



HAL
open science

Vectorisation d'une molécule proapoptotique TRAIL par des nanotubes de carbone (NTCs) : cible thérapeutique prometteuse du cancer

Albatoul Zakaria

► To cite this version:

Albatoul Zakaria. Vectorisation d'une molécule proapoptotique TRAIL par des nanotubes de carbone (NTCs) : cible thérapeutique prometteuse du cancer. Pharmacie galénique. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3018 . tel-01665218

HAL Id: tel-01665218

<https://theses.hal.science/tel-01665218>

Submitted on 15 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE FRANCHE COMTÉ

UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques

ÉCOLE DOCTORALE «ENVIRONNEMENTS-SANTÉ»

Année 2015

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Vectorisation d'une molécule proapoptotique TRAIL par des nanotubes de carbone (NTCs): cible thérapeutique prometteuse du cancer

Présentée par

Albatoul ZAKARIA

Directeur de thèse : Dr. Guillaume HERLEM

Membres du jury

Mme Souad AMMAR (Professeur),	Université de Paris Diderot	Rapporteur
Mme Chantal PICHON (Professeur),	Université d'Orléans	Rapporteur
M. Jean-Olivier DURAND (Directeur de recherche),	Université de Montpellier II	Examineur
M. Olivier MICHEAU (Directeur de recherche),	Université de Bourgogne	Examineur
M. Tijani GHARBI (Professeur),	Université de Franche-Comté	Examineur

Vectorisation d'une molécule proapoptotique TRAIL par des nanotubes de carbone (NTCs): cible thérapeutique prometteuse du cancer.

RESUMÉ: TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) est une protéine anti-tumorale capable de se lier spécifiquement aux récepteurs agonistes de mort (TRAIL-R1 ou DR4 et TRAIL-R2 ou DR5) des cellules cancéreuses et d'induire leur apoptose sans être toxique pour les cellules saines. Grâce à leurs propriétés exceptionnelles, notamment leur biocompatibilité, les nanotubes de carbone et surtout les SWCNTSs sont utilisés dans un large éventail d'applications et sont considérés très prometteurs pour révolutionner la thérapie anticancéreuse en nanomédecine. Les SWCNTSs sont connus par leur diffusion rapide dans un milieu aqueux tel que le sang, ouvrant la voie de développement de nouveaux nanovecteurs de médicaments. L'objectif principal de nos travaux de thèse a consisté à fonctionnaliser TRAIL sur des SWCNTSs pour mimer sa fonction membranaire en induisant une forte agrégation des récepteurs et déclencher l'apoptose (*mort cellulaire programmée*).

Dans un premier temps, la fonctionnalisation des SWCNTSs avec TRAIL a été réalisée : adsorption non covalente des molécules de PSE sur les nanotubes *via* π - π stacking, puis greffage du TRAIL au complexe SWCNTS-PSE pour former le nanovecteur (nommé NPT). Ensuite, nous avons caractérisé notre NPT par différentes méthodes (RAMAN, XPS, IR, MET, STEM...) afin d'estimer le taux de greffage du TRAIL sur le NPT, qui était environ de 80%.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les paramètres thermodynamiques tels que le pH et la température du NPT en comparaison avec TRAIL seul par une approche chromatographique d'affinité (CHLP). Les résultats obtenus montrent une meilleure affinité du nanovecteur par rapport à TRAIL seul avec le récepteur TRAIL-R2 immobilisé sur la colonne chromatographique. En outre, des calculs de docking ont montré également que le complexe NPT couplé aux homotrimères de TRAIL est le plus stable une fois docké au récepteur TRAIL-R2. Ainsi, nous avons montré que les interactions de type Van der Waals et des liaisons hydrogène régissent l'association NPT-DR5 pour un pH supérieur à 7,4 (comme pour TRAIL seul). Enfin, notre nanovecteur s'est avéré plus efficace que TRAIL seul dans des différents tests menés *in vitro* sur des plusieurs types de lignées tumorales. Le NPT a permis une augmentation du potentiel pro-apoptotique de TRAIL avec un gain de fonction apoptotique estimé entre 10-20 fois par rapport à celui obtenu avec TRAIL seul.

Dans ce travail, nous fournissons ainsi une preuve de concept que les nanovecteurs basés sur la fonctionnalisation du TRAIL avec les SWCNTSs peuvent être utiles pour les futurs traitements anti-cancéreux en nanomédecine.

MOTS-CLÉS: nanotubes de carbone, acide pyrenebutanoïque N-hydroxysuccinimide ester (PSE), nanovecteur, TRAIL, récepteur de mort, nanomédecine, thérapie anticancéreuse, chromatographie d'affinité (CHLP), docking.

Vectorization of a proapoptotic molecule TRAIL by carbon nanotubes (CNTs): promising therapeutic target for cancer.

ABSTRACT: TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) is a protein involved in immune anti-tumor surveillance. This cytokine is able to bound specifically to agonist death receptors (TRAIL-R1 or DR4 and TRAIL-R2 or DR5) of cancer cells, inducing apoptosis without being toxic to healthy cells. Thanks to their exceptional properties such as biocompatibility, carbon nanotubes and especially single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) are used in a wide range of applications and are considered to be very promising for cancer therapy in nanomedicine. The SWCNTs are known to rapidly diffuse in aqueous media such as blood, opening the way for the development of new drug nanovectors or nanocarriers. The main purpose of this work is to functionalize SWCNTs with TRAIL to mimic the membrane function of TRAIL by inducing a strong aggregation of death receptors and then induce apoptosis.

First of all, the choice of SWCNTs functionalization with TRAIL was considered the first key in this thesis: non-covalent adsorption of PSE molecules on the nanotubes *via* π - π stacking and TRAIL was next attached to a SWCNTs-PSE to form our nanovector, called NPT. Then, the NPT was characterized by various methods (Raman, XPS, IR, TEM, STEM,...) in order to estimate the grafted degree of TRAIL on the NPT surface (about 80%). Secondly, we investigated the effects of the thermodynamic parameters such as pH and temperature on NPT *versus* TRAIL by a chromatographic approach (HPLC). The results showed a better affinity for NPT compared to TRAIL alone with the TRAIL-R2 receptor immobilized on the chromatographic column. In addition, docking calculations have also shown that the NPT complex coupled to TRAIL homotrimers is the most stable when docked to DR5. Thus, we have demonstrated that Van der Waals interactions and hydrogen bonds govern the NPT-DR5 association for pH > 7.4 (as for TRAIL). Finally, our TRAIL-based SWCNTs nanovectors (NPT) proved to be more efficient than TRAIL alone towards death receptors in triggering cancer cell killing *in vitro*. These NPTs increased the pro-apoptotic potential of TRAIL by nearly 10 to 20-fold in different Human tumor cell lines tested including colorectal, non-small cell lung cancer, or hepatocarcinomas.

We provide in this work a proof of concept that nanovectors based on SWCNTs functionalization with TRAIL may be useful for future cancer treatments in nanomedicine.

KEYWORDS: carbon nanotubes, pyrenebutanoic acid N-hydroxysuccinimid ester (PSE), nanovector, TRAIL, death receptor, nanomedicine, cancer therapy, affinity chromatography (HPLC), docking.

Et je vous dis que la vie est réellement obscure sauf là où il y a élan

Et tout élan est aveugle sauf là où il y a savoir

Et tout savoir est vain sauf là où il y a travail

Et tout travail est vide sauf là où il y a amour

Et qu'est-ce travailler avec amour ?

C'est mettre en toute chose que vous façonnez un souffle de votre esprit

Gibran khalil Gibran

Remerciements

Les principaux travaux de cette thèse ont été effectués au sein de l'équipe de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique (EA4662) à l'Université de Franche-Comté et en collaboration avec l'unité INSERM-UMR866 (Lipides Nutrition Cancer) à l'Université de Bourgogne.

Je tiens tout d'abord à adresser ma profonde reconnaissance à chacun des membres du jury pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, et qui me font l'honneur de juger mon travail :

Mme Souad AMMAR, Professeur au Laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), à l'Université de Paris Diderot.

Mme Chantal PICHON, Professeur au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM)-CNRS UPR 4301, à l'Université d'Orléans.

M. Jean-Olivier DURAND, Directeur de recherche à l'institut Charles Gerhardt Montpellier, à l'Université de Montpellier 2.

M. Olivier MICHEAU, Directeur de recherche au sein de l'unité INSERM-UMR866 (Lipides Nutrition Cancer), à l'Université de Bourgogne.

M. Tijani GHARBI, Professeur et directeur de l'équipe de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique (EA4662), à l'Université de Franche-Comté.

M. Guillaume HERLEM, Directeur de thèse au sein de l'équipe de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique (EA4662), à l'Université de Franche-Comté.

Je remercie le Professeur Souad AMMAR qui après avoir suivi mon travail tout au long de ma thèse malgré son emploi du temps très chargé, participe aujourd'hui à ma soutenance en tant que rapporteur.

Je tiens ensuite à remercier le Professeur Tijani GHARBI. Tout d'abord merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique (EA4662) pour y effectuer ma thèse dans de bonnes conditions techniques et pratiques. Et merci également de participer à l'aboutissement de mon travail de thèse en tant qu'examinateur lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Guillaume HERLEM. Merci pour ta disponibilité, ton enthousiasme et tes nombreux conseils. Je te suis très reconnaissante de m'avoir accordée ta confiance, de m'avoir toujours laissée prendre des initiatives et de m'avoir laissée une certaine part d'indépendance dans mon travail. Je ne peux

oublier ta gentillesse et ton aide rapide avec Monsieur GHARBI pour résoudre le moindre problème et soucis pendant mes déplacements.

Je présente aussi mes remerciements chaleureux à Fabien PICAUD, Maître de conférences au sein de l'équipe de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique (EA4662). Je voudrais par ailleurs lui exprimer ma gratitude pour la rigueur scientifique dont il a toujours fait preuve ainsi que pour ses qualités humaines et son soutien permanent. Un grand merci Fabien pour ta bonté !!!

Je remercie infiniment Monsieur le Professeur Eric DELABROUSSE, Chef de Service Radiologie Viscérale à l'Hôpital Jean Minjot de Besançon pour son temps consacré au début de ma thèse pour nous écouter. Je n'oublie pas les réunions qui ont abouti à cibler le ligand TRAIL. Le mot "MERCI" ne suffit pas !!! Grâce à vous, le choix du TRAIL a été mis en place !!!

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la confiance et la générosité de Monsieur Olivier MICHEAU (INSERM-UMR866), qui m'a permis de découvrir l'univers de la recherche et de confirmer mon intérêt pour la science. Je te remercie Olivier pour ta bienveillance, ton aide que tu m'as apportée avec dévouement et disponibilité permanente, pour ton soutien moral, pour tes conseils judicieux et tes remarques pertinentes que ce soit au niveau technique ou au niveau logistique et humain. C'est grâce à toi que j'ai pu apprendre et maîtriser les techniques de la biologie cellulaire et moléculaire.

Je présente mes remerciements les plus sincères au département de Chimie analytique de l'Université de Franche-Comté, et en particulier à Monsieur le Professeur Yves GUILLAUME de m'avoir accueillie au sein de son équipe et offert l'opportunité d'apprendre la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). C'est aussi grâce à la contribution et aux conseils de Marc PUDLO, Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Besançon que j'ai pu améliorer mes connaissances en infra-rouge et fonctionnaliser mes nanotubes de carbone.

Je présente aussi mes remerciements aux membres du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS, et plus particulièrement aux messieurs Rémi CHASSAGNON et Lucien SAVIOT, sans oublier de remercier également Madame Jeannine LHERMINIER et Monsieur Joël MICHEL qui appartiennent au Centre de Microscopie INRA/UB, UMR 1347 Agroécologie, AgroSup/INRA/UB, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes-ERL CNRS 6300. Je tiens à remercier aussi Monsieur Xavier DEVAUX, chercheur au sein d'institut Jean Lamour, UMR 7198 CNRS - Université de Lorraine, et Monsieur Eric DUVERGER d'institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174. Je vous remercie tous pour avoir assuré le bon déroulement des expériences, et de m'aider à apprendre les

techniques de caractérisation par spectroscopie RAMAN, Microscopie électronique à transmission (TEM), microscopie à haute résolution STEM et XPS.

Je remercie aussi l'établissement français du sang (EFS) Bourgogne-Franche-Comté pour leur aide et les cellules tumorales qu'ils nous ont été offertes.

Mes remerciements s'adressent également à l'association AZM & SAADE à Tripoli-Liban, à l'Université de Franche-Comté (bourse de mobilité), pour leurs soutiens financiers. Egalement, merci aux gens avec lesquels j'ai eu l'occasion d'enseigner ensemble : Ahmed HAMMAD (Faculté des Lettres), Jérôme HUSSON (Faculté des Sciences), Cathy Meunier (IUT Belfort-Montbéliard). Et Grand merci à Lydie pour les moments passés ensemble et ton soutien pendant les Tps (Faculté de Pharmacie).

Je voudrais par ailleurs remercier toute l'équipe de Nanomédecine (EA 4662), et en particulier mes colocataires de bureau durant mon séjour à Besançon : Imen, Walla, Khaoula (la blida comme on dit à la tunisienne), Alia, Chafia, Taleb, Ahmad, Bassel, Mohammed, Nadia ... Mes amis en Pharma : Céline, Mohammed, Anne-Marie (notre secrétaire du labo avec son grand cœur : elle n'a jamais arrêté de préparer mes bons de commande pendant les quatre ans de ma thèse), Lydie (gros bisous pour ton soutien pendant les expériences), Mona (ma chère amie). Mon amie Nour qui a été plus qu'une sœur surtout qu'on a partagé toute la vie étudiante ensemble à la résidence et à la faculté. Je ne peux pas oublier Claire qui m'a appris un peu la cuisine de Lorraine. Nous avons passé des moments agréables ensemble avec Sophie (le trinôme bisontin) pendant les trajets Nancy-Besançon. Mes amis et collègues dijonnais à l'unité INSERM (OM Team) : Aymeric, Thibault, Florent, Hazem, Sophiane ... Je ne peux pas oublier vos soutiens et aides techniques et les pause-café ensemble. Carla et son petit Vincent, Gwendoline et les trajets Besançon-Dijon. Votre soutien et la bonne ambiance permanente ont fait de cette thèse une période plus qu'agréable. Que de bons souvenirs!

Encore et sans fin, gros bisous à Chadi & Majida (abou bader & foziyyé), Raymond & Gladys, Maurice, Nahdi & Rita, Jaafar & Wafaa, Tahseen, Fatima, Ghinwa : vous étiez ma famille pendant mes années à Besançon. Merci à tous ce qui ont contribué avec grand cœur au bon déroulement des préparations pour la soutenance surtout Madame Martine GAUTHERON (la secrétaire d'école doctorale Homme-Environnement-Santé), Moustafa, Hussein & Fatima, les deux Ali (:p), Diala, Dani, Elie ...

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à ma famille et spécialement à mes parents, mes frères, mes tantes (Nada et Mariam), mon oncle Moustafa et mes cousins pour

leur soutien moral, leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve. Sans eux, je n'aurais pas été ce que je suis aujourd'hui. Ils ont toujours su m'inculquer la valeur de la science, m'ont soutenue inconditionnellement pendant toute ma vie. Que ce travail leur soit dédié avec toute mon affection. Ma profonde gratitude s'adresse aussi à mon frère Abed qui n'a pas arrêté de me joindre que ce soit à Beyrouth ou à Besançon, pour ses encouragements, son écoute, ses plats faits avec amour et tout le reste... Bon courage habibi à toi et à ta fiancée Hiba pour vos thèses.

Une pensée spéciale pour ma grand-mère et ma tante Dounia, deux personnalités exceptionnelles qui ont marqué ma vie, et dont je n'ai pas pu assister à leur enterrement.

Enfin, et pour clôturer ces remerciements, comment remercier du fond du cœur la personne la plus importante à ma vie ? Je suis bien incapable d'exprimer ici la force de ce que je ressens pour toi. Je ne peux que remercier le destin qui a bouleversé notre amitié à un amour infini. Merci MAHMOUD pour ton courage et ton soutien sans faille pour que mon manuscrit et ma soutenance soient au top. Tu es formidable !!!

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I : NANOPARTICULES DE VECTORISATION, NANOTUBES DE CARBONE ET TRAIL	26
Les nanoparticules – Partie 1	30
I.1 LES NANOPARTICULES : DEFINITION, PROPRIETES ET APPLICATIONS	30
<i>I.1.1 Définition et propriétés</i>	<i>30</i>
<i>I.1.2 Applications.....</i>	<i>31</i>
I.2 LES NANOPARTICULES : LES DIFFERENTS TYPES ET LES TROIS GENERATIONS DISTINCTES.....	32
<i>I.2.1 Les différents types de nanoparticules</i>	<i>33</i>
<i>I.2.2 Les trois générations de nanoparticules.....</i>	<i>35</i>
<i>I.2.3 Les nanoparticules multifonctionnelles</i>	<i>37</i>
<i>I.2.4 Conclusion</i>	<i>38</i>
Les nanotubes de carbone - Partie 2.....	39
I.3 LES NANOTUBES DE CARBONE (NTCS).....	39
<i>I.3.1 Description et structure.....</i>	<i>39</i>
I.3.1.1 Les différentes formes allotropiques du carbone	39
I.3.1.2 La synthèse des nanotubes de carbone	42
I.3.1.3 Purification des nanotubes de carbone	45
<i>I.3.2 Propriétés technologiques des NTCs.....</i>	<i>45</i>
I.3.2.1 Propriétés mécaniques	46
I.3.2.2 Propriétés électriques et optiques	46
I.3.2.3 Propriétés chimiques	47
<i>I.3.3 Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.....</i>	<i>47</i>
<i>I.3.4 Applications des NTCs.....</i>	<i>48</i>
I.3.4.1 Applications industrielles	48
I.3.4.2 Applications médicales.....	48
<i>I.3.5 Toxicité des NTCs</i>	<i>50</i>
I.3.5.1 Exposition aux nanotubes de carbone NTCs	50
I.3.5.2 Les éléments physiques influençant la toxicité des NTCs.....	51
I.3.5.3 La toxicité des NTCs : recherche actuelle <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	52
<i>I.3.6 Internalisation cellulaire</i>	<i>53</i>
I.3.6.1 Internalisation cellulaire des nanoparticules NP.....	53
I.3.6.2 Internalisation cellulaire des nanotubes de carbone (NTCs)	54
<i>I.3.7 Conclusion sur les nanotubes.....</i>	<i>56</i>

.....	57
I.4 QUELQUES DEFINITIONS : TRAIL ET APOPTOSE	57
<i>I.4.1 Apoptose (ou mort cellulaire programmée) dans le cancer</i>	<i>57</i>
<i>I.4.2 TRAIL et ses récepteurs : structure, expression, et fonctions</i>	<i>59</i>
I.4.2.1 Les récepteurs agonistes et antagonistes de TRAIL	60
I.4.2.2 Expression de TRAIL et ses récepteurs	62
I.4.2.3 Rôles physiologiques de TRAIL	64
<i>I.4.3 La signalisation apoptotique induite par TRAIL</i>	<i>65</i>
<i>I.4.4 Conclusion sur les thérapies actuelles du TRAIL : nécessité de restauration et d'optimisation de la sensibilité à TRAIL</i>	<i>68</i>
I.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
CHAPITRE II : FONCTIONNALISATION ET CARACTERISATION DES SWCNTS AVEC LE PSE ET TRAIL	83
II.1 LA FONCTIONNALISATION DES NTCs.....	86
<i>II.1.1 Défauts des NTCs</i>	<i>86</i>
<i>II.1.2 Méthodes de fonctionnalisation des SWCNTs.....</i>	<i>88</i>
II.1.2.1 La fonctionnalisation covalente des SWCNTs.....	88
II.1.2.2 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs	89
II.1.2.3 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs par des pyrènes.....	91
II.2 LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES NTCs FONCTIONNALISES.....	92
<i>II.2.1 Microscopie électronique</i>	<i>92</i>
<i>II.2.2 Infra-rouge</i>	<i>94</i>
<i>II.2.3 RAMAN</i>	<i>94</i>
<i>II.2.4 XPS</i>	<i>96</i>
II.3 RESULTATS - PARTIE1	96
<i>II.3.1 Résultats obtenus</i>	<i>96</i>
<i>II.3.2 Les résultats expérimentaux : Imagerie STEM.....</i>	<i>98</i>
<i>II.3.3 Les résultats expérimentaux : Analyses Spectroscopiques</i>	<i>100</i>
II.3.3.1 Spectroscopie RAMAN	100
II.3.3.2 Spectroscopie Infra-rouge (IR).....	102
II.3.3.3 Spectroscopie XPS	104
<i>II.3.4 Les résultats théoriques</i>	<i>105</i>
<i>II.3.5 Discussion des résultats expérimentaux et théoriques</i>	<i>108</i>
II.4 RESULTATS - PARTIE2	111
<i>II.4.1 Description du nanovecteur NPT</i>	<i>111</i>
<i>II.4.2 Caractérisation du nanovecteur NPT</i>	<i>112</i>
II.5 CONCLUSION	114
II.6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116

CHAPITRE III ETUDE THERMODYNAMIQUE DU NANOVECTEUR NPT ET DU TRAIL PAR UNE APPROCHE CHROMATOGRAPHIQUE D’AFFINITE (CHLP) ET PAR DOCKING	121
III.1 INTRODUCTION	124
III.1.1 Docking	124
III.1.2 Quelques notions sur la modélisation	126
III.1.2.1 Champ de force.....	126
III.1.2.2 Optimisation structurale.....	127
III.1.2.3 Solvant.....	127
III.1.2.4 Docking	127
III.1.3 Chromatographie liquide à haute performance (CHLP)	128
III.1.3.1 Définitions et avantages.....	128
III.1.3.2 Principe.....	129
III.1.3.3 Mesure des grandeurs chromatographiques	130
III.1.4 Les différents types d’interactions entre un ligand et un récepteur	133
III.1.4.1 Interactions hydrophobes (primaires)	133
III.1.4.2 Liaisons hydrogène (secondaires).....	134
III.1.4.3 Interactions de Van der Waals (secondaires).....	134
III.2 RESULTATS DU DOCKING.....	135
III.2.1 Effet du zinc sur le docking du TRAIL	136
III.2.2 Résidus d’interactions TRAIL-DR5 par docking.....	139
III.3 RESULTATS EXPERIMENTAUX DES INTERACTIONS TRAIL-DR5 PAR CHLP	140
III.3.1 Temps de rétention des différentes espèces injectées	140
III.3.2 Courbes de Van’t Hoff.....	141
III.3.3 Paramètres thermodynamiques ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$.....	142
III.3.4 Compensation enthalpie-entropie (CEE).....	143
III.3.5 Effet du pH sur la fixation de TRAIL sur DR5	145
III.4 DISCUSSION-CONCLUSION	146
III.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
CHAPITRE IV ACTIVITE APOPTOTIQUE DU NANOVECTEUR NPT (TESTS <i>IN VITRO</i> SUR DES MODELES CELLULAIRES)	155
IV.1 INTRODUCTION	158
IV.2 RESULTATS – PARTIE 1	159
IV.2.1 Différents modèles cellulaires étudiés	159
IV.2.2 Analyse des récepteurs par cytométrie en flux	159
IV.2.3 Différents tests <i>in vitro</i> : comparaison entre les activités de NPT et TRAIL.....	161
IV.2.3.1 Test de viabilité cellulaire.....	161
IV.2.3.2 Test de Hoechst staining.....	164
IV.2.3.3 Test de marquage à l’Annexine V	166

IV.2.3.4 Analyse des éléments du complexe DISC	170
IV.3 RESULTATS – PARTIE 2	172
<i>IV.3.1 Modèles cellulaires étudiés</i>	<i>172</i>
<i>IV.3.2 Analyse des récepteurs</i>	<i>172</i>
<i>IV.3.3 Différentes expériences in vitro sur les lignées déficientes en récepteurs de TRAIL : effets des récepteurs agonistes</i>	<i>173</i>
IV.4 RESULTATS – PARTIE 3	177
<i>IV.4.1 Mécanismes de régulation de la mort induite par TRAIL</i>	<i>177</i>
<i>IV.4.2 N-glycosylation des récepteurs.....</i>	<i>178</i>
IV.4.2.1 Résultats obtenus sur les lignées d'ostéosarcome humain.....	178
IV.4.2.2 Résultats obtenus sur les lignées de mélanome murin.....	180
IV.5 DISCUSSION-CONCLUSION	183
IV.6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	190
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	199
A1 Protocoles expérimentaux et théoriques du chapitre II	203
A1.1 Produits chimiques et matériaux.....	205
A1.2 Procédures expérimentales	205
A1.2.1 Processus de coupure des SWCNTs	205
A1.2.2 Préparation du PSE-SWCNT	205
A1.2.3 Préparation du nanovecteur Pegylé aboutissant à NPT.....	206
A1.2.4 Estimation du taux de TRAIL sur NPT.....	207
A1.3 Structures et caractérisations	208
A1.3.1 Microscopie électronique	208
A1.3.1.1 Microscopie électronique (STEM).....	208
A1.3.1.2 Microscopie électronique (TEM)	208
A1.3.2 Caractérisations spectroscopiques.....	209
A1.4 Simulation moléculaire.....	210
A1.4.1 Relaxation de la géométrie.....	210
A1.4.2 Calcul PDOS du SWCNT-PSE.....	211
A1.5 Références Bibliographiques	212
A2 Protocoles expérimentaux du chapitre III	215
A2.1 Produits chimiques et matériels	217
A2.2 Equipements.....	217
A2.3 Fixation du récepteur DR5 sur la colonne chromatographique.....	218
A2.4 Conditions expérimentales.....	219

A2.5 Détermination des données chromatographiques	220
A2.6 Analyse statistique	221
A2.7 Les simulations théoriques par Docking	221
A2.8 Références Bibliographiques	223
A3 Protocoles expérimentaux du chapitre IV	225
A3.1 Protocole de production du TRAIL	227
A3.2 Produits chimiques et anticorps	228
A3.3 Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	229
A3.4 Mesure de la viabilité cellulaire.....	229
A3.5 Marquage d'apoptose à l'Annexine V	230
A3.6 Marquage d'apoptose par Hoechst	230
A3.7 Immuno-précipitations.....	231
A3.8 Western-blotting	231
A3.9 Analyse statistique	232
A3.10 Références Bibliographiques	233

INTRODUCTION GENERALE

Les nanotechnologies représentent l'ensemble des techniques et procédés permettant de manipuler la matière à une échelle de quelques nanomètres. Actuellement, l'utilisation des nanotechnologies en médecine, ouvrant la voie à un champ d'applications prometteuses, la nanomédecine, permet d'apporter de nouveaux espoirs dans le domaine de la santé. Discipline émergente, la nanomédecine se crée peu à peu une place de tout premier ordre en ouvrant des perspectives sérieuses sur des enjeux clefs : optimiser la délivrance du médicament, en permettant le ciblage spécifique des tissus ou des cellules, mais aussi mieux contrôler la vitesse de libération du médicament dans l'organisme, et offrir des voies de détection précoce et précise des maladies. Ces applications, nommées théranostiques sont possibles grâce à l'exploitation des propriétés physiques, chimiques et biologiques des matériaux à l'échelle nanométrique. Le défi actuel de cette approche révolutionnaire, qui utilise les nanoparticules, consiste à maîtriser les enjeux scientifiques des matériaux possédant des propriétés nouvelles, et par conséquent de chercher des outils compatibles au niveau cellulaire permettant ainsi leur interaction à cette échelle ultime.

Ces dernières années, de grands progrès ont été réalisés tant en matière de traitement que de détection et de prévention du cancer. Pourtant, le cancer reste la première cause de mortalité en France (et dans le monde) devant les maladies cardiovasculaires et les accidents corporels. Les thérapies anti-cancéreuses actuelles sont basées sur l'exérèse chirurgicale, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie. Malgré des progrès significatifs, ces thérapies restent relativement inefficaces contre les stades avancés métastatiques ou contre certains types de cancers. En outre, les traitements actuels manifestent des effets secondaires rendant ces traitements invalides chez les patients. D'où vient la nécessité de trouver de nouveaux traitements efficaces et moins contraignants au niveau thérapeutique. Les explorations dans ce champ sont multiples et se concentrent sur la découverte de molécules de restauration des mécanismes détériorés pendant les processus cancéreux (mort cellulaire par apoptose par exemple). La cytokine TRAIL « *TNF-Related Apoptosis inducing ligand* » fait partie de ces molécules. TRAIL représente une molécule anti-cancéreuse prometteuse due à leur capacité sélective d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales sans impact sur les cellules saines adjacentes.

La nanomédecine est, quant à elle, une voie exploratoire visant à utiliser des nano-objets capables de franchir différentes barrières biologiques (la matrice extracellulaire, les membranes, les organelles, les voies de signalisation cellulaires...) et ainsi atteindre une cible précise. Théoriquement, il semble donc possible d'utiliser un nanovecteur capable de délivrer

son principe actif chargé vers la zone ciblée, c'est-à-dire la tumeur ou même vers des cellules spécifiques de la tumeur. Ainsi, les effets secondaires sont énormément réduits grâce à la délivrance ciblée du principe actif, qui est cependant libéré en dose infime. Malgré la simplicité du principe, le développement biotechnologique de ces nanovecteurs reste un défi majeur.

Actuellement, de nombreux nanovecteurs doués de propriétés originales existent, tels que les micelles, les nanotubes de carbone, les dendrimères, etc... Ils se distinguent les uns des autres par leurs différentes propriétés : les nanovecteurs **de première génération** permettent un ciblage passif des nanoparticules, qui s'accumulent préférentiellement dans les tissus tumoraux et sont rapidement éliminés par un mécanisme de clairance sanguine (élimination au niveau sanguin de ces corps étrangers par des phénomènes impliquant des cellules du foie). Les nanovecteurs **de deuxième génération** (ou furtifs) sont des nanoparticules recouvertes de polyéthylène glycol (particules PEGylées). Cela permet de ralentir leur élimination et de prolonger leur permanence sanguine [Morillea *et al.*; 2010]. En outre, les nanovecteurs **de troisième génération** sont porteurs de PEG et d'une autre molécule particulière de ciblage (ligand d'un récepteur par exemple). Grâce à cette molécule de ciblage, ce type de nanovecteurs (le plus répandu et utilisé à l'ère actuelle), semble capable de cibler spécifiquement la cellule cancéreuse.

En raison de leurs propriétés exceptionnelles, les nanotubes de carbone sont utilisés dans une large gamme d'applications tant en physico-chimiques que dans le monde médical. En effet, leur résistance mécanique est élevée, ils possèdent une très grande flexibilité et présentent une forte hydrophobicité. En particulier les nanotubes de carbone monofeuillets « Single-Walled Carbon nanotubes (SWCNT) » sont connus par leur biocompatibilité et leur diffusion rapide dans un milieu aqueux tel que le sang, ouvrant la voie de développement à de nouveaux types de médicaments (en les utilisant comme nanovecteurs ou nanocarriers).

La majorité des études précliniques ont prouvé l'efficacité anti-cancéreuse de TRAIL. En outre, cette protéine est bien tolérée par l'organisme après injection intraveineuse chez l'Homme. En revanche, l'utilisation du TRAIL en monothérapie pendant les essais cliniques, n'a pas montré une satisfaction anti-tumorale suffisante pour l'utiliser prochainement en clinique. Par conséquent, une optimisation du TRAIL pour une future application clinique peut donc s'avérer judicieuse et c'est ce que nous proposons à travers ce travail de thèse en élaborant un nanovecteur combinant TRAIL et SWCNT.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'un nanovecteur formé de SWCNTs fonctionnalisés avec du TRAIL, nommé NPT par la suite. La caractérisation de notre nanovecteur a été élaborée par différentes méthodes. Une meilleure technique de dispersion des nanotubes a été primordiale avant de les vectoriser au niveau des lignées cellulaires tumorales. Cette dernière étape du projet était nécessaire afin de comparer l'activité biologique du NPT *vis-à-vis* du TRAIL seul, suite à l'activation des récepteurs de mort (Death receptors, DR4 et DR5). Normalement, il existe une compétition entre les récepteurs de mort (DR4 et DR5) et les récepteurs antagonistes (DcR1 et DcR2) pour TRAIL [Shirley *et al.*; 2011]. Il était donc primordial de comprendre les phénomènes se déroulant à la surface cellulaire (voie des récepteurs) afin de conclure à une meilleure activité apoptotique apportée par notre nanovecteur.

Ce manuscrit de thèse s'articule en quatre chapitres, et les principaux buts de travail sont résumés dans le (Schéma-1) :

Le **premier chapitre** traite l'état de l'art bibliographique sur les nanoparticules de vectorisation utilisées en nanomédecine, les propriétés des nanotubes de carbone et le choix de ce type de vecteurs. Ainsi, nous définissons TRAIL et ses utilisations dans les thérapies anti-cancéreuses actuelles. Nous nous intéresserons ensuite dans le **second chapitre** au choix de notre fonctionnalisation des SWCNTs avec TRAIL et aux différentes méthodes et techniques de caractérisation aboutissant au calcul du taux de chargement du TRAIL sur nos nanovecteurs.

Nous présentons dans le **troisième chapitre** une étude couplant les simulations *via* le Docking moléculaire et la chromatographie d'affinité pour mieux connaître les interactions entre TRAIL d'une part, le nanovecteur NPT, d'une autre part, avec le récepteur DR5. L'approche par chromatographie liquide à haute performance (CHLP) permet de comparer les paramètres thermodynamiques du nanovecteur NPT, tels que le pH et la température *versus* ceux du TRAIL seul. A cet effet, le récepteur DR5 a été immobilisé par l'intermédiaire de ses groupes amino sur un support chromatographique en utilisant une technique "*in situ*" d'immobilisation. Cette partie permettra une meilleure corrélation entre les résultats chromatographiques expérimentaux et ceux théoriques afin d'avoir une image complète de l'interface NPT/DR5.

Enfin, nous ciblerons l'activité biologique de notre NPT dans le *quatrième chapitre*. Ce chapitre est consacré aux différentes techniques utilisées afin de comparer, d'une part, l'apoptose induite *in vitro* par NPT *versus* TRAIL sur différents modèles de lignées cellulaires tumorales. Il s'agit d'estimer d'autre part le taux de gain de fonction apoptotique obtenu par NPT, de cibler la voie des récepteurs de mort pour étudier l'implication des récepteurs et leur régulation dans le processus apoptotique.

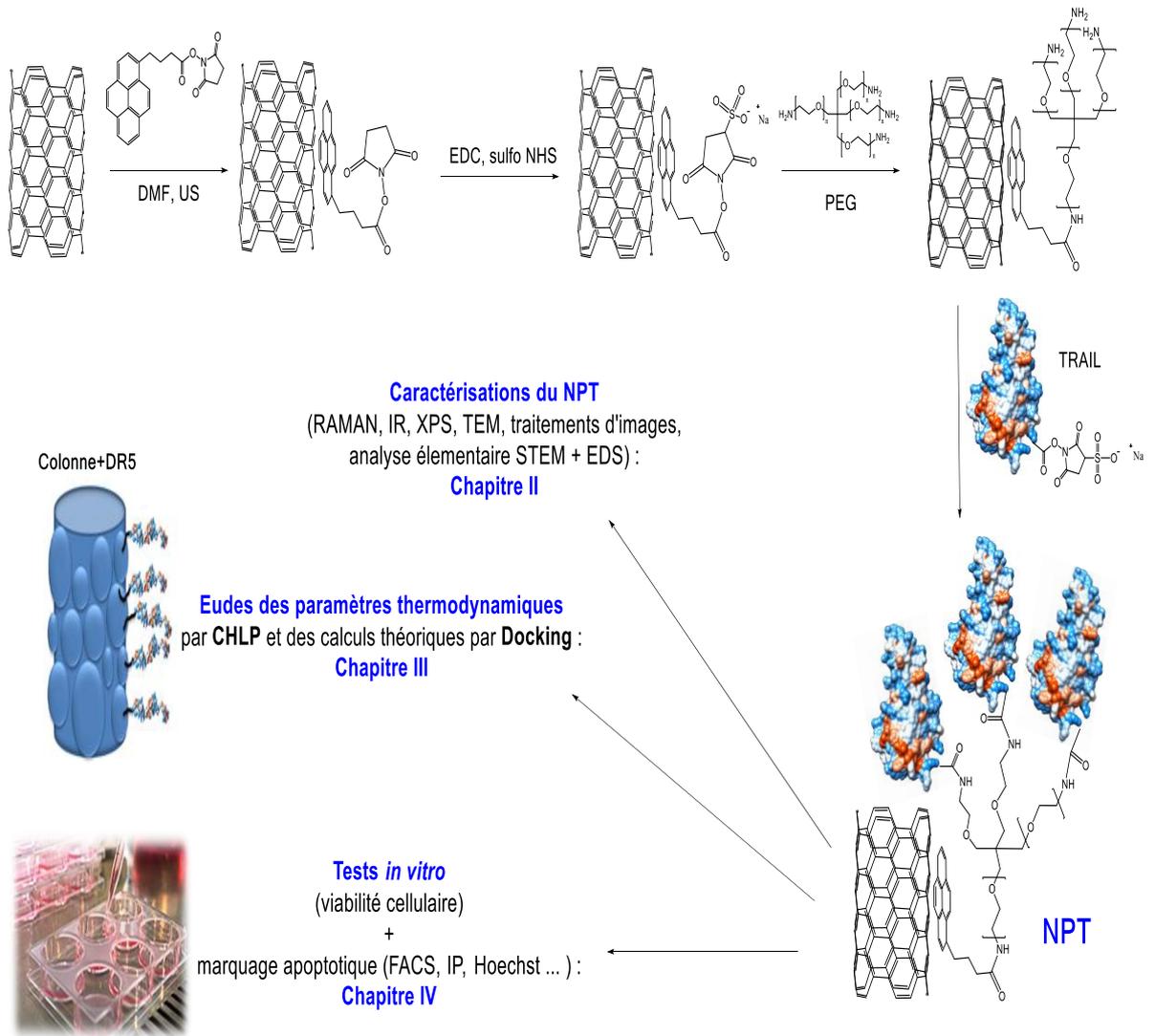


Schéma - 1 Représentation schématique des principaux objectifs du travail dans ce manuscrit de thèse.

Références bibliographiques :

- [Morillea *et al.*; 2010] Morillea, M.; Montierb, T.; Legrasc, P.; Carmoyb, N.; Brodind, P.; Pitarde, B.; Benoîta, J. P.; Passirania, C., Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* **2010**, *31* (2), 321-329.
- [Shirley *et al.*; 2011] Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O., Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **2011**, *6* (3), 311-323.

Chapitre I : Nanoparticules de vectorisation, nanotubes de carbone et TRAIL

Table des matières

Les nanoparticules – Partie 1	30
I.1 LES NANOPARTICULES : DEFINITION, PROPRIETES ET APPLICATIONS	30
<i>I.1.1 Définition et propriétés</i>	<i>30</i>
<i>I.1.2 Applications.....</i>	<i>31</i>
I.2 LES NANOPARTICULES : LES DIFFERENTS TYPES ET LES TROIS GENERATIONS	
DISTINCTES	32
<i>I.2.1 Les différents types de nanoparticules</i>	<i>33</i>
<i>I.2.2 Les trois générations de nanoparticules.....</i>	<i>35</i>
<i>I.2.3 Les nanoparticules multifonctionnelles</i>	<i>37</i>
<i>I.2.4 Conclusion</i>	<i>38</i>
Les nanotubes de carbone - Partie 2.....	39
I.3 LES NANOTUBES DE CARBONE (NTCs).....	39
<i>I.3.1 Description et structure.....</i>	<i>39</i>
I.3.1.1 Les différentes formes allotropiques du carbone.....	39
I.3.1.2 La synthèse des nanotubes de carbone	42
I.3.1.3 Purification des nanotubes de carbone	45
<i>I.3.2 Propriétés technologiques des NTCs</i>	<i>45</i>
I.3.2.1 Propriétés mécaniques	46
I.3.2.2 Propriétés électriques et optiques	46
I.3.2.3 Propriétés chimiques	47
<i>I.3.3 Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.....</i>	<i>47</i>
<i>I.3.4 Applications des NTCs</i>	<i>48</i>
I.3.4.1 Applications industrielles	48
I.3.4.2 Applications médicales.....	48
<i>I.3.5 Toxicité des NTCs</i>	<i>50</i>
I.3.5.1 Exposition aux nanotubes de carbone NTCs	50
I.3.5.2 Les éléments physiques influençant la toxicité des NTCs.....	51
I.3.5.3 La toxicité des NTCs : recherche actuelle <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	52
<i>I.3.6 Internalisation cellulaire</i>	<i>53</i>
I.3.6.1 Internalisation cellulaire des nanoparticules NP.....	53
I.3.6.2 Internalisation cellulaire des nanotubes de carbone (NTCs)	54
<i>I.3.7 Conclusion sur les nanotubes.....</i>	<i>56</i>
TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) et thérapie anti-cancéreuse - Partie 3	57
I.4 QUELQUES DEFINITIONS : TRAIL ET APOPTOSE	57
<i>I.4.1 Apoptose (ou mort cellulaire programmée) dans le cancer</i>	<i>57</i>
<i>I.4.2 TRAIL et ses récepteurs : structure, expression, et fonctions</i>	<i>59</i>

Chapitre I : Nanovecteurs, nanotubes de carbone et TRAIL

I.4.2.1 Les récepteurs agonistes et antagonistes de TRAIL	60
I.4.2.2 Expression de TRAIL et ses récepteurs	62
I.4.2.3 Rôles physiologiques de TRAIL	64
<i>I.4.3 La signalisation apoptotique induite par TRAIL</i>	65
<i>I.4.4 Conclusion sur les thérapies actuelles du TRAIL : nécessité de restauration et d'optimisation de la sensibilité à TRAIL</i>	68
I.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70

Abréviations

CRD	Cystein rich domain
$\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	Mesure du déplacement des électrons sous l'effet du champ électrique; elle s'exprime en $\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DWCNT	Double-wall carbon nanotubes
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
FasL	Fas Ligand
IFN	Interféron
LNC	Lipid NanoCapsules
LPS	Lipopolysaccharide
MWCNT	Multi-walled carbon nanotubes
Nm	Nanomètre
NP	Nanoparticules
NTC	Nanotube de carbone
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SWCNTS	Simple-walled carbon nanotubes
TNF	Tumor necrosis factor

Les nanoparticules – Partie 1

Le domaine de la nanotechnologie, actuellement, représente une discipline scientifique en pleine effervescence. L'utilisation des nanoparticules, notamment dans le cadre de la médecine (discipline nommée nanomédecine) ouvrirait un champ de potentialité important permettrait une énorme amélioration de la détection précoce et du traitement de nombreuses pathologies telles que les cancers, les maladies auto-immunes ou infectieuses. Par conséquent, le développement de cette discipline constitue un enjeu majeur de santé publique.

Depuis ces dernières années, les nanoparticules (NPs) constituent des plateformes très prometteuses de la recherche dans plusieurs domaines tels que la biologie, la physique et la chimie. Ainsi, les NP permettent de délivrer un agent de contraste ou thérapeutique sélectivement vers une zone ciblée, telle qu'une cellule par exemple.

Dans ce chapitre, nous présenterons les principaux types de nanoparticules servant à la vectorisation (les nanovecteurs) utilisées en nanomédecine ainsi que leurs propriétés et leurs applications. Ce chapitre s'intéressera ensuite aux propriétés de nanotubes de carbone et au choix de ce type de vecteur. Enfin, il présentera la molécule thérapeutique embarquée : TRAIL, les récepteurs cellulaires visés, ses applications dans les thérapies actuelles et sa capacité d'induire l'apoptose (mort cellulaire programmée).

I.1 Les nanoparticules : définition, propriétés et applications

I.1.1 Définition et propriétés

Les nanoparticules sont constituées d'un assemblage atomique aboutissant à une structure de taille nanométrique comprise entre 1 à 100 nm. Les nanoparticules sont caractérisées par leur taille (nanométrique) qui peut offrir alors une énorme surface spécifique et une stabilité importante. Ainsi, les nanoparticules peuvent former des dispersions homogènes qui ne sédimentent pas, et sont capables par exemple d'arriver à leurs cibles cellulaires spécifiquement. Par conséquent, ces nanoparticules peuvent jouer un rôle important dans la vectorisation ciblée prometteuse des principes actifs (voir paragraphe I.2.2).

Récemment, les nanoparticules ont été utilisées pour la détection et le traitement de pathologies. Parmi les applications les plus avancées dans ce domaine, se situe la délivrance de médicaments, et notamment le développement de thérapies ciblées anti-cancéreuses. Cela permet, d'une part, d'augmenter la sélectivité des molécules anti-tumorales délivrées par les nanoparticules *vis-à-vis* des tumeurs, et d'autre part, de réduire les effets secondaires résultante de la chimiothérapie.

Aujourd'hui, il existe un défi majeur de la prévention, de la localisation et du traitement des pathologies cancéreuses pour la délivrance des principes actifs vers leurs cibles (tissus, cellules). A ce niveau, une question importante se pose : comment le principe actif (avec des concentrations suffisantes pour être efficaces) pourrait-il cibler les zones malades sans toucher les cellules saines et sans induire des dégâts ainsi qu'une accumulation toxique dans d'autres tissus ? A noter que malgré l'efficacité du traitement, les conséquences inacceptables et inappropriées peuvent aboutir à l'abandonner.

Par ailleurs, les principes actifs (95% possèdent des propriétés pharmacocinétiques faibles) ne peuvent pas traverser les différentes barrières qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ceci est dû à leurs caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaires, etc...) peu efficaces pour une meilleure absorption, et qui peuvent aboutir à une dégradation, une métabolisation ou une élimination de ces principes actifs. Par conséquent, les traitements actuels, pour ces raisons, ne pourraient pas atteindre leur cible. D'où, la nécessité primordiale de développer des vecteurs de principes actifs pour une délivrance spécifique des médicaments vers leur site actif [Koo *et al.*; 2005].

I.1.2 Applications

Les champs d'applications des nanoparticules sont très vastes. Comme nous l'avons dit précédemment, les nanoparticules sont connues surtout pour délivrer des principes actifs thérapeutiques et diagnostiques vers une cible donnée. Au niveau thérapeutique, nous pouvons citer quelques exemples thérapeutiques des nanoparticules.

- **La radiothérapie** permet de détruire des cellules présentes à proximité d'une source de rayonnements radioactifs. L'intérêt des nanoparticules est alors de véhiculer la source radioactive directement au niveau de la zone à traiter [Li *et al.*; 2004].

- **L'hyperthermie** permet d'échauffer localement la zone cible grâce à des nanoparticules avec une augmentation de la température (vers 45°C) pour induire l'apoptose des cellules ciblées présentes à proximité de la source de chaleur (champ magnétique extérieur ou laser) [Wust *et al.*; 2006]. Par conséquent, l'hyperthermie possède le même objectif que la radiothérapie.
- **La thérapie photodynamique** permet de produire des radicaux libres oxydants par des molécules photosensibles qui absorbent un rayonnement lumineux. Ce processus induit la mort des cellules environnantes [Wilson and Patterson; 2008]. Ainsi, les nanoparticules sont des transporteurs de molécules photosensibles vers la zone cible [Kopelman *et al.*; 2005] tout comme elles le faisaient dans les cas précédents pour lesquels les agents thérapeutiques étaient vectorisés par les nanoparticules vers leurs cibles. A noter qu'il est toujours souhaitable que ces agents thérapeutiques s'accumulent de façon préférentielle au sein des tissus à traiter afin de minimiser leur impact sur les cellules saines.
- **L'imagerie médicale** (élément de diagnostic) fait partie des applications de la nanomédecine où les nanoparticules jouent le rôle de traceurs ou d'agents de contraste.

Par conséquent, l'intérêt majeur des nanoparticules, et leur originalité est de véhiculer les agents d'intérêt vers une cible tout en protégeant les principes actifs thérapeutiques ou diagnostiques. Elles apparaissent donc comme des éléments de vectorisation exceptionnels.

I.2 Les nanoparticules : les différents types et les trois générations distinctes

Actuellement, les nanoparticules se différencient les unes des autres par le type de leur cœur de base les constituant pour la protection et le relargage des principes actifs, et par le contrôle de leur surface permettant aux nanoparticules de véhiculer les agents d'intérêt vers leur cible.

I.2.1 Les différents types de nanoparticules

Il existe différents types de nanoparticules qui se distinguent selon la composition du cœur organique ou inorganique [Kumar; 2006]. Les principaux types des nanoparticules sont répertoriés dans la (Figure I-1) ci-dessous.

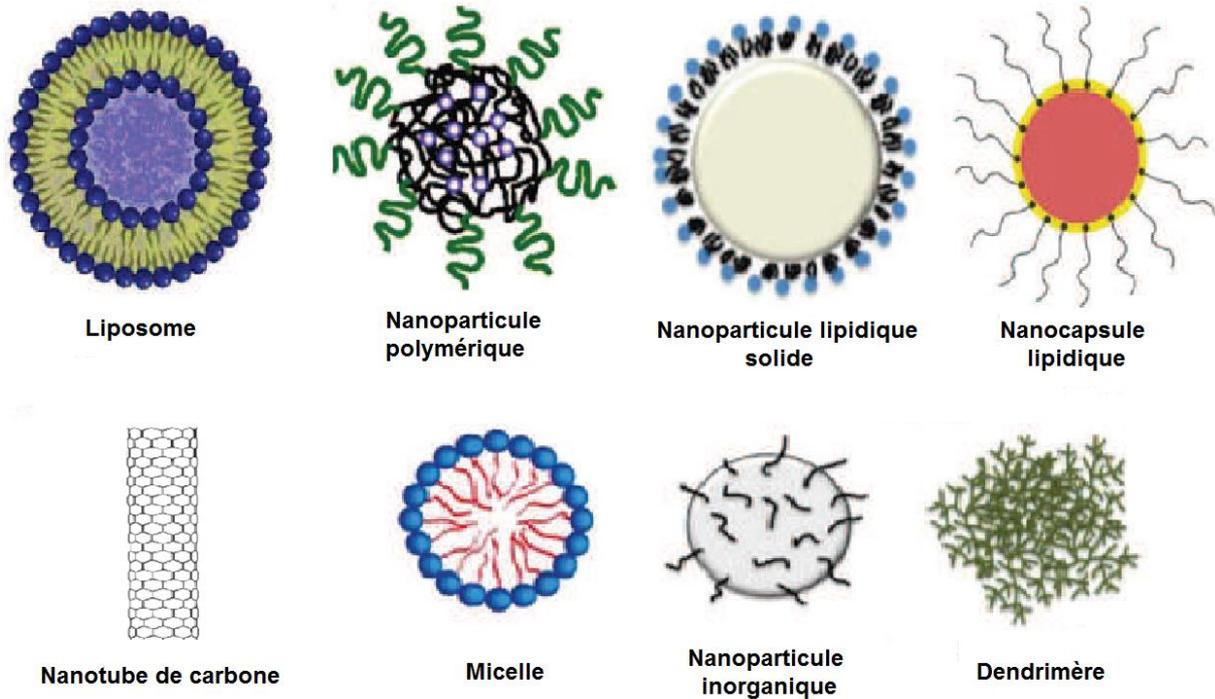


Figure I—1 Variété des nanoparticules de vectorisation des principes actifs (d'après [Faraji and Wipf; 2009]).

- **Les liposomes** sont des vésicules de bicouches phospholipidiques encapsulant des compartiments aqueux avec une taille qui varie de quelques nanomètres à quelques micromètres [Torchilin; 2006]. Elles sont non toxiques et biocompatibles et sont donc utilisées comme transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou diagnostics [Gregoriadis; 1976]. En revanche, elles sont limitées par plusieurs facteurs tels que leur faible stabilité, leur efficacité d'encapsulation des molécules actives, et leur production compliquée [Pinto-Alphandary *et al.*; 2000].
- **Les micelles** sont des agrégats sphéroïdaux de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent. Elles possèdent une tête polaire hydrophile dirigée vers le solvant et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur. Elles se forment quand la concentration en

surfactant dans le milieu dépasse un seuil (ou concentration micellaire critique) [Koo *et al.*; 2005]. Le type de micelles dépend du surfactant mis en jeu, comme par exemple les micelles à base de phospholipides ou de surfactants PEGylés [Liu *et al.*; 2005, Oishi *et al.*; 2006, Sawant *et al.*; 2006].

- **Les nanoparticules polymériques** à base de polymères (polysaccharides par exemple) sont biocompatibles, beaucoup plus stables que les liposomes, et biodégradables. Cependant, leur production est difficile et le rendement de fabrication est faible [Kumar; 2006].

Les dendrimères et les nanogels rentrent dans la catégorie de ce type de nanoparticules. Les *dendrimères* sont très ramifiés, ont une taille comprise entre 1 et 10 nm et se forment par addition contrôlée de couches successives de monomères à partir d'un monomère existant au cœur de la particule. Leur synthèse est limitée car délicate [Boas and Heegaard; 2004]. Les *nanogels* sont constitués de polymères hydrophiles mais utilisés d'une façon moins courante. Ils sont plus flexibles que les autres nanoparticules polymériques. Ils possèdent une particule finale gonflée d'eau et donc une grande surface spécifique et une importante capacité d'encapsulation [Oh *et al.*; 2008, Vinogradov *et al.*; 2002].

Les principaux inconvénients des nanoparticules polymériques proviennent des importants déchets de solvants suite à leur synthèse, ce qui pourrait induire une possible toxicité cellulaire. Ainsi, leur production est difficile et leur durée de conservation est limitée.

- **Les nanoparticules lipidiques** sont non toxiques, biodégradables et à base de triglycérides. Ainsi, nous pouvons citer les *nanoparticules lipidiques solides* (SLN) les plus importantes dans cette catégorie de nanoparticules [Wissing *et al.*; 2004, Wong *et al.*; 2007]. Les SLN sont constituées d'une matrice de lipides solides, et sont plus stables. En revanche, les SLN ont quelques inconvénients tels que l'accroissement de la taille avec le temps, leur possibilité de former des gels d'une façon inattendue, et leur faible rendement d'encapsulation des principes actifs.

Les nanocapsules lipidiques (LNC) sont formées d'une partie lipidique centrale liquide enfermée dans une enveloppe solide [Peltier *et al.*; 2006].

➤ **Les nanoparticules inorganiques** sont représentées par les nanoparticules magnétiques [Cheon and Lee; 2008] et les nanocristaux semi-conducteurs [Schroeder *et al.*; 2007].

Les *nanoparticules magnétiques* ont un diamètre de quelques nanomètres et peuvent être entourées d'une coque de silice par exemple.

Les *nanocristaux semi-conducteurs* (ou boîtes quantiques) ont un diamètre de quelques nm et ont une partie centrale cristalline semi-conductrice entourée d'une matrice à base de zinc par exemple.

I.2.2 Les trois générations de nanoparticules

Afin d'améliorer la fonction biologique des nanoparticules, celles-ci ont été classées selon trois générations.

➤ **Les nanoparticules de première génération** étaient formées de colloïdes stables en milieu aqueux. Elles étaient capables d'éviter l'excrétion par le système rénal (filtration par des pores de quelques nanomètres seulement), mais gardaient leurs effets thérapeutiques (Figure I-2 A).

En principe, les agents thérapeutiques de faible poids moléculaire sont encapsulés par des nanoparticules de 10 nm par exemple. Mais, le paramètre de faible taille ne leur permet pas d'avoir une grande diffusion dans le sang. Ainsi, les nanoparticules sont reconnues par le système immunitaire et phagocytées par les macrophages. Donc, pour surmonter la phagocytose et pour que les nanoparticules puissent arriver aux zones ciblées, la notion *furtivité* a été usitée.

➤ **Les nanoparticules furtives de seconde génération** ont été mises en place suite à une addition d'un agent de furtivité à la surface des nanoparticules de la première génération (Figure I-2 B) pour limiter l'opsonisation.

L'*opsonisation* est un mécanisme de reconnaissance des particules étrangères qui sont rapidement marquées pendant leur circulation dans le sang par l'intermédiaire des protéines appelées opsonines. Les particules opsonisées sont ensuite phagocytées par des macrophages. Pour limiter ce processus, les particules sont recouvertes d'agent de furtivité ce qui leur

permet d'échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires pour éviter la fixation des opsonines [Moghimi and Szebeni; 2003].

Les agents de furtivité sont biocompatibles, solubles en milieu aqueux, non toxiques et ont par ailleurs une faible immunogénicité. Parmi ces agents utilisés pour protéger les nanoparticules, nous pouvons citer les polymères comme le polyéthylène glycol (PEG) par exemple. Ainsi, la taille et la structure des chaînes polymériques ont un grand impact dans l'amélioration du taux de PEGylation à la surface des particules : plus la chaîne de PEG est ramifiée, plus elle est efficace [Moghimi *et al.*; 2001].

L'activité thérapeutique ou diagnostique des principes actifs est trop limitée par les mécanismes métaboliques. En effet, l'excrétion de ces principes actifs va diminuer leur quantité qui arrive dans la zone cible, et ils vont s'accumuler dans les organes de séquestration tels que le rein, le foie et la rate. La toxicité induite au niveau de ces tissus s'en retrouve donc augmentée. Ainsi, des possibilités de modification de la surface des nanoparticules ont été mises en place afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules portant les agents thérapeutiques et de relarguer lentement les principes actifs dans le sang [Torchilin; 2006].

➤ **Les nanoparticules ciblantes de troisième génération** se caractérisent par une barrière stérique par une addition d'agents de ciblage (Figure I-2 C) à la surface des nanoparticules *via* un bras espaceur [Andrieux *et al.*; 2003].

Elles sont mises en place pour limiter la longue persistance des nanoparticules de deuxième génération dans le sang et leur extravasation dans les zones extrêmement vascularisées comme le foie. Ainsi, pour favoriser l'accumulation des nanoparticules dans une zone d'intérêt, il est important de fonctionnaliser leur surface par des ligands biologiques reconnus par les cellules cibles. Les ligands ont des natures et des structures différentes telles que des saccharides, des oligonucléotides [Farokhzad *et al.*; 2006], des anticorps [Yang *et al.*; 2008], des peptides [Cai *et al.*; 2006], ou d'autres types de molécules comme le folate [Schroeder *et al.*; 2007].

Etant donné que l'addition de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise leur phagocytose par les macrophages [McNeeley *et al.*; 2007], il est indispensable d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité pour contrebalancer cet effet. Cependant, et pour

éviter la formation d'une barrière stérique masquant les ligands, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la nanoparticule par un bras espaceur dans le but d'avoir une plus grande liberté de mouvement à la surface de la couche de furtivité et favoriser ainsi sa liaison avec la cible. En outre, le bras espaceur flexible joue un rôle important dans la liberté de mouvement de l'agent de ciblage afin d'augmenter la possibilité d'interaction entre le ligand et la cible dans les meilleures conditions.

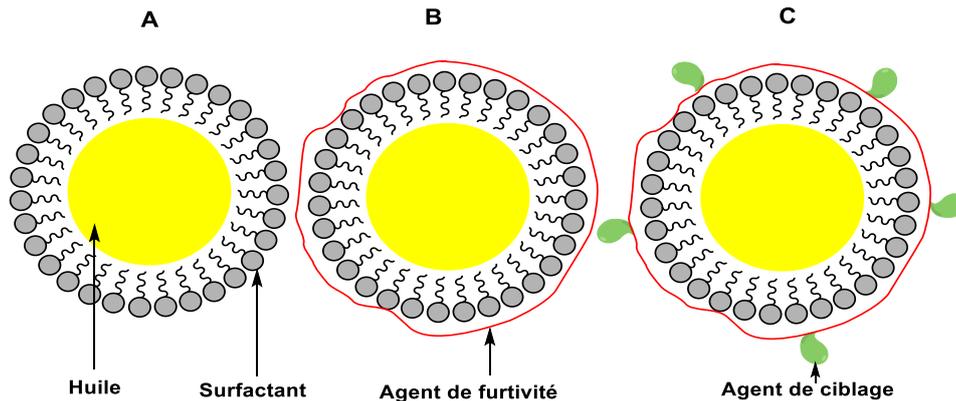


Figure I—2 Les trois générations des nanoparticules (NPs). Il s'agit d'un exemple des nano-émulsions. NP de la première génération totalement nue (A). NP furtive de la deuxième génération (B). NP de la troisième génération avec des agents de ciblage (C).

I.2.3 Les nanoparticules multifonctionnelles

D'après tout ce qui précède, nous pouvons dire que les nanoparticules forment une unité d'assemblage sur laquelle différents agents peuvent se fixer tels que les agents de furtivité, de ciblage, de contraste, les agents thérapeutiques et les agents d'activation qui induisent le relargage d'un autre type de principe actif par un stimulus extérieur (pH par exemple). Ainsi, les agents d'activation permettent un meilleur ciblage des principes actifs d'une façon contrôlée au sein de leur zone d'intérêt.

A noter qu'il est possible, à partir d'un même noyau d'assemblage de base, d'aboutir à des nanoparticules possédant des propriétés différentes grâce aux agents choisis. Par ailleurs, le principe des nanoparticules multifonctionnelles [Ferrari; 2005], qui regroupe toutes les considérations évoquées précédemment est illustré dans la (Figure I-3) ci-dessous.

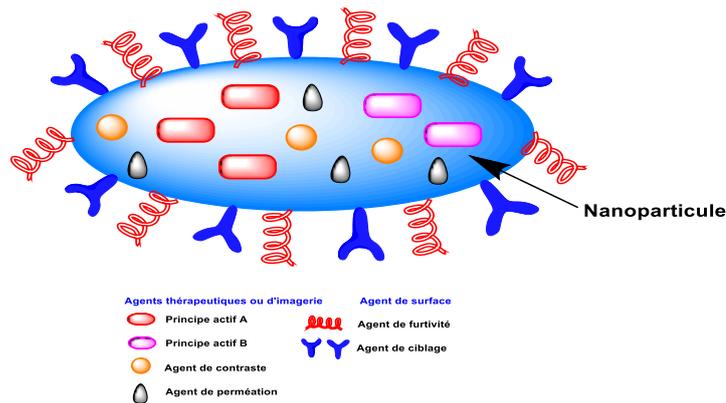


Figure I—3 Principe de nanoparticule multifonctionnelle. Cette nanoparticule peut véhiculer un ou plusieurs principes actifs. Elle comporte des agents de furtivité à la surface des particules pour éviter leur phagocytose par les macrophages et augmente ainsi leur temps de circulation dans l'organisme. Les agents de perméation aident à passer à travers les différents types de membranes, cas de la paroi des vaisseaux sanguins par exemple, présentes entre les nanoparticules et la zone d'intérêt. Finalement, les agents de ciblage comme un anticorps, greffés sur la nanoparticule permettent un ciblage actif et favorisent donc l'accumulation tissulaire des nanoparticules ou leur internalisation par les cellules cibles (d'après [Ferrari; 2005]).

I.2.4 Conclusion

Les nanoparticules d'intérêt en nanomédecine offrent de réelles perspectives thérapeutiques. Elles permettent une meilleure délivrance d'agents thérapeutiques dans la zone d'intérêt tout en limitant leur arrivée dans d'autres tissus. Cela permet ainsi de réduire les effets secondaires des traitements et améliorent les propriétés insatisfaisantes des principes actifs. Concernant le diagnostic, elles permettent une détection plus précoce de maladies.

En effet, malgré la grande diversité des nanoparticules à différentes finalités, celles abordées en applications cliniques sont minoritaires. Ainsi, les conditions de la production de nanoparticules, leur stabilité et leur efficacité thérapeutique restent un défi majeur pour une utilisation clinique. Cependant, leur toxicité représente actuellement un élément critique accru à tous les niveaux.

Parmi les différents types de nanoparticules, les *nanotubes de carbone* mentionnés plus haut (Figure I-1) vont constituer notre support dans la deuxième partie de ce chapitre. Nous allons donc présenter leur production, leurs différentes propriétés et leur utilisation en nanomédecine comme éléments de vectorisation. Le choix de ce type de nanoparticules biocompatibles est détaillé dans ce qui suit.

Les nanotubes de carbone - Partie 2

I.3 Les nanotubes de carbone (NTCs)

Récemment en nanosciences, plusieurs formes de carbone ont été découvertes. Les plus connues sont les fullerènes C₆₀ construits à partir de 60 atomes de carbone et ayant une forme sphérique. Les formes plus allongées et cylindriques, découvertes en 1991 [Iijima; 1991], sont appelées nanotubes. Les nanotubes, dont la production et les applications actuellement en plein essor, représentent les nanoparticules manufacturées pour lesquelles les risques d'exposition sont les plus grands. En effet, la production mondiale de NTC atteint aujourd'hui plusieurs centaines de tonnes par an, et ces nano-objets pourraient bientôt être utilisés, en masse, dans des secteurs divers tels que l'aéronautique et l'automobile.

Les nanotubes de carbone (NTCs) sont très stables d'un point de vue chimique et thermique. Ils ont des résistances mécaniques remarquables malgré leur formidable légèreté. Ces caractéristiques ont permis leur utilisation dans un large éventail d'applications et dans des domaines variés allant de l'électronique (transistors) à la chimie (nouveaux catalyseurs) en passant par le domaine médical [Lin *et al.*; 2004].

Dans le domaine médical, les NTCs sont utilisés pour la synthèse des bio-détecteurs ou pour la délivrance des médicaments et des vaccins par exemple. Cependant, avant que des médicaments ou des vaccins puissent être véhiculés par des NTCs, la biocompatibilité et la toxicité cellulaire des NTCs doivent être établies [Colvin; 2003]. Malgré cela, ces nanostructures de carbone bénéficient aujourd'hui d'une grande considération pour les différentes applications thérapeutiques, notamment comme vecteurs pour le traitement anticancéreux ciblé [Liu *et al.*; 2008, Zakaria *et al.*; 2015, Zhang *et al.*; 2009].

I.3.1 Description et structure

I.3.1.1 Les différentes formes allotropiques du carbone

Il existe deux formes allotropiques *naturelles* du carbone : le graphite et le diamant. Dans les années 80-90, d'autres nouvelles formes allotropiques *non naturelles* du carbone ont été synthétisées comme le fullerène et les nanotubes de carbone.

➤ **Le fullerène** avec sa forme en ballon de football, est composé de pentagones et d'hexagones formant une structure en forme de cage où chaque atome de carbone est lié à trois autres atomes de carbone (Figure I-4). Ainsi, il n'est pas aromatique et connu par sa forte stabilité.

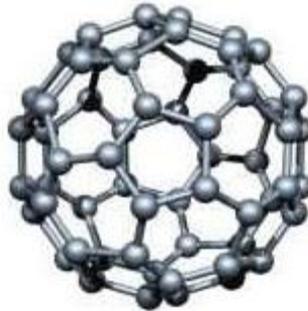


Figure I—4 Structure du fullerène C60

➤ **Les nanotubes de carbone** constituent la quatrième forme allotropique connue du carbone. Ce sont des cylindres nanométriques construits à partir de dérivés de feuilles de graphène où les atomes de carbone sont organisés selon un réseau hexagonal sans défaut et enroulés en tube [Ajayan; 1999, Dresselhaus *et al.*; 2001].

Les nanotubes de carbone (NTCs) sont divisés en deux catégories : les nanotubes mono-parois (ou SWCNTs) [Bethune *et al.*; 1993, Iijima and Ichihashi; 1993] présentent un diamètre de 0,8 à 2 nm et une longueur de l'ordre du micromètre ; les nanotubes multi-parois (ou MWCNTs) ont un diamètre de 10 à 80 nm et une longueur qui peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres [Daenen *et al.*; 2003b, Govindaraj and Rao; 2004]. Les SWCNTs peuvent être considérés comme des longs plans de graphène enroulés sur eux-mêmes (Figure I-5 A) et fermés aux extrémités par deux fullerènes (Figure I-5 C).

Les NTCs et les fullerènes sont des membres de la même famille et peuvent être considérés comme des fullerènes allongés. Ainsi, les NTCs sont formés d'hexagones de carbone hybridé sp^2 comme le graphite et chaque unité hexagonale peut être assimilée à un noyau benzénique. Les nanotubes de carbone sont donc des espèces aromatiques.

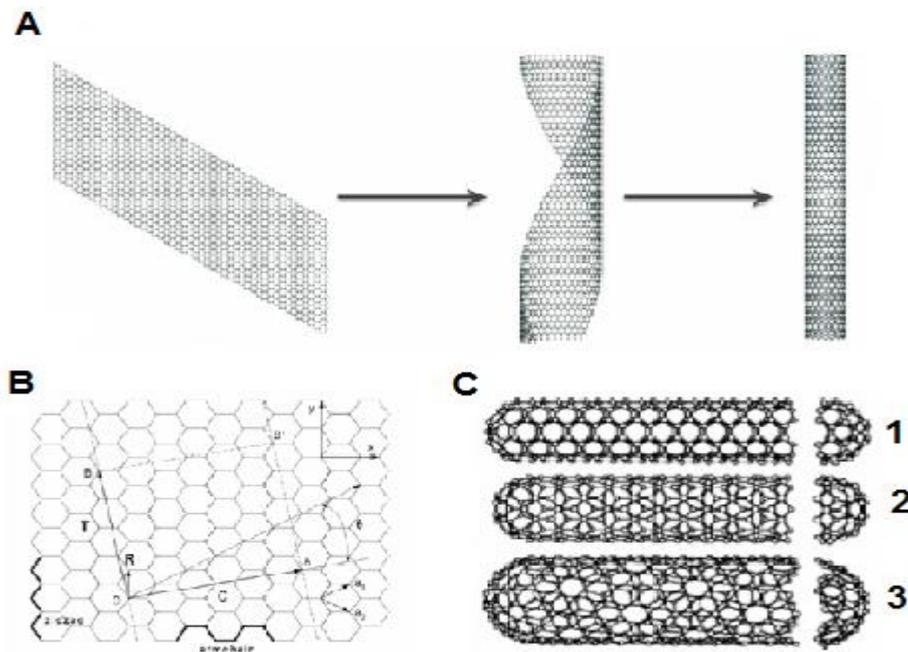


Figure I—5 Structure des nanotubes de carbone (d'après [Govindaraj and Rao; 2004]).

En outre, les propriétés électroniques des nanotubes de carbone changent selon l'enroulement du feuillet de graphène [Avouris; 2002] (feuillet externe dans le cas des nanotubes de carbone multi parois) dans une orientation spécifique et peuvent être classés en trois catégories :

- Les nanotubes en fauteuil (**armchair**), possèdent un enroulement du feuillet de graphène parallèle aux cotés des hexagones (Figure I-5 B & C 1), et sont métalliques d'un point de vue électronique.
- Les nanotubes en **zigzag** possèdent un enroulement du feuillet de graphène perpendiculaire au côté des hexagones (Figure I-5 B & C 2) et sont semi-conducteurs.
- Les nanotubes **chiraux** regroupent tous les autres enroulements s'effectuant selon un vecteur \mathbf{OA} quelconque (Figure I-5 B). Ce sont les intermédiaires des nanotubes en fauteuils et zigzag (Figure I-5 C 3), et ont la propriété d'être pour 1/3 métalliques et pour 2/3 semi-conducteurs.

I.3.1.2 La synthèse des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone peuvent être synthétisés par trois techniques principales : arc électrique, ablation laser et décomposition catalytique. La synthèse des différents types de nanotubes (mono, ou multi parois) dépend de la présence ou non de catalyseur.

➤ **La technique par décharge d'un arc électrique** est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée pour la synthèse de nanotubes de carbone. Elle a permis de fabriquer les premiers nanotubes multi-parois [Iijima; 1991]. Elle consiste à sublimer du graphite à l'anode et à le condenser à la cathode (Figure I-6) dans une enceinte sous atmosphère inerte à pression réduite ou atmosphérique [Daenen *et al.*; 2003b, Ebbesen and Ajayan; 1992, Govindaraj and Rao; 2004]. L'utilisation de graphite pur a abouti à la fabrication des MWCNTs, et l'utilisation de graphite contenant des catalyseurs métalliques tels que le fer, le cobalt ou le nickel, a abouti à la synthèse de SWCNTs [Bethune *et al.*; 1993, Iijima and Ichihashi; 1993, Journet *et al.*; 1997].

C'est une technique économique et facilement réalisable qui permet d'obtenir des NTCs avec très peu de défauts structuraux. Cependant, le rendement de cette méthode de synthèse est faible du fait de la présence d'impuretés comme les fullerènes, le carbone amorphe ou les catalyseurs métalliques pendant la synthèse des SWCNTs.

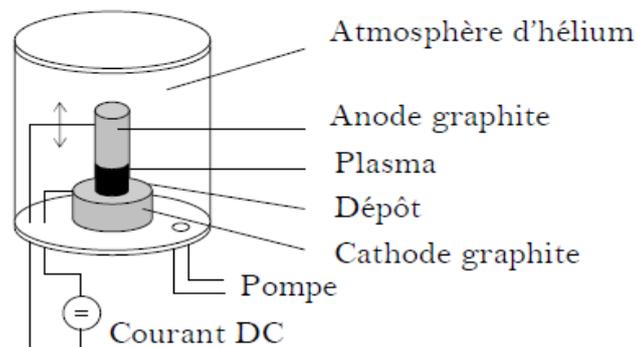


Figure I—6 Synthèse des NTCs par arc électrique : principe du montage. (d'après [Journet *et al.*; 1997]).

➤ **La technique par ablation laser** consiste à viser une cible de graphite placée dans une enceinte chauffée à 1200°C par un rayonnement laser de forte énergie (en continu [Maser *et al.*; 1998] ou pulsé [Yudasaka *et al.*; 1999]), dans le but de sublimer ou d'expulser du carbone, qui vient se condenser sous forme de nanotubes de carbone sur une tige de cuivre refroidie par de l'eau glacée (Figure I-7).

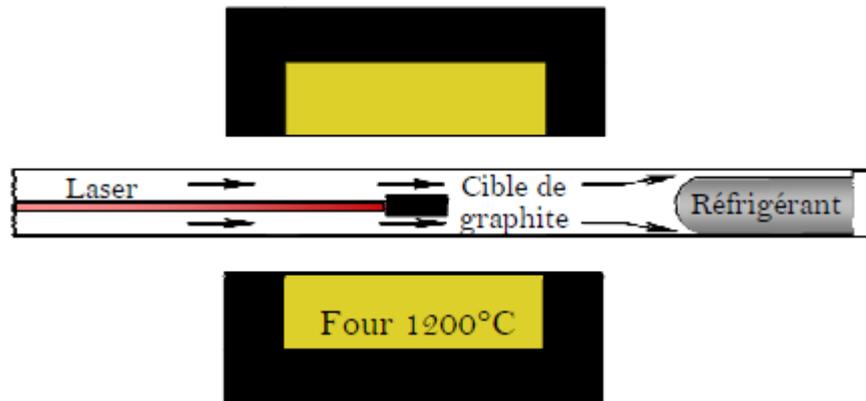


Figure I—7 Principe du montage de synthèse des nanotubes de carbone par ablation laser.

Cette méthode de synthèse consiste à vaporiser la cible graphitique en présence d'un catalyseur métallique dans une atmosphère inerte. Cependant, cette technique nécessite un laser puissant pour vaporiser le graphite. Les SWCNTs sont uniquement obtenus par cette méthode avec un diamètre contrôlé et une pureté importante.

➤ **La technique par décomposition catalytique** est la méthode utilisée en phase vapeur. Elle remonte à 1993 pour synthétiser, pour la première fois, des MWCNTs [Yacaman *et al.*; 1993]. Cette méthode a permis d'obtenir des nanotubes d'une longueur d'environ 50 µm pour un diamètre compris entre 5 et 50 nm. La taille des NTCs est gouvernée par celle des particules de fer à partir desquelles les nanotubes croissent.

La croissance de nanotubes par dépôt chimique en phase vapeur (ou CVD) a permis d'obtenir des nanotubes de carbone dont le diamètre est contrôlé par celui des particules de catalyseurs (Fe, Ni ou Co). Cette méthode consiste à décomposer un gaz comme source de carbone (méthane ou monoxyde de carbone) dans un four à haute température en présence

d'un catalyseur [Ren *et al.*; 1998]. Cependant, cette méthode ne donne pas un rendement très élevé et seulement quelques milligrammes à quelques grammes de SWCNTs sont obtenus.

Pour synthétiser des nanotubes de carbone à plus grande échelle, une méthode de croissance de nanotubes par dépôt chimique en phase vapeur à haute pression (ou HiPCO) a été mise au point par le groupe de Smalley [Nikolaev *et al.*; 1999]. Ce procédé consiste à décomposer sous haute pression du monoxyde de carbone en présence de metallocène (Figure I-8) et permet de synthétiser des SWCNTs.

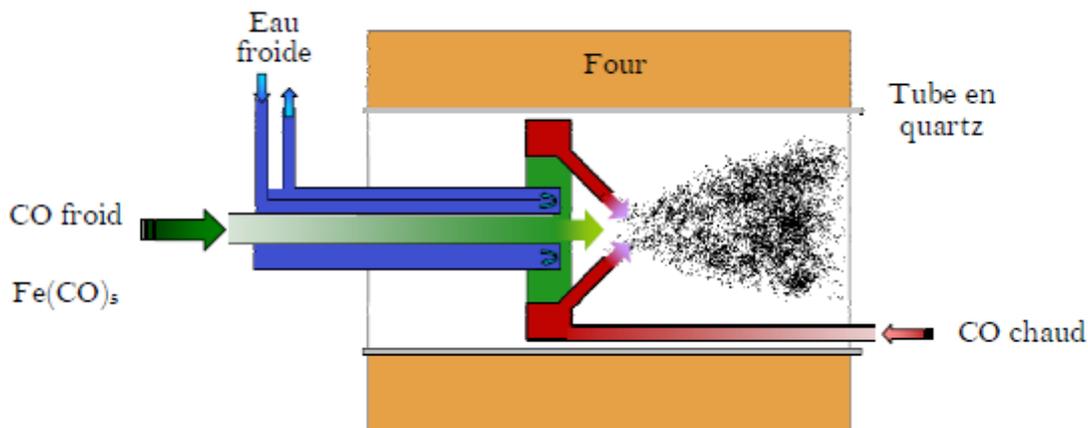


Figure I—8 Principe de la synthèse de nanotubes par CVD par la technique HiPCO (d'après [Nikolaev *et al.*; 1999]).

Les nanotubes synthétisés par cette méthode présentent un diamètre de 0,7 à 1,4 nm avec un fort rayon de courbure (Figure I-9).

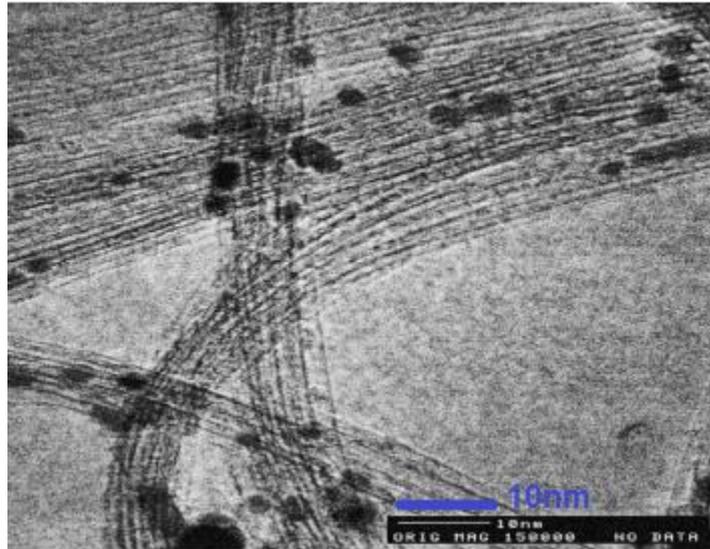


Figure I—9 Image TEM de nanotubes de carbone mono paroi (SWCNTs) synthétisés par la méthode HiPCO (d'après [Nikolaev *et al.*; 1999]).

I.3.1.3 Purification des nanotubes de carbone

Suite à leur synthèse, les NTCs contiennent une grande quantité d'impuretés. Ces dernières sont problématiques pour les applications envisagées. Parmi ces impuretés, nous pouvons citer le graphite, le carbone amorphe, les catalyseurs métalliques ou les fullerènes.

Par conséquent, une purification de ces NTCs est nécessaire avant leur utilisation. Il existe différentes méthodes de purification telles que l'oxydation, les traitements acides, le traitement aux ultrasons, la microfiltration, la fonctionnalisation et la chromatographie [Daenen *et al.*; 2003a].

I.3.2 Propriétés technologiques des NTCs

Actuellement, les NTCs, suscitent un énorme intérêt dans le monde de la recherche grâce à leurs propriétés exceptionnelles. D'un point de vue mécanique, ils présentent à la fois une excellente rigidité, comparable à celle de l'acier, tout en étant extrêmement léger. Un tel filament présente une résistance 100 fois supérieure à l'acier, pour un poids divisé par six, et cela avec une résistance peu commune aux hautes températures. Du point de vue du comportement électrique et optique, les nanotubes mono paroi (SWCNTs) ont la particularité exceptionnelle de pouvoir être soit métalliques soit semi-conducteurs (comme nous l'avons

déjà mentionné) en fonction de leur géométrie (diamètre du tube et angle d'enroulement de la feuille de graphène). Nous résumons ici quelques propriétés fantastiques de ces nano-objets :

I.3.2.1 Propriétés mécaniques

Les nanotubes sont caractérisés par les propriétés suivantes :

- **Résilience** : la résistance des NTCs devrait être, d'après des simulations numériques, presque 100 fois supérieure à l'acier pour un poids 6 fois moindre. Cette propriété dépend aussi de la nature du nanotube : les MWCNTs sont beaucoup plus résistants que les SWCNTs.
- **Dureté** : certains nanotubes sont plus durs que le diamant [**Wang et al.; 2004**].
- **Conductivité thermique** : les NTCs ont une conductivité thermique très élevée, de 6 à 20 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Cette conductivité peut dans certains cas de s'approcher de celle du diamant ($20 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

I.3.2.2 Propriétés électriques et optiques

Les propriétés *électriques* des NTCs sont dépendantes de leur nature. Les nanotubes SWCNTs affichent de ce point de vue des qualités meilleures que les MWCNTs, par les interactions électriques, de type Van der Waals, qui apparaissent entre les différentes couches de graphène.

Ils ont une conductivité supérieure à celle du cuivre et 70 fois supérieure à celle du silicium dopé; une grande mobilité jamais mesurée de $100\,000 \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à 300 K. Ainsi, ils deviennent supraconducteurs à basse température [**Bouchiat; 2007**]; permettent de réaliser des transistors à un niveau de miniaturisation jamais atteint jusqu'à maintenant [**Filippone; 2012**] et pourraient également permettre de réaliser des émetteurs d'électrons à l'échelle du nanomètre.

Les plus importantes propriétés *optiques* des NTCs se simplifient par leurs propriétés d'absorption de la lumière, leurs propriétés d'électroluminescence et leurs propriétés de photoluminescence.

I.3.2.3 Propriétés chimiques

Les nanotubes de carbone sont des structures creuses, qui peuvent être remplies avec d'autres composés chimiques, ce qui en fait des récipients clos à l'échelle nanométrique. Ils sont relativement peu réactifs et une modification chimique de leur surface fait souvent appel à des espèces fortement réactives (oxydants forts, réducteurs forts, espèces radicalaires par exemple). C'est pourquoi une chimie de greffage de nanotubes basée sur des interactions covalentes [Tasis *et al.*; 2006] et non covalentes [Britz and Khlobystov; 2006] s'est fortement développée ces dernières années (adsorption de tensioactifs, enroulement de polymères, d'ADN, adsorption de pyrènes...)[De Juana and Pérez; 2013, Hirsch; 2002, Sozykin and Beskachko; 2013].

I.3.3 Fonctionnalisation des nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont insolubles dans les solvants. Le développement de différents types de fonctionnalisation covalente [Banerjee *et al.*; 2003, Tasis *et al.*; 2006] ou non covalente [Britz and Khlobystov; 2006] des NTCs a permis de les rendre solubles dans différents solvants, selon la nature des groupements greffés à leur surface. La fonctionnalisation par des espèces hydrophiles a donc permis de rendre ces nanotubes hydrophiles et solubles dans l'eau. Ainsi, les NTCs hydrosolubles ont été utilisés dans de nombreuses applications biologiques et en particulier, pour la vectorisation de médicaments. Ils sont prometteurs grâce à leur grande surface spécifique, qui permet de transporter simultanément un ou plusieurs principes actifs comme des agents de ciblage ou d'imagerie, par exemple. Ces caractéristiques importantes font des NTCs des éléments de nanovectorisation de troisième génération.

La partie de fonctionnalisation sera détaillée dans le chapitre II.

I.3.4 Applications des NTCs

I.3.4.1 Applications industrielles

Les nanotubes de carbone sont déjà utilisés dans l'industrie [Endo *et al.*; 2008]. En effet, ils sont employés dans des équipements sportifs (vélos, raquettes de tennis), aéronautiques (ailes d'avion) et automobile (pneumatiques). Très prochainement, ils pourront entrer dans la composition de textiles techniques (vêtements plus résistants), permettre d'élaborer de nouveaux composants électroniques (diodes, écrans plats) ou être utilisés dans la filtration (membrane filtrante) et le stockage d'énergie.

I.3.4.2 Applications médicales

Grâce à leur petite taille, les NTCs pourraient être utilisés dans le domaine médical et pharmaceutique. La fonctionnalisation des NTCs par modification de leur surface rend les NTC biocompatibles pour devenir fluorescents et utilisés en imagerie, ou encore pour véhiculer un principe actif spécifiquement vers des cibles biologiques. Nous citons ci-dessous quelques applications médicales des NTCs.

➤ **L'ingénierie biomédicale** est un champ d'application des NTCs fonctionnalisés [Venkatesan and Kim; 2010]. Les NTCs pourraient par exemple, entrer dans la composition de nouveaux matériaux bio-mimétiques qui seraient utilisés dans la fabrication de prothèses orthopédiques. En effet, il y aurait une meilleure adhérence des ostéoblastes sur les NTCs optimisant ainsi l'intégration osseuse. Les NTCs permettraient également d'augmenter la résistance mécanique de ces nouveaux biomatériaux. Ils pourraient aussi être utilisés comme support de croissance osseuse dans le traitement des fractures. Les NTCs ont été, par exemple, fonctionnalisés avec des charges négatives attirant les ions calcium, facilitant ainsi la guérison des fractures [Fiorito; 2008]. De même, l'utilisation de biomatériaux composés de NTC inhibant la différenciation et la fonction des ostéoclastes permet une meilleure régénération de l'os [Narita *et al.*; 2009].

➤ **Le dépistage et diagnostic thérapeutiques** où les NTCs fonctionnalisés sont utilisés comme biosenseurs pour détecter des changements biochimiques [Lei and Ju; 2010]: les NTCs fonctionnalisés avec des protéines de maladies auto-immunes ont été utilisés dans le processus de reconnaissance d'anticorps sécrétés dans le cadre de ces maladies et ainsi leur

diagnostic [Chen *et al.*; 2003]. De même, des NTCs fonctionnalisés avec un anticorps spécifique d'une hémagglutinine virale ont aidé à la détection du virus de la grippe [Takeda *et al.*; 2007].

➤ **L'imagerie médicale** représente un champ important des applications médicales des NTCs. Les NTCs peuvent être utilisés comme agents de contraste en imagerie médicale. Ainsi, l'utilisation de SWCNTs fonctionnalisés avec un peptide tumoral spécifique a permis la détection de cette tumeur dans un modèle murin [De La Zerda *et al.*; 2008]. En effet, le marquage de NTCs par des fluorophores par exemple permet également d'étudier la biodistribution de ces NTCs dans l'organisme.

➤ **La vectorisation de principes actifs** des NTCs fonctionnalisés sert à la délivrance des médicaments. Elle est beaucoup utilisée actuellement en industrie pharmaceutique [Bianco *et al.*; 2005]. Les NTCs grâce à leur grande surface spécifique permettant de fixer à la surface (ou à l'intérieur de leur cavité) de nombreux agents thérapeutiques apparaissent comme des outils idéaux pour transporter en grande quantité ces principes actifs.

Les NTCs fonctionnalisés assurent également le transport de peptides en vaccination. Par exemple, Pantarotto et ses collaborateurs ont montré que l'administration de NTCs fonctionnalisés avec un peptide du virus de la fièvre aphteuse induit la production d'anticorps spécifiques chez la souris [Pantarotto *et al.*; 2003]. Les NTCs fonctionnalisés rendent également possible une délivrance de principes actifs vers le cerveau, en permettant un passage de ces molécules à travers la barrière hémato-encéphalique et en les protégeant d'une dégradation enzymatique. Des NTCs fonctionnalisés avec des acides nucléiques ont été capables d'être insérés dans les cellules microgliales [Kateb *et al.*; 2007].

La thérapie anticancéreuse par des NTCs est une nouvelle approche du traitement du cancer. Des NTCs fonctionnalisés avec une molécule tumorale et par un principe actif à activité anti-tumorale permettent une délivrance ciblée d'agent anti-cancéreux (le paclitaxel ou la doxorubicine [Zhang *et al.*; 2009], par exemple) dans les cellules touchées [Liu *et al.*; 2008].

Une autre stratégie basée sur le principe de la thérapie génique, serait d'inactiver les cellules tumorales en utilisant des ARN interférents. Les NTCs facilitent en effet le passage des ARN interférents à travers les membranes cellulaires. Dans un modèle de xénogreffe de

carcinome pulmonaire murin, des complexes formés de NTCs fonctionnalisés avec un ARN interférent ont exercé une activité anti-tumorale [Podesta *et al.*; 2009].

Une autre stratégie basée sur l'utilisation des NTCs comme vecteur de radionucléides a été élaborée dans un modèle de xéno greffe de lymphome murin [McDevitt *et al.*; 2007]. Les NTCs ont été fonctionnalisés avec un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) et un radionucléide. Ces NTCs ont bien ciblé les cellules tumorales.

I.3.5 Toxicité des NTCs

I.3.5.1 Exposition aux nanotubes de carbone NTCs

Trois voies d'exposition aux NTCs ont été décrites. Ce sont la voie respiratoire (la voie principale d'exposition), la voie cutanée et la voie orale.

Les études d'exposition aux NTCs sont encore peu nombreuses et décrites dans le milieu professionnel [Aschberger *et al.*; 2010, Niosh; 2010]. Plusieurs études ont ainsi cherché à évaluer l'exposition aux NTCs par voie respiratoire de personnels travaillant à la production ou à l'utilisation des NTCs, dans des industries ou dans des laboratoires de recherche. Le tableau ci-dessous résume les différents travaux à ce niveau (Tableau-1). Il est à noter que la valeur d'exposition *référence* dans la plupart des études de toxicité est de 53 $\mu\text{g.m}^{-3}$

Secteur professionnel	Activité	Concentration en NTC dans l'air	Références
Industrie/Production	Synthèse	0.7 à 53 $\mu\text{g.m}^{-3}$	[Maynard <i>et al.</i> ; 2004]
	Pesée	64 $\mu\text{g.m}^{-3}$	
Industrie/Utilisation	Mélange	93 $\mu\text{g.m}^{-3}$	[Mazzuckelli <i>et al.</i> ; 2007]
	Découpage	1094 $\mu\text{g.m}^{-3}$	
Laboratoire de recherche	Pas de protection	430 $\mu\text{g.m}^{-3}$	[Han <i>et al.</i> ; 2008]
	Protection	40 $\mu\text{g.m}^{-3}$	
Laboratoire de recherche	Mélange/Sonication	—	[Johnson <i>et al.</i> ; 2010]

Table I—1 Données d'exposition aux NTCs par voie respiratoire en milieu professionnel.

Cependant, il existe deux types d'exposition de la population générale aux NTCs. Le premier concerne l'exposition **directe** résultant de la présence des NTCs dans des produits de consommation comme les textiles ou les équipements sportifs et électroniques. Aucune donnée quantitative d'exposition n'est disponible ce niveau d'exposition peut être considéré comme faible. Le second résulte d'une exposition indirecte environnementale par destruction ou incinération des déchets contenant des NTCs [Mueller and Nowack; 2008].

I.3.5.2 Les éléments physiques influençant la toxicité des NTCs

Les propriétés physiques des NTCs ayant un impact majeur sur la toxicité de ces nanomatériaux sont détaillées dans ce qui suit.

- **La surface spécifique** est caractérisée par la valeur du rapport surface/masse. Ce rapport est très élevé pour les NTCs, par leur faible taille et leur structure tubulaire [Warheit *et al.*; 2004]. Ce paramètre est indispensable lors de l'étude de la toxicologie des nanoparticules. Actuellement, aucune étude porte sur le rôle de la surface spécifique dans la toxicité des NTCs.
- **L'état d'agglomération des nanotubes de carbone** pourrait jouer un rôle significatif dans la toxicité cellulaire due aux NTCs. Par exemple, dans un modèle cellulaire mésothélial, les NTCs à des doses de 7,5 à 30 µg / mL, induisent une toxicité cellulaire accompagnée de l'augmentation de l'agglomération de ces nanoparticules [Wick *et al.*; 2007].
- **Les contaminants métalliques** sont produits lors de la synthèse des NTCs qui nécessite l'utilisation de catalyseurs métalliques comme le fer par exemple. Le fer est un générateur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) oxydatives [Kaczmarek *et al.*; 2007]. Donc, il faut que les études de la toxicité des NTCs tiennent compte du degré de pureté des NTCs et du type du catalyseur métallique utilisé. Actuellement, il est presque impossible de supprimer les traces de catalyseurs des NTCs. Une étude approfondie du rôle de ces catalyseurs dans la toxicité des NTCs est donc essentielle.
- **La longueur des nanotubes de carbone** pourrait avoir un impact sur leur toxicité. Une étude menée sur l'installation intratrachéale (IT) de 0,5 mg de MWCNTs par rat montre que les NTCs d'une grande longueur (0,713 vs 6 µm) ne sont pas éliminés assez rapidement

par rapport aux NTCs de petite taille, et induisent ainsi une inflammation *in vitro* [Muller *et al.*; 2005].

I.3.5.3 La toxicité des NTCs : recherche actuelle *in vivo* et *in vitro*

Actuellement, les recherches sur la toxicité *in vivo* des nanotubes de carbone progressent rapidement et concernent essentiellement la toxicité par inhalation. Saito *et al.* ont tiré la conclusion suivante de tous les travaux précédents sur les NTCs: pas de toxicité significative telle que la carcinogénèse par exemple, induite par les NTCs *in vivo* [Saito *et al.*; 2014]. Les organes, sites d'accumulation des NTCs après le transport à travers la circulation sanguine, la réponse des tissus et de cellules à l'accumulation, la période d'accumulation des NTCs et leur biodégradabilité sont des questions importantes à élucider rapidement.

Les résultats des études de la toxicité *in vitro* sont difficiles à interpréter [Saito *et al.*; 2014]. En réalité il est extrêmement difficile de déterminer quel facteur est évalué dans une étude toxicologique *in vitro* des NTCs. Ces nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons citer l'épaisseur, la longueur, la forme, la réactivité de surface, l'agrégation ainsi que l'influence des métaux résiduels, les dispersants... [Foldvari and Bagonluri; 2008] sont tous liés entre eux et leur influence individuelle est difficile à déterminer [Jia *et al.*; 2005, Nerl *et al.*; 2011].

Contrairement aux médicaments, peu d'informations existent pour les NTCs ainsi que les corrélations des données *in vivo* et *in vitro* [Snyder-Talkington *et al.*; 2012]. Cette question ne sera pas résolue avant les essais cliniques. Une autre raison est qu'il n'existe pas de moyens standards pour traiter les facteurs qui influencent les résultats des études de corrélation, tels que l'espèce animale, le mode d'administration utilisé dans les études *in vivo*, et le choix des cellules utilisées dans les études *in vitro* [Firme and Bandaru; 2010]. Dans l'avenir, il sera nécessaire de s'assurer que ces facteurs sont compatibles pour toutes les études afin d'analyser les données provenant de sources internationales et déterminer la corrélation entre *in vivo* et les évaluations de toxicité *in vitro* du NTC, au moins dans des modèles murins [Van der Zande *et al.*; 2011].

I.3.6 Internalisation cellulaire

I.3.6.1 Internalisation cellulaire des nanoparticules NP

Les réponses biologiques suite à une stimulation cellulaire par des nanoparticules (NP) sont fortement influencées par l'internalisation cellulaire de ces NP. Les mécanismes possibles d'internalisation des NP sont résumés dans la (Figure I-10) ci-dessous.

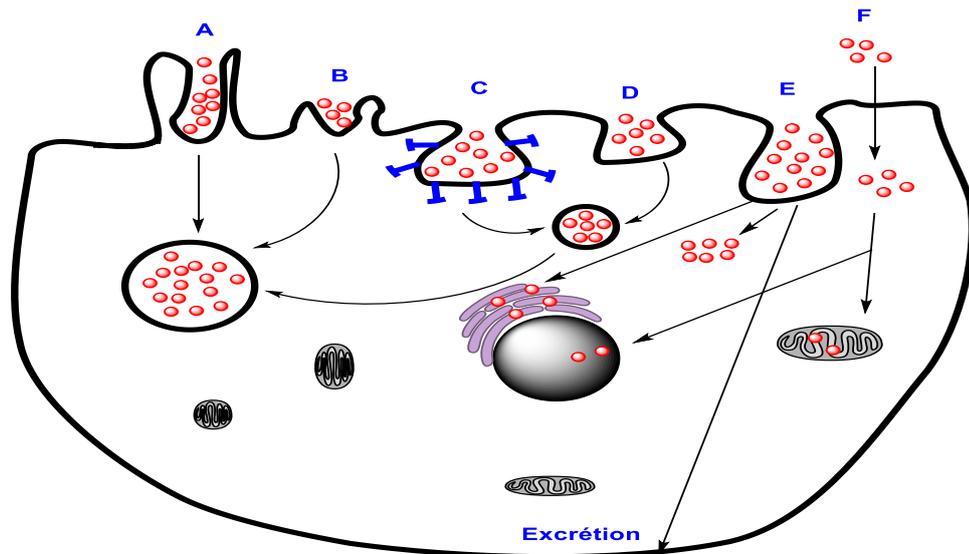


Figure I—10 Les mécanismes d'internalisation cellulaire des nanoparticules (NP) par : phagocytose (A), macropinocytose (B), endocytose clathrine-dépendante (C), endocytose clathrine-indépendante ou cavéoline-indépendante (D) endocytose cavéoline-dépendante (E) ou par un transport passif des NP à travers la membrane plasmique (F) (d'après [Mühlfeld *et al.*; 2008]).

L'**endocytose** représente la voie principale d'internalisation des nanoparticules dans la cellule. Cette endocytose se fait grâce à la taille de ces NP (>10 nm) [Yameen *et al.*; 2014], qui permet la formation de nouvelles vésicules intracellulaires à partir de la membrane plasmique et aboutit à une internalisation des lipides et des protéines par exemple (Figure I-10). L'endocytose est un mécanisme cellulaire très dynamique et fortement régulé. Ainsi, les cellules peuvent internaliser presque jusqu'à 5 fois leur volume par heure [Steinman *et al.*; 1983].

Parmi les voies d'endocytose cellulaire, les deux voies les plus importantes sont la phagocytose et la pinocytose.

La phagocytose se fait essentiellement dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques [Aderem and Underhill; 1999]. La grande taille des vésicules de phagocytose, appelées également phagosomes (> 250 nm), représente la caractéristique principale de cette internalisation [Rabinovitch; 1995]. Les interactions attractives telles que les interactions ioniques, les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes/hydrophiles entre les surfaces des NP et celles cellulaires permettent une internalisation cellulaire par phagocytose.

La pinocytose existe presque dans tous les types cellulaires. Nous pouvons distinguer l'endocytose clathrine- ou cavéoline-dépendante, l'endocytose clathrine- ou cavéoline-indépendantes et la macropinocytose [Mühlfeld *et al.*; 2008, Yameen *et al.*; 2014]. Cependant, la voie des clathrines est la plus étudiée pour l'internalisation cellulaire. Elle est assez complexe, et implique la signalisation intercellulaire, le recyclage de la membrane et l'absorption des éléments nutritifs [Kirchhausen; 2000]. Ainsi, l'internalisation des nanoparticules dépend de plusieurs facteurs : les caractéristiques physico-chimiques (taille des NP par exemple), la forme et la charge de surface mais également le type de la lignée cellulaire. En effet, il est possible que l'endocytose clathrine-dépendante soit la voie d'internalisation des NP ayant une de taille de presque 100 nm [Yameen *et al.*; 2014].

Ainsi l'étape principale pour un passage en phase clinique reste la compréhension des processus d'internalisation des nanoparticules chargées des principes actifs.

Dans les cellules, le choix du type d'internalisation dépend de la taille des NP, leurs formes et leurs charges de surface. Le mode d'internalisation peut déterminer le devenir et la localisation intracellulaire des NP. Nous pouvons donc améliorer l'effet thérapeutique en élaborant de stratégies fiables afin de contrôler, ou au moins, influencer l'absorption cellulaire [Yameen *et al.*; 2014].

I.3.6.2 Internalisation cellulaire des nanotubes de carbone (NTCs)

Le mécanisme exact d'internalisation cellulaire des NTCs n'est pas encore bien établi. Certaines publications ont montré que l'endocytose et/ou le passage passif des NTCs

pourraient être impliqués [Lacerda *et al.*; 2012, Tan *et al.*; 2011]. Nous résumons tous les modes d'internalisation des NTCs dans la (Figure I-11) ci-dessous.

Entre les voies d'internalisation possibles des NTCs, il faut signaler l'importance de la nature des groupements fonctionnels à leur surface, qu'elle soit covalente ou non. Par ailleurs, les macromolécules biologiques telles que des protéines, de l'ADN ou des anticorps sur la surface du nanotubes sont internalisés par une endocytose énergie-dépendante [Kam *et al.*; 2006, Lacerda *et al.*; 2012]. Il est probable que les macromolécules sur la surface des NTCs entravent les interactions directes NTC-membrane, rendant les tubes incapables de traverser directement la membrane plasmique. Dans ce contexte, l'interaction des molécules liées à la surface des NTCs avec les récepteurs extracellulaires qui les reconnaissent comme ligands pourraient déclencher le processus actif d'internalisation de tout le complexe NTC-molécule. Cette explication est cohérente avec une translocation membranaire directe des NTCs fonctionnalisés avec des molécules de faible poids moléculaire à travers la membrane cellulaire. Ce mécanisme passif permet la localisation directe des NTCs fonctionnalisés dans le cytoplasme et rend potentiellement les agents thérapeutiques transportés disponibles pour leurs cibles intracellulaires. [Al-Jamal *et al.*; 2011, Lacerda *et al.*; 2012].

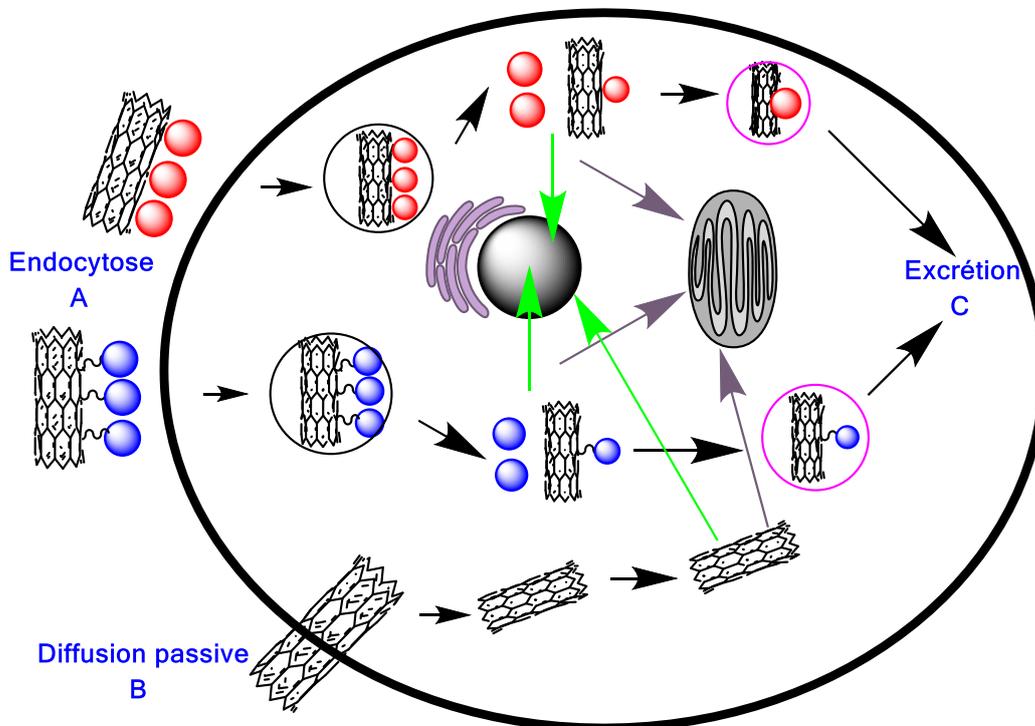


Figure I—11 Stratégies proposées pour l'internalisation cellulaire des NTCs. Le mécanisme exact n'est pas encore connu. Mais, l'endocytose (A) et la pénétration passive (B)

sont les principaux mécanismes d'internalisation cellulaire des NTCs. Suite au relargage du principe actif dans le cytoplasme, ce dernier pourrait atteindre sa cible avec quelques NTCs dans le noyau pour livrer des gènes par exemple (flèche verte), ou dans les mitochondries pour induire l'apoptose par exemple (flèche violette). A noter que l'endocytose regroupe les NTC fonctionnalisés par une molécule avec une liaison covalente (molécules bleues) ou non-covalente (molécules rouges). Les nanotubes seront excrétés quand ils auront accompli leur mission d'amener les principes actifs vers leurs cibles (C) (d'après [Tan *et al.*; 2011]).

A noter que les dimensions des NTCs ont un grand impact sur les mécanismes d'internalisation parce que les NTCs interagissent avec les cellules. Leur impact a également été confirmé dans une étude où il a été démontré que les NTCs fonctionnalisés avec des groupes carboxyles ou amides rentrent dans les cellules non phagocytaires par pénétration directe quand ils sont bien individualisés ou par endocytose énergie-dépendante lorsqu'ils sont présents en petits faisceaux [Mu *et al.*; 2009].

Par ailleurs, la longueur des NTCs, leur degré d'agrégation et le revêtement de surface pourraient être des paramètres principaux dans le changement d'un mécanisme d'internalisation des NTCs à un autre [Kang *et al.*; 2010]. A noter que le type cellulaire étudié joue également un rôle important pendant le processus d'internalisation. En effet, les cellules phagocytaires et non phagocytaires peuvent avoir des mécanismes d'internalisation différents des NTCs en raison de leur différence de fonction biologique.

I.3.7 Conclusion sur les nanotubes

Comme nous l'avons vu dans cette partie, les nanotubes de carbone (NTCs) sont très prometteurs pour révolutionner la thérapie, l'imagerie et le diagnostic de diverses maladies, grâce aux propriétés exceptionnelles qui les caractérisent, notamment leur biocompatibilité. En revanche, il est absolument nécessaire d'étudier d'autres aspects tels que la toxicité des NTCs et leur devenir dans l'organisme.

Ainsi, les possibilités illimitées des stratégies de traitement demeurent une des perspectives les plus excitantes des NTCs. Pour tout cela, nous avons choisi les nanotubes de carbone comme nanovecteur de la protéine proapoptotique d'intérêt (TRAIL).

TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) et thérapie anti-cancéreuse - Partie 3

I.4 Quelques définitions : TRAIL et apoptose

I.4.1 Apoptose (ou mort cellulaire programmée) dans le cancer

Le processus physiologique désigné par le terme *apoptose* est essentiel et primordial pour un maintien homéostatique de l'organisme tout en éliminant les cellules anormales et endommagées.

Le déclenchement de l'apoptose se fait en réponse à un signal tel que des cytokines ou un dommage d'ADN. Selon la nature du stimulus, il existe deux voies d'apoptose qui concernent la voie des *récepteurs de mort* (ou voie extrinsèque) et la voie *mitochondriale* (ou voie intrinsèque). Cependant, les anomalies de régulation de ces voies d'apoptose aboutissent à différentes pathologies telles que le cancer (dû à l'activation des onco-protéines surexprimées, comme c-Myc [Ricci *et al.*; 2004] ou Ras [Nesterov *et al.*; 2004, Wang *et al.*; 2005]), ou dans de nombreuses infections virales, par exemple par le virus de l'hépatite C [Lan *et al.*; 2008] ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) [Babu *et al.*; 2009].

Quand une cellule rentre en apoptose, plusieurs changements morphologiques apparaissent et les plus importants sont la condensation de la chromatine et du cytoplasme ainsi que le bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique. Cela aboutit à la formation de corps apoptotiques phagocytés par la suite essentiellement par des macrophages.

Les principales protéines effectrices d'apoptose sont des protéases à cystéines activées en cascade (ou *caspases*). En comparaison avec la nécrose, l'apoptose ne permet pas d'avoir une inflammation, les membranes plasmiques ne sont pas détruites et l'intégrité de la membrane est maintenue sans relargage du contenu cellulaire (Figure I-12). La cellule en apoptose expose sur le feuillet externe de la membrane plasmique de la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide présent normalement dans le feuillet interne qui rend l'externalisation du PS comme un marqueur important d'apoptose.

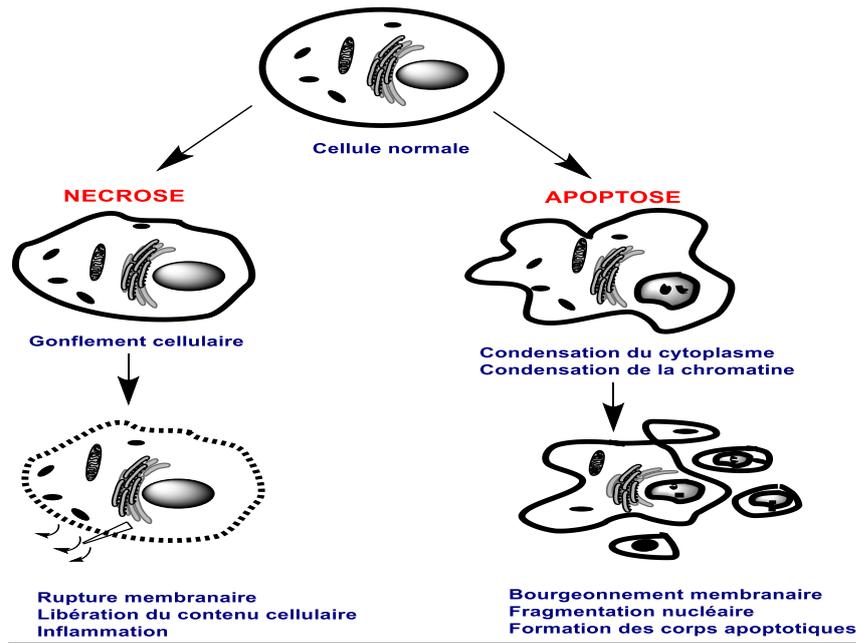


Figure I—12 Les différences morphologiques d'une cellule en apoptose ou en nécrose.

Dans certains types des cellules tumorales, l'apoptose est déclenchée par de nombreux agents chimiothérapeutiques en activant la voie mitochondriale par l'intermédiaire du suppresseur de tumeur p53 [Lee *et al.*; 2009]. Puisque la protéine p53 est mutée dans presque 50 % des tumeurs, une résistance aux traitements est obtenue [Meng *et al.*; 2000, Tomasetti *et al.*; 2006, Wu *et al.*; 1999a]. D'autres stratégies thérapeutiques sont donc à envisager. En effet, l'implication de la voie extrinsèque apoptotique (en activant surtout TRAIL-R2) pourrait être une stratégie efficace pour résoudre ce problème [Carter *et al.*; 2008, Wu *et al.*; 1999a]. Cette voie permet d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses indépendamment de p53 [Galligan *et al.*; 2005].

Différents membres de la superfamille du TNF (TNF α , FasL, TRAIL ...) sont impliqués dans la transduction du signal apoptotique par l'intermédiaire des récepteurs de mort (TRAIL-R1 et TRAIL-R2). Par rapport aux autres membres de la superfamille TNF, TRAIL est un agent thérapeutique prometteur parce qu'il induit l'apoptose des cellules tumorales sans être toxique pour les cellules saines [Kelley *et al.*; 2001, Lawrence *et al.*; 2001, Shirley *et al.*; 2011]. Ainsi, son administration est bien tolérée chez les patients [Herbst *et al.*; 2010, Micheau *et al.*; 2013, Pan *et al.*; 2011]. Cependant, des cellules cancéreuses peuvent échapper au traitement par TRAIL tout en manifestant une résistance

plus ou moins forte à ce traitement [Jacquemin *et al.*; 2012, Jacquemin *et al.*; 2010, Merino *et al.*; 2006, Micheau *et al.*; 2013, Morizot *et al.*; 2011, Soria *et al.*; 2010]. Il est donc nécessaire d'identifier les mécanismes de cette résistance afin d'améliorer l'effet thérapeutique anti-tumoral du TRAIL.

I.4.2 TRAIL et ses récepteurs : structure, expression, et fonctions

En 1995, TRAIL (ou Apo2L) a été identifié comme un membre de la superfamille des cytokines. TRAIL possède une forte homologie de son domaine extracellulaire avec les autres membres de la superfamille du TNF tels que TNF α et FasL [Wiley *et al.*; 1995]. TRAIL est une protéine transmembranaire de type II (c'est-à-dire l'extrémité C-terminale se dresse vers la face extérieure de la membrane plasmique) formée de 281 acides aminés. Au niveau de la structure, TRAIL peut avoir trois parties : un domaine d'homologie au TNF « TNF like domain » dans sa partie extracellulaire, une hélice transmembranaire et un petit domaine intracellulaire cytoplasmique. TRAIL peut être clivé par des métalloprotéases pour libérer la forme soluble de cette cytokine. Ainsi, la capacité de la forme soluble de TRAIL à induire l'apoptose est significativement inférieure à celle de la forme de TRAIL associée à la membrane [Schneider *et al.*; 1998, Shirley *et al.*; 2011, Wajant *et al.*; 2001] (Figure I-13 A). Cependant, un rôle de clivage de TRAIL a été attribué à la cathepsine E (protéase membre de la famille des peptidases A1 et exprimée dans les cellules immunitaires telles que les phagocytes), en catalysant la libération protéolytique de la forme trimérique de TRAIL soluble à la surface des cellules tumorales et en induisant aussi l'apoptose dans ces lignées tumorales [Kawakubo *et al.*; 2007]. En outre, son potentiel apoptotique varie selon l'expression des récepteurs antagonistes à TRAIL ou selon l'efficacité du clivage de TRAIL à la surface cellulaire.

Ainsi, TRAIL est une protéine homotrimérique (Figure I-13 B). Son domaine TNF like caractérisé par deux feuillets β anti-parallèles formant sa structure, et qui interagissent d'une façon tête-bêche afin de former un homotrimère [Cha *et al.*; 1999]. Sous cette conformation d'homotrimère, TRAIL est donc capable d'exercer son activité biologique. En revanche, TRAIL est le seul membre de la famille TNF, qui possède un résidu cystéine (Cys 230) permettant la liaison entre les trois monomères par un ion zinc. Le zinc n'a pas un rôle

important dans le repliement des monomères, mais il est cependant indispensable pour permettre la stabilité du trimère et l'activité biologique de TRAIL [Bodmer *et al.*; 2000, Hymowitz *et al.*; 2000]. Par conséquent, la mutation du résidu (Cys 230) permet la synthèse des monomères ou des dimères de TRAIL, mais qui sont biologiquement inactifs [Bodmer *et al.*; 2000].

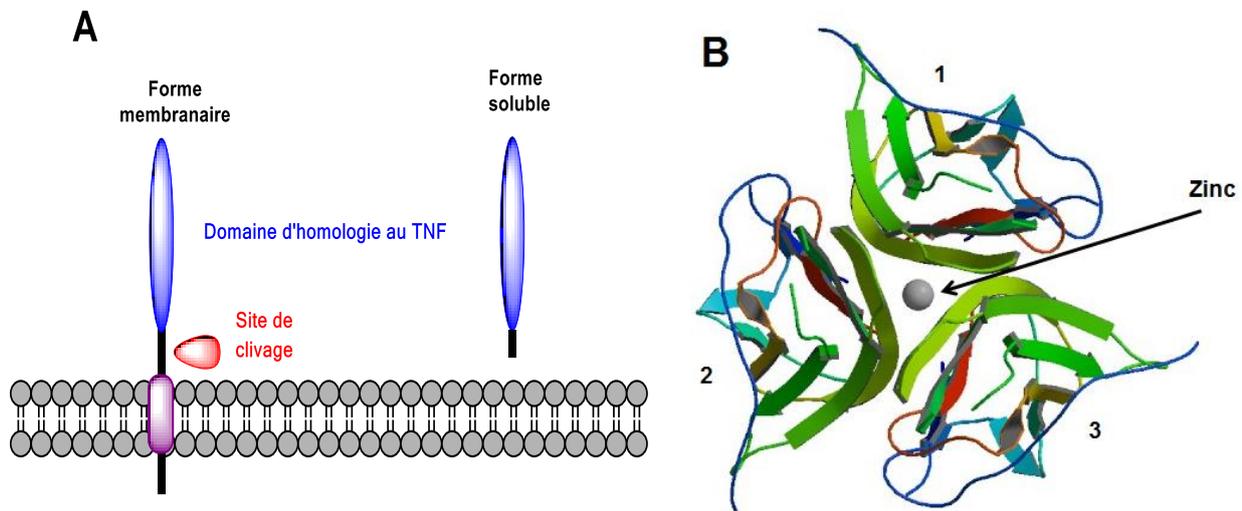


Figure I—13 Représentation schématique de TRAIL. Structures schématiques des formes membranaire et soluble de TRAIL (A). Un trimère de TRAIL avec un atome de zinc au centre. Cet atome de zinc permet la stabilisation du trimère, sa solubilité et son activité biologique. Les monomères sont numérotés de 1 à 3 (d'après [Hymowitz *et al.*; 2000]) (B).

I.4.2.1 Les récepteurs agonistes et antagonistes de TRAIL

TRAIL peut se fixer principalement sur deux types distincts de récepteurs : les récepteurs de mort ou **agonistes** (TRAIL-R1 et TRAIL-R2, nommés aussi death receptors 4 (DR4) et 5 (DR5)), et les récepteurs **antagonistes** (TRAIL-R3 et TRAIL-R4, nommés aussi Decoy Receptor 1 (DcR1) et 2 (DcR2)) [Micheau *et al.*; 2013, Morizot *et al.*; 2011, Shirley *et al.*; 2011]. De même que pour les autres récepteurs de la famille du TNF, TRAIL possède des récepteurs caractérisés dans leur partie extracellulaire par la présence de domaines riches en cystéines (CRD), spécifiques pour la liaison de TRAIL (Figure I-14). Une fois TRAIL fixé sur les récepteurs de mort, une signalisation apoptotique pourra avoir lieu par l'intermédiaire d'un domaine de mort (DD) existant dans la partie intracellulaire des récepteurs. En effet, cette signalisation aboutit à la formation du complexe d'initiation d'apoptose encore appelé DISC « Death Inducing Signaling Complex ».

En revanche, les récepteurs antagonistes n'induisent pas l'apoptose parce qu'ils ne possèdent pas un domaine de mort efficace dans leur partie intracellulaire. D'une part, DcR1 est dépourvu d'un domaine de mort et a un glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui permet l'ancrage de ce récepteur à la membrane. Ce GPI séquestre TRAIL dans les radeaux lipidiques. D'autre part, DcR2 a un DD tronqué (non fonctionnel) et inhibe l'activation des caspases initiatrices d'apoptose. [Merino *et al.*; 2006, Morizot *et al.*; 2011, Shirley *et al.*; 2011].

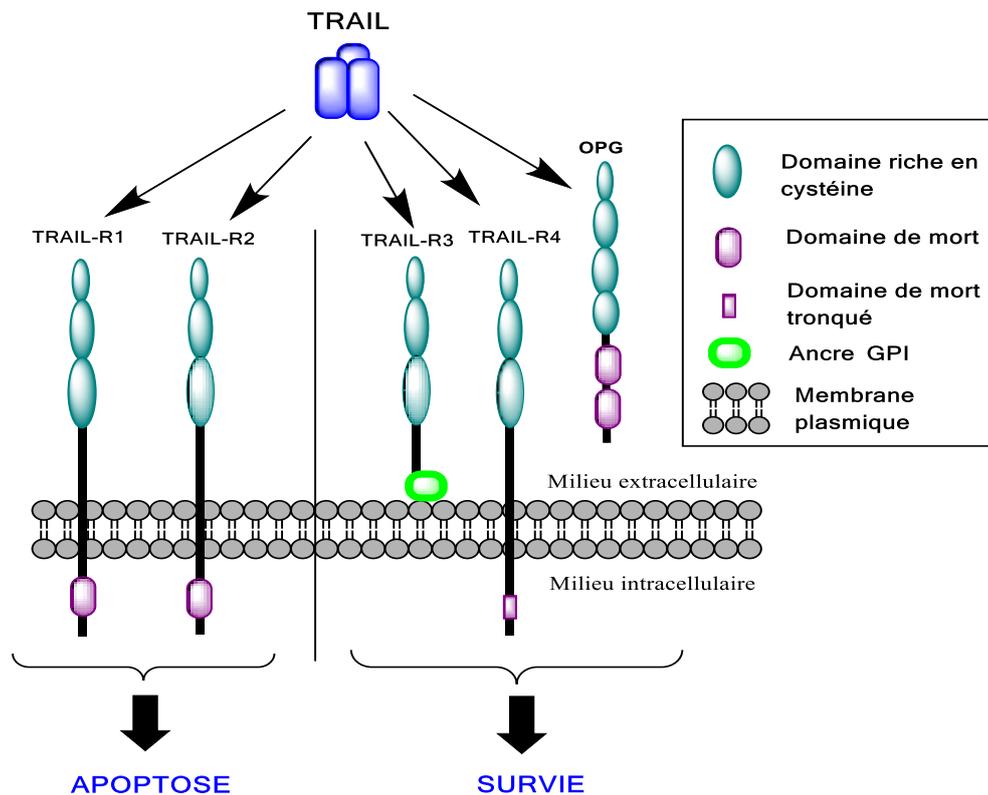


Figure I—14 Le trimère du TRAIL se fixe sur les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 qui possèdent un domaine de mort intracellulaire (DD) formé d'environ 80 acides aminés. Ceci induit une transduction de signal permettant un recrutement et une activation des différentes molécules aboutissant à l'apoptose. Par contre, la fixation du TRAIL sur les récepteurs antagonistes TRAIL-R3, TRAIL-R4 et l'ostéoprotégérine (OPG) ne permet pas d'avoir une signalisation apoptotique.

Concernant l'ostéoprotégérine (OPG), ce récepteur (membre de la superfamille de TNF), est le seul récepteur soluble de TRAIL. Contrairement aux autres récepteurs de TRAIL, ce récepteur possède quatre domaines riches en cystéines (Figure I-14), et retrouvé essentiellement sous forme de dimère lié par des ponts disulfures, mais peut avoir aussi une

forme monomérique [Emery *et al.*; 1998, Simonet *et al.*; 1997]. Il joue un rôle important dans le processus d'ostéoclastogénèse, parce qu'il rentre en compétition avec le récepteur RANK (*Receptor activator of NF- κ B*) en fixant le ligand RANKL (un autre membre des ligands de la famille du TNF) [Simonet *et al.*; 1997]. Un rôle de récepteur antagoniste lui a été attribué, mais son rôle dans la signalisation par TRAIL est très controversé. Cependant, une étude menée sur des patientes atteintes de tumeurs mammaires, a montré que les cellules stromales de la moelle osseuse, expriment l'ostéoprotégérine. Ce qui permet aux cellules tumorales mammaires de devenir résistantes à l'apoptose induite par TRAIL [Neville-Webbe *et al.*; 2004]. Nous ne parlerons donc pas d'OPG dans les chapitres suivants de cette thèse.

Chez la souris, il existe un seul récepteur agoniste, baptisé mTRAIL-R2 (mDR5 ou murine KILLER). Ce récepteur est homologue aux récepteurs agonistes humains TRAIL-R1 et TRAIL-R2, puisqu'il contient un domaine de mort (DD) capable d'induire l'apoptose [Wu *et al.*; 1999b]. Cependant, des récepteurs murins antagonistes ont été également identifiés et caractérisés (mDcR1 et 2) [Schneider *et al.*; 2003].

1.4.2.2 Expression de TRAIL et ses récepteurs

Récemment, plusieurs études ont été intéressées à analyser l'expression et la distribution tissulaire des récepteurs de TRAIL. L'analyse immuno-histochimique a montré une expression des récepteurs de TRAIL dans plusieurs tissus et cellules normales, en suggérant que la majorité des cellules peuvent fixer TRAIL [Spierings *et al.*; 2004]. Par contre, la caractérisation d'expression des récepteurs de TRAIL à la surface des cellules normales sanguines périphériques, a prouvé que l'expression de chaque type de récepteurs de TRAIL est restreinte selon les populations cellulaires : TRAIL-R1 est exprimé distinctement sur les lymphocytes B, TRAIL-R2 sur les monocytes, TRAIL-R3 sur les neutrophiles, les lymphocytes cytotoxiques CD⁸⁺ et NKT expriment d'une façon impressionnante le récepteur TRAIL-R4 [Hasegawa *et al.*; 2004]. Les lymphocytes cytotoxiques CD⁸⁺ et NKT jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire antivirale et antitumorale, ce qui pourrait expliquer leur expression du récepteur antagoniste TRAIL-R4 pour se protéger contre TRAIL malgré leur faible taux d'expression de TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Cependant, l'augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à TRAIL a été documentée suite à une manque d'expression des récepteurs antagonistes [Hasegawa *et al.*; 2004]. Cependant, les cellules qui

expriment un ou deux récepteurs antagonistes à TRAIL, ne sont pas nécessairement résistantes à TRAIL, et des cellules dépourvues en récepteurs antagonistes peuvent être résistantes à l'apoptose induite par TRAIL [LeBlanc and Ashkenazi; 2003, Mérimo; 2007]. A ce niveau, nous pouvons citer le cas des lymphocytes CD⁴⁺ : ce type cellulaire n'exprime pas des récepteurs de TRAIL et montre ainsi une résistance à l'apoptose induite par TRAIL [Hasegawa *et al.*; 2004]. Une autre étude plus récente, a montré par un modèle de microscopie en trois dimensions (3D), que les lymphocytes CD⁴⁺ n'expriment pas le récepteur TRAIL-R2, et l'expriment quand ils sont actifs. Cependant, cette étude a tiré la conclusion que les récepteurs agonistes de TRAIL sont exprimés et stockés dans le cytoplasme des cellules CD⁴⁺. Dès que ces cellules sont activées, le récepteur TRAIL-R2 est mobilisé et surexprimé à la surface cellulaire. Ce résultat suggère que les lymphocytes CD⁴⁺ sont programmés d'être éliminés par apoptose après une forte activation [Barblu and Herbeuval; 2012].

En outre, d'autres travaux sur des fibroblastes et des cellules musculaires lisses ont décrit une expression du récepteur TRAIL-R2 dans ces cellules, mais non plus TRAIL-R1. Ainsi, la machinerie anti-apoptotique qui aboutit à la résistance à l'apoptose induite par TRAIL a été trouvée dans ces deux types cellulaires. La re-sensibilisation de ces cellules à l'apoptose est possible grâce à deux stratégies, soit en bloquant les protéines anti-apoptotiques agissant au niveau mitochondrial (famille des protéines Bcl-2), soit en amont, en inhibant la protéine c-FLIP régulatrice du complexe DISC par exemple [Van Dijk *et al.*; 2013].

De plus, il n'est pas entièrement clair comment les récepteurs de TRAIL sont répandus, ou comment ces récepteurs modulent la signalisation apoptotique dans les cellules tumorales ou normales. Les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 sont largement exprimés dans les cellules tumorales, ce qui a incité l'évaluation de leurs ligands pour le traitement du cancer [Shirley *et al.*; 2011]. Concernant les récepteurs antagonistes, des travaux ont montré que les cellules cancéreuses expriment les récepteurs antagonistes de TRAIL, mais restent sensibles à TRAIL [Daniels *et al.*; 2005]. D'autres études ont corrélié l'expression membranaire du récepteur TRAIL-R4 à la résistance des cellules de *Leucémie Aigue Myéloïde* (LAM) [Riccioni *et al.*; 2005]. Ainsi, il a été démontré par Morizot et ses collaborateurs que le récepteur antagoniste TRAIL-R4 dans des états pathologiques est surexprimé dans des cellules tumorales primaires. Au niveau physiologique, TRAIL-R4 ou

DcR2 pourrait protéger les cellules sélectivement de la mort cellulaire induite par TRAIL. [Morizot *et al.*; 2011, Riccioni *et al.*; 2005].

En revanche, et sous un stimulus approprié, TRAIL est exprimé à la surface des cellules immunitaires telles que des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK) après une stimulation par le LPS, IFN- β et IFN- γ [Ehrlich *et al.*; 2003, Fanger *et al.*; 1999, Halaas *et al.*; 2000].

I.4.2.3 Rôles physiologiques de TRAIL

TRAIL joue un rôle important dans le déroulement et la régulation de la réponse immunitaire. Cette cytokine est connue physiologiquement pour induire l'apoptose. Par ailleurs, les souris déficientes pour le gène codant pour TRAIL sont viables et ne présentent pas de défauts reproductifs [Cretney *et al.*; 2002, Sedger *et al.*; 2002].

Des nombreuses études ont décrit l'implication du TRAIL dans la surveillance anti-tumorale. Les études menées dans des modèles murins ont montré que l'absence de TRAIL ou de ses récepteurs favorise l'apparition ou la croissance tumorale [Cretney *et al.*; 2002, Finnberg *et al.*; 2008, Sedger *et al.*; 2002]. Une induction chimique des fibrosarcomes a été favorisée chez la souris en absence de TRAIL [Cretney *et al.*; 2002]. Cependant, l'oncogène Myc est surexprimé dans les lymphocytes B de la souris, sous l'effet d'une ablation génétique d'un allèle du gène de récepteur mDR5. Cette ablation a été capable de déclencher une lymphomagénèse expérimentale chez la souris [Finnberg *et al.*; 2008]. Dans cette étude, un rôle anti-métastatique a été attribué à TRAIL chez la souris, puisqu'il existe une augmentation significative de la survenue de métastases des lymphomes et des carcinomes de la peau chez les souris déficientes pour le récepteur murin mDR5 [Finnberg *et al.*; 2008]. Egalement, il a été démontré par une étude menée sur des échantillons du cancer de sein chez l'homme, une corrélation entre la dérégulation de TRAIL et la présence de métastase dans le cerveau [Bos *et al.*; 2009]. Dans ce cas, TRAIL est connue comme une molécule anti-métastatique, parce que des cellules tumorales initialement résistantes à TRAIL, se re-sensibilisent à cette cytokine pendant la perte d'adhésion cellulaire. Ce processus serait expliqué par l'induction possible d'une signalisation anti-apoptotique de certaines molécules d'adhésion cellulaire [Grosse-Wilde *et al.*; 2008].

En outre, TRAIL a un impact important dans l'**auto-immunité** (capacité qu'a le système immunitaire à reconnaître d'une façon anormale les molécules du soi). A ce niveau, certains travaux ont montré que l'expression du TRAIL conduit à un affaiblissement immunitaire dans certains cas d'arthrite rhumatoïde [Song *et al.*; 2000] ou de diabète [Mi *et al.*; 2003]. Les anticorps et les cytokines sont ainsi moins produits, ce qui aboutit à une faible prolifération des lymphocytes T dirigés contre le soi.

TRAIL est également impliqué au cours des processus de défense de l'organisme contre les **maladies infectieuses** face à certains pathogènes. Par exemple, une étude a montré une re-sensibilisation des cellules résistantes à TRAIL suite à une infection par le cytomégalo virus humain. Les récepteurs de mort DR4 et DR5 sont ainsi surexprimés à la surface des cellules touchées par le virus et TRAIL cible ces cellules tout en évitant les cellules normales non infectées [Sedger *et al.*; 1999].

Ainsi, un rôle suggéré d'un **équilibre** ou activation régulatrice des cellules immunitaires est attribué au TRAIL. Ce ligand serait capable de moduler des processus participant à un maintien d'équilibre du système immunitaire comme par exemple l'élimination des neutrophiles âgés [Lum *et al.*; 2005], ce qui participe au renouvellement des cellules immunitaires.

Enfin, la fonction de TRAIL la plus importante reste sans aucune ambiguïté la **fonction antitumorale**. TRAIL est ainsi décrit comme un agent anti-tumoral par excellence *in vitro* et *in vivo*. Il possède de plus la capacité de reconnaissance des cellules cancéreuses sans incidence pour les cellules saines [Ashkenazi *et al.*; 1999, Merino *et al.*; 2006, Micheau *et al.*; 2013, Morizot *et al.*; 2011, Shirley *et al.*; 2011].

I.4.3 La signalisation apoptotique induite par TRAIL

Comme nous l'avons signalé plus haut, nous nous intéressons dans notre travail uniquement à la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque). La voie intrinsèque ou mitochondriale ne fait pas partie de nos préoccupations dans cette thèse.

Le ligand TRAIL est une protéine homotrimérique. Il se fixe sur les domaines extracellulaires riches en cystéines (CRD) de récepteurs agonistes DR4 et DR5, et aboutit à une homo- ou hétéro-trimérisation de ces derniers. A noter que dans des travaux antérieurs, le

complexe TRAIL/DR5 a été étudié et modélisé en précisant ainsi les types d'interactions entre ces deux entités [Hymowitz *et al.*; 2000].

Une transduction du signal apoptotique dans les cellules représente l'étape suivante de la trimérisation des récepteurs agonistes de TRAIL (Figure I-15). Ces récepteurs s'agrègent, et possèdent dans leur partie intracellulaire un domaine de mort (DD) qui va permettre de recruter des molécules adaptatrices FADD. Ces dernières possèdent à leur tour, un DD qui interagit avec le DD des récepteurs agonistes. Egalement, FADD possède un autre domaine appelé domaine effecteur de mort DED. Ce dernier interagit avec le DED existant sur les procaspases initiatrices 8/10 [Schneider *et al.*; 1997], et forme le complexe Death-Inducing Signalling Complex (DISC). Ensuite, dans ce complexe DISC, un auto-clivage activateur des caspases initiatrices va s'effectuer et les caspases initiatrices vont activer alors les caspases effectrices telles que la caspase-3 essentiellement. Cela aboutit finalement à l'apoptose [Mérino *et al.*; 2007].

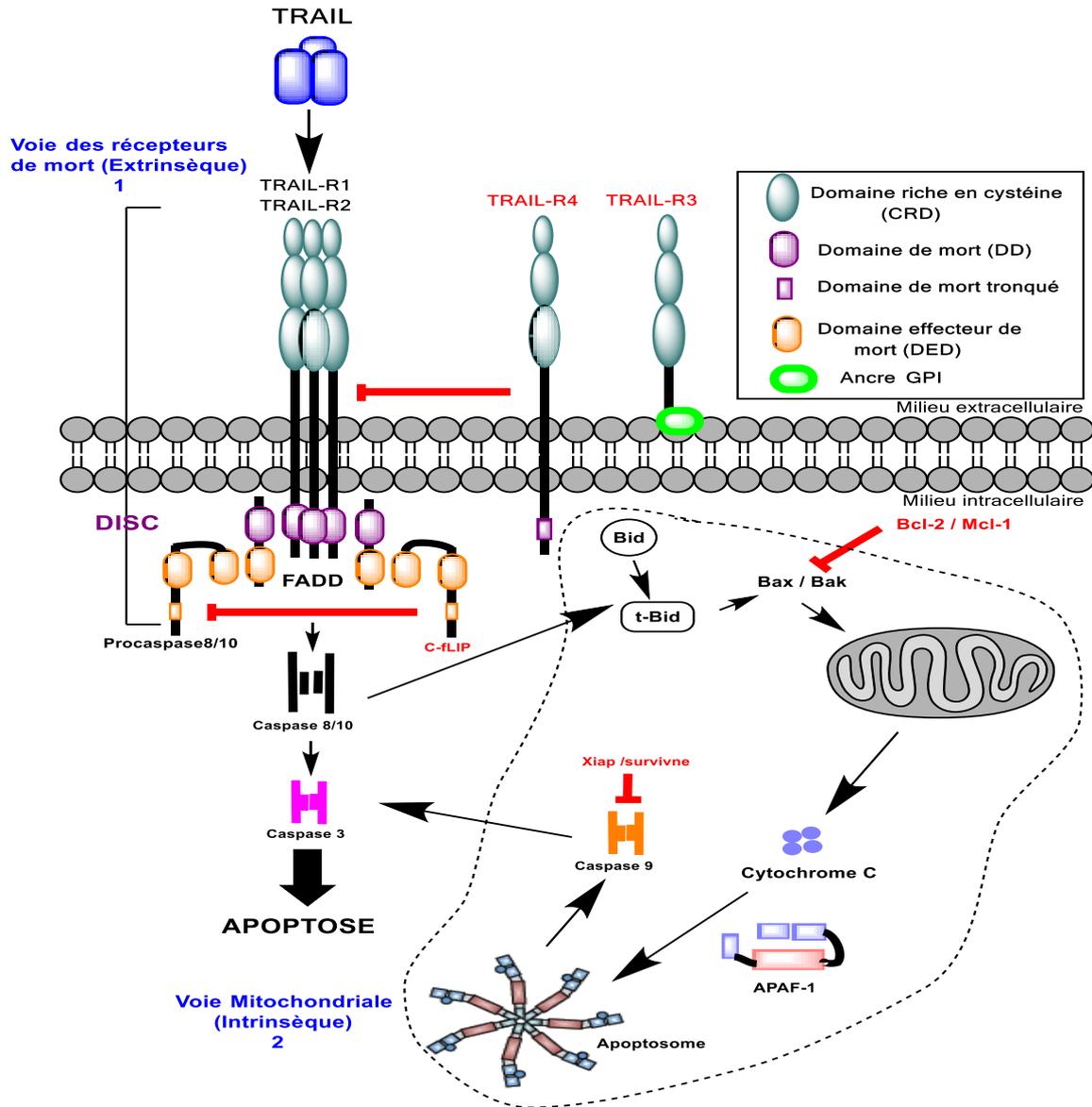


Figure I—15 TRAIL déclenche la signalisation d'apoptose par l'intermédiaire de deux voies:

1. La voie des récepteurs de mort ou extrinsèque qui a lieu suite à la fixation de TRAIL sur les récepteurs de mort TRAIL-R1 et/ou TRAILR2. Cela induit leur homo- ou hétéro-trimérisation. Ensuite, il y a une cascade d'événements : recrutement d'une molécule adaptatrice FADD par leur DD, recrutement des caspases initiateuses par leurs DED et activation des caspases effectrices telles que la caspase-3.
2. La voie mitochondriale ou intrinsèque est déclenchée par les caspases initiateuses par la protéine Bid. Les protéines Bax et Bak sont donc activées. Cela aboutit à une perméabilisation mitochondriale tout en relargant le cytochrome C dans le cytosol et la formation d'apoptosome au sein duquel la caspase-9 est activée et permet donc l'activation des caspases effectrices

Récemment, différentes *modifications post-traductionnelles* ont été décrites comme éléments essentiels pour un bon assemblage du DISC et comme initiatrice de la signalisation apoptotique par TRAIL. La *glycosylation* (réaction enzymatique permettant de lier un glucide à une chaîne de macromolécules de façon covalente) des récepteurs agonistes DR4 et DR5 est l'une des principales modifications post-traductionnelles : DR5 a été surtout cité dans une publication de l'équipe de Wagner. Ce récepteur pourrait avoir une **O-glycosylation** sur un résidu sérine ou thréonine dans sa partie extracellulaire. Ainsi, la O-glycosylation des récepteurs de mort (DR4 et DR5) est demandée pour induire leur oligomérisation suite à la fixation du TRAIL [Micheau *et al.*; 2013, Wagner *et al.*; 2007].

Cependant, DR4 est **N-glycosylé** sur un résidu asparagine [Yoshida *et al.*; 2007], mais pas DR5. Donc, nous pouvons conclure qu'il existe des modes distincts de régulation pour les DR4 et DR5, et ces deux récepteurs joueraient ainsi des rôles différents. Ceci est bien confirmé dans des travaux très récents à l'unité INSERM 866 à l'Université de Bourgogne. En effet, l'état de glycosylation des récepteurs DR4 et DR5 pourrait être considéré comme un biomarqueur de la sensibilité ou de la résistance dans la thérapie ciblée anti-cancéreuse du TRAIL.

A noter qu'il existe d'autres modalités de modifications post-traductionnelles des récepteurs agonistes, comme l'acétylation et la phosphorylation par exemple. Ces modifications représentent un intérêt certain pour la recherche scientifique pour leur impact sur les différents récepteurs de TRAIL en cancérologie mais ne font pas l'objet de ces travaux de thèse.

I.4.4 Conclusion sur les thérapies actuelles du TRAIL : nécessité de restauration et d'optimisation de la sensibilité à TRAIL

La recherche sur TRAIL est en croissance accrue ces derniers temps, et de nombreux travaux précliniques [Ganten *et al.*; 2004, Jacquemin *et al.*; 2012, Lacour *et al.*; 2003, Mérino *et al.*; 2007, Micheau *et al.*; 2013, Morizot *et al.*; 2011] ont montré les capacités thérapeutiques anti-tumorales exceptionnelles de TRAIL, due à l'innocuité de TRAIL par injection intraveineuse chez les patients. En revanche, les essais cliniques n'ont pas pu prouver une efficacité assez satisfaisante (malgré l'effet thérapeutique stabilisant de la

pathologie) de cet agent antitumoral ou des anticorps agonistes des récepteurs de TRAIL en monothérapie [Herbst *et al.*; 2010, Pan *et al.*; 2011]. Il devient donc nécessaire d'optimiser TRAIL dans les études cliniques.

D'autre part, la possibilité d'une thérapie combinatoire du TRAIL avec d'autres traitements anti-tumoraux semble être plus efficace au niveau clinique, parce que la sensibilisation de certains types de lignées cancéreuses résistantes à TRAIL est possible [Chen *et al.*; 2012, Kozloff *et al.*; 2012, Micheau *et al.*; 2013, Soria *et al.*; 2010]. Des alternatives à ces stratégies combinatoires existent également, consistant à améliorer l'efficacité pro-apoptotique de TRAIL basées sur la valence, notamment.

L'objectif principal de nos travaux a consisté à fonctionnaliser TRAIL sur des nanotubes de carbone pour mimer sa fonction membranaire, qui est de loin la plus efficace.

I.5 Références Bibliographiques

- [Aderem and Underhill; 1999] Aderem, A.; Underhill, D. M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology* **1999**, *17*, 593-623.
- [Ajayan; 1999] Ajayan, P. M., Nanotubes from Carbon. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (7), 1787–1800.
- [Al-Jamal *et al.*; 2011] Al-Jamal, K. T.; Nerl, H.; Müller, K. H.; Ali-Boucetta, H.; Li, S.; Haynes, P. D.; Jinschek, J. R.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K.; Porter, A. E., Cellular uptake mechanisms of functionalised multi-walled carbon nanotubes by 3D electron tomography imaging. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2627-2635.
- [Andrieux *et al.*; 2003] Andrieux, K.; Desmaële, D.; D'angelo, J.; Couvreur, P., Nanotechnologies and new drugs. *Actualite Chimique* **2003**, *11-12*, 135-139.
- [Aschberger *et al.*; 2010] Aschberger, K.; Johnston, H. J.; Stone, V.; Aitken, R. J.; Hankin, S. M.; Peters, S. A.; Tran, C. L.; Christensen, F. M., Review of carbon nanotubes toxicity and exposure--appraisal of human health risk assessment based on open literature. *Critical Reviews in Toxicology* **2010**, *40*, 759-790.
- [Ashkenazi *et al.*; 1999] Ashkenazi, A.; Pai, R. C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D. A.; Marsters, S. A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A. E.; Hebert, A.; DeForge, L.; Koumenis, I. L.; Lewis, D.; Harris, L.; Bussiere, J.; Koeppen, H.; Shahrokh, Z.; Schwall, R. H., Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of Clinical Investigation* **1999**, *104* (2), 155-162.
- [Avouris; 2002] Avouris, P., Carbon nanotube electronics. *Chemical physics* **2002**, *281* (2-3), 429-445.
- [Babu *et al.*; 2009] Babu, C. K.; Suwansrinon, K.; Bren, G. D.; Badley, A. D.; Rizza, S. A., HIV induces TRAIL sensitivity in hepatocytes. *PLoS One* **2009**, *4* (2), e4623.
- [Banerjee *et al.*; 2003] Banerjee, S.; Kahn, M. G. C.; Wong, S. S., Rational Chemical Strategies for Carbon Nanotube Functionalization. *The Chemistry a European Journal* **2003**, *9*, 1898-1908.
- [Barblu and Herbeuval; 2012] Barblu, L.; Herbeuval, J. P., Three-Dimensional Microscopy Characterization of Death Receptor 5 Expression by Over-Activated Human Primary CD4+ T Cells and Apoptosis. *PLoS One* **2012**, *7* (3), e32874.
- [Bethune *et al.*; 1993] Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; De Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R., Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layers walls. *Nature* **1993**, *363*, 605-607.
- [Bianco *et al.*; 2005] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (6), 674–679.
- [Boas and Heegaard; 2004] Boas, U.; Heegaard, P. M. H., Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews* **2004**, *33* (1), 43-63.
- [Bodmer *et al.*; 2000] Bodmer, J. L.; Meier, P.; Tschopp, J.; Schneider, P., Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (27), 20632-20637.
- [Bos *et al.*; 2009] Bos, P. D.; Zhang, X. H.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R. R.; Nguyen, D. X.; Minn, A. J.; van de Vijver, M. J.; Gerald, W. L.; Foekens, J. A.; Massagué, J., Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **2009**, *459* (7249), 1005-1009.

- [Bouchiat; 2007]** Bouchiat, H., Supraconductivité des nanotubes de carbone (Physique des solides, Orsay). *Article sur le site du département de Physique de l'École normale supérieure* **2007**.
- [Britz and Khlobystov; 2006]** Britz, D. A.; Khlobystov, A. N., Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 637-659.
- [Cai et al.; 2006]** Cai, W.; Shin, D. W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S. X.; Gambhir, S. S.; Chen, X., Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Letters* **2006**, *6* (4), 669-676.
- [Carter et al.; 2008]** Carter, B. Z.; Mak, D. H.; Schober, W. D.; Dietrich, M. F.; Pinilla, C.; Vassilev, L. T., Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5. *Blood* **2008**, *111* (7), 3742-3750.
- [Cha et al.; 1999]** Cha, S. S.; Kim, Y. H.; Choi, B. J.; Sung, B. J.; Shin, N. K.; Shin, H. C.; Sung, Y. C.; Oh, B. H., 2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* **1999**, *11* (2), 253-261.
- [Chen et al.; 2003]** Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Kam, N. W.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. J.; Dai, H., Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **2003**, *100* (9), 4984-4989.
- [Chen et al.; 2012]** Chen, W.; Hou, J.; Zhao, Y.; Qiu, L.; Ke, X.; Wang, Z.; Leng, Y.; Jing, H.; Xi, H.; Zheng, X.; Wang, F.; Zhu, B.; Yang, S., Circularly Permuted TRAIL (CPT) combined with Thalidomide for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: An Open-Label, Multicenter Phase II Clinical Trial In *54 th ASH annual meeting abstr 2958*, 2012.
- [Cheon and Lee; 2008]** Cheon, J.; Lee, J. H., Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (12), 1630-1640.
- [Colvin; 2003]** Colvin, V. L., The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (10), 1166-1170.
- [Cretney et al.; 2002]** Cretney, E.; Takeda, K.; Yagita, H.; Glaccum, M.; Peschon, J. J.; Smyth, M. J., Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *The Journal of Immunology* **2002**, *168*, 1356-1361.
- [Daenen et al.; 2003a]** Daenen, M.; de Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J., Purification in the wonderful world of carbon nanotubes. *Eindhoven University of Technology* **2003a**, 24-29.
- [Daenen et al.; 2003b]** Daenen, M.; De Fouw, R. D.; Hamers, B.; Janssen, P. G. A.; Schouteden, K.; Veld, M. A. J., Introduction In The wonderful world of carbon nanotubes. *Eindhoven University of Technology* **2003b**, 4.
- [Daniels et al.; 2005]** Daniels, R. A.; Turley, H.; Kimberley, F. C.; Liu, X. S.; Mongkolsapaya, J.; Ch'En, P.; Xu, X. N.; Jin, B. Q.; Pezzella, F.; Screaton, G. R., Expression of TRAIL and TRAIL receptors in normal and malignant tissues. *Cell Research* **2005**, *15* (6), 430-438.
- [De Juana and Pérez; 2013]** De Juana, A.; Pérez, E. M., Getting tubed: mechanical bond in endohedral derivatives of carbon nanotubes? *Nanoscale* **2013**, *5*, 7141-7148.
- [De La Zerda et al.; 2008]** De La Zerda, A.; Zavaleta, C.; Keren, S.; Vaithilingam, S.; Bodapati, S.; Liu, Z.; Levi, J.; Smith, B. R.; Ma, T. J.; Oralkan, O.; Cheng, Z.; Chen, X.; Dai, H.; Khuri-

- Yakub, B. T.; Gambhir, S. S., Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3*, 557-562.
- [Dresselhaus *et al.*; 2001] Dresselhaus, M. S.; Gene, D.; Phaedon, A., eds, Carbon Nanotubes : Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Springer* **2001**, 80.
- [Ebbesen and Ajayan; 1992] Ebbesen, T. W.; Ajayan, P. M., Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature* **1992**, *358*, 220-222.
- [Ehrlich *et al.*; 2003] Ehrlich, S.; Infante-Duarte, C.; Seeger, B.; Zipp, F., Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* **2003**, *24* (6), 244-253.
- [Emery *et al.*; 1998] Emery, J. G.; McDonnell, P.; Burke, M. B.; Deen, K. C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E. R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Rosenberg, M.; Lee, J. C.; Young, P. R., Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (23), 14363-14367.
- [Endo *et al.*; 2008] Endo, M.; Strano, M. S.; Ajayan, P. M., Potential Applications of Carbon Nanotubes. *Carbon Nanotubes* **2008**, *111* (13-61).
- [Fanger *et al.*; 1999] Fanger, N. A.; Maliszewski, C. R.; Schooley, K.; Griffiths, T. S., Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190* (8), 1155-1164.
- [Faraji and Wipf; 2009] Faraji, A. H.; Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (8), 2950-2962.
- [Farokhzad *et al.*; 2006] Farokhzad, O. C.; Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Richie, J. P.; Langer, R., Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (16), 6315-6320.
- [Ferrari; 2005] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (3), 161-171.
- [Filippone; 2012] Filippone, D., IBM : the next generation silicon transistors arrives. *Article sur le site web Journal du net* **2012**.
- [Finnberg *et al.*; 2008] Finnberg, N.; Klein-Szanto, A. J.; El-Deiry, W. S., TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **2008**, *118* (1), 111-123.
- [Fiorito; 2008] Fiorito, S., *Carbon Nanotubes: Angels Or Demons?* Pan Stanford Publishing: 2008; p 1-147.
- [Firme and Bandaru; 2010] Firme, C. P.; Bandaru, P. R., Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2010**, *6*, 245-256.
- [Foldvari and Bagonluri; 2008] Foldvari, M.; Bagonluri, M., Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine*. **2008**, *4* (3), 183-200.
- [Galligan *et al.*; 2005] Galligan, L.; Longley, D. B.; McEwan, M.; Wilson, T. R.; McLaughlin, K.; Johnston, P. G., Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: The roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP. *Molecular Cancer Therapeutics* **2005**, *4* (12), 2026-2036.

- [Ganten *et al.*; 2004] Ganten, T. M.; Haas, T. L.; Sykora, J.; Stahl, H.; Sprick, M. R.; Fas, S. C.; Krueger, A.; Weigand, M. A.; Grosse-Wilde, A.; Stremmel, W.; Krammer, P. H.; H., W., Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death & Differentiation* **2004**, *11 Suppl 1*, S86-96.
- [Govindaraj and Rao; 2004] Govindaraj, A.; Rao, C. N. R., Nanotubes and nanowires. *In The chemistry of nanomaterials, In Wiley* **2004**, 208-284.
- [Gregoriadis; 1976] Gregoriadis, G., Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine .1. *The New England Journal of Medicine* **1976**, *295* (13), 704-710.
- [Grosse-Wilde *et al.*; 2008] Grosse-Wilde, A.; Voloshanenko, O.; Bailey, S. L.; Longton, G. M.; Schaefer, U.; Csernok, A. I.; Schütz, G.; Greiner, E. F.; Kemp, C. J.; Walczak, H., TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. *The Journal of Clinical Investigation* **2008**, *118* (1), 100-110.
- [Halaas *et al.*; 2000] Halaas, O.; Vik, R.; Ashkenazi, A.; Espevik, T., Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *The Scandinavian Journal of Immunology* **2000**, *51* (3), 244-250.
- [Han *et al.*; 2008] Han, J. H.; Lee, E. J.; Lee, J. H.; So, K. P.; Lee, Y. H.; Bae, G. N.; Lee, S. B.; Ji, J. H.; Cho, M. H.; Yu, I. J., Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhalation Toxicology* **2008**, *20* (8), 741-749.
- [Hasegawa *et al.*; 2004] Hasegawa, H.; Yamada, Y.; Harasawa, H.; Tsuji, T.; Murata, K.; Sugahara, K.; Tsuruda, K.; Masuda, M.; Takasu, N.; Kamihira, S., Restricted expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 in human peripheral blood lymphocytes. *Cellular Immunology* **2004**, *231* ((1-2)), 1-7.
- [Herbst *et al.*; 2010] Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P. J.; Gordon, M. S.; Novotny, W.; Goldwasser, M. A.; Tohnya, T. M.; Lum, B. L.; Ashkenazi, A.; Jubb, A. M.; Mendelson, D. S., Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *The Journal of clinical Oncology* **2010**, *28* (17), 2839-2846.
- [Hirsch; 2002] Hirsch, A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1853-1859.
- [Hymowitz *et al.*; 2000] Hymowitz, S. G.; O'Connell, M. P.; Ultsch, M. H.; Hurst, A.; Totpal, K.; Ashkenazi, A.; de Vos, A. M.; Kelley, R. F., A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **2000**, *39*, 633-650.
- [Iijima; 1991] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.
- [Iijima and Ichihashi; 1993] Iijima, S.; Ichihashi, T., Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **1993**, *363*, 603-605.
- [Jacquemin *et al.*; 2010] Jacquemin, G.; Shirley, S.; Micheau, O., Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **2010**, *67* (18), 3115-3130.
- [Jacquemin *et al.*; 2012] Jacquemin, G.; Granci, V.; Gallouet, A. S.; Lalaoui, N.; Morlé, A.; Iessi, E.; Morizot, A.; Garrido, C.; Guillaudeux, T.; Micheau, O., Quercetin-mediated Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. *Haematologica* **2012**, *97*, 38-46.

- [Jia *et al.*; 2005] Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y.; Guo, X., Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39* (5), 1378-1383.
- [Johnson *et al.*; 2010] Johnson, D. R.; Methner, M. M.; Kennedy, A. J.; Steevens, J. A., Potential for occupational exposure to engineered carbon-based nanomaterials in environmental laboratory studies. *Environmental Health Perspectives* **2010** *118* (1), 49-54.
- [Journet *et al.*; 1997] Journet, C.; Maser, W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A., Large-scale production of SWNT by electric arc technique. *Nature* **1997**, *388*, 217-223.
- [Kaczmarek *et al.*; 2007] Kaczmarek, M.; Timofeeva, O. A.; Karaczyn, A.; Malyguine, A.; Kasprzak, K. S.; Salnikow, K., The role of ascorbate in the modulation of HIF-1[alpha] protein and HIFdependent transcription by chromium(VI) and nickel(II). *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *42* (8), 1246-1257.
- [Kam *et al.*; 2006] Kam, N. W.; Liu, Z.; Dai, H., Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie* **2006**, *118* (4), 591-595.
- [Kang *et al.*; 2010] Kang, B.; Chang, S.; Dai, Y.; Yu, D.; Chen, D., Cell response to carbon nanotubes: sizedependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate. *Small* **2010**, *6*, 2362-2366.
- [Kateb *et al.*; 2007] Kateb, B.; Van Handel, M.; Zhang, L.; Bronikowski, M. J.; Manohara, H.; Badie, B., Internalization of MWCNTs by microglia: possible application in immunotherapy of brain tumors. *Neuroimage* **2007**, *37*, Suppl 1:S9-S17.
- [Kawakubo *et al.*; 2007] Kawakubo, T.; Okamoto, K.; Iwata, J.; Shin, M.; Okamoto, Y.; Yasukochi, A.; Nakayama, K. I.; Kadowaki, T.; Tsukuba, T.; Yamamoto, K., Cathepsin E Prevents Tumor Growth and Metastasis by Catalyzing the Proteolytic Release of Soluble TRAIL from Tumor Cell Surface. *Cancer Research* **2007**, *67* (22), 10869-10878.
- [Kelley *et al.*; 2001] Kelley, S. K.; Harris, L. A.; Xie, D.; Deforge, L.; Totpal, K.; Bussiere, J.; Fox, J. A., Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *299* (1), 31-38.
- [Kirchhausen; 2000] Kirchhausen, T., Clathrin. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 699-727.
- [Koo *et al.*; 2005] Koo, O. M.; Rubinstein, I.; Onyuksel, H., Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. . *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, *1* (3), 193-212.
- [Kopelman *et al.*; 2005] Kopelman, R.; Lee Koo, Y. E.; Philbert, M.; Moffat, B. A.; Reddy, G. R.; McConville, P.; Hall, D. E.; Chenevert, T. L.; Bhojani, M. S.; Buck, S. M.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D., Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *The Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 404-410.
- [Kozloff *et al.*; 2012] Kozloff, M.; Messersmith, W. A.; Kapp, A. V.; Ashkenazi, A.; Royer-Joo, S.; Portera, C. C.; al., e., Phase Ib study of dulanermin combined with first-line FOLFOX plus bevacizumab (BV) in patients (Pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *The Journal of Clinical Oncology* **2012**, *30*(15s): abstr 3552.
- [Kumar; 2006] Kumar, C., ed. , Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for life science, ed. C. Kumar. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim*. **2006**, *2*.

- [Lacerda *et al.*; 2012] Lacerda, L.; Russier, J.; Pastorin, G.; Herrero, M. A.; Venturelli, E.; Dumortier, H.; Al-Jamal, K. T.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A., Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials* **2012**, *33* (11), 3334–3343.
- [Lacour *et al.*; 2003] Lacour, S.; Micheau, O.; Hammann, A.; Drouineaud, V.; Tschopp, J.; Solary, E.; Dimanche-Boitrel, M. T., Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* **2003**, *22*, 1807–1816.
- [Lan *et al.*; 2008] Lan, L.; Gorke, S.; Rau, S. J.; Zeisel, M. B.; Hildt, E.; Himmelsbach, K.; Carvajal-Yepes, M.; Huber, R.; Wakita, T.; Schmitt-Graeff, A.; Royer, C.; Blum, H. E.; Fischer, R.; Baumert, T. F., Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *The Journal of Immunology* **2008**, *181* (7), 4926-4935.
- [Lawrence *et al.*; 2001] Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; Hooley, J.; Sherwood, S.; Pai, R.; Leung, S.; Khan, L.; Gliniak, B.; Bussiere, J.; Smith, C. A.; Strom, S. S.; Kelley, S.; Fox, J. A.; Thomas, D.; Ashkenazi, A., Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine* **2001**, *7* (4), 383-385.
- [LeBlanc and Ashkenazi; 2003] LeBlanc, H. N.; Ashkenazi, A., Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation* **2003**, *10*, 66–75.
- [Lee *et al.*; 2009] Lee, D. H.; Rhee, J. G.; Lee, Y. J., Reactive oxygen species up-regulate p53 and Puma; a possible mechanism for apoptosis during combined treatment with TRAIL and wogonin. *The British Journal of Pharmacology* **2009**, *157* (7), 1189-1202.
- [Lei and Ju; 2010] Lei, J. P.; Ju, H. X., Nanotubes in biosensing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, *2* (5), 496–509.
- [Li *et al.*; 2004] Li, L. Y.; Wartchow, C. A.; Danthi, S. N.; Shen, Z. M.; Dechene, N.; Pease, J., A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-FLK-1 antibody coated Y-90-labeled nanoparticles. *The International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2004**, *58* (4), 1215-1227.
- [Lin *et al.*; 2004] Lin, Y.; Taylor, S.; Li, H.; Fernando, K. A. S.; Qu, L.; Wang, W.; Gu, L.; Zhou, B.; Sun, Y. P., Advances toward bioapplications of carbon nanotubes *The Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14*, 527-541.
- [Liu *et al.*; 2005] Liu, S. Q.; Tong, Y. W.; Yang, Y. Y., Incorporation and in vitro release of doxorubicin in thermally sensitive micelles made from poly(N-isopropylacrylamide)-*Bibliographie-225-co* N,N-dimethylacrylamide)-*b*-poly(D,L-lactide -co-glycolide) with varying compositions. *Biomaterials* **2005**, *26* (24), 5064-5074.
- [Liu *et al.*; 2008] Liu, Z.; Chen, K.; Davis, C.; Sherlock, S.; Cao, Q.; Chen, X.; Dai, H., Drug Delivery with Carbon Nanotubes for In vivo Cancer Treatment *Cancer Research* **2008**, *68* (16), 6652-6660.
- [Lum *et al.*; 2005] Lum, J. J.; Bren, G.; McClure, R.; Badley, A. D., Elimination of senescent neutrophils by TNF-related apoptosis-inducing [corrected] ligand. *The Journal of Immunology* **2005**, *175* (2), 1232-1238.
- [Maser *et al.*; 1998] Maser, W. K.; Munoz, E.; Benito, A. M.; Martinez, M. T.; de la Fuente, G. F.; Maniette, Y.; Anglaret, E.; Sauvajol, J.-L., Production of high-density single-walled nanotube material by a simple laser-ablation method. *Chemical Physics Letters* **1998**, *292*, 587-593.

- [Maynard *et al.*; 2004] Maynard, A. D.; Baron, P. A.; Foley, M.; Shvedova, A. A.; Kisin, E. R.; Castranova, V., Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *The Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2004**, 67 (1), 87-107.
- [Mazzuckelli *et al.*; 2007] Mazzuckelli, L. F.; Methner, M. M.; Birch, M. E.; Evans, D. E.; Ku, B. K.; Crouch, K.; Hoover, M. D., Identification and Characterization of Potential Sources of Worker Exposure to Carbon Nanofibers During Polymer Composite Laboratory Operations. *The Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **2007** 4(12), D125-D130.
- [McDevitt *et al.*; 2007] McDevitt, M. R.; Chattopadhyay, D.; Kappel, B. J.; Jaggi, J. S.; Schiffman, S. R.; Antczak, C.; Njardarson, J. T.; Brentjens, R.; Scheinberg, D. A., Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *The Journal of Nuclear Medicine* **2007**, 48 (7), 1180-1189.
- [McNeeley *et al.*; 2007] McNeeley, K. M.; Annapragada, A.; Bellamkonda, R. V., Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma. *Nanotechnology*, **2007**, 18 (38), 385101-385112.
- [Meng *et al.*; 2000] Meng, R. D.; McDonald, E. R. r.; Sheikh, M. S.; Fornace, A. J. J.; El-Deiry, W. S., The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAILR4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Molecular Therapy* **2000**, 1 (2), 130-144.
- [Merino *et al.*; 2006] Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O., Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular & Cellular Biology* **2006**, 26, 7046-7055.
- [Mérino; 2007]Mérino, D. Résistance des cellules cancéreuses à la mort induite par TRAIL: rôle des récepteurs leurres. Thèse de doctorat-Université de Bourgogne, 2007.
- [Mérino *et al.*; 2007] Mérino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Solary, E.; Micheau, O., TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2007**, 11 (10), 1299-1314.
- [Mi *et al.*; 2003] Mi, Q. S.; Ly, D.; Lamhamedi-Cherradi, S. E.; Salojin, K. V.; Zhou, L.; Grattan, M.; Meagher, C.; Zucker, P.; Chen, Y. H.; Nagle, J.; Taub, D.; Delovitch, T. L., Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* **2003**, 52 (8), 1967-1975.
- [Micheau *et al.*; 2013] Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F., Death receptors as targets in cancer. *The British Journal of Pharmacology* **2013**, 169 (8), 1723-1744.
- [Moghimi *et al.*; 2001] Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C., Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* **2001**, 53 (2), 283-318.
- [Moghimi and Szebeni; 2003] Moghimi, S. M.; Szebeni, J., Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research* **2003**, 42 (6), 463-478.
- [Morizot *et al.*; 2011] Morizot, A.; Merino, D.; Lalaoui, N.; Jacquemin, G.; Granci, V.; Iessi, E.; Lanneau, D.; Bouyer, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; Saas, P.; Garrido, C.; Micheau, O., Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death & Differentiation* **2011**, 18 (4), 700-711.
- [Mu *et al.*; 2009] Mu, Q.; Broughton, D. L.; Yan, B., Endosomal leakage and nuclear translocation of multiwalled carbon nanotubes: developing a model for cell uptake. *Nano Letters* **2009**, 9, 4370-4375.

- [Mueller and Nowack; 2008] Mueller, N. C.; Nowack, B., Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42* (12), 4447–4453.
- [Mühlfeld *et al.*; 2008] Mühlfeld, C.; Gehr, P.; Rothen-Rutishauser, B., Translocation and cellular entering mechanisms of nanoparticles in the respiratory tract. *Swiss Medical Weekly* **2008**, *138* (27-28), 387-391.
- [Muller *et al.*; 2005] Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J. F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D., Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2005**, *207* (3), 221-231.
- [Narita *et al.*; 2009] Narita, N.; Kobayashi, Y.; Nakamura, H.; Maeda, K.; Ishihara, A.; Mizoguchi, T.; Usui, Y.; Aoki, K.; Simizu, M.; Kato, H.; Ozawa, H.; Udagawa, N.; Endo, M.; Takahashi, N.; Saito, N., Multiwalled Carbon Nanotubes Specifically Inhibit Osteoclast Differentiation and Function. *Nano Letters* **2009**, *9* (4), 1406–1413.
- [Nerl *et al.*; 2011] Nerl, H. C.; Cheng, C.; Goode, A. E.; Bergin, S. D.; Lich, B.; Gass, M.; Porter, A. E., Imaging methods for determining uptake and toxicity of carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Nanomedicine* **2011**, *6* (5), 849-865.
- [Nesterov *et al.*; 2004] Nesterov, A.; Nikrad, M.; Johnson, T.; Kraft, A. S., Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Research* **2004**, *64* (11), 3922-3927.
- [Neville-Webbe *et al.*; 2004] Neville-Webbe, H. L.; Cross, N. A.; Eaton, C. L.; Nyambo, R.; Evans, C. A.; Coleman, R. E.; Holen, I., Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Research and Treatment* **2004**, *86* (3), 269-279.
- [Nikolaev *et al.*; 1999] Nikolaev, P.; Bronikowski, M. J.; Bradley, R. K.; Rohmund, F.; Colbert, D. T.; Smith, K. A.; Smalley, R. E., Gasphase catalytic growth of single-walled carbon nanotubes from carbon monoxide. *Chemical physics letters* **1999**, *313*, 91-97.
- [Niosh; 2010] Niosh, occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers. *Draft current intelligence bulletin occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers*. Cincinnati, OH: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational safety and Health. DHHS (NIOSH), NIOSH Docket; Number: NIOSH 161-A; Available at <http://www.cdc.gov/niosh/docket/review/docket161A/>. Accessed 21 June 2011. **2010**.
- [Oh *et al.*; 2008] Oh, J. K.; Drumrighta, R.; Siegartb, D. J.; Matyjaszewski, K., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33* (4), 448-477.
- [Oishi *et al.*; 2006] Oishi, M.; Kataoka, K.; Nagasaki, Y., pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17* (3), 677-688.
- [Pan *et al.*; 2011] Pan, Y.; Xu, R.; Peach, M.; Huang, C. P.; Branstette, D.; Novotny, W.; Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Holland, P. M., Evaluation of pharmacodynamic biomarkers in a Phase 1a trial of dulanermin (rhApo2L/TRAIL) in patients with advanced tumours. *The British Journal of Cancer* **2011**, *105* (12), 1830-1838.
- [Pantarotto *et al.*; 2003] Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J. P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Immunization with peptide-functionalized

- carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry and Biology* **2003**, *10*, 961-66.
- [Peltier et al.; 2006]** Peltier, S.; Oger, J. M.; Lagarce, F.; Couet, W.; Benoît, J. P., Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23* (6), 1243-1250.
- [Pinto-Alphandary et al.; 2000]** Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A.; Couvreur, P., Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *The International Journal of Antimicrobial Agents* **2000**, *13* (3), 155-168.
- [Podesta et al.; 2009]** Podesta, J. E.; Al-Jamal, K. T.; Herrero, M. A.; Tian, B.; Ali-Boucetta, H.; Hegde, V.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K., Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. *Small* **2009**, *10*, 1176-1185.
- [Rabinovitch; 1995]** Rabinovitch, M., Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology* **1995**, *5* (3), 85-87.
- [Ren et al.; 1998]** Ren, Z. F.; Huang, Z. P.; Xu, J. W.; Wang, J. H.; Bush, P.; Siegal, M. P., Provencio, P. N., Synthesis of large arrays of well-aligned carbon nanotubes on Glass. *Science* **1998**, *282*, 1105-1107.
- [Ricci et al.; 2004]** Ricci, M. S.; Jin, Z.; Dews, M.; Yu, D.; Thomas-Tikhonenko, A.; Dicker, D. T.; El-Deiry, W. S., Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, *24*, 8541-8555.
- [Riccioni et al.; 2005]** Riccioni, R.; Pasquini, L.; Mariani, G.; Saulle, E.; Rossini, A.; Diverio, D.; Pelosi, E.; Vitale, A.; Chierichini, A.; Cedrone, M.; Foà, R.; Lo Coco, F.; Peschle, C.; Testa, U., TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* **2005**, *90* (5), 612-624.
- [Saito et al.; 2014]** Saito, N.; Haniu, H.; Usui, Y.; Aoki, K.; Hara, K.; Takanashi, S.; Shimizu, M.; Narita, N.; Okamoto, M.; Kobayashi, S.; Nomura, H.; Kato, H.; Nishimura, N.; Taruta, S.; Endo, M., Safe Clinical Use of Carbon Nanotubes as Innovative Biomaterials. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (11), 6040-6079.
- [Sawant et al.; 2006]** Sawant, R. M.; Hurley, J. P.; Salmaso, S.; Kale, A.; Tolcheva, E.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P., "SMART" drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17* (4), 943-949.
- [Schneider et al.; 1997]** Schneider, P.; Thome, M.; K., B.; Bodmer, J. L.; Hofmann, K.; Kataoka, T.; Holler, N.; Tschopp, J., TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* **1997**, *7* (6), 831-836.
- [Schneider et al.; 1998]** Schneider, P.; Holler, N.; Bodmer, J. L.; Hahne, M.; Frei, K.; Fontana, A.; Tschopp, J., Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity. *The Journal of Experimental Medicine* **1998**, *187* (8), 1205-1213.
- [Schneider et al.; 2003]** Schneider, P.; Olson, D.; Tardivel, A.; Browning, B.; Lugovskoy, A.; Gong, D.; Dobles, M.; Hertig, S.; Hofmann, K.; Van Vlijmen, H.; Hsu, Y. M.; Burkly, L. C.; Tschopp, J.; Zheng, T. S., Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (7), 5444-5454.

- [Schroeder *et al.*; 2007] Schroeder, J. E.; Shweky, I.; Shmeeda, H.; Banin, U.; Gabizon, A., Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2007**, *124* ((1-2)), 28-34.
- [Sedger *et al.*; 1999] Sedger, L. M.; Shows, D. M.; Blanton, R. A.; Peschon, J. J.; Goodwin, R. G.; Cosman, D.; Wiley, S. R., IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *Journal of Immunology* **1999**, *163* (2), 920-926.
- [Sedger *et al.*; 2002] Sedger, L. M.; Glaccum, M. B.; Schuh, J. C.; Kanaly, S. T.; Williamson, E.; Kayagaki, N.; Yun, T.; Smolak, P.; Le, T.; Goodwin, R.; Gliniak, B., Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *The European Journal of Immunology* **2002**, *32* (8), 2246-2254.
- [Shirley *et al.*; 2011] Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O., Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **2011**, *6* (3), 311-323.
- [Simonet *et al.*; 1997] Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M. S.; Lüthy, R.; Nguyen, H. Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; Shimamoto, G.; DeRose, M.; Elliott, R.; Colombero, A.; Tan, H. L.; Trail, G.; Sullivan, J.; Davy, E.; Bucay, N.; Renshaw-Gegg, L.; Hughes, T. M.; Hill, D.; Pattison, W.; Campbell, P.; Sander, S.; Van, G.; Tarpley, J.; Derby, P.; Lee, R.; Boyle, W. J., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **1997**, *89* (2), 309-319.
- [Snyder-Talkington *et al.*; 2012] Snyder-Talkington, B. N.; Qian, Y.; Castranova, V.; Guo, N. L., New perspectives for in vitro risk assessment of multiwalled carbon nanotubes: application of coculture and bioinformatics. *The Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B Critical Reviews* **2012**, *15* (7), 468-492.
- [Song *et al.*; 2000] Song, K.; Chen, Y.; Göke, R.; Wilmen, A.; Seidel, C.; Göke, A.; Hilliard, B.; Chen, Y., Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *The Journal of Experimental Medicine* **2000**, *191* (7), 1095-1104.
- [Soria *et al.*; 2010] Soria, J. C.; Smit, E.; Khayat, D.; Besse, B.; Yang, X.; Hsu, C. P.; Reese, D.; Wizek, J.; Blackhall, F., Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *The Journal of clinical Oncology* **2010**, *28* (9), 1527-1533.
- [Sozykin and Beskachko; 2013] Sozykin, S. A.; Beskachko, V. P., Structure of endohedral complexes of carbon nanotubes encapsulated with lithium and sodium. *Molecular Physics* **2013**, *111*, 930-938.
- [Spierings *et al.*; 2004] Spierings, D. C.; De Vries, E. G.; Vellenga, E.; Van den Heuvel, F. A.; Koornstra, J. J.; Wesseling, J.; Hollema, H.; De Jong, S., Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2004**, *52* (6), 821-831.
- [Steinman *et al.*; 1983] Steinman, R. M.; Mellman, I. S.; Muller, W. A.; Cohn, Z. A., Endocytosis and the Recycling of Plasma Membrane. *The Journal of Cellular Biology* **1983**, *96* (1), 1-27.
- [Takeda *et al.*; 2007] Takeda, S.; Ozaki, H.; Hattori, S.; Ishii, A.; Kida, H.; Mukasa, K., Detection of influenza virus hemagglutinin with randomly immobilized anti-hemagglutinin antibody on a carbon nanotube sensor. *The Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2007**, *7*, 752-756.

- [Tan *et al.*; 2011] Tan, A.; Yildirimer, L.; Rajadas, J.; De La Peña, H.; Pastorin, G.; Seifalian, A., Quantum Dots and Carbon Nanotubes in Oncology. A Review on Emerging Theranostic Applications in Nanomedicine. *Nanomedicine* **2011**, *6* (6), 1101-1114.
- [Tasis *et al.*; 2006] Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M., Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical reviews* **2006**, *106*, 1105-1136.
- [Tomasetti *et al.*; 2006] Tomasetti, M.; Andera, L.; Alleva, R.; Borghi, B.; Neuzil, J.; Procopio, A., Alpha-tocopheryl succinate induces DR4 and DR5 expression by a p53-dependent route: Implication for sensitisation of resistant cancer cells to TRAIL apoptosis. *FEBS Letters* **2006**, *580* (8), 1925-1931.
- [Torchilin; 2006] Torchilin, V. P., Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2006**, *58* (14), 1532-1555.
- [Van der Zande *et al.*; 2011] Van der Zande, M.; Junker, R.; Walboomers, X. F.; Jansen, J. A., Carbon nanotubes in animal models: a systematic review on toxic potential. *Tissue Engineering Part B Reviews* **2011**, *17* (1), 57-69.
- [Van Dijk *et al.*; 2013] Van Dijk, M.; Halpin-McCormick, A.; Sessler, T.; Samali, A.; Szegezdi, E., Resistance to TRAIL in non-transformed cells is due to multiple redundant pathways. *Cell Death and Disease* **2013**, *4*, e702.
- [Venkatesan and Kim; 2010] Venkatesan, J.; Kim, S. K., Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Marine Drugs* **2010**, *8* (8), 2252-2266.
- [Vinogradov *et al.*; 2002] Vinogradov, S. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, A. V., Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. . *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (1), 135-147.
- [Wagner *et al.*; 2007] Wagner, K. W.; Punnoose, E. A.; Januario, T.; Lawrence, D. A.; Pitti, R. M.; Lancaster, K.; Lee, D.; Von Goetz, M.; Yee, S. F.; Totpal, K.; Huw, L.; Katta, V.; Cavet, G.; Hymowitz, S. G.; Amler, L.; Ashkenazi, A., Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine* **2007**, *13* (9), 1070-1077.
- [Wajant *et al.*; 2001] Wajant, H.; Moosmayer, D.; Wüest, T.; Bartke, T.; Gerlach, E.; Schönherr, U.; Peters, N.; Scheurich, P.; Pfizenmaier, K., Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigendirected activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **2001**, *20* (30), 4101-4106.
- [Wang *et al.*; 2005] Wang, Y.; Quon, K. C.; Knee, D. A.; Nesterov, A.; Kraft, A. S., RAS, MYC, and sensitivity to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Research* **2005**, *65* (4), 1615-1616; author reply 1616-1617.
- [Wang *et al.*; 2004] Wang, Z.; Zhao, Y.; Tait, K.; Liao, X.; Schiferl, D.; Zha, C.; Downs, R. T.; Qian, J.; Zhu, Y.; Shen, T., A quenchable superhard carbon phase synthesized by cold compression of carbon nanotubes. *PNAS Journal* **2004**, *101* (38), 13699-13702.
- [Warheit *et al.*; 2004] Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A.; Webb, T. R., Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences* **2004**, *77* (1), 117-125.
- [Wick *et al.*; 2007] Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L. K.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. J.; Bruinink, A., The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity *Toxicological Letters* **2007**, *168* (2), 121-131.

- [Wiley *et al.*; 1995] Wiley, S. R.; Schooley, K.; Smolak, P. J.; Din, W. S.; Huang, C. P.; Nicholl, J. K.; Sutherland, G. R.; Smith, T. D.; Rauch, C.; Smith, C. A., Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **1995**, *3* (3), 673-682.
- [Wilson and Patterson; 2008] Wilson, B. C.; Patterson, M. S., The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Medicine and Biology* **2008**, *53* (9), R61-R109.
- [Wissing *et al.*; 2004] Wissing, S. A.; Kayser, O.; Muller, R. H., Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (9), 1257-1272.
- [Wong *et al.*; 2007] Wong, H. L.; Bendayan, R.; Rauth, A. M.; Li, Y.; Wu, X. Y., Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews* **2007**, *59* (6), 491-504.
- [Wu *et al.*; 1999a] Wu, G. S.; Burns, T. F.; McDonald, E. R. r.; Meng, R. D.; Kao, G.; Muschel, R.; Yen, T.; El-Deiry, W. S., Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **1999a**, *18* (47), 6411-6418.
- [Wu *et al.*; 1999b] Wu, G. S.; Burns, T. F.; Zhan, Y.; Alnemri, E. S.; El-Deiry, W. S., Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Research* **1999b**, *59* (12), 2770-2775.
- [Wust *et al.*; 2006] Wust, P.; Gneveckow, U.; Johannsen, M.; Böhmer, D.; Henkel, T.; Kahmann, F.; Sehouli, J.; Felix, R.; Ricke, J.; Jordan, A., Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy - feasibility, tolerance and achieved temperatures. *The International Journal of Hyperthermia* **2006**, *22* (8), 673-685.
- [Yacaman *et al.*; 1993] Yacaman, M. J.; Yoshida, M. M.; Rendon, L.; Santiesteban, J. G., Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Applied Physics Letters* **1993**, *62* (2), 202-204.
- [Yameen *et al.*; 2014] Yameen, B.; Choi, W. I.; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C., Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *The Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 485-499.
- [Yang *et al.*; 2008] Yang, J.; Lima, E. K.; Leeb, H. J.; Parka, J.; Leeb, S. C.; Leec, K.; Yoond, H. G.; Suhe, J. S.; Huhe, Y. M.; Haama, S., Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials* **2008**, *29* (16), 2548-2555.
- [Yoshida *et al.*; 2007] Yoshida, T.; Shiraishi, T.; Horinaka, M.; Wakada, M.; Sakai, T., Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncology Reports* **2007**, *18* (5), 1239-1242.
- [Yudasaka *et al.*; 1999] Yudasaka, M.; Yamada, R.; Sensui, N.; Wilkins, T.; Ichihashi, T.; Iijima, S., Mechanism of the effect of NiCo, Ni and Co catalysts on the yield of single-wall carbon nanotubes by pulsed Nd: YAG laser ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 6224-6229.
- [Zakaria *et al.*; 2015] Zakaria, A. B.; Picaud, F.; Rattier, T.; Pudlo, M.; Saviot, L.; Chassagnon, R.; Lherminier, J.; Gharbi, T.; Micheau, O.; Herlem, G., Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing. *Nano Letters* **2015**, *15* (2), 891-895.
- [Zhang *et al.*; 2009] Zhang, X.; Meng, L.; Lu, Q.; Fei, Z.; Dyson, P. J., Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6041-6047.

Chapitre II : Fonctionnalisation et caractérisation des SWCNTs avec le PSE et TRAIL

Table des matières

II.1 LA FONCTIONNALISATION DES NTCs.....	86
<i>II.1.1 Défauts des NTCs</i>	<i>86</i>
<i>II.1.2 Méthodes de fonctionnalisation des SWCNTs.....</i>	<i>88</i>
II.1.2.1 La fonctionnalisation covalente des SWCNTs.....	88
II.1.2.2 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs.....	89
II.1.2.3 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs par des pyrènes.....	91
II.2 LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES NTCs FONCTIONNALISES.....	92
<i>II.2.1 Microscopie électronique</i>	<i>92</i>
<i>II.2.2 Infra-rouge</i>	<i>94</i>
<i>II.2.3 RAMAN</i>	<i>94</i>
<i>II.2.4 XPS</i>	<i>96</i>
II.3 RESULTATS - PARTIE1	96
<i>II.3.1 Résultats obtenus</i>	<i>96</i>
<i>II.3.2 Les résultats expérimentaux : Imagerie STEM.....</i>	<i>98</i>
<i>II.3.3 Les résultats expérimentaux : Analyses Spectroscopiques.....</i>	<i>100</i>
II.3.3.1 Spectroscopie RAMAN.....	100
II.3.3.2 Spectroscopie Infra-rouge (IR).....	102
II.3.3.3 Spectroscopie XPS	104
<i>II.3.4 Les résultats théoriques</i>	<i>105</i>
<i>II.3.5 Discussion des résultats expérimentaux et théoriques</i>	<i>108</i>
II.4 RESULTATS - PARTIE2	111
<i>II.4.1 Description du nanovecteur NPT.....</i>	<i>111</i>
<i>II.4.2 Caractérisation du nanovecteur NPT</i>	<i>112</i>
II.5 CONCLUSION	114
II.6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116

Abréviations

BF	Bright field
DF	Dark field
DFT	Density Functional Theory
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
EDS	Energy dispersive X-ray spectrometry
ELF	Electron localization function
HOMO	Highest occupied molecular orbital
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
STEM	Scanning transmission electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy

II.1 La fonctionnalisation des NTCs

II.1.1 Défauts des NTCs

Depuis la découverte des nanotubes de carbone, leur fonctionnalisation représente une discipline de plus en plus active pour les chercheurs. L'intérêt pour ces nanomatériaux s'est vu amplifié lorsque leur solubilité (notamment en milieu aqueux) a connu des améliorations sans précédent [Rajter and French; 2010, Wang; 2009]. Nous pouvons ainsi les affecter à différentes applications par une « simple » modification chimique de surface et donc élargir les perspectives de leurs champs d'applications [Balasubramanian and Burghard; 2005].

La fonctionnalisation des NTCs est facilitée grâce aux défauts qui existent aux extrémités des nanotubes et sur leurs parois. Les deux types de défauts des NTCs les plus fréquents sont représentés sur la (Figure II-1). Ils sont caractérisés soit par des vides atomiques (ou lacunes) dans l'arrangement périodique hexagonal, soit par des défauts dits de Stone-Wales représentés par un réarrangement des atomes de carbone pour former des pentagones ou des heptagones à la place des hexagones

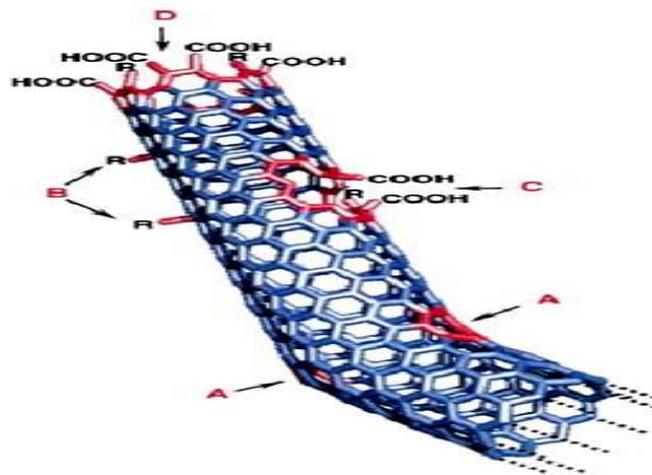


Figure II—1 Les défauts présents aux extrémités et sur la paroi des NTCs (d'après le site web (<http://slideplayer.fr/slide/503115/>)).

En effet, dans ces conditions, l'hybridation des atomes de carbone autour des défauts est changée pour passer en hybridation sp^3 où la quatrième liaison se crée en général avec un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle (-OH). Ainsi, les liaisons carbone-carbone

prennent alors un état d'hybridation mixte sp^2 - sp^3 puisque comme nous l'avons dit dans le chapitre 1 (paragraphe 1.3.1.1), les NTCs sont formés normalement d'hexagones de carbone hybridé en sp^2 . Ce changement d'état d'hybridation entraîne une courbure de la paroi des nanotubes et permet une forte réactivité chimique de surface des NTCs sur la paroi, majoritairement sur les extrémités et les défauts.

A noter que d'autres types de défauts sont très utiles et avantageux pour la fonctionnalisation des NTCs. Prenons l'exemple d'une réaction d'oxydation aboutissant à des trous dans la paroi des NTCs. Un groupement carboxyle (-COOH) est donc porté sur les atomes de carbone environnants. Le premier greffage avec des fonctions chimiques sur les nanotubes de carbone mono paroi (SWCNTs) a eu lieu en 1998 par la réaction entre les fonctions carboxyliques actives sur les NTCs oxydés et les amines. Cette réaction a permis la création de liaisons amides qui ont rendu solubles des NTCs dans les solvants organiques [Chen *et al.*; 1998].

En outre, la fonctionnalisation des NTCs avec des acides forts à une haute température, permet d'avoir un raccourcissement des nanotubes [Liu *et al.*; 1998] et donc des défauts structurels munis des changements des propriétés et des caractéristiques des NTCs [Riggs *et al.*; 2000].

Parmi les NTCs, les nanotubes de carbone mono parois (SWCNTs) sont les nanotubes que nous avons choisis afin d'effectuer les différents tests mentionnés à la suite de ce chapitre, pour les raisons suivantes. Ils ont une simple géométrie et présentent les meilleures contraintes mécaniques géométriques. Ils peuvent être tordus, aplatis et pliés sans que leur squelette de carbone soit rompu. Leur fonctionnalisation est régie par la chimie de surface comprenant à la fois le plan du graphène de la paroi latérale des SWCNTs et la fermeture aux extrémités. En réalité, ces deux régions distinctes contiennent des défauts formés lors de la synthèse de SWCNTs, surtout les défauts de type Stone-Wales qui favorisent leur modification chimique [Yang *et al.*; 2013b]. Les principales étapes sont limitées principalement à l'ouverture des capsules du tube et à la formation de groupes fonctionnels sur des sites de défauts le long des parois latérales. Les SWCNTs fonctionnalisés résultant par ces voies conservent leurs propriétés électroniques et mécaniques vierges [Sun *et al.*; 2008].

II.1.2 Méthodes de fonctionnalisation des SWCNTs

Les SWCNTs se caractérisent par différentes propriétés intéressantes. Ce sont les interactions de type *Van der Waals* sur les parois des SWCNTs et la présence d'une cavité interne et d'une chaîne carbonée très réactives. Cependant, la fonctionnalisation de SWCNTs est classée en deux grandes catégories : la fonctionnalisation chimique par des méthodes covalentes et la fonctionnalisation non-covalente par l'intermédiaire des méthodes physiques, en fonction des interactions entre les NTCs impliqués et les molécules actives [Karousis and Tagmatarchis; 2010]. Cependant, la fonctionnalisation des SWCNTs peut-être représentée dans la (Figure II-2) ci-dessous.

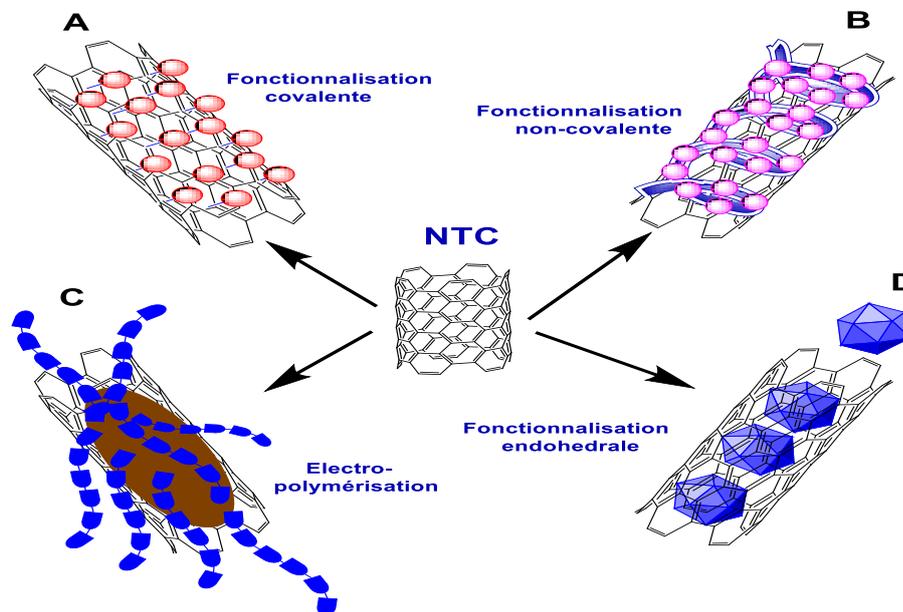


Figure II—2 La fonctionnalisation des nanotubes mono paroi (SWCNTs) de carbone par des méthodes différentes : méthode covalente (A), méthode non-covalente (B), électro-polymérisation (C) et fonction endohédrale ou interne (D) (d'après [Hirsch; 2002a]).

II.1.2.1 La fonctionnalisation covalente des SWCNTs

La fixation covalente de groupements chimiques peut être effectuée d'une façon sélective et contrôlée aux extrémités par l'intermédiaire des acides carboxyliques formés par une oxydation des NTCs dans l'acide nitrique et sulfurique (Figure II-3 A), ou sur les parois par cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azométhine (Figure II-3 B) [Bianco *et al.*; 2005a,

Bianco *et al.*; 2005b, Klumpp *et al.*; 2006], ou grâce à de nombreux défauts introduits par les dommages oxydatifs [Maggini *et al.*; 1993].

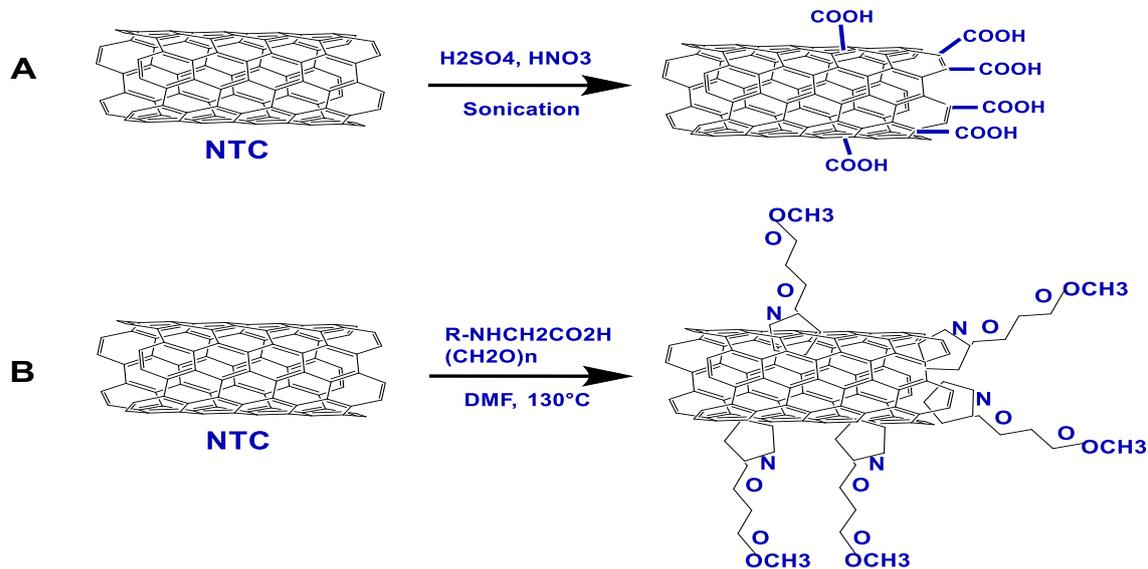


Figure II—3 Les voies de la fonctionnalisation covalente des NTCs (d'après [Klumpp et al.; 2006]).

Dans les deux premiers cas, l'halogénéation et en particulier la fluoration des NTCs sont devenues populaires par rapport à d'autres voies telles que la cycloaddition et l'hydrogénation pour initier la fonctionnalisation covalente [Balasubramanian and Burghard; 2005]. Les NTCs fluorés résultants ont des liaisons C-F plus faibles que celles dans les fluorures d'alkyle, permettant des modifications supplémentaires à travers des sites de substitution ultérieurs. Dans le troisième cas, la fonctionnalisation des défauts de NTCs dus aux acides forts génère des groupes fonctionnels tels que l'acide carboxylique, la cétone, l'alcool et des groupes ester. Cela favorise les réactions chimiques suivantes, telles que la silanisation, l'estérification, la thiolation, et les réactions avec des macromolécules [Battigelli *et al.*; 2013].

II.1.2.2 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs

Contrairement à la modification covalente de NTCs, la fonctionnalisation non covalente par empilement (ou π - π stacking) est une voie intéressante dans des conditions

modérées et qui ne détruit pas le système conjugué de la paroi latérale des NTCs. En effet, cette voie de fonctionnalisation offre la possibilité d'attacher des groupes fonctionnels au graphène sans perturber le réseau électronique. Dans ce contexte, la physisorption de petites molécules aromatiques telles que la couverture des polymères, des tensioactifs, et la fonctionnalisation endohédrale des SWCNTs [De Juana and Pérez; 2013, Sozykin and Beskachko; 2013] est une bonne preuve pour certifier cet attachement non covalent.

Si ces modifications non covalentes ont besoin d'accroître leur capacité à conserver les propriétés souhaitées du complexe de SWCNTs, elles ont déjà prouvé une amélioration tout à fait remarquable de la solubilité des SWCNTs. En effet, les NTCs ont une tendance à s'agréger en raison de leur forte aromaticité par des interactions de type Van der Waals, ce qui aboutit à la formation de faisceaux (bundles) de nanotubes de carbone qui se dissocient difficilement. En conséquence, les NTCs sont totalement insolubles lorsqu'ils sont non-modifiés et immergés dans la plupart des solvants [Bergin *et al.*; 2008].

D'après ce qui précède, nous pouvons dire que la fonctionnalisation non-covalente est une méthode physique de liaison entre les NTCs et le groupe fonctionnel. Cette approche est divisée en deux sous-types: la fonctionnalisation interne et la fonctionnalisation externe.

➤ **La fonctionnalisation interne** se fait par une introduction de molécules [Loi *et al.*; 2010], de particules métalliques [Weiqiang *et al.*; 1997] ou de fullerène à l'intérieur des NTCs (Figure II-2 D). Cependant, la taille des NTCs influence fortement le choix et la taille des molécules insérées. Ainsi, elle n'a pas permis ni un changement de la surface des NTCs ni une amélioration de leur solubilité.

➤ **La fonctionnalisation externe** repose sur les interactions Van der Waals entre les NTCs et les groupes actifs. Les exemples cités plus haut tels que des polymères (Figure II-2 B), et des tensioactifs (docécylsulfate de sodium ou SDS), permettent de bien disperser les NTCs et les individualiser dans plusieurs types de solvants [De Juana and Pérez; 2013, Sozykin and Beskachko; 2013]. Egalement, les pyrènes font partie de cette sous-catégorie et sont bien détaillés dans le paragraphe suivant, puisque nous avons utilisé et fonctionnalisé nos nanotubes de carbone avec ce type de petites molécules.

II.1.2.3 La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs par des pyrènes

La fonctionnalisation non-covalente des SWCNTs avec des biomolécules et assurant un meilleur contrôle de la spécificité, par l'intermédiaire des groupements pyrènes, a été réalisée pour la première fois en 2001 [Chen *et al.*; 2001]. Cette fonctionnalisation a été déterminée par une molécule bi-fonctionnelle, appelée l'acide 1-pyrenebutanoïque, estérifiée par un groupement succinimidyl. Des interactions de type π - π stacking entre le N-succinimidyl-1-pyrenebutanoate et la paroi des NTCs ont permis la fixation ou l'adsorption irréversibles des biomolécules à la surface des NTCs (Figure II-4). Les SWCNTs caractérisés par leur caractère hydrophobe ont été dispersés dans le solvant DMF, et sont ainsi fonctionnalisés avec plusieurs types de bio-molécules immobilisées à leur surface, telles que la ferritine par exemple.

Ensuite, plusieurs études ont été conduites faisant appel à l'utilisation des pyrènes pour une fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone [Nakashima; 2006, Tomonari *et al.*; 2006]. Cependant, ces molécules sont capables de stabiliser les NTC dans le milieu aqueux sans aboutir à une dégradation du réseau carbonique sp^2 [Hirsch; 2002b].

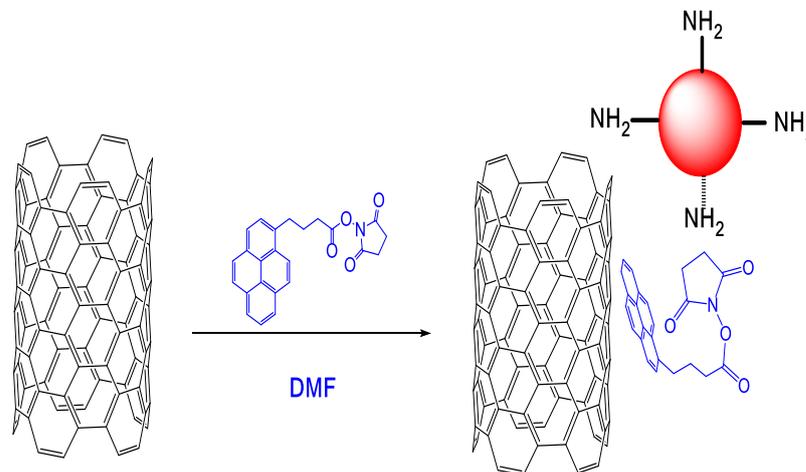


Figure II—4 Le principe de la fonctionnalisation non-covalente des NTCs par des groupements pyrènes portant des esters actifs (d'après [Chen *et al.*; 2001]).

A noter qu'il existe une autre méthode de fonctionnalisation simple des NTCs pour l'immobilisation des biomolécules. L'électropolymérisation repose sur l'emprisonnement de

biomolécules dans un film polymère (Figure II-2 C). Nous pouvons citer l'électropolymérisation d'une enzyme ou de biocapteurs enzymatiques à base de NTCs par exemple [Rivas *et al.*; 2007]. Particulièrement, les films à bases des polypyrroles représentent un support idéal pour l'interaction avec les NTCs.

II.2 Les techniques de caractérisation des NTCs fonctionnalisés.

La caractérisation des nanotubes de carbone est compliquée en raison de leur taille nanométrique. Il existait avant la synthèse des matériaux à l'échelle nanométrique de nombreuses techniques de caractérisation qu'il a fallu donc adapter à cette échelle ultime en profitant des propriétés optiques des NTCs et leur structure électronique. Cependant, les techniques les plus courantes de caractérisation des NTCs, sont divisées en 2 catégories : les méthodes qualitatives et quantitatives. Les premières regroupent les spectroscopies Raman, et infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN), les microscopies électroniques à transmission (TEM) à balayage (MEB) et à force atomique (AFM). La deuxième catégorie concerne l'utilisation de l'analyse gravimétrique, la spectroscopie de photoélectron, etc.

Cette partie du manuscrit sera donc consacrée aux différentes techniques de caractérisation utilisées avec leurs principes, leurs avantages et les principaux résultats des caractérisations obtenus dans cette thèse.

II.2.1 Microscopie électronique

Actuellement, la méthode de caractérisation des nanotubes de carbone la plus utilisée pour les applications médicales, repose sur la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie électronique à balayage par transmission (STEM) [Su *et al.*; 2014, Tang *et al.*; 2014]. Les deux techniques (STEM et TEM) fortement liées, utilisent un faisceau d'électrons pour capturer un échantillon à observer. Elles ont une très bonne résolution spatiale (de l'ordre de 1-2Å), mais la préparation d'un échantillon à passer en TEM ou STEM est parfois délicate et nécessite des temps d'observations plus longs par rapport aux autres techniques existantes. Cependant, les informations déduites par microscopie sont

impressionnantes puisqu'elles sont faites à partir des échantillons à l'échelle du nm. Ainsi, ces échantillons sont bien localisés et avec une très haute précision rendant le STEM et le TEM, les méthodes d'analyses très performantes pour des échantillons en couche mince.

Le STEM est un juste milieu entre le TEM et le microscope électronique à balayage (MEB). Le faisceau d'électrons est focalisé par la source électronique ou en une sonde électronique très petite, et traverse un échantillon ultra mince à analyser, en balayant la surface grâce à un système de lentilles magnétiques. Les observations se font en champ clair ou en champ sombre, avec plusieurs avantages tels que la réduction des effets d'aberration. La reconstruction d'image se fait donc point par point à partir de l'intensité transmise et permet donc l'obtention d'images en haute résolution en champ sombre, le contrôle facile de la zone d'observation et la possibilité de dresser une cartographie chimique de l'échantillon par analyse des rayons X par exemple.

Le TEM fonctionne avec une transmission du faisceau d'électrons qui traverse un échantillon donné suffisamment mince en utilisant des lentilles magnétiques. Ces dernières projettent l'image d'échantillon sur un écran tout en transformant l'image électronique en image optique. La résolution des images obtenues peut atteindre 0.08 nm. Ce type de microscopie présente plusieurs intérêts, tels que la combinaison de la forte résolution avec la diffraction et l'étude de la composition chimique d'un échantillon donné.

Ainsi, les modes d'imagerie utilisés avec ces deux types de microscopie sont les suivants :

- **Le mode diffraction** qui repose sur le phénomène de diffraction du faisceau électronique en des petits faisceaux quand il traverse un échantillon. L'image sera formée par recombinaison des petits faisceaux à l'aide des lentilles magnétiques.
- **Le mode en champ clair** repose sur la présence d'écran dans le plan image, et les électrons non-diffractés seront donc les seuls capables de former l'image sur l'écran. Au contraire, les parties d'échantillons qui diffractent le faisceau sont plus sombres. Le champ clair (BF) se traduit par une image claire, qui vient d'une transmission totale du faisceau en absence d'échantillon.

- Le mode en champ sombre est basé sur la présence du diaphragme dans le plan focal. Des électrons diffractés à un angle donné peuvent aboutir seuls à la formation d'image. Les zones sombres d'image se caractérisent par la diffraction à différents angles. Il existe aussi une transmission totale du faisceau, en absence d'échantillon. Ainsi, le champ sombre (BD) se traduit par une image sombre, suite à une absence de diffraction.

II.2.2 Infra-rouge

La spectroscopie infrarouge (IR) permet de sonder un échantillon donné pour déterminer sa composition à une gamme énergétique comprise entre 0,06 et 0,55 eV. Cette gamme d'énergie trop basse ne permet pas d'avoir les états électroniques de transition entre les bandes des NTCs. Cependant, elle autorise à aller sonder la vibration des liaisons chimiques et adapte les longueurs d'onde uniformément à ces vibrations.

Concernant les NTCs fonctionnalisés, il existe des modes de vibration en spectroscopie IR (**Figure II-5**). Ce type de spectroscopie pourrait être donc employé afin d'identifier les liaisons chimiques qui correspondent aux molécules greffées à la surface des NTCs [**Izard et al.; 2008**].

II.2.3 RAMAN

Ce type de spectroscopie vibrationnelle, complémentaire de la spectroscopie IR, permet de mesurer la diffusion photonique dans un échantillon. Généralement, suite à la diffusion photonique dans un matériau, il existe une absorption énergétique des photons par les électrons qui sont donc excités. Pendant la relaxation, les électrons excités permettent la libération d'un photon à la même énergie (**Figure II-5**). C'est la diffusion de Rayleigh.

Il existe des électrons qui, en relaxant, permettent de libérer une valeur d'énergie non identique à celle de l'absorption. Par conséquent, à l'état de relaxation, les électrons sont dans des couches énergétiques supérieures, cas de la diffusion de Stokes, ou des couches énergétiques inférieures, cas de la diffusion anti-Stokes.

La diffusion de Stokes qualifie les états vibrationnels et permet l'émission d'un phonon afin que l'électron revienne à sa position initiale. Au contraire, la diffusion anti-Stokes ne qualifie pas les états de vibration dans un échantillon et permet donc d'avoir une absorption du phonon (Figure II-5). Le signal émis avec la diffusion de Stokes est plus intense que celui anti-Stokes, puisqu'il y a plus de niveaux électroniques mis en jeu.

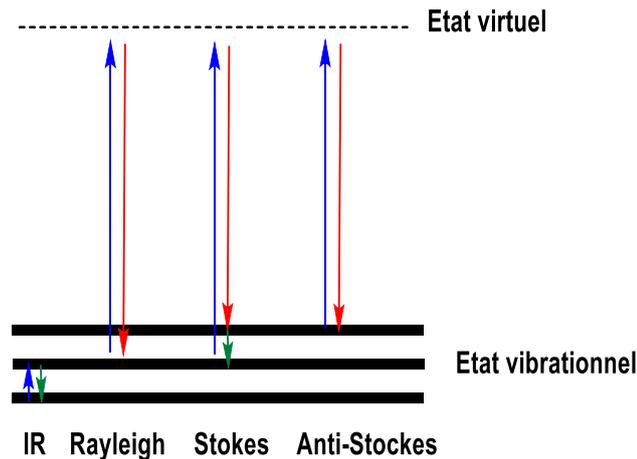


Figure II—5 Les transitions électroniques pour les spectroscopies infrarouges, et Raman. Les vibrations nées sont indiquées par les flèches vertes. Dans le cas des NTCs, l'état virtuel est en réalité réel.

Le Raman et l'IR sont des techniques complémentaires puisque les vibrations sont créés par la diffusion de Stokes selon des axes transversaux, radiaux, axiaux et longitudinaux dans le cas des NTCs [Hulman *et al.*; 2009].

Dans la spectroscopie Raman, la taille, le diamètre et le taux de fonctionnalisation peuvent influencer leur résonance et donc le signal Raman. Ainsi, ce signal diminue (cas de la fonctionnalisation des NTCs), puisqu'il y a une faible résonance des NTCs suite au changement de leur structure (atomes de carbone sp^3) [Burghard; 2005, Graupner; 2007].

Différentes bandes existent dans la spectroscopie Raman: Bandes G, D et G'.

La bande G est nommée bande Graphite parce qu'elle existe dans le graphite. Elle représente le signal des atomes de carbone sp^2 et le pic donne lieu à 2 bandes G+ (dépendante du type de NTCs) et G- (largement plus sensible à ce facteur) [Graupner; 2007].

La bande D (nommée bande Diamant) correspond dans les nanotubes aux atomes de carbone hybridés sp^3 . Le rapport des pics d'intensité des bandes D et G permet de déterminer la présence et le taux de défauts à la surface des NTCs. Il permettra donc aussi d'être une preuve d'une fonctionnalisation des NTCs puisque ce rapport augmentera avec l'augmentation de la fonctionnalisation [Strano *et al.*; 2003].

La bande G' est aussi utilisée pour la normalisation de la bande D pour déterminer la fonctionnalisation des NTCs. La bande G' n'est pas sensible comme la bande D à la perte de résonance en cas de forte fonctionnalisation [Maultzsch *et al.*; 2002].

II.2.4 XPS

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) est une technique qui permet le sondage d'états électroniques d'un composé afin de mesurer l'énergie photoélectronique. Cette technique basée sur la mesure de l'énergie cinétique des électrons émis par un échantillon sous l'influence de photons X ayant une énergie $h\nu$, permet d'étudier l'éjection des électrons, qui ont une énergie de liaison inférieure à $h\nu$. Le calcul se fait par rapport à l'équation de conservation d'énergie selon cette relation : Energie de liaison = $h\nu$ – Energie cinétique.

Le phénomène de déplacement chimique se traduit par une sensibilité des énergies de liaison à l'environnement chimique d'un atome. Des variations d'énergie de liaison (par variation de la nature des liaisons chimiques) aboutissent donc à des changements d'états électroniques de quelques eV dans un échantillon donné [Delichère and S.; 2010]. Des travaux effectués sur les nanotubes, ont montré des déplacements de la bande de carbone C1s, et la technique XPS manifeste la modification de l'état électronique des NTCs après réaction [Graupner *et al.*; 2006].

II.3 Résultats - Partie1

II.3.1 Résultats obtenus

Notre but principal est de développer un nouveau nanovecteur basé sur la fonctionnalisation de SWCNTS avec un ligand thérapeutique (TRAIL) via l'acide 1-

pyrenebutanoïque ester N-hydroxysuccinimide (PSE) à travers une procédure de couplage à base de carboxy-diimide.

En effet, le PSE est une molécule bi-fonctionnelle capable de former un complexe (noté SWCNT-PSE) via le π - π stacking du pyrène sur le nanotube [Chen *et al.*; 2001]. Dans ce but, nous avons examiné en détail les différentes étapes de la synthèse du nanovecteur en couplant les analyses spectroscopiques et les simulations moléculaires. Le choix du SWCNTs a été guidé par son hydrophobicité malgré l'inconvénient de former des faisceaux, et conduisant à un coefficient de diffusion intéressant d'environ 10^4 nm²/s en milieu physiologique [Judkins *et al.*; 2013].

Les SWCNTs ont été raccourcis par une oxydation chimique et sont notés SWCNTs-COOH en vue de leur internalisation dans les cellules. Même si les nanotubes de carbone sont communément fonctionnalisés par des traitements acides oxydants, nous proposons ici de révéifier nos NTCs par plusieurs techniques.

En effet, la stabilité effective de la fonctionnalisation de SWCNTs y compris les défauts sur les nanotubes vient de leur traitement avec l'acide. Dans ce but, la **spectroscopie Raman** a été réalisée pour étudier l'interaction entre le PSE et le SWCNTs par la modification des trois principaux modes de vibration Raman actifs sur la complexation du SWCNTs par PSE. La **spectroscopie ATR-IR** a également été utilisée pour étudier la modification de la structure chimique des SWCNTs après la formation du complexe SWCNT-PSE. Les **analyses XPS** ont été effectuées pour détecter les groupes fonctionnels, le pourcentage des diverses concentrations atomiques et le déplacement chimique (ou shift en anglais) imposé par les groupes fonctionnels sur les atomes des NTCs. Les différences dans les résultats spectroscopiques ont été évaluées par rapport à l'oxydation et la fonctionnalisation des états des SWCNTs afin d'identifier sans ambiguïté leurs caractéristiques.

Enfin, les **calculs réalisés à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité (ou DFT)** ont été effectués avec des corrections de Van der Waals dans le but de mieux décrire l'adsorption physique sur la paroi latérale des SWCNTs. Ces méthodes permettent de décrire le complexe SWCNT-PSE où l'empilement par π - π stacking se produit entre le groupement pyrène du PSE et la surface des SWCNTs. Le calcul de la densité d'états projetés sur les atomes (PDOS) renforce les observations faites par les analyses XPS même si cela reste une

approximation. Les résultats montrent que les spectres sont fortement influencés par la densité d'états des atomes de carbone sur les parois latérales des NTCs et de la quantité de PSE par rapport au nanotube de carbone.

A noter que tous les protocoles expérimentaux suivis et qui concernent ce chapitre sont inclus dans l'Annexe 1. Les résultats sont divisés en deux grandes parties : la première se manifeste par toutes les méthodes de caractérisation avant d'ajouter TRAIL, et sera notée caractérisation du SWCNT-PSE. La deuxième partie concerne la totalité du nanovecteur élaboré après l'addition de la protéine TRAIL.

II.3.2 Les résultats expérimentaux : Imagerie STEM

Des images à haute résolution STEM-BF des nanotubes de carbone oxydés (Figure II-6) et du complexe SWCNT-PSE sont présentées dans la (Figure II-7). Les images obtenues montrent clairement les dimensions des nanotubes oxydés (hexagones apparus à l'échelle de 2 nm) et leur chiralité (représentée par la valeur des indices n,m). Nous pouvons constater l'apparition de nanotube (18,1) où m est très faible. Nous nous rapprochons donc de nanotubes en zig-zag (Figure II-6 A). D'autres dimensions ont également été observées (Figure II-6 B).

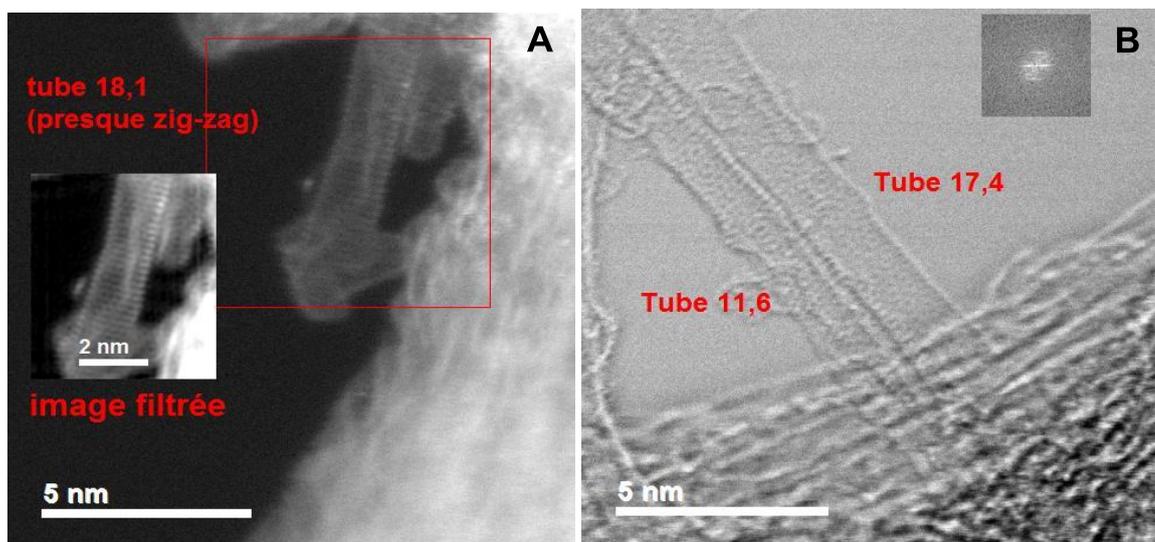


Figure II—6 Les images de haute résolution STEM des SWCNTs oxydés (A), et STEM-BF (B).

Cependant, la plupart des SWCNTs sont agrégés en petits paquets de quelques tubes. Ces derniers semblent recouverts de couches de PSE de quelques nm d'épaisseur, mais les tubes isolés revêtus ont également été observés.

Un SWCNT isolé revêtu est bien montré dans la (Figure II-7 A). Les parois du tube apparaissent bien définies et droites sur les deux côtés. Une seconde couche apparaît tout autour de la paroi du NTC sur la micrographie en pointillés, mais moins définie. Cela est dû à la première couche de molécules de PSE qui sont en interaction étroite avec les SWCNTs. La distance moyenne entre cette seconde couche et la paroi du tube est d'environ 0,35 nm. Une deuxième ligne en pointillés a également été systématiquement observée sur les tubes externes d'un faisceau. Ce qui indique que les molécules aromatiques (les pyrènes) ont été adsorbées uniquement sur les surfaces libres des SWCNTs.

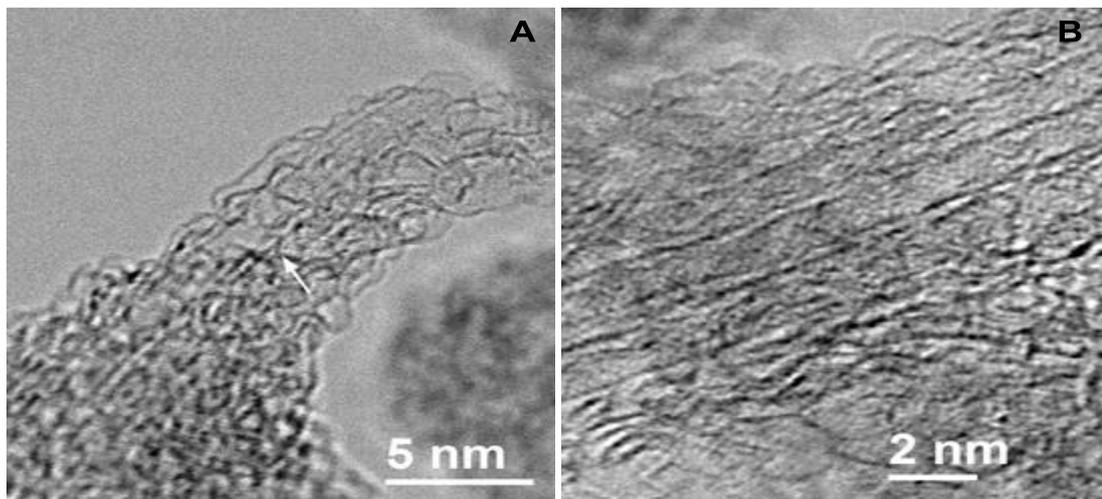


Figure II—7 Les images de haute résolution STEM-BF de SWCNTs-PSE. Une couche de SWCNT isolé (A). La flèche souligne le tube. Une couche d'un ensemble de trois SWCNTs (B).

Une micrographie à haute résolution d'un faisceau de trois SWCNTs revêtus de PSE est montrée dans la (Figure II-7 B). Le faisceau recouvert de PSE semble-être enfermé dans une gamme de petits flocons empilés. Cependant, de faibles contrastes régulièrement disposés à courte distance sont clairement visibles sur les SWCNTs. Ces contrastes peuvent être dus uniquement au réseau périodique du tube et sont superposés avec la molécule de PSE. Cette dernière devrait s'empiler avec une certaine périodicité en gardant l'arrangement du tube sous-jacent.

II.3.3 Les résultats expérimentaux : Analyses Spectroscopiques

L'assemblage des nanotubes en faisceaux affecte nettement la structure électronique des SWCNTs. L'interaction entre les atomes de carbone de la paroi latérale des nanotubes et la fraction pyrène implique des changements importants. Ainsi, les SWCNTs sont capables de résister à des niveaux de puissance laser assez élevés, donnant un signal Raman reproductible sur de longues périodes de temps (> 30 min) sans avoir une importante photodégradation dans les conditions ambiantes. Théoriquement, le nombre de pics Raman et les modes de phonons infrarouges actifs dépendent exclusivement des indices chiraux et peuvent être déduits de l'analyse des groupes de symétrie de SWCNTs zigzag avec un rendement de 8 actifs en Raman et 3 modes actifs en IR.

II.3.3.1 Spectroscopie RAMAN

Expérimentalement, les trois modes de vibration actifs les plus importants en Raman ont été retrouvés pour nos échantillons. Ils ont donné lieu à la bande G (G pour le graphite), la bande D (désordre de la bande induite) et les modes de respiration radiales (RBM), visibles dans les spectres Raman (Figure II-8) [Burghard; 2005].

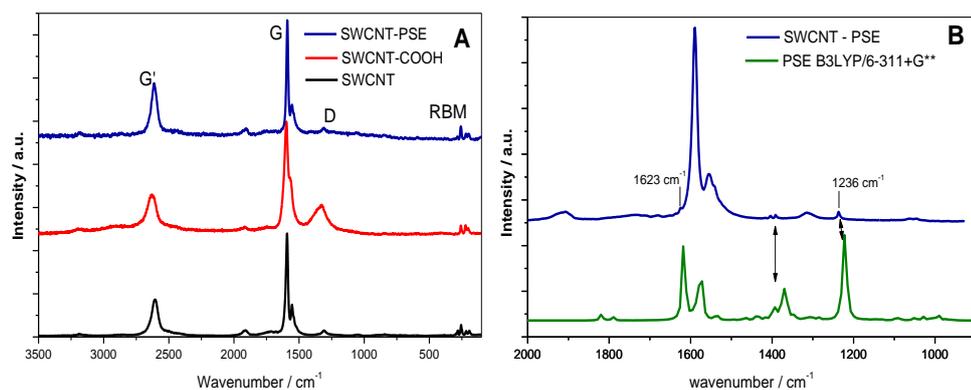


Figure II—8 Les spectres RAMAN des SWCNTs, SWCNTs-COOH et SWCNT-PSE montrant la présence des principales caractéristiques. (A) Les bandes D, G (G+ et G-) et les bandes G' sont indiquées. (B) La comparaison entre les spectres Raman SWCNT-PSE expérimentaux et le spectre théorique du PSE.

La bande D est présente entre 1250 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} et est due aux hybridations de sp^2 et sp^3 du carbone comme nous l'avons déjà mentionné. Elle est renforcée lorsqu'un désordre dans le réseau de carbone apparaît. Une fois que les bandes G ont été normalisées à la même intensité (Figure II-8 A), il est plus facile de comparer et de suivre la variation de l'intensité de la bande D, en allant des SWCNTs nus aux SWCNTs fonctionnalisés. Le spectre Raman de SWCNT-COOH présente une plus haute intensité de la bande D à 1320 cm^{-1} par rapport aux SWCNTs. Ce résultat indique que le traitement acide augmente le caractère sp^3 du SWCNTs quand ils sont raccourcis et introduit des groupes carboxyliques dans les sites de défauts. Le passage de SWCNTs-COOH à SWCNT-PSE (bande D à 1308 cm^{-1}) peut être déduite directement à la diminution de l'intensité bande D. La variation du rapport D/G dans ce cas souligne une stabilisation des SWCNTs-COOH endommagés consécutivement à l'empilement des interactions (π - π stacking) du PSE.

Enfin, la bande G, située entre 1500 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} , porte sur les modes d'étirement tangentiel et dépend fortement de la chiralité des nanotubes. Si la théorie (groupe de symétrie) prévoit six modes Raman actifs pour les nanotubes chiraux, venant de leur symétrie cylindrique parfaite, nous n'observons expérimentalement que deux bandes G principales. Un pic aigu (noté G +) est situé à $1591,9\text{ cm}^{-1}$ pour le SWCNT nu (et déplacé à $1590,1\text{ cm}^{-1}$ et $1597,5\text{ cm}^{-1}$ pour le SWCNT-PSE et le SWCNT-COOH respectivement) et un autre pic ou pic de côté (noté G -), à $1554,3\text{ cm}^{-1}$ (même valeur pour le SWCNT-PSE et $1574,0\text{ cm}^{-1}$ pour le SWCNT-COOH). Il a été montré que ces spectres avec une fréquence élevée des pics (G +) ou faible (G -) mettent en évidence un comportement semi-conducteur [Jorio *et al.*; 2003] pour les trois types de SWCNTs. En outre, les déplacements et les augmentations des bandes G lorsque le SWCNT-COOH devient SWCNT-PSE pourraient être clairement attribués à la signature de la présence PSE sur la paroi latérale des SWCNTs.

En traçant le spectre théorique du PSE optimisé, nous observons la contribution du PSE à la signature Raman du complexe SWCNT-PSE dans la (Figure II-8 B), où sa présence est clairement soulignée par des pics spécifiques à environ 1236 cm^{-1} , autour de 1400 cm^{-1} et 1623 cm^{-1} .

Les aires des pics des bandes D et G pour les SWCNTs, SWCNTs-COOH et SWCNT-PSE ont été comparées dans le (Tableau II-1) pour estimer le niveau de défauts à plusieurs

étapes de la synthèse. Le rapport des bandes D/G donne une estimation du niveau relatif de défauts présents dans les échantillons de matériaux correspondants et montre une augmentation de défauts générés après traitement à l'acide, puis une diminution de la valeur de rapport après l'ajout du PSE.

	Bande D	Bande G	ratio
SWCNTS	2.189	6.638	0.330
SWCNTS-COOH	9.782	8.747	0.522
SWCNTS-PSE	2.172	5.245	0.414

Table II—1 Les zones intégrées de bandes D et G ainsi que le rapport de bandes D/G, l'estimation du niveau relatif de défauts générés dans la paroi latérale des SWCNTs.

Par conséquent, à partir de la micro-spectroscopie Raman, de nombreux changements au cours du processus de fonctionnalisation peuvent être observés, tels que le décalage en fréquence supérieure (ou upshift) et la variation de la forme du spectre contrairement aux études Raman classiques [Karachevtsev *et al.*; 2011].

II.3.3.2 Spectroscopie Infra-rouge (IR)

En dépit de la forte absorption des SWCNTs dans la gamme IR, certaines informations peuvent être extraites à partir des spectres ATR-IR, mais dans une moindre mesure que la spectroscopie Raman. Ceci explique pourquoi peu d'expériences ont été consacrées à la mesure des modes de vibration infrarouge actifs des SWCNTs. Cependant, le SWCNT nu présente deux bandes caractéristiques : la première est représentée par une ligne faible dans la gamme de 872 à 892 cm^{-1} et la deuxième est une large bande à 1600 cm^{-1} . Ces bandes sont en accord avec les prédictions théoriques d'une approche de force constante basée sur la symétrie, et liés aux modes IR actif (A_{1U} et E_{1U}) dans le graphite [Dobardzic *et al.*; 2003, Kuhlmann *et al.*; 1998]. En outre, la bande à 1600 cm^{-1} provient d'un mode du graphite,

connu pour être décalé vers des fréquences plus élevées de l'ordre de 10 cm^{-1} avec le SWCNT.

Les bandes à 1060 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} et 1390 cm^{-1} sont pertinentes avec le SWCNT nu. Le groupe bien défini à 1240 cm^{-1} est propre aux nanotubes de carbone. Il résulte de la superposition entre un mode IR actif faible du SWCNT et une forte contribution de la bande D dans la diffusion Raman. Ainsi, il correspond à un mode d'affectation du premier ordre A_2 comme la bande à 1390 cm^{-1} [J.L. Bantignies *et al.*; 2006, Kim *et al.*; 2005]. La présence de la bande à 1060 cm^{-1} est difficile à interpréter. Elle pourrait provenir des affectations de second ordre $2A_1$ ou $2E_G$ ou d'une trace de carbone amorphe dans l'échantillon.

Si les spectres de SWCNT-PSE et du PSE sont assez similaires (Figure II-9), leur comparaison met en évidence des différences importantes dues à la fonctionnalisation. Parmi les différents groupes fonctionnels produits par le traitement acide, la présence de groupes hydroxyles ($-\text{OH}$) provenant des groupes carboxyliques générés pendant le processus de découpage conduit à un large pic entre 3000 et 3600 cm^{-1} dans les spectres SWCNT-PSE. Contrairement à la diffusion Raman du PSE responsable d'une fluorescence, le signal IR du PSE est visible et très intense. Il peut être observé entre 1700 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} et indique clairement la présence du PSE interagissant faiblement avec les SWCNTs.

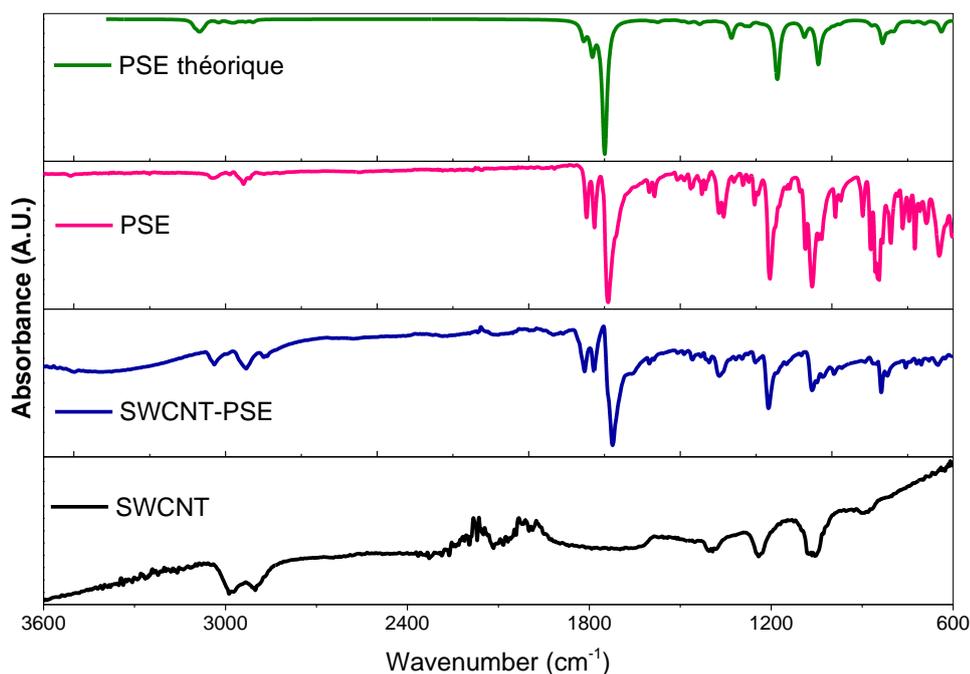


Figure II—9 Les spectres IR expérimentaux des SWCNTs, SWCNT-PSE et PSE.

II.3.3.3 Spectroscopie XPS

Le spectre XPS (Figure II-10 A) montre des pics distincts de carbone représentant les principaux constituants du complexe SWCNT-PSE. La structure du pic principal de C1s a une énergie de liaison (ou binding energy (BE)) de 284,7 eV et un maximum à 289,3 eV similaires à ceux rapportés dans la littérature [Okpalugo *et al.*; 2005].

En effet, les nanotubes fonctionnalisés ont été précédemment raccourcis dans un acide oxydant et donc possèdent des groupes fonctionnels carboxyliques (-COOH) attachés à leurs extrémités. Ainsi, les atomes d'oxygène des groupements carboxylates et cétoniques sont responsables du pic XPS O 1s à 532,9 eV tel qu'il apparaît dans la (Figure II-10 B). Après une analyse XPS, la teneur en oxygène reste stable autour de 14 % en partant du SWCNT-COOH pour aboutir au SWCNTS-PSE. Cependant, et contrairement au pic O1s de SWCNT-COOH, le pic du SWCNTS-PSE est bien défini suggérant une stabilisation du nanotube endommagé après le traitement acide par transfert de charge des empilements π du PSE.

En outre, la teneur en carbone a tendance à diminuer lorsque les SWCNTs-COOH sont fonctionnalisés avec PSE (C 1s est à 86 % pour les SWCNTs-COOH par rapport à C1s qui est

de 81% (N1s: 5%) pour SWCNT-PSE). Cette petite quantité d'azote mesurée par XPS pourrait être interprétée comme une couverture faible du PSE sur les SWCNTs.

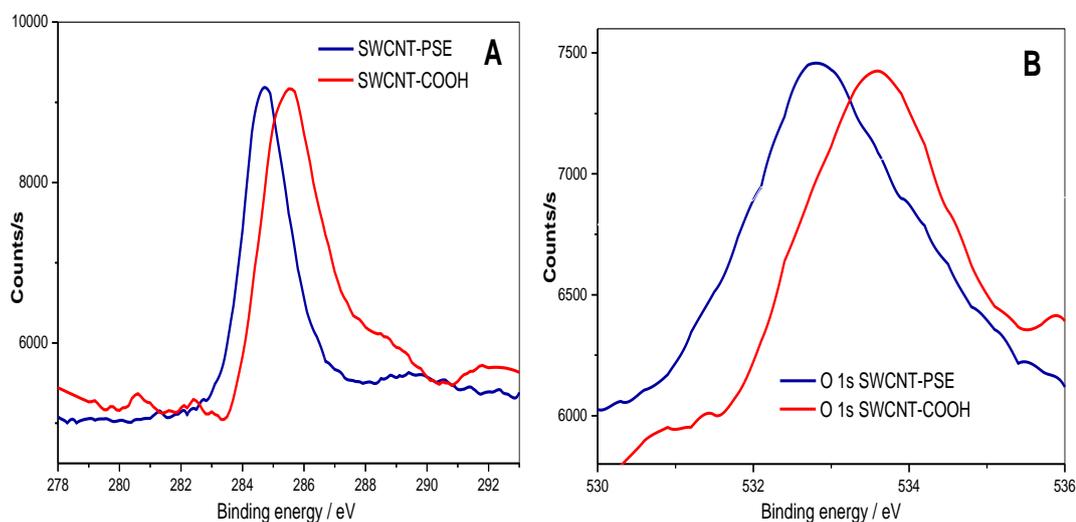


Figure II—10 Les spectres XPS des SWCNTs-COOH et SWCNT-PSE (A) C 1s et énergies de liaison O 1s de base (B). Les spectres XPS des SWCNTs-COOH et SWCNT-PSE (A) C 1s et énergies de liaison O 1s de base (B).

II.3.4 Les résultats théoriques

Afin de corroborer nos résultats expérimentaux, nous avons effectué une optimisation de géométrie par DFT corrigée avec des forces de Van der Waals des SWCNTs fonctionnalisés pour bien localiser la géométrie d'adsorption du PSE, et extraire de ces données celles qui nous permettent de tracer les spectres des différents systèmes.

Nos premiers calculs ont tenté à déterminer la position exacte du PSE adsorbé. En effet, la présence d'amas de nanotubes dans le dispositif expérimental mis en place, pourrait conduire à une adsorption dans les sites de rainures (site existant à la jonction de deux nanotubes) sur la paroi latérale de SWCNTs ou dans le canal interstitiel (site d'adsorption qui a été négligé ici en raison de la taille de molécule).

La molécule de PSE adopte préférentiellement le π - π stacking sur la paroi latérale (Figure II-11 A) du SWCNTs [Fan and Zhang; 2008]. Les paramètres géométriques sont en accord avec les expériences. La liaison C-C est égale à $1,42 \pm 0,02$ Å (Figure II-11 B), et l'écart entre la fraction pyrène et la paroi latérale est de $3,02$ Å. La différence d'énergie entre SWCNTs et SWCNTs-PSE est suffisamment élevée pour conclure sans ambiguïté sur le type

d'adsorption par π - π stacking (-2,050 eV sur la paroi latérale par rapport à -1,420 eV dans le site de rainure, bien que ce site puisse être favorisé dans d'autres situations particulières [Arab *et al.*; 2004, Arab *et al.*; 2007].

D'après nos calculs, il n'y a pas de physisorption favorable de PSE entre deux SWCNTs. Lorsque le PSE est placé sur la paroi latérale de SWCNTs, cette molécule peut adapter sa structure et sa géométrie pour favoriser le π - π stacking contrairement à ce qu'elle pourrait entre 2 SWCNTs. Notez que la valeur d'énergie d'interaction, est tout à fait en accord avec les travaux antérieurs effectués (-1,5 eV pour le SWCNTs(5,5)) [Lin *et al.*; 2007].

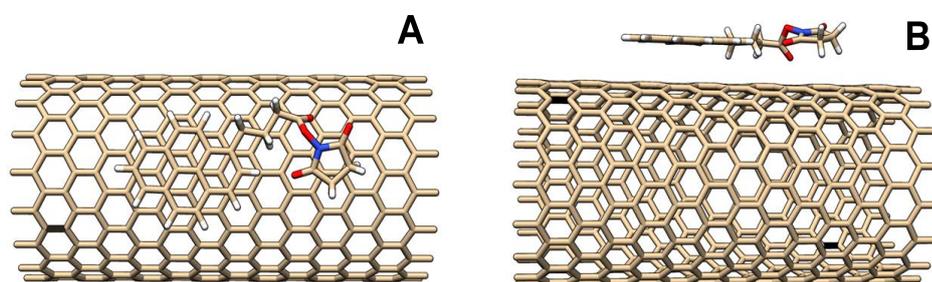


Figure II—11 La géométrie optimisée entre les SWCNTs et PSE (A) écart de hauteur entre PSE et la paroi latérale (B).

La faible énergie de liaison observée dans le cas de PSE adsorbé sur la paroi latérale de SWCNTs est principalement due à la position de la HOMO (-9,626 eV) sous le potentiel chimique (-4,252 eV). Selon la littérature, cette faible énergie provient principalement du mélange des orbitales HOMO (ou LUMO) avec l'orbitale de SWCNTs. La force de cette hybridation peut être déduite de l'orientation géométrique des orbitales HOMO et LUMO par rapport à la surface des SWCNTs. Comme le montre la (Figure II-12), les fonctions d'onde le long de la circonférence du tube sont permises, alors qu'elles restent continues le long de l'axe infini des SWCNTs. Notez que lorsque des effets de taille apparaissent, elles entraînent certaines modulations de la structure électronique de SWCNTs pouvant conduire au confinement quantique et donc à la discrétisation des niveaux d'énergie [Jiang *et al.*; 2002, Meunier *et al.*; 1999, Rubio *et al.*; 1999]. Dans notre cas, la taille de SWCNTs périodique a été choisie pour éviter cela.

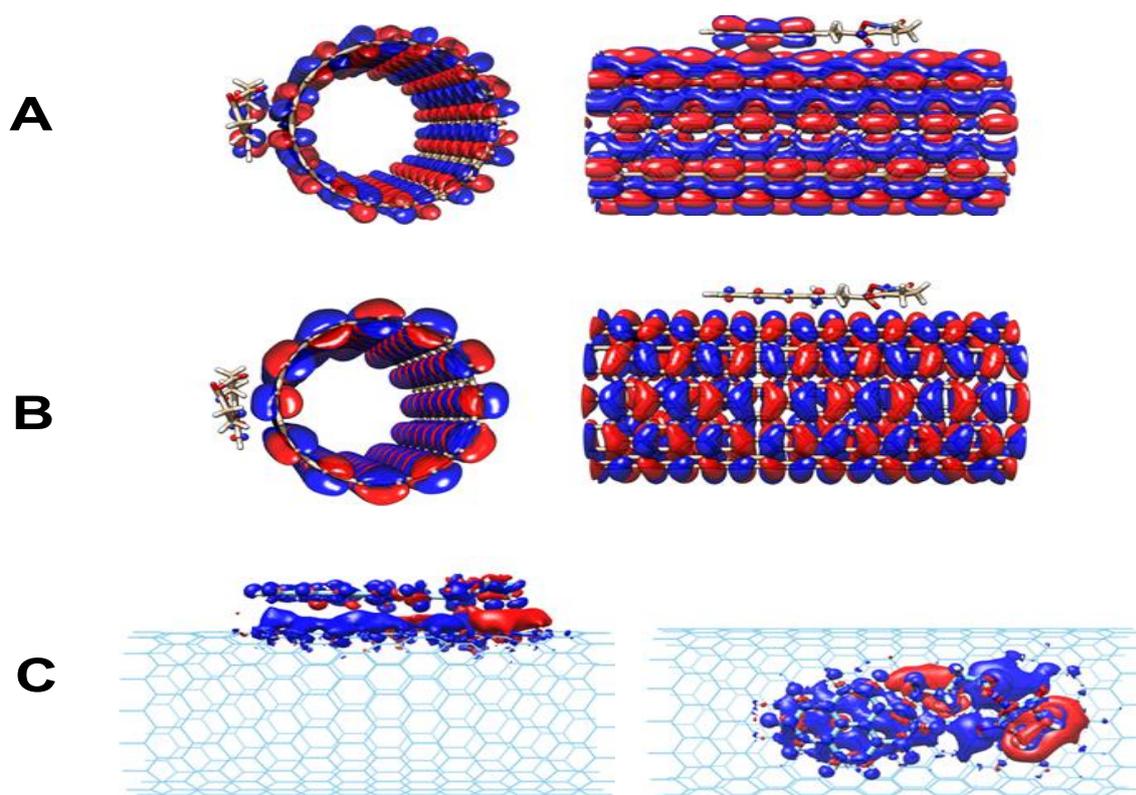


Figure II—12 Les orbitales moléculaires HOMO (A) et LUMO (B). Les couleurs bleues et rouges indiquent les orbitales de liaison et les orbitales anti-liantes, respectivement). La différence de la carte de densité de charge (couleurs bleues et rouges indiquent la diminution et l'augmentation de la densité de charge totale, respectivement) (C).

La physisorption du PSE sur la paroi latérale des SWCNTs a également été étudiée par le mécanisme de transfert de charge. Les différences de densité de charge entre le PSE isolé et le complexe SWCNT-PSE ont été tracées sur la (Figure II-12 C). Elle montre que l'interaction π - π entre les deux molécules induit une forte réorganisation intra-électronique de charge sur le PSE entre les groupements pyrène (diminution par exemple), et le groupe succinimide (augmentation par exemple), ainsi que sur la paroi latérale des SWCNTs.

Toutes les variations de charge électronique intra et intermoléculaires spatiales aboutissent aux dipôles électrostatiques induits par l'interaction π - π . La fonction de localisation électronique ELF a été tracée dans la (Figure II-13), centrée sur les trois localisations électroniques principales observées dans le système complet (plans contenant N, O et C du PSE). Nous montrons clairement que les électrons sont bien positionnés autour de

leurs positions atomiques sans un partage covalent entre les deux molécules. Cela corrobore donc une physisorption entre le PSE et le SWCNTs.

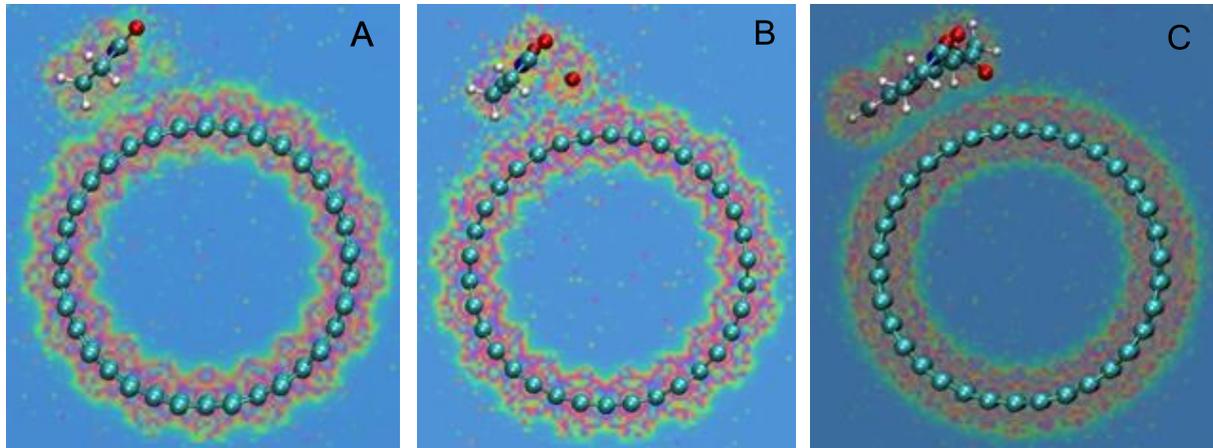


Figure II—13 La distribution ELF localisée sur le plan contenant N du PSE (A). La distribution ELF localisée sur le plan contenant O du PSE (B) et de la distribution ELF localisée sur le plan contenant C du PSE (C). La localisation idéale (ELF représenté en rouge) indique la liaison chimique est clairement centrée sur la position d'atome de chaque molécule.

II.3.5 Discussion des résultats expérimentaux et théoriques

Les résultats XPS doivent être interprétés avec prudence en raison de la présence de plusieurs espèces avec différentes hybridations (atomes de carbone sp^2 et sp^3). Le calcul de la densité d'états, qui n'est qu'une approximation grossière du profil obtenu par XPS, reste utile dans notre cas. En effet, plutôt que de calculer l'énergie de liaison d'une molécule (différence entre les énergies électroniques de la molécule neutre et ionisées), les valeurs propres sont calculées pour la molécule neutre en se basant sur l'approximation de Koopmans. De cette manière, les valeurs propres ε_n sont liées à l'énergie de liaison adiabatique E_{bin} des orbitales moléculaires par l'expression $-\varepsilon_n = E_{bin} + E_R$ où E_R est l'énergie de relaxation.

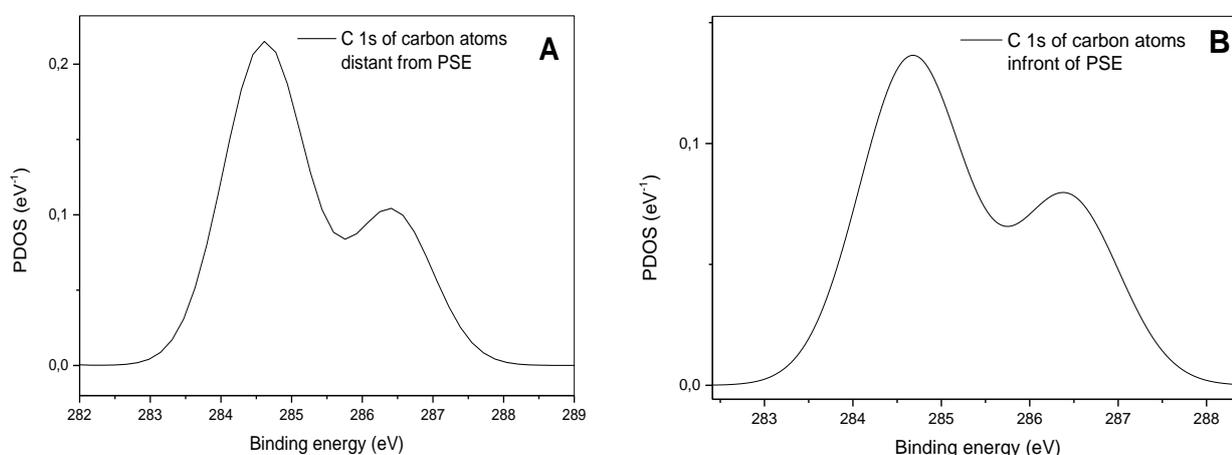
Les PDOS de C1s du SWCNTS (Figure II-14 A) d'une longueur de la maille élémentaire de 21,27 Å, voisine de celle de PSE, ont une allure similaire au spectre XPS des atomes de carbone de la paroi latérale (Figure II-10 A) éloignés de PSE. Pour les atomes de carbone en face de PSE, le pic le moins intense a une tendance à augmenter pour atteindre plus de la moitié de la hauteur du pic le plus intense. Pour un SWCNTS d'une longueur de

29,85 Å, il y a un élargissement du spectre (Figure II-14 C), avec l'apparition de pics satellites.

Nous avons cependant vérifié que la contribution du pic C1s du groupement pyrène est tout à fait négligeable sur le spectre XPS. Concernant le pic O 1s (Figure II-14 B), le profil est plus simple que celui de C1s, et est en très bon accord avec le spectre expérimental (Figure II-10 B). En outre, l'écart important de charge du groupement pyrène vers le groupe succinimide pourrait indiquer une forte adsorption du PSE sur la paroi latérale du SWCNTs. Ce résultat, qui pourrait être interprété par spectroscopie XPS comme un décalage de 0,8 eV, peut être lié à la délocalisation des électrons de la paroi latérale de SWCNTs vers la molécule de PSE et surtout au groupement succinimide [Yang *et al.*; 2013a].

Ce changement dans les spectres XPS a également été observé (upshift) au cours de la fonctionnalisation de SWCNTs par des atomes d'hydrogène, et a conduit à l'hybridation des C 1s de sp^2 à sp^3 [Nikitin *et al.*; 2005]. Ici, le décalage indique un renforcement de l'hybridation sp^2 quand le SWCNTs-COOH devient SWCNTs-PSE. Si nous combinons cet effet à la soudaine apparition/disparition de la bande D dans les spectres Raman, nous pouvons conclure que l'adsorption de PSE par interaction π - π augmente le caractère sp^2 du C1s et limite la bande D.

Notez également que la distance la plus faible (3.02Å) entre le PSE adsorbé et le SWCNTs ne pouvait raisonnablement mener à une liaison chimique entre les deux molécules. Le petit chevauchement entre les orbitales de SWCNTs et PSE et l'analyse ELF ne montrent clairement aucun partage d'électron.



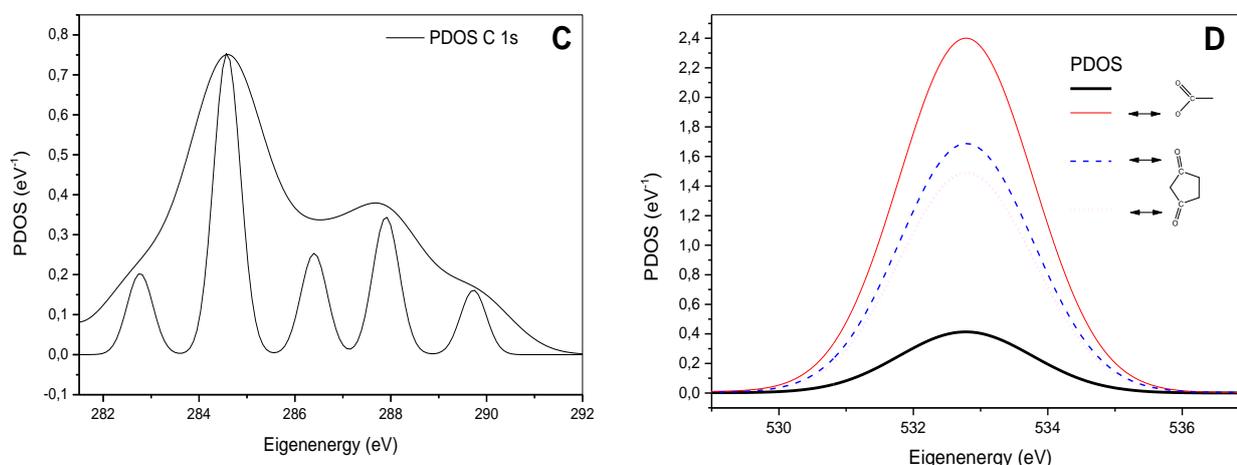


Figure II—14 PDOS du SWCNTs-PSE pour la région C 1s des atomes de carbone distants du PSE (A), en face du PSE (B), effet de la longueur du SWCNT (C) et région O 1s (D).

Comme démontré ci-dessus, la fonctionnalisation non-covalente affecte la constitution des bundles de SWCNTs lorsque les groupes fonctionnels adsorbés modifient significativement les conditions d'empilement ou d'association des SWCNTs.

La microscopie micro-RAMAN confocale révèle des détails importants sur la vibration de SWCNTs qui ne peut être accessible par les spectres Raman classique à laser puissant. Le PSE physico-adsorbé sur le SWCNTs était suffisant pour produire des changements détectables de RBM et de la bande G.

L'ATR-IR permet d'identifier certaines caractéristiques spécifiques telles que les modes tangentiels situés autour de 1600 cm^{-1} et le mode radial autour de 880 cm^{-1} de SWCNTs. Quant à l'analyse XPS, les niveaux de base expérimentaux C1s et O1s sont en bon accord avec les PDOS calculés. L'influence majeure du calcul vient de la taille des systèmes étudiés. La DFT donne des résultats théoriques comparables aux résultats expérimentaux pour des systèmes impliquant des interactions de π - π stacking. Les changements observés expérimentalement dans les différents spectres ont été clairement caractérisés par nos calculs théoriques comme dues à des molécules physico-adsorbées sur la paroi latérale de SWCNTs.

II.4 Résultats - Partie2

II.4.1 Description du nanovecteur NPT

Dans la première partie des résultats, nous avons décrit la procédure de coupure des nanotubes dans le mélange acide (voir Annexe1). Ainsi, leur caractérisation avec le PSE a été abordée par plusieurs techniques.

Afin de s'assurer de la bonne fonctionnalisation des nanotubes avec le groupement pyrène, la deuxième partie des résultats a consisté à greffer le ligand TRAIL en fin de réaction afin de créer le nanovecteur NPT proprement dit. Le NPT représente la symbolisation de NTC-PSE-TRAIL, et sera utilisé dans le reste du manuscrit. Les principales réactions de fonctionnalisation de nanotubes avec la protéine TRAIL sont décrites dans le schéma (Figure II-15) ci-dessous.

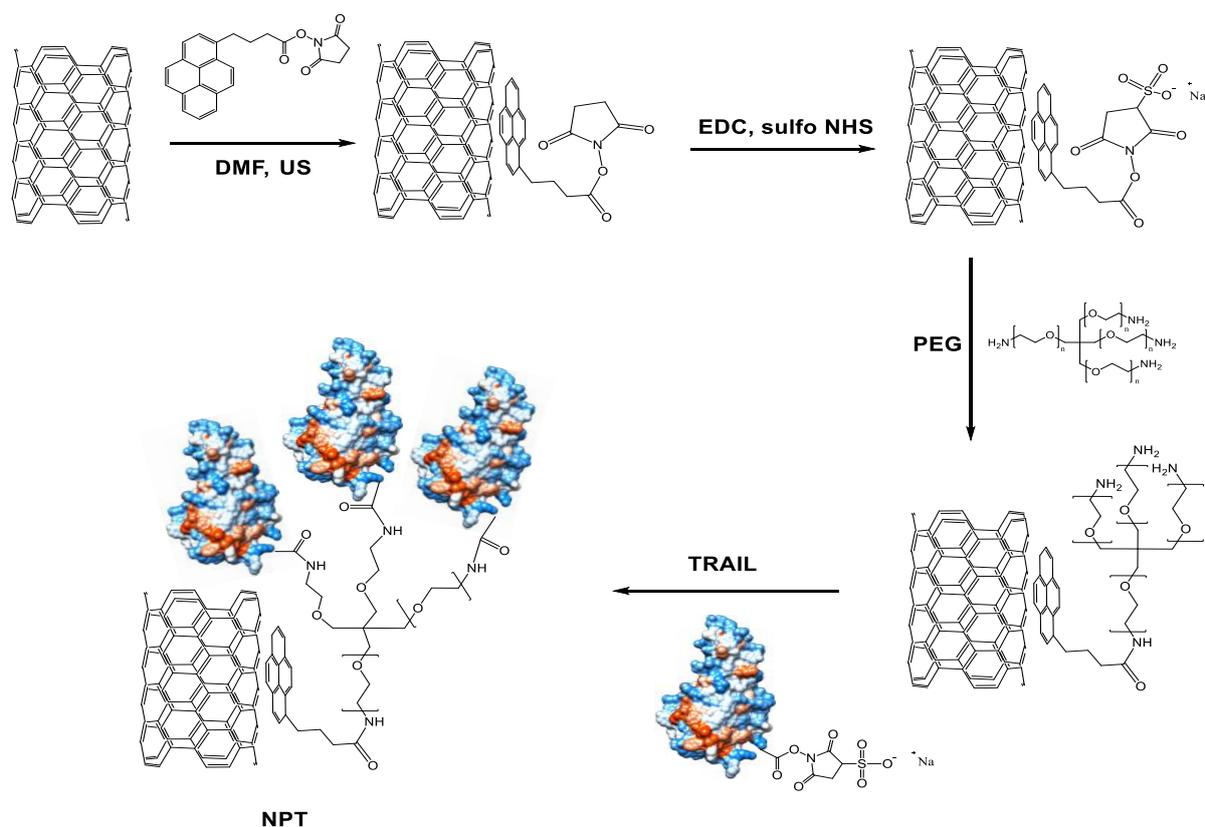


Figure II—15 Représentation schématique de réactions chimiques utilisées pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone avec TRAIL. Le nanovecteur obtenu à la fin des réactions est nommé NPT.

II.4.2 Caractérisation du nanovecteur NPT

Malheureusement, la caractérisation de la présence du TRAIL sur le nanovecteur par les méthodes citées plus-haut (RAMAN, infra-rouge, XPS) n'a pas été possible. Suite aux problèmes techniques, surtout la photoluminescence du signal avec l'échantillon contenant TRAIL par RAMAN, et la nécessité d'avoir un échantillon bien sec contenant la protéine avec l'infrarouge, ces problèmes techniques ont été de réels obstacles.

La meilleure solution a été l'observation des échantillons avec la microscopie électronique à transmission (MET), qui est l'une des méthodes principales utilisées aujourd'hui pour la caractérisation des objets à une très haute résolution et avec des détails impressionnants. Un protocole d'immuno-marquage bien spécifique a été élaboré (voir Annexe1 : paragraphe A1.3.1.2). La présence du TRAIL a bien été identifiée sur les nanotubes de carbone (Figure II-16 B) par rapport aux nanotubes contrôles (Figure II-16 A). Le taux de greffage du TRAIL a atteint environ 80% sur les nanotubes (voir Annexe1 : paragraphe A1.2.4). Ceci représente un très bon indice de fonctionnalisation protéique sur les nanotubes.

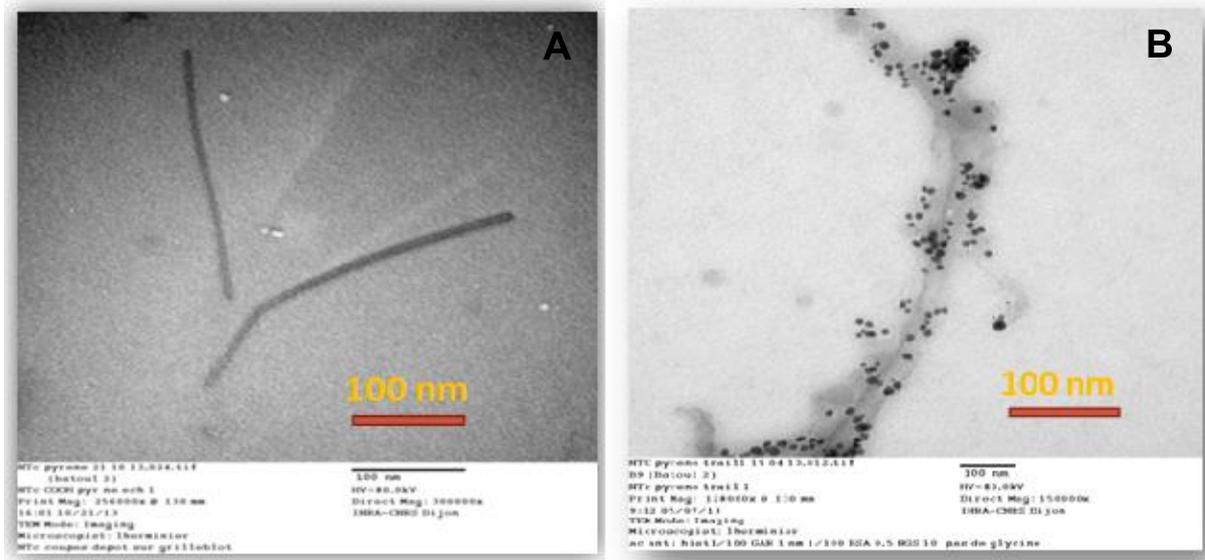


Figure II—16 Images par microscopie électronique (TEM) obtenues pour des nanotubes contrôles (NTC-Pyrene) (A) et des nanotubes fonctionnalisés avec du TRAIL greffé sur leur surface ou du nanovecteur tout simplement, nommé (NPT) (B). Les points noirs représentent

TRAIL greffé identifié par des anticorps spécifiques et dont le signal a été amplifié avec l'argent (voir Annexe-1 : partie A1.3.1.2).

D'autres types d'observations ont été également effectués, mais sans utiliser des protocoles d'immuno-marquage, et avec une analyse X élémentaire à l'échelle atomique des éléments présents dans chaque échantillon couplée au STEM. Les analyses montrent la présence du carbone qui provient des nanotubes et du TRAIL, mais aussi la présence d'autres éléments comme le phosphore (P), présent dans la solution du tampon phosphate, le silicium (qui vient de verreries utilisées pendant les expériences), et du fer (présents dans le processus de fabrication HIPCO des nanotubes). En revanche, les éléments N, et S proviennent de la protéine TRAIL (Figure II-17). Ainsi, sur le plan quantitatif, il est possible d'estimer (carrés de taille 0 \AA^2 dans la (Figure II-17 A) par l'analyse dispersive en énergie (ou EDS), (Figure II-17 C)) que le rapport entre l'azote et le soufre est d'environ 4. Cette valeur est semblable à ce qui est mesuré géométriquement à partir de la structure du TRAIL cristallin où les atomes de soufre ont 4 voisins d'azote en moyenne situés à moins de 5 \AA .

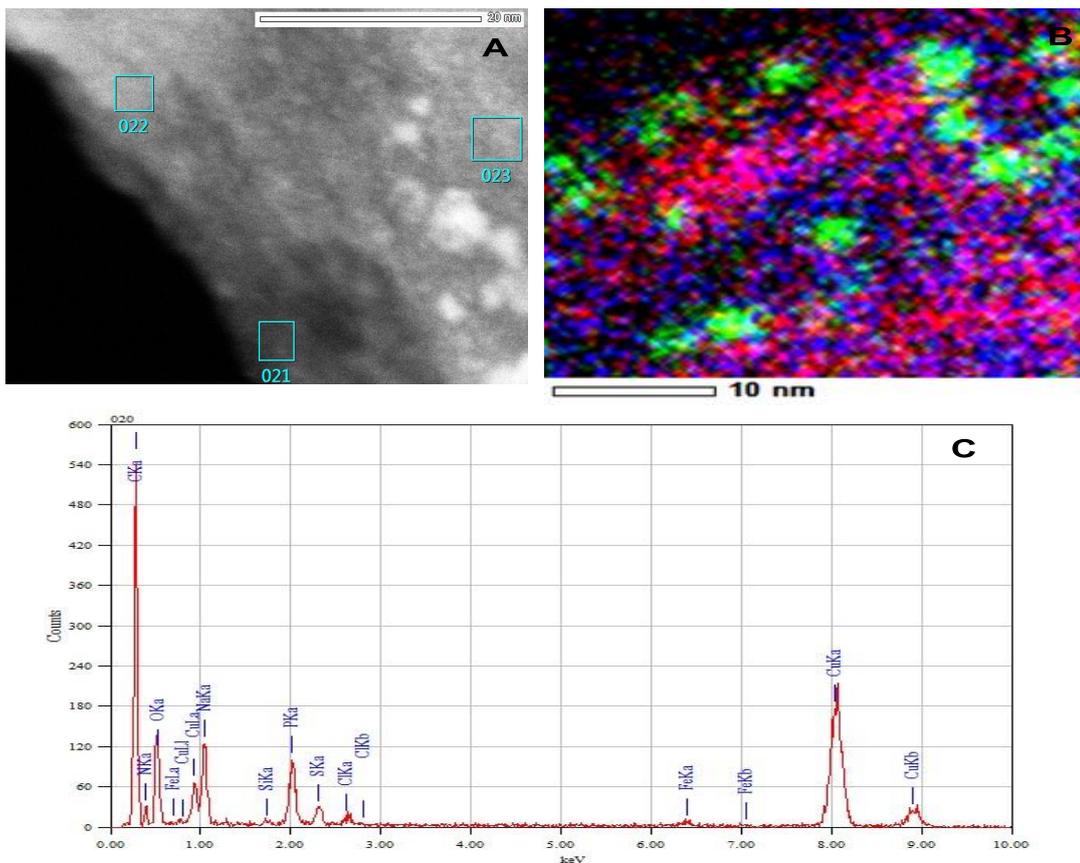


Figure II—17 images de microscopie électronique (STEM) obtenues pour les nanovecteurs (NPT) déposés sur des grilles de cuivre (A) Superposition des éléments (bleu: S, vert: Fe, rouge: N) : ces éléments sont observés par une analyse EDS couplé au STEM (B). Spectre d’EDS montrant la présence de C, N, O, S et les atomes de ligand TRAIL (C).

II.5 Conclusion

En conclusion, ce chapitre représente une étape primordiale dans le déroulement de cette thèse. En effet, nous pouvons dire que nous avons réussi à synthétiser correctement le nanovecteur NPT formé de nanotubes de carbone porteur du ligand anti-cancéreux TRAIL.

La caractérisation du nanovecteur a été divisée en deux étapes principales : des méthodes d’analyses avant d’ajouter le ligand TRAIL pour s’assurer des interactions de type π - π stacking créées entre les nanotubes et le PSE. Ces analyses ont été réalisées surtout par microscopie électronique, spectres RAMAN, infra-rouge, et analyses XPS. En même temps, des études théoriques ont été menées pour étudier les différentes interactions à plusieurs niveaux au sein du nanovecteur. La deuxième étape a consisté à évaluer la présence de la protéine TRAIL, une fois greffée au nanovecteur. Avant cette étape, un élément de dispersion

(polyéthylène glycol) a été utilisé pour surmonter le problème de formation des agrégats des nanotubes de carbone dans le milieu aqueux [Heister *et al.*; 2012].

En outre, la présence du TRAIL sur les nanotubes a été prouvée par deux méthodes expérimentales avec un taux de fonctionnalisation qui atteint presque 80%. Les différentes parties de cette analyse ont été détaillées dans l'Annexe 1 de ce chapitre (paragraphe A.1.2.4). A noter que nous avons essayé un autre type de fonctionnalisation (covalente) du TRAIL sur SWCNTs. Malheureusement le rendement de fonctionnalisation a été moins important que celui de la fonctionnalisation non-covalente. Les produits utilisés pour ce type de fonctionnalisation étaient toxiques au niveau cellulaire. Cela nous a poussés à abandonner cette voie.

A partir de cette étape de fonctionnalisation et des caractérisations du nanovecteur NPT, nous avons effectué des mesures thermodynamiques par chromatographie liquide d'affinité (CHLP) corrélées à des simulations théoriques par des logiciels de Docking (chapitre III), puis nous avons étudié les effets thérapeutiques du nanovecteur sur différents modèles et lignées tumorales afin de tester son activité anti-tumorale (chapitre IV).

II.6 Références Bibliographiques

- [Arab *et al.*; 2004] Arab, M.; Picaud, F.; Devel, M.; Ramseyer, C.; Girardet, C., Molecular selectivity due to adsorption properties in nanotubes. *Physical Reviews B* **2004**, *69*, 165401.
- [Arab *et al.*; 2007] Arab, M.; Picaud, F.; Ramseyer, C.; Babaa, M. R.; Valsaque, F.; McRae, E., Characterization of single wall carbon nanotubes by means of rare gas adsorption. *The Journal of Chemical Physics* **2007**, *126*, 054709.
- [Balasubramanian and Burghard; 2005] Balasubramanian, K.; Burghard, M., Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small* **2005**, *1* (2), 180-192.
- [Battigelli *et al.*; 2013] Battigelli, A.; Menard-Moyon, C.; Da Ros, T.; Prato, M.; Bianco, A., Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 1899-18920.
- [Bergin *et al.*; 2008] Bergin, S. D.; Nicolosi, V.; Streich, P. V.; Giordani, S.; Sun, Z.; Windle, A. H.; Ryan, P.; Niraj, N. P. P.; Wang, Z. T. T.; Carpenter, L.; Blau, W. J.; Boland, J. J.; Hamilton, J. P.; Coleman, J. N., Towards Solutions of Single-Walled Carbon Nanotubes in Common Solvent. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 1876-1881.
- [Bianco *et al.*; 2005a] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M., Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical communications* **2005a**, *5*, 571-577.
- [Bianco *et al.*; 2005b] Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005b**, *9*, 674-679.
- [Burghard; 2005] Burghard, M., Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes. *Surface Science Reports* **2005**, *58*, 1-109.
- [Chen *et al.*; 1998] Chen, J.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Chen, Y.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C., Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science* **1998**, *282* (5386), 95-98.
- [Chen *et al.*; 2001] Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D.; Dai, H. J., Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *The Journal of American Chemical Society* **2001**, *123*, 3838-3839.
- [De Juana and Pérez; 2013] De Juana, A.; Pérez, E. M., Getting tubed: mechanical bond in endohedral derivatives of carbon nanotubes? *Nanoscale* **2013**, *5*, 7141-7148.
- [Delichère and S.; 2010] Delichère, P.; S., L., Caractérisation de surface de perovskites La(1-x)SrxCo(1-y)FeyO3 In *4ème conférence francophone sur les spectroscopies d'électrons*, Fès-Maroc, 2010.
- [Dobardzic *et al.*; 2003] Dobardzic, E.; Milosevic, I.; Nikolic, B.; Vukovic, T.; Damnjanovic, M., Single-wall carbon nanotubes phonon spectra: Symmetry-based calculations. *Physical Reviews B* **2003**, *68*, 045408.
- [Fan and Zhang; 2008] Fan, W.; Zhang, R., Structural and electronic properties of single-walled carbon nanotubes adsorbed with 1-pyrenebutanoic acid, succinimidyl ester. *Sciences in China Series B: Chemistry* **2008**, *51*, 1203-1210.
- [Graupner *et al.*; 2006] Graupner, R.; Abraham, J.; Wunderlich, D.; Vencelová, A.; Lauffer, P.; Röhr, J.; Hundhausen, M.; Ley, L.; Hirsch, A., Nucleophilic-alkylation-reoxidation: a functionalization sequence for single-wall carbon nanotubes. *The Journal of American Chemical Society* **2006**, *128* (20), 6683-6689.

- [Graupner; 2007] Graupner, R., Raman spectroscopy of covalently functionalized single-wall carbon nanotubes. *The Journal of Raman Spectroscopy* **2007**, *38* (6), 673-683.
- [Heister *et al.*; 2012] Heister, E.; Neves, V.; Lamprecht, C.; Silva, S. R. P.; Coley, H. M.; McFadden, J., Drug loading, dispersion stability, and therapeutic efficacy in targeted drug delivery with carbon nanotubes *Carbon* **2012**, *50* (2), 622-632.
- [Hirsch; 2002a] Hirsch, A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. 41 ed.; International, A. C., Ed. 2002a; Vol. 11, pp 1853-1859.
- [Hirsch; 2002b] Hirsch, A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002b**, *41*, 1853-1859.
- [Hulman *et al.*; 2009] Hulman, M.; Skakalova, V.; Roth, S.; Kuzmany, H., Raman spectroscopy of single-wall carbon nanotubes and graphite irradiated by γ rays *Journal of Applied Physics* **2009**, *98* (2), 024311 - 024311-5
- [Izard *et al.*; 2008] Izard, N.; Kazaoui, S.; Hata, K.; Okazaki, T.; Saito, T.; Iijima, S.; Minami, N., Semiconductor-enriched single wall carbon nanotube networks applied to field effect transistors. *Applied Physics Letters* **2008**, *92* (24), 243112.
- [J.L. Bantignies *et al.*; 2006] J.L. Bantignies, J. L.; J.L. Sauvajol, J. L.; A. Rahmani, A.; E. Flahaut, E., Infrared-active phonons in carbon nanotubes. *Physical Reviews B* **2006**, *74*, 195425-195425.
- [Jiang *et al.*; 2002] Jiang, J.; Dong, J. M.; Xing, D. Y., Electronic properties in finite-length metallic nanotubes. *Physical Reviews B* **2002**, *65*, 245418-245424.
- [Jorio *et al.*; 2003] Jorio, A.; Pimenta, M. A.; Souza, A. G.; Saito, R.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S., Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *The New Journal of Physics* **2003**, *5*.
- [Judkins *et al.*; 2013] Judkins, J.; Lee, H. H.; Tung, S.; Kim, J. W., Diffusion of Single-Walled Carbon Nanotube Under Physiological Conditions. *The Journal of Biomedical Nanotechnology* **2013**, *9*, 1065-1070.
- [Karachevtsev *et al.*; 2011] Karachevtsev, V. A.; Stepanian, S. G.; Glamazda, A. Y.; Karachevtsev, M. V.; Eremenko, V. V.; Lytvyn, O. S.; Adamowicz, L., Noncovalent Interaction of Single-Walled Carbon Nanotubes with 1-Pyrenebutanoic Acid Succinimide Ester and Glucoseoxidase. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 21072-21082.
- [Karousis and Tagmatarchis; 2010] Karousis, N.; Tagmatarchis, N., Current Progress on the Chemical Modification of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 5366-5397.
- [Kim *et al.*; 2005] Kim, U. J.; Liu, X. M.; Furtado, C. A.; Chen, G.; Saito, R.; Jiang, J.; Dresselhaus, M. S.; Eklund, P. C., Infrared-Active Vibrational Modes of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Physical Reviews Letters* **2005**, *95*, 157402-157404.
- [Klumpp *et al.*; 2006] Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A., Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica & Biophysica Acta* **2006**, *1758*, 404-412.
- [Kuhlmann *et al.*; 1998] Kuhlmann, U.; Jantoljak, H.; Pfander, N.; Bernier, C.; C. Journet, C., Infrared active phonons in single-walled carbon nanotubes. *Chemical physics Letters* **1998**, *294*, 237-240.

- [Lin *et al.*; 2007] Lin, C. S.; Zhang, R. Q.; Niehaus, T. A.; Frauenheim, T., Geometric and electronic structures of carbon nanotubes adsorbed with flavin adenine dinucleotide : A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (11), 4069-4073.
- [Liu *et al.*; 1998] Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E., Fullerene pipes *Science* **1998**, *280* (5367), 1253-1256.
- [Loi *et al.*; 2010] Loi, M. A.; Jia Gao, J.; Cordella, F.; Blondeau, P.; Menna, E.; Bártoová, B.; Hébert, C.; Lazar, S.; Gianluigi, A.; Botton, G. A.; Milko, M.; Ambrosch-Draxl, C., Encapsulation of Conjugated Oligomers in Single-Walled Carbon Nanotubes: Towards Nanohybrids for Photonic Devices. *Advanced Materials* **2010**, *22* (14), 1635-1639.
- [Maggini *et al.*; 1993] Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M., Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *The Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 9798-9799.
- [Maultzsch *et al.*; 2002] Maultzsch, J.; Reich, S.; Thomsen, C.; Webster, S.; Czerw, R.; Carroll, D. L.; Vieira, S. M. C.; Birkett, P. R.; Rego, C. A., Raman characterization of boron-doped multiwalled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2002**, *81* (14), 2647.
- [Meunier *et al.*; 1999] Meunier, V.; Senet, P.; Lambin, P., Scanning tunneling spectroscopy signature of finite-size and connected nanotubes: A tight-binding study. *Physical Reviews B* **1999**, *60*, 7792-7795.
- [Nakashima; 2006] Nakashima, N., Solubilization of single-walled carbon nanotubes with condensed aromatic compounds. *Science and Technology of Advanced Materials* **2006**, *7* (7), 609-616.
- [Nikitin *et al.*; 2005] Nikitin, A.; Ogasawara, H.; Mann, D.; Denecke, R.; Zhang, Z.; Dai, H.; Cho, K.; Nilsson, A., Hydrogenation of single-walled carbon nanotubes. *Physical Reviews B* **2005**, *71*, 225507.
- [Okpalugo *et al.*; 2005] Okpalugo, T. I. T.; Papakonstantinou, P.; Murphy, H.; McLaughlin, J.; Brown, N. M. D., High resolution XPS characterization of chemical functionalized MWCNTs and SWCNTs. *Carbon* **2005**, *43*, 153-161.
- [Rajter and French; 2010] Rajter, R.; French, R. H., Van der Waals-London dispersion interaction framework for experimentally realistic carbon nanotube systems. *The International Journal of Materials Research* **2010**, *101* (1), 27-42.
- [Riggs *et al.*; 2000] Riggs, E.; Guo, Z.; Carroll, D. L.; Sun, Y. P., Strong Luminescence of Solubilized Carbon Nanotubes. *The Journal of American Chemical Society* **2000**, *122* (24), 5879-5880.
- [Rivas *et al.*; 2007] Rivas, G. A.; Rubianes, M. D.; Rodriguez, M. C.; Ferreyra, N. F.; Luque, G. L.; Pedano, M. L.; Miscoria, S. A.; Parrado, C., Carbon nanotubes in biosensing. New highly sensitive and selective platforms for the development of electrochemical sensors. *Talanta* **2007**, *74*, 291-307.
- [Rubio *et al.*; 1999] Rubio, A.; Sanchez-Portal, D.; Artacho, E.; Ordejon, P.; Soler, J. M., Electronic States in a Finite Carbon Nanotube: A One-Dimensional Quantum Box. *Physical Reviews Letters* **1999**, *82*, 3520-3523.
- [Sozykin and Beskachko; 2013] Sozykin, S. A.; Beskachko, V. P., Structure of endohedral complexes of carbon nanotubes encapsulated with lithium and sodium. *Molecular Physics* **2013**, *111*, 930-938.

- [Strano *et al.*; 2003] 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.; Smalley, R. E., Electronic Structure Control of Single-Walled Carbon Nanotube Functionalization. *Science* **2003**, *301* (5639), 1519-1522
- [Su *et al.*; 2014] Su, Q.; Du, G.; Zhang, J.; Zhong, Y.; Xu, B.; Yang, Y.; Neupane, S.; Li, W., In Situ Transmission Electron Microscopy Observation of Electrochemical Sodiation of Individual Co₉S₈-Filled Carbon Nanotubes. *ACS nano* **2014**, *8* (4), 3620–3627.
- [Sun *et al.*; 2008] Sun, L.; Warren, G. L.; O'Reilly, J. Y.; Everett, W. N.; Lee, S. M.; Davis, D.; Lagoudas, D.; Sue, H. J., Mechanical properties of surface-functionalized SWCNT/epoxy composites. *Carbon* **2008**, *46*, 320-328.
- [Tang *et al.*; 2014] Tang, D. M.; Liu, C.; Yu, W. J.; Zhang, L. L.; Hou, P. X.; Li, J. C.; Li, F.; Bando, Y.; Golberg, D.; Cheng, H. M., Structural changes in iron oxide and gold catalysts during nucleation of carbon nanotubes studied by in situ transmission electron microscopy. *ACS nano* **2014**, *8* (1), 292-301.
- [Tomonari *et al.*; 2006] Tomonari, Y.; Murakami, H.; Nakashima, N., Solubilization of single-walled carbon nanotubes by using polycyclic aromatic ammonium amphiphiles in water - Strategy for the design of high-performance solubilizers. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12* (15), 4027-4034.
- [Wang; 2009] Wang, H., Dispersing Carbon Nanotubes Using Surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, *14* (5), 364-371.
- [Weiqiang *et al.*; 1997] Weiqiang, H.; Shoushan, F.; Qunqing, L.; Yongdan, H., Synthesis of Gallium Nitride Nanorods Through a Carbon Nanotube-Confined Reaction. *Science* **1997**, *277* (5330), 1287-1289.
- [Yang *et al.*; 2013a] Yang, J. E.; Gao, Y.; Zhang, W.; Tang, P.; Tan, J.; Lu, A. H.; Ma, D., Cobalt Phthalocyanine-Graphene Oxide Nanocomposite: Complicated Mutual Electronic Interaction. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013a**, *117*, 3785-3788.
- [Yang *et al.*; 2013b] Yang, S.; Yu, S.; Cho, M., Influence of Thrower–Stone–Wales defects on the interfacial properties of carbon nanotube/polypropylene composites by a molecular dynamics approach. *Carbon* **2013b**, *55*, 133-143.

Chapitre III Etude thermodynamique du nanovecteur NPT et du TRAIL par une approche chromatographique d'affinité (CHLP) et par docking

Table des matières

III.1 INTRODUCTION	124
<i>III.1.1 Docking</i>	<i>124</i>
<i>III.1.2 Quelques notions sur la modélisation</i>	<i>126</i>
III.1.2.1 Champ de force	126
III.1.2.2 Optimisation structurale	127
III.1.2.3 Solvant	127
III.1.2.4 Docking.....	127
<i>III.1.3 Chromatographie liquide à haute performance (CHLP)</i>	<i>128</i>
III.1.3.1 Définitions et avantages	128
III.1.3.2 Principe	129
III.1.3.3 Mesure des grandeurs chromatographiques	130
<i>III.1.4 Les différents types d'interactions entre un ligand et un récepteur</i>	<i>133</i>
III.1.4.1 Interactions hydrophobes (primaires)	133
III.1.4.2 Liaisons hydrogène (secondaires)	134
III.1.4.3 Interactions de Van der Waals (secondaires)	134
III.2 RESULTATS DU DOCKING.....	135
<i>III.2.1 Effet du zinc sur le docking du TRAIL</i>	<i>136</i>
<i>III.2.2 Résidus d'interactions TRAIL-DR5 par docking.....</i>	<i>139</i>
III.3 RESULTATS EXPERIMENTAUX DES INTERACTIONS TRAIL-DR5 PAR CHLP	140
<i>III.3.1 Temps de rétention des différentes espèces injectées</i>	<i>140</i>
<i>III.3.2 Courbes de Van't Hoff.....</i>	<i>141</i>
<i>III.3.3 Paramètres thermodynamiques ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$.....</i>	<i>142</i>
<i>III.3.4 Compensation enthalpie-entropie (CEE).....</i>	<i>143</i>
<i>III.3.5 Effet du pH sur la fixation de TRAIL sur DR5</i>	<i>145</i>
III.4 DISCUSSION-CONCLUSION	146
III.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151

Abréviations

AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
CEE	Compensation enthalpie-entropie
CHLP	Chromatographie liquide à haute performance
Cys-	Résidu cystéine
Gln-	Résidu glutamine
NAMD	(Nanoscale Molecular Dynamics) code de dynamique moléculaire
PPI	Protein-protein interactions
RMSD	Root mean square deviation
Tyr-	Résidu tyrosine
Zn	Zinc

III.1 Introduction

III.1.1 Docking

Un besoin toujours plus important dans le domaine de la « bio-informatique », engendre des efforts accrus pour répondre à des questions biologiques non résolues clairement dans les expériences. La structure tridimensionnelle et les changements de conformation des biomolécules sont au cœur d'études des interactions moléculaires dans les processus biologiques. En outre, la détermination structurale des protéines a été considérablement développée expérimentalement grâce à plusieurs techniques comme la cristallographie par diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire. Aujourd'hui, plus de 107 000 structures biologiques sont hébergées par le site « Protein Data Bank ».

Parfois, l'étude structurale des biomolécules ne suffit pas pour déterminer les processus d'interactions, puisque les méthodes expérimentales offrent des informations sur des structures dites *figées* sans décrire les mécanismes d'interaction, leur site et leur mode. D'où des modèles de simulation par amarrage « Docking » ont été inventés, d'une part, pour *interpréter* les résultats obtenus expérimentalement, et d'autre part pour *prévoir* les interactions possibles entre les différentes macromolécules.

En outre, la modélisation permet d'avoir deux moyens d'études. D'une part, au niveau d'une molécule isolée par la dynamique moléculaire pour déterminer son état le plus stable et les changements de conformations possibles de cette dernière. D'autre part, au niveau de deux ou plusieurs molécules qui s'interagissent ensemble pour prédire, par le docking, la possibilité de formation des complexes et leur structure tridimensionnelle. Actuellement, la modélisation offre une étude détaillée de molécules au niveau de leur conformation et les changements qu'elles peuvent subir [Simona *et al.*; 2004], la cinétique des réactions [Pellarin and Caffisch; 2006, Strodel *et al.*; 2007], les impacts du milieu d'étude tels que l'effet du pH et la solvation [Geneste *et al.*; 2014], et les différentes étapes réactionnelles [Dokholyan; 2006, Jahn and Radford; 2005]. En revanche, les molécules biologiques sont *flexibles* et leur structure change à la moindre interaction avec d'autres molécules, ce qui rend cette caractéristique complexe à mettre en œuvre par la simulation.

Le modèle du docking le plus communément utilisé, est le modèle géométrique clef-serrure « key-lock », où une première molécule généralement un récepteur dans une conformation *clé*, s'associe avec une autre molécule correspondante comme un ligand par exemple dans une conformation *serrure*. Le principe clef-serrure apparaît dans la (Figure III-1). Dans ce but, plusieurs logiciels de Docking ont été élaborés pour trouver les conformations des molécules les plus stables et leur orientation par un calcul thermodynamique reposant sur des champs de force décrits par la biophysique. Plusieurs exemples de logiciels qui prennent en compte la flexibilité dans des algorithmes de Docking existent, citons AUTODOCK [Morris *et al.*; 1998], et DOCK [Ewing and Kuntz; 1997].

Cependant, les méthodes de calcul pour la modélisation structurale des interactions de type protéine-protéine « PPI » tiennent un rôle fondamental en tant que source d'informations structurales sur les complexes protéiques. Ces derniers complètent les structures déterminées expérimentalement et sont un moyen de compréhension des mécanismes d'association protéique [Sinha *et al.*; 2012].

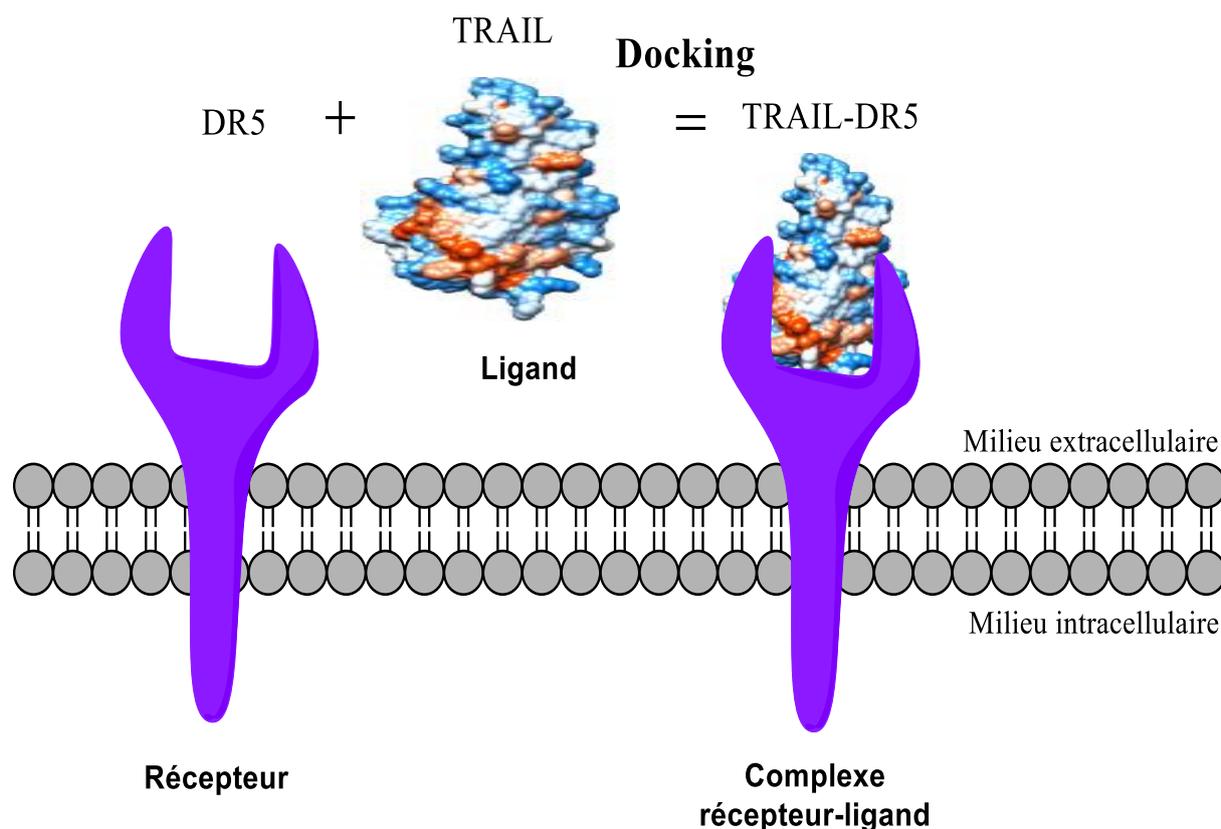


Figure III—1 Principe du Docking du récepteur DR5 avec son ligand TRAIL selon le modèle clef-serrure.

III.1.2 Quelques notions sur la modélisation

Pour modéliser une molécule biologique, le premier point consiste à créer un modèle en s'appuyant sur des données cristallographiques de préférence. Ensuite, un champ de force est nécessaire pour décrire les liaisons chimiques au sein du système moléculaire. Ainsi, une optimisation de géométrie permet d'amener le système à l'état le plus stable.

III.1.2.1 Champ de force

Il permet de mentionner les interactions des molécules du système sans changer leur nature. A partir de cette étape, le calcul sera précisé par une fonction mathématique bien déterminée pour décrire les angles des liaisons atomiques, les longueurs de liaisons et les différents paramètres permettant de définir le potentiel moléculaire.

III.1.2.2 Optimisation structurale

L'énergie totale du système, déjà décrite par un potentiel moléculaire dans le paragraphe précédent, représente l'énergie de stabilité des molécules. L'optimisation de la structure des molécules est une étape très importante en modélisation. Elle permet de déterminer l'énergie minimale pour laquelle le système est en équilibre et prend la conformation la plus stable.

III.1.2.3 Solvant

Dans le milieu biologique, les molécules sont en contact permanent avec un solvant. Par conséquent, il faut prendre en considération l'énergie de solvation en simulation. Des molécules d'eau peuvent être ajoutées ainsi dans une boîte virtuelle autour de la molécule d'intérêt. Parfois, des ions (positifs et négatifs) peuvent-être aussi être ajoutés pour que le système soit électriquement neutre.

Le modèle TIP3P [Jorgensen *et al.*; 1983], utilisé dans nos calculs, est le modèle le plus répandu en simulation et permet de modéliser efficacement les molécules d'eau (voir Annexe 2).

III.1.2.4 Docking

Il existe beaucoup d'exemples de molécules « dockées » dans la littérature : ADN-protéines [Gupta *et al.*; 2013], protéines-ligands [Mukherjee *et al.*; 2005] et des interactions de type protéine-protéine [Sinha *et al.*; 2012, Tovchigrechko *et al.*; 2002]. Dans ce contexte, la modélisation du complexe formé par le ligand protéique TRAIL avec son récepteur DR5 a été décrite dans plusieurs publications : TRAIL forme un homo-trimère capable de se fixer sur différents récepteurs. La structure cristalline du complexe TRAIL/DR5 a montré des changements radicaux dans la charge de surface du ligand TRAIL, ce qui a permis d'avoir la possibilité de concevoir la nature et les positions spécifiques de contact entre le ligand et le récepteur. Ensuite, une description plus détaillée du complexe, a renseigné sur la résolution de sa structure, l'alignement de séquences et surtout sur le rôle important attribué à un ion de

zinc entre les monomères de TRAIL, et qui est nécessaire pour stabiliser le trimère de TRAIL, et lui permet une activité biologique optimale [Ashkenazi; 2002, Hymowitz *et al.*; 2000, Mongkolsapaya *et al.*; 1999].

En outre, plusieurs modèles en forme de mosaïques ont été proposés dans la littérature pour l'interaction du récepteur DR5 avec son ligand TRAIL à la surface cellulaire : des dimères pré-associés de récepteur DR5 recrutent le ligand trimérique de TRAIL, ou des récepteurs associés en trimères recrutent des trimères de TRAIL [Kimberley and Screaton; 2004].

D'autres travaux ont analysé les mécanismes possibles d'interaction entre le ligand trimérique TRAIL avec les récepteurs de mort (DR4 et DR5). Des suggestions de régulation du complexe formé, par les récepteurs antagonistes (DcR1 et DcR2) ou par des molécules recrutées en aval à l'intérieur de la cellule, ont été cependant proposées. C'est le cas des modèles proposés aussi pour la formation des dimères des caspases initiateuses d'apoptose [Shirley *et al.*; 2011]. Les données de docking du TRAIL avec DR5 sont très restreintes à ce niveau, cela nous a encouragés à étudier plus précisément le processus énergétique entre TRAIL et DR5 par des logiciels de docking.

III.1.3 Chromatographie liquide à haute performance (CHLP)

III.1.3.1 Définitions et avantages

La CHLP d'affinité, connue comme une méthode de séparation, est une technique importante d'étude des interactions entre différentes molécules biologiques (protéines, peptides ...). Cette technique est surtout appropriée pour étudier le mécanisme d'association entre un xénobiotique et une autre molécule comme un récepteur par exemple. Elle propose un large éventail d'applications surtout dans le domaine biomédical [Geneste *et al.*; 2014, Massolini *et al.*; 2001, Sarr *et al.*; 2010]. En outre, elle constitue une approche fiable de mesure des paramètres physico-chimiques tels que le pH, la température et la force ionique du milieu d'étude.

Parmi les nombreux avantages de cette technique, nous pouvons citer sa haute résolution, la séparation rapide des constituants d'un mélange injecté, les mesures quantitatives précises, la reproductibilité des analyses répétées sur une même colonne chromatographique.

III.1.3.2 Principe

Le principe de base de cette technique se déroule en quatre étapes successives : la **phase mobile du solvant** (milieu d'étude) circule en permanence à travers la colonne et le système chromatographique. L'échantillon (NPT ou TRAIL dans notre cas) est **injecté** par une vanne d'injection dans le système, sous l'effet d'une pompe à haute pression.

Ensuite, cet échantillon, transporté par la phase mobile, doit **passer** dans la colonne chromatographique remplie de phase stationnaire. Dans notre cas, le récepteur de mort DR5 est immobilisé sur un support de silice constituant la phase stationnaire de la colonne. Une élévation de la pression dans le système chromatographique a lieu grâce à un fort débit d'écoulement de la phase mobile. L'échantillon est retenu par la colonne et doit y sortir au bout d'un temps T_R plus ou moins long selon son affinité pour la phase stationnaire. Ces notions de temps de rétention T_R d'échantillon et le facteur de rétention k' caractérisent la fixation d'échantillon sur la phase stationnaire de la colonne. Finalement, le signal chromatographique est **déecté** par un détecteur UV-visible et un chromatogramme est ainsi obtenu. Cependant, k' peut être mesuré directement par le chromatogramme grâce au temps séparant le sommet du pic d'élution d'échantillon de son injection. Ce principe est détaillé dans la (Figure III-2) ci-dessous.

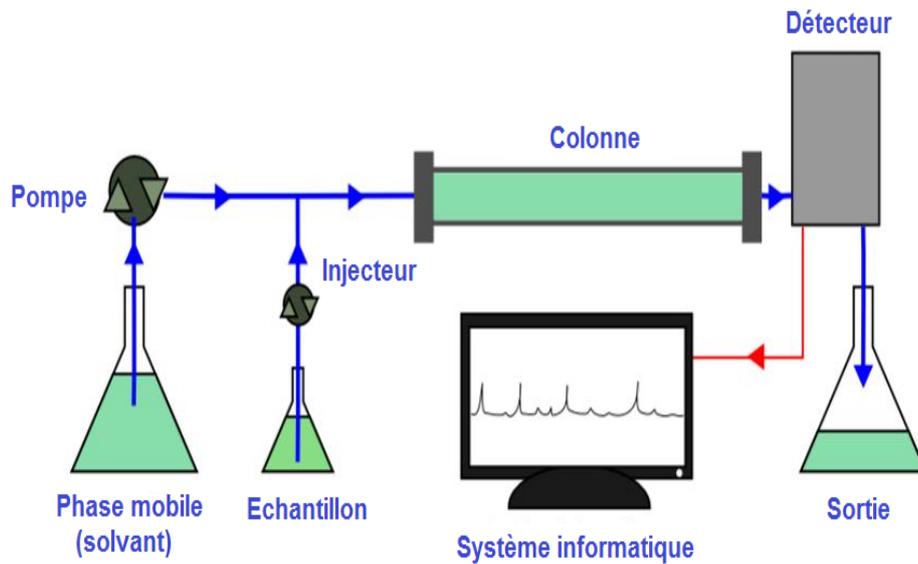


Figure III—2 Représentation schématique du principe de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). D'après [Schneider; 2007].

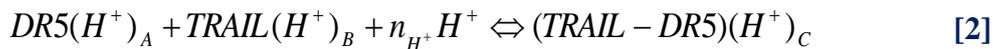
III.1.3.3 Mesure des grandeurs chromatographiques

Nous avons fixé ou immobilisé le récepteur DR5 d'une manière covalente sur une résine formée de particules de silice sur lesquelles sont greffés des groupements amine dans la colonne chromatographique. La technique d'immobilisation du DR5 sur la phase stationnaire de la colonne est détaillée brièvement dans l'Annexe 2 (paragraphe A2.3). Cette immobilisation du DR5 aboutit à la création d'une colonne spécifiquement dédiée à l'étude des mécanismes d'association entre le récepteur DR5 et son ligand TRAIL. Dans cette partie, nous décrivons les différentes équations mathématiques qui permettent de mesurer et de calculer les différentes grandeurs chromatographiques.

➤ **Constante d'association k' .** Elle caractérise l'affinité du ligand TRAIL pour son récepteur DR5. Cette constante k' est liée au temps de sortie du TRAIL de la colonne chromatographique désigné par le terme (temps de rétention T_R du TRAIL) et au temps mort de la colonne T_0 , qui est la première perturbation à partir de la ligne basale par l'équation suivante :

$$k'_{TRAIL} = \frac{T_R - T_0}{T_0} \quad [1]$$

➤ **Effet du pH.** Il est caractérisé par l'association d'un seul ou plusieurs protons au ligand TRAIL. D'une autre façon, l'effet du pH s'explique par une association ou dissociation résultantes d'une modification des pKa des acides aminés (a.a) ionisables dans la réaction. Suite à une variation du pH dans la phase mobile (milieu d'étude), le mécanisme d'interaction du TRAIL avec le récepteur DR5 est important à étudier pour décrire la conservation de masse du ligand, du récepteur, ainsi que l'association de protons au ligand (TRAIL) [Bagnost; 2010].



avec $n_{H^+} = C - (A+B)$ est le nombre de protons liés à TRAIL pendant la réaction.

Nous arrivons à l'équation suivante :

$$\log k' = \log k'_0 - n_{H^+} \log [H^+] \quad [3]$$

Après dérivation de l'équation [3] :

$$n_{H^+} = \frac{\partial \log k'}{\partial \text{pH}} \quad [4]$$

➤ **Effet de la température.** La variation de température permet de tracer les courbes de Van't Hoff. Il existe une relation entre l'enthalpie libre standard ΔG° du mécanisme d'interaction du TRAIL avec DR5 et la constante d'association k' par l'équation :

$$\Delta G^\circ = -RTk'_{TRAIL} \quad [5]$$

Avec T la température (Kelvin) et R la constante des gaz parfaits. Egalement, k' pourrait-être exprimée par l'enthalpie standard ΔH° et par l'entropie standard ΔS° du mécanisme d'interaction TRAIL-DR5 par l'équation :

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad [6]$$

A partir de l'équation [6], nous obtenons :

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \Delta S^\circ \quad [7]$$

$$\text{Avec} \quad \Delta S^{\circ*} = \frac{\Delta S^{\circ}}{R} + \varphi \quad [8]$$

Par conséquent, la courbe de Van't Hoff qui est représentée par la variation de $\ln k'$ en fonction de $1/T$ est une droite qui permet le calcul des paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° . Quand les conditions expérimentales changent, $\Delta S^{\circ*}$ (sans unité) varie d'une façon identique à ΔS° car φ est une constante [Melander and Horvath; 1980].

➤ **Compensation enthalpie-entropie (CEE).** Elle permet d'analyser en détail le processus d'interactions entre le ligand TRAIL et le récepteur DR5 suite aux variations des conditions expérimentales. La CEE est un outil extra-thermodynamique, qui permet d'étudier les paramètres physico-chimiques [Melander and Horvath; 1980]. Cependant, la CEE est caractérisée par l'équation suivante :

$$\Delta H^{\circ} = \beta \Delta S^{\circ} + \Delta G^{\circ}_{\beta} \quad [9]$$

où ΔG°_{β} désigne l'enthalpie libre du mécanisme d'interactions du TRAIL avec son récepteur DR5 à la température de compensation β . Quand les conditions du milieu changent (modification du pH par exemple), le ligand TRAIL possède une certaine enthalpie libre ΔG°_{β} (variation d'énergie de Gibbs) à la température de compensation β , indépendamment des conditions d'analyse. D'où, nous pouvons dire que la contribution enthalpique reste identique pour toutes les conditions, idem pour l'entropie ΔS° dans ce cas [Ranatunga et al.; 2002].

Du fait que TRAIL interagit avec DR5 indépendamment des conditions, la relation suivante entre la température de compensation β et le facteur de rétention k' , est possible à une température donnée T :

$$\ln k'_{TRAIL})_T = \frac{-\Delta H^{\circ}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{\beta} \right) - \frac{\Delta G^{\circ}_{\beta}}{R\beta} \quad [10]$$

La courbe $\ln k'_{TRAIL})_T = f\left(\frac{\Delta H^{\circ}}{R}\right)$ [10'] est une droite avec une pente égale à $[-(1/T) + (1/\beta)]$. Cependant, la température de compensation β , représente la température pour laquelle le ligand TRAIL possède le même facteur de rétention k'_{TRAIL} sur le récepteur DR5 et c'est valable pour toutes les conditions opératoires. Ainsi, et si la CEE est étudiée, nous pouvons conclure que TRAIL est retenu sur la colonne DR5 via généralement le même type

d'interactions [Melander and Horvath; 1980]. En revanche, s'il existe une différence dans les valeurs des pentes d'équation [10'], aux différentes conditions étudiées, cela signifie qu'il y a un changement du processus d'interaction entre le ligand TRAIL et le récepteur DR5 d'après [Ranatunga *et al.*; 2002]. Cette partie sera détaillée d'une façon plus explicite dans la partie des résultats (paragraphe III.3.4). Ainsi, les différents types d'interactions possibles entre un ligand et son récepteur sont expliqués dans le paragraphe (III.1.4) ci-dessous.

III.1.4 Les différents types d'interactions entre un ligand et un récepteur

La condition primordiale pour qu'un ligand interagisse avec un récepteur donné est qu'il soit dans son voisinage. Il existe deux types d'interactions possibles pour un meilleur assemblage ligand/récepteur (ou TRAIL/DR5 dans notre cas) : les interactions primaires et à longue portée (interactions hydrophobes), et les interactions secondaires à courtes portées (essentiellement les interactions de van der Waals et liaisons hydrogènes).

III.1.4.1 Interactions hydrophobes (primaires)

Ce type d'interactions est répandu dans le repliement protéique. Les protéines gardent leur fonctionnalité biologique tout en réduisant leur propre surface de contact et leurs interactions indésirables avec les molécules d'eau.

Dans un milieu aqueux, les molécules d'eau n'interagissent pas avec une molécule hydrophobe donnée et les liaisons hydrogène finissent par rompre. Ainsi, une cage (clathrate) crée par de nouvelles liaisons hydrogène entre les molécules d'eau tout autour de la molécule hydrophobe (Figure III-3) [Cheng and Rosicky; 1998]. Le système obtenu est donc plus ordonné et ΔS devient négative. Dès qu'une autre molécule hydrophobe est mise en jeu dans le milieu, elle interagit spontanément avec la première molécule hydrophobe par des interactions hydrophobes.

Dans ce cas, l'enthalpie augmente (ΔH positif) suite à une cassure des liaisons hydrogènes du clathrate et le système sera plus désordonné (ΔS positif). Cependant, les interactions hydrophobes aboutissent à une réaction spontanée car : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

(Equation de Gibbs) [11] ; ΔH a une petite valeur positive ; ΔS a une grande valeur positive, et la valeur résultante de ΔG est donc négative.

Molécule d'eau (clathrate)

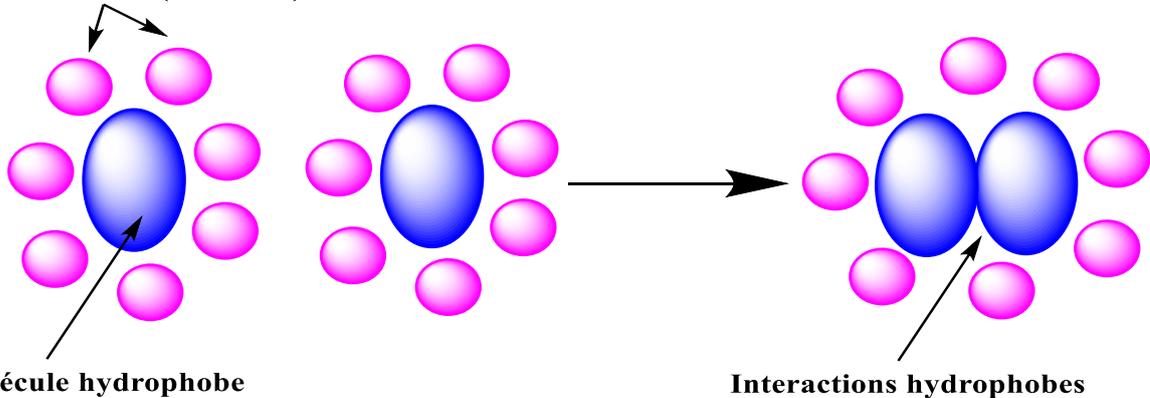


Figure III—3 Représentation schématique de la formation des interactions hydrophobes entre deux molécules par une réaction spontanée.

III.1.4.2 Liaisons hydrogène (secondaires)

Les atomes électronégatifs (oxygène, chlore et fluor) s'associent à l'hydrogène par des liaisons nommées liaisons hydrogène. Ces dernières se caractérisent par une interaction de haute énergie et par une attraction vers les doublets non liants du TRAIL *via* des charges partielles positives sur l'hydrogène.

Les liaisons hydrogènes possèdent une propriété importante dans le milieu aqueux (transfert des protons entre les molécules qu'elles lient) et peuvent être ainsi inter- et/ou intramoléculaires (la formation de la clathrate par exemple : voir paragraphe III.1.4.1).

III.1.4.3 Interactions de Van der Waals (secondaires)

Ce sont des interactions inter- et intra- moléculaires électriques de faible énergie, ayant comme origine les interactions entre des dipôles permanents ou induits. Elles peuvent avoir trois origines [Leite *et al.*; 2012] :

➤ **Forces de Keesom (forces d'orientation)**. Il s'agit d'une interaction électrostatique dipôle-dipôle, c'est-à-dire entre deux dipôles permanents selon leur orientation. C'est le cas des molécules de la phase mobile qui ont un dipôle permanent (eau).

- **Forces de Debye (forces d'induction).** C'est le cas des dipôles induits. Il existe un champ électrique crée par une molécule dipolaire qui va polariser les molécules présentes dans son voisinage et celles-ci seront donc attirées par les molécules polaires.
- **Forces de London (forces de dispersion).** Elles se caractérisent par des interactions électrostatiques attractives entre des dipôles induits dues aux mouvements relatifs des électrons et des noyaux. Généralement, elles sont faibles devant les autres forces secondaires (liaisons hydrogène, forces de Keesom...) pour les molécules polaires. Cependant, les forces de London sont présentes comme forces d'attraction entre les molécules non polaires (diazote ou méthane par exemple).

Dans ce chapitre, nous étudions l'influence de différents paramètres thermodynamiques tels que le pH (effet décrit dans la littérature juste par la modification du type de mort cellulaire [Jouan-Lanhouet *et al.*; 2012]) et la température. En effet, peu (voire aucun) de travaux existent sur l'affinité du TRAIL avec ses différents récepteurs où DR5 possède la meilleure affinité à TRAIL par rapport aux autres à 37°C [Truneh *et al.*; 2000]). Ces paramètres ont été examinés par la technique de chromatographie d'affinité (CHLP) en injectant le ligand TRAIL seul ou fonctionnalisé sur des nanotubes de carbone (NPT), véhiculés par la phase mobile jusqu'à leur rétention par la colonne chromatographique (ou phase stationnaire). Cette dernière contient des molécules du récepteur DR5 greffées par une liaison covalente sur des particules de silice. En parallèle à ce travail expérimental, des calculs théoriques de docking ont été réalisés afin d'avoir une étude complète et conclure sur les meilleures conditions d'interactions du complexe formé par le ligand TRAIL fonctionnalisé ou pas et son récepteur DR5.

III.2 Résultats du Docking

La capacité des membres de la superfamille des cytokines TNF à former des trimères (ou à des degrés plus élevés d'oligomérisation) est déterminante pour l'activation du récepteur. Dans un premier temps, nous avons examiné l'influence de l'oligomérisation du TRAIL sur sa complexation avec le récepteur DR5 afin de donner une interprétation précise des expériences.

III.2.1 Effet du zinc sur le docking du TRAIL

La tendance de TRAIL à former des trimères stables, a été observée expérimentalement. Théoriquement, elle a été montrée par des calculs du docking en utilisant une structure relaxée du TRAIL à partir de sa forme cristalline (Figure III-4 A). Malgré un écart de 0,82 Å (RMSD) entre les structures relaxées et cristallines, le ligand TRAIL a de nouveau la possibilité de former des oligomères stables dans une solution physiologique (Figure III-4 B).

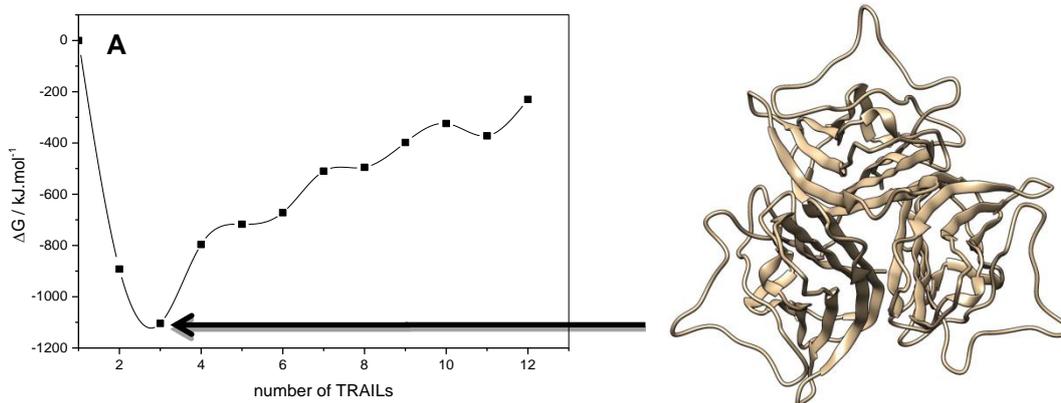
Cependant, en absence d'ions zinc pendant la procédure du docking, le trimère ne possède pas la même géométrie que celle décrite à l'état cristallin, et peut former des pentamères stables. Lorsque $ZnCl_2$ est ajouté et chélaté par le résidu Cys230 (pdb # 1D4V), le processus du docking aboutit à l'homo-trimère attendu (pdb # 1D0G) avec une énergie (-1260 kJ / mol) beaucoup plus négative que celle du trimère dépourvu en sel de zinc $ZnCl_2$ (-722 kJ / mole). Bien que TRAIL puisse s'oligomériser comme indiqué par des calculs du docking, l'ion Zn^{2+} (présent sous forme de traces au cours de la production de TRAIL - voir Annexe 3 du chapitre IV) donne une plus grande stabilité à l'homo-trimère du TRAIL, et il est indispensable pour une meilleure fonction biologique du TRAIL [Bodmer *et al.*; 2000]. Par conséquent, TRAIL tend à s'oligomériser soit comme un homo-trimère ou un oligomère, et nous pouvons donc supposer qu'il est greffé en tant que tel sur la surface de SWCNTS du nanovecteur (NPT).

A partir des tests *in vitro* effectués avec le nanovecteur à base du TRAIL (NPT) (chapitre IV), l'efficacité observée des structures du TRAIL embarquées sur les SWCNTs vers le récepteur DR5 repose également sur le greffage chimique. La chimie douce utilisée pour le greffage ne semble pas avoir dénaturé l'activité du TRAIL sur le NPT.

Dans ce contexte, le docking du TRAIL avec DR5 a été réalisé avec des structures relaxées dans du sérum physiologique par NAMD. Le RMSD entre DR5 cristallisé et DR5 solvato dans du sérum physiologique est de 0,76 Å. Alors que la trimérisation du TRAIL est énergétiquement favorisée, au moins deux voies possibles peuvent être envisagées pour le docking: la première voie consiste à ajouter TRAIL un par un au récepteur DR5, et la deuxième voie consiste à ajouter les trimères du TRAIL à un seul DR5.

D'après les calculs effectués, le docking des trimères de TRAIL à DR5 (Figure III-4 C) est énergétiquement favorisé et clairement démontré par une comparaison à l'addition de monomères de TRAIL. Le docking d'un homo-trimère du TRAIL (chélaté avec l'ion de zinc) et trois récepteurs DR5 permet d'avoir une structure du complexe similaire à celle observée par la cristallographie.

La même tendance a été observée avec des calculs du docking entre DR5 et NPT transportant le monomère et l'homotrimère du TRAIL. En effet, différents points de greffage (groupes amines) d'homotrimère du TRAIL ont été sélectionnés (en haut, en bas et au milieu). Le docking a donné une énergie de liaison dans l'intervalle [-1,000; -800 KJ / mol], et inférieure à celle observée avec la structure NPT intégrant le monomère du TRAIL (Figure III-4 D). Le récepteur DR5 peut être piégé entre plusieurs homotrimères du TRAIL à partir du nanovecteur NPT, mais aussi entre les SWCNTs fonctionnalisés avec PSE et les homotrimères de TRAIL du NPT. En addition, l'énergie de liaison entre les SWCNTs fonctionnalisés avec PSE et DR5 n'est pas négligeable avec -440 kJ / mol par rapport à -380 kJ / mol pour SWCNTS nu Figure III-4 E. Les résidus dans la boucle 90, ayant interagis auparavant avec le revêtement PSE sur les SWCNTs, ont contribué aussi à réduire l'énergie libre du complexe. Ce qui pourrait expliquer l'efficacité du NPT pour déclencher l'apoptose, par rapport à TRAIL seul.



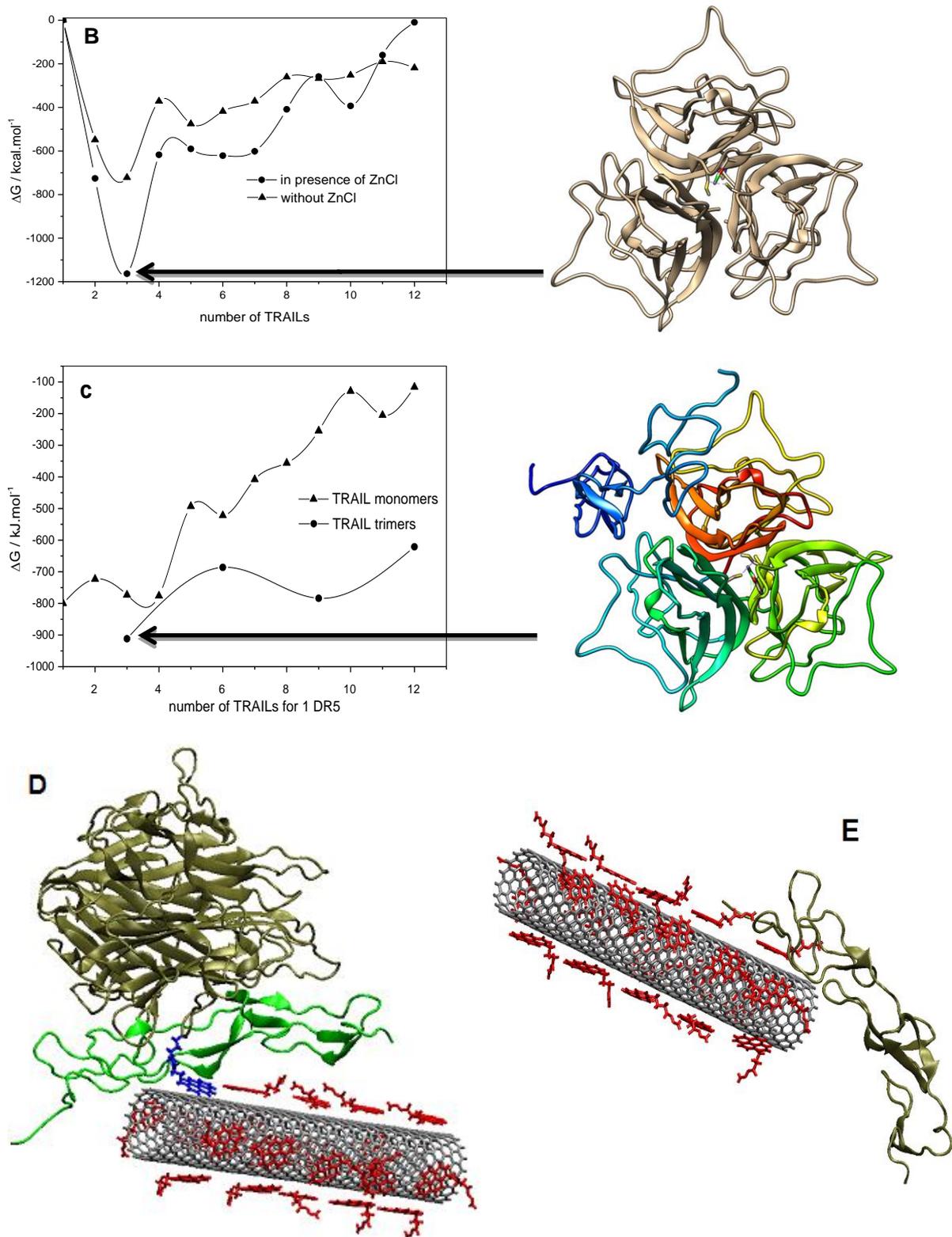


Figure III—4 Calculs de docking réalisés entre les monomères de TRAIL à l'état cristallin (A), et dans des conditions physiologiques avec la présence ou l'absence de sel de zinc (ZnCl₂) (B). Des calculs de docking du TRAIL au récepteur DR5 ont également été effectués selon deux stratégies: en ajoutant TRAIL un par un à DR5, ou en ajoutant des trimères de

TRAIL à DR5. Au bas de chaque courbe, la conformation du complexe entre les oligomères de TRAIL, ou entre TRAILS et DR5s, est représentée (vue de dessus) (C). Vue du meilleur score entre NPT portant le trimère de TRAIL et DR5 (D), et entre les SWCNTs recouverts du PSE et DR5 (E).

III.2.2 Résidus d'interactions TRAIL-DR5 par docking

Plusieurs études ont porté sur le complexe TRAIL-DR5 et leurs modes d'interaction. Dans la structure DR5, deux boucles importantes ont été jugées essentielles pour optimiser son interaction avec TRAIL. La boucle-50 du DR5 (DR5 50-loop) (résidus 51-65) liée par des interactions hydrophobes à des agrégats tout autour du résidu Tyr-216 du TRAIL, et joue un rôle crucial pour l'activité biologique du TRAIL. La seconde boucle est la boucle-90 du DR5 (DR5 90-loop) (résidus 91-104) du récepteur DR5, qui interagit par des liaisons hydrogène avec des agrégats de résidus de TRAIL, en particulier avec des sites positionnés autour du résidu Gln-205 [Hymowitz *et al.*; 2000, Mongkolsapaya *et al.*; 1999].

A partir du meilleur score de docking sur le complexe entre un homo-trimère du TRAIL (stabilisé avec ion Zn^{2+}) et un récepteur DR5 (bleu foncé) il est possible de voir que la partie aromatique de Tyr-216 et 237 interagit fortement comme le montre la (Figure III-5). Pour les deux boucles -50 et -90 de DR5 avec TRAIL, les interactions mises en jeu sont conservées par rapport à celles observées dans les structures cristallines. L'amarrage protéine-protéine appliquée à TRAIL et DR5 à l'état solvate est en excellent accord avec les résultats cristallographiques. Sur la base de ces résultats, il est alors intéressant de tester la complexation de trimères TRAIL embarqués sur un nanovecteur et DR5, par rapport à TRAIL seul par la méthode chromatographique CHLP.

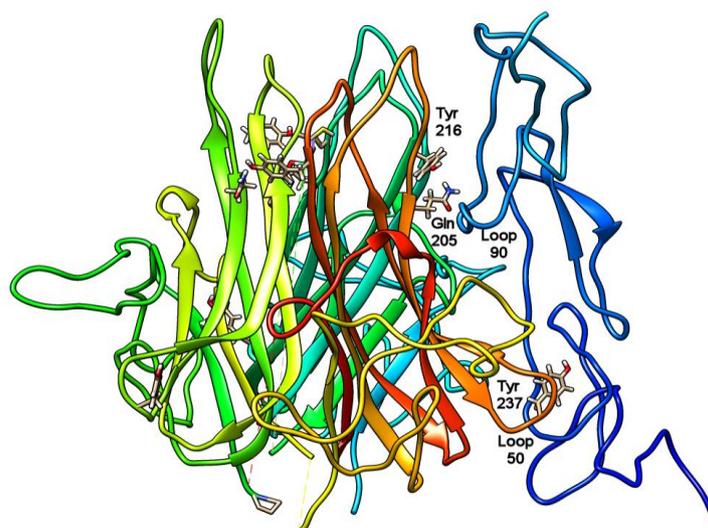


Figure III—5 Calculs de docking sur les structures relaxées dans le sérum du complexe entre un homo-trimère du TRAIL (stabilisées avec des ions Zn^{2+}) et un récepteur DR5, avec en détails des résidus du TRAIL Tyr-216 et Tyr-237 (bâton rendu), et les boucles -50 et -90 du DR5, qui interagissent avec TRAIL.

III.3 Résultats expérimentaux des interactions TRAIL-DR5 par CHLP

III.3.1 Temps de rétention des différentes espèces injectées

Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois et les coefficients de variation des valeurs de k' étaient toutes inférieures à 5%, ce qui indique une reproductibilité élevée et une bonne stabilité des systèmes chromatographiques pour TRAIL et NPT. Les chromatogrammes ont montré que le temps de rétention pour NPT est plus élevé que celui de TRAIL pour la même concentration injectée (voir la section expérimentale détaillée dans l'Annexe 2 – paragraphe A2.4). Des exemples sont rassemblés dans la (Figure III–6), montrant que les temps de rétention pour une concentration injectée de TRAIL et NPT de 15 μ M ont été respectivement de 2,48 min ($k' = 16,693$) pour TRAIL (Figure III–5 B) et 7,82 min ($k' = 19,298$) pour le nanovecteur NPT (Figure III–6 C).

Notez que les SWCNTs raccourcis par une oxydation acide et fonctionnalisés avec de l'acide pyrene-butanoïque N-hydrosuccinimide-ester (PSE) (voir la section expérimentale d'Annexe 1) sont considérés comme des contrôles. Les SWCNTs n'ont pas été retenus par la

colonne (dû à leur hydrophobicité) et ils sont sortis de la colonne au même temps mort considéré à 0,13 min (Figure III–6 A).

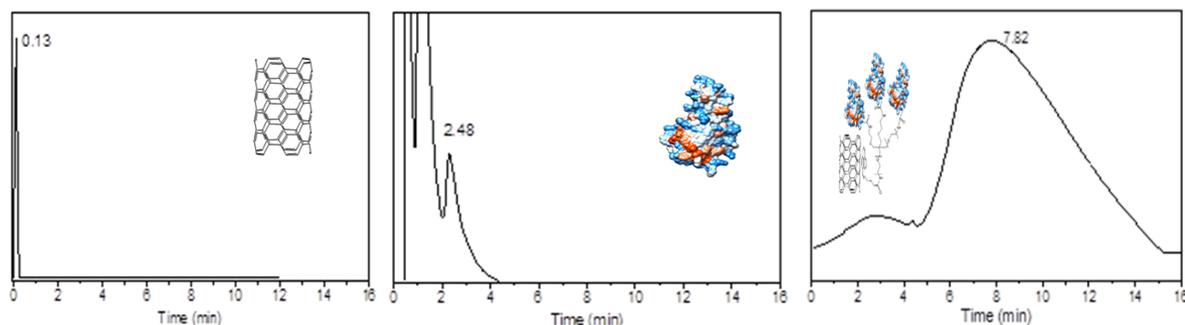


Figure III—6 Chromatogrammes obtenus par CHLP (les temps de rétention pour les différentes substances injectées (TRAIL et NPT à 15 μ M) en min) pour les nanotubes contrôles SWCNTs (A), TRAIL (B) et du nanovecteur NPT (C). Les conditions chromatographiques sont les suivantes: tampon phosphate (PBS) de la phase mobile à une force ionique constante (0,05 M); pH = 7; débit de 0,5 mL/min; température de la colonne: 25 °C (298 K).

III.3.2 Courbes de Van't Hoff

Les expériences ont été réalisées à des températures allant de 10°C à 40°C pour accéder aux valeurs thermodynamiques. Dans le domaine de températures étudiées, les courbes de Van't Hoff ($\ln k'$ en fonction de $1/T$, équation [7]) sont tracées pour chaque valeur de pH. La (Figure III–7) représente les courbes de Van't Hoff pour TRAIL et NPT.

Les coefficients de corrélation des droites obtenues sont de $0,930 \pm 0,018$ pour TRAIL (Figure III–7 A) et $0,900 \pm 0,001$ pour le nanovecteur NPT (Figure III–7 B). L'allure de ces courbes montre que ces dernières sont linéaires, ce qui signifie que les mécanismes d'association de TRAIL et de NPT avec le récepteur DR5 sont indépendants de la température.

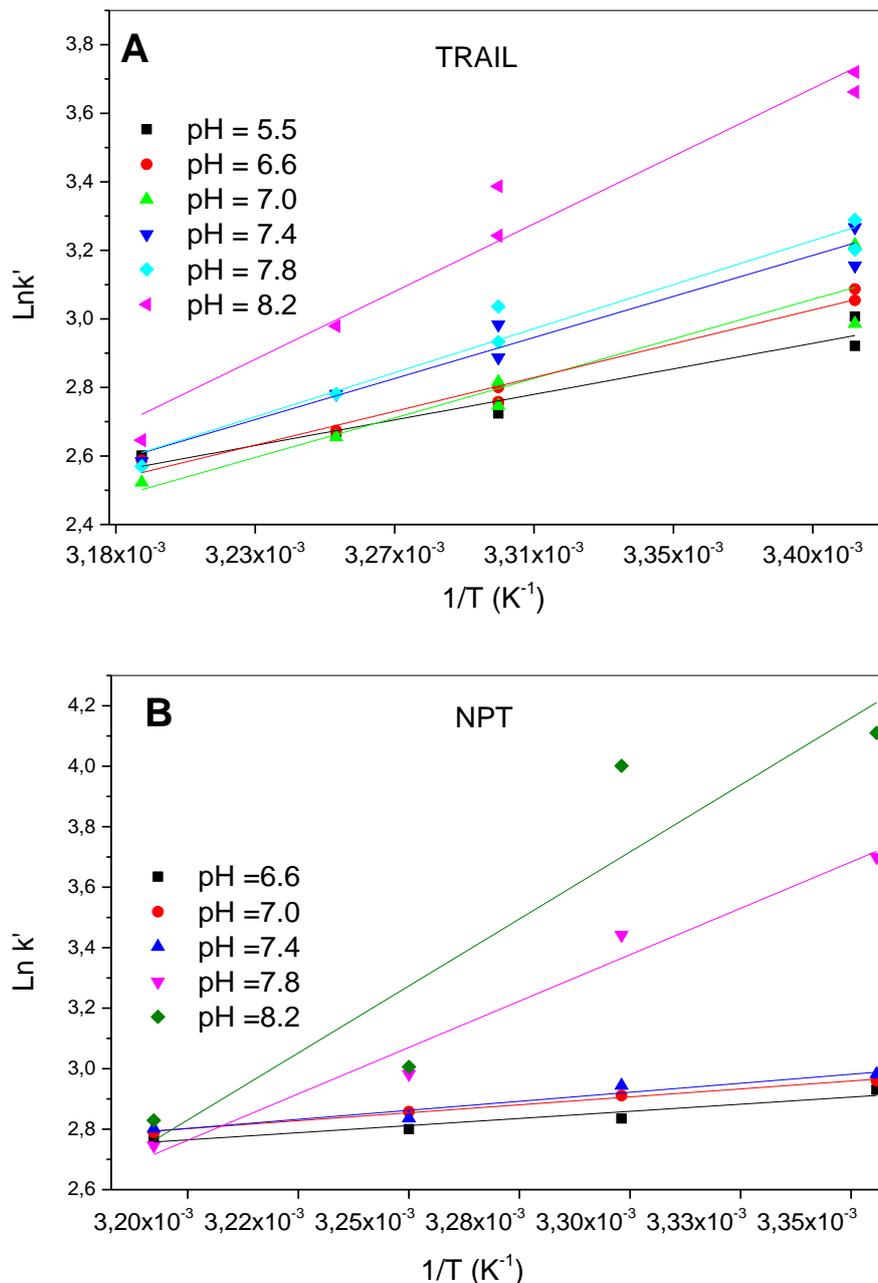


Figure III—7 Courbes de Van't Hoff : influence de la température des valeurs $\ln k'$ pour TRAIL (A) (intervalles de pH 5,5 à 8,2) et pour NPT (intervalles de pH 6,6 à 8,2) (B).

III.3.3 Paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS°

A partir des droites obtenues, il est alors possible d'accéder aux paramètres thermodynamiques (ΔH° et ΔS°) du mécanisme d'association du TRAIL et du nanovecteur NPT avec DR5 (leurs valeurs ont été calculées à l'aide de l'équation [6] et de la courbe de

Van't Hoff $\ln k'$ en fonction de $1/T$), c'est-à-dire à partir de la pente et de l'interception de cette équation. Ces données thermodynamiques sont résumées dans le (Tableau III-1) ci-dessous représentant l'interaction du TRAIL, NPT avec le récepteur DR5 aux différentes conditions expérimentales du pH.

pH	TRAIL		NPT	
	ΔH° (kJ/mol)	$\Delta S^{\circ*}$	ΔH° (kJ/mol)	$\Delta S^{\circ*}$
6.6	-19,013	-4,746	-7,864	-0,263
7.0	-22,236	-6,033	-8,779	-0,578
7.4	-22,970	-6,204	-10,026	-1,058
7.8	-24,633	-6,843	-51,509	-17,069
8.2	-37,910	-11,826	-74,962	-26,037

Table III—1 Paramètres thermodynamiques du mécanisme d'association de TRAIL et du nanovecteur NPT avec le récepteur DR5 aux différentes conditions étudiées du pH (6.6 ; 7 ; 7.4 ; 7.8 et 8.2). ΔH° en (kJ/mol) et $\Delta S^{\circ*}$ (sans unité).

Les résultats obtenus pour ces données thermodynamiques sont toujours négatifs. Leur interprétation sera faite plus tard (partie III.4 Discussion et Conclusion).

III.3.4 Compensation enthalpie-entropie (CEE)

Nous avons utilisé une approche thermodynamique supplémentaire, nommée compensation d'enthalpie-entropie afin d'analyser en détails le processus physico-chimique entre TRAIL, NPT et DR5. Cette approche a déjà été utilisée dans les procédures chromatographiques pour analyser et comparer les mécanismes de rétention pour un groupe de composés [Geneste *et al.*; 2014]. Mathématiquement, la compensation enthalpie-entropie

peut être exprimée par l'équation [10], qui a été expliquée dans le paragraphe III.1.3.3 de l'introduction de ce chapitre.

Ainsi, la courbe ($\ln k'$ à une température ($T = 298 \text{ K}$) en fonction de $-\Delta H^\circ$), est représentée dans la (Figure III-8) pour TRAIL et NPT :

$$\text{Pour TRAIL : } \ln k' = 1.7439 \cdot 10^{-5} \Delta H^\circ + 2.8022 \quad r^2=0.98$$

$$\text{Pour NPT : } \ln k' = 2.5528 \cdot 10^{-5} \Delta H^\circ + 2.3507 \quad r^2=0.93$$

Les courbes obtenues pour TRAIL et NPT sont linéaires avec des pentes différentes et des températures de compensation β . Les températures de compensation β sont égales à 321 K pour TRAIL et 311 K pour NPT, respectivement, ce qui implique des différences de mécanismes d'association entre TRAIL, NPT avec DR5.

Par conséquent, et selon ces comportements expérimentaux, le ligand TRAIL peut se lier à son récepteur DR5 *via* deux voies d'interactions. La première consiste en des interactions à longue portée essentiellement par des interactions primaires (interactions hydrophobes). Puis, le ligand TRAIL s'engage avec son récepteur DR5 par des interactions à courtes portées (interactions secondaires) représentées essentiellement par des interactions de type Van der Waals et des liaisons hydrogène [Ashkenazi; 2002, Hymowitz *et al.*; 2000, Mongkolsapaya *et al.*; 1999].

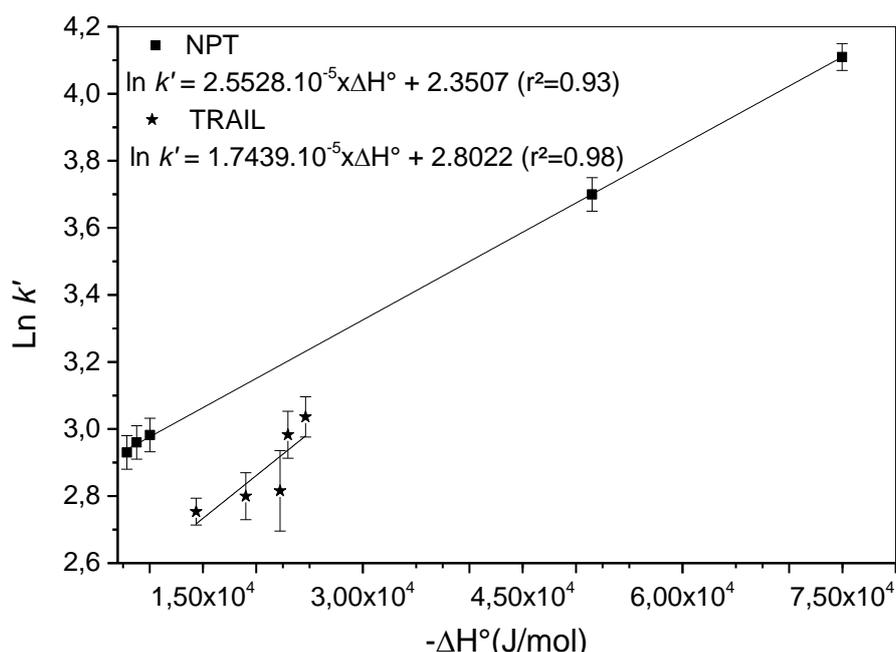


Figure III—8 Courbe représentative de la variation du $\ln k'$ en fonction de $-\Delta H^\circ$ (J/mol) pour TRAIL et NPT à la température $T = 298\text{K}$ pour la gamme de $\text{pH} = 6,6$ à $8,2$. Les résultats de la régression linéaire sont également donnés et sont représentés sur chaque courbe.

III.3.5 Effet du pH sur la fixation de TRAIL sur DR5

Le pH est un paramètre physico-chimique très important au niveau de l'organisme et la plupart des macromolécules peuvent s'ioniser. Ainsi, il pourrait jouer un rôle dans le processus d'association du TRAIL avec DR5. En effet, une compréhension plus approfondie est indispensable lorsque le changement de pH se produit. Il est donc intéressant d'étudier l'effet de ce paramètre sur la liaison du TRAIL avec son récepteur.

La (Figure III-9) montre à une température de 298K toutes les mesures sur les variations des facteurs de rétention de TRAIL et NPT lorsque le pH a augmenté de 6,6 à 8,2. Les tendances sont loin d'un comportement linéaire et suivent une fonction quadratique ayant la forme $\log k' = \log k'_0 - apH + bpH^2$ [12] ; où k'_0 est le facteur de rétention extrapolé à $\text{pH} = 0$, a et b sont des constantes liées à la structure de TRAIL et déterminées à partir du polynôme d'interpolation sur la (Figure III-9). Dans ce cas, le nombre de protons H^+ (n_{H^+}) lié à la

réaction d'association entre TRAIL et NPT avec DR5 est obtenu lorsque la pente de la dérivé

$\left[\frac{\delta \log k'}{\delta pH} \right]_{pH=\frac{a}{2b}}$ est nulle pour un $pH = a/2b$ (Figure III–9).

Pour TRAIL : $\log k' = 14.3214 - 3.84 pH + 0.282pH^2$ $r^2 = 0.913$

Pour NPT : $\log k' = 6.052 - 1.444 pH + 0.108pH^2$ $r^2=0.923$

Nous observons des variations similaires pour toutes les températures étudiées (équation [12]). L'interprétation sera faite dans la partie discussion. En tenant compte de chaque espèce, les sites de protonation et de la conservation de la masse appliquée à TRAIL, DR5 et TRAIL-DR5 ou (TNP, DR5 et NPT-DR5) complexe, nous avons l'équilibre obtenu avec l'équation [2], et n_{H^+} est calculé à partir d'équation [4].

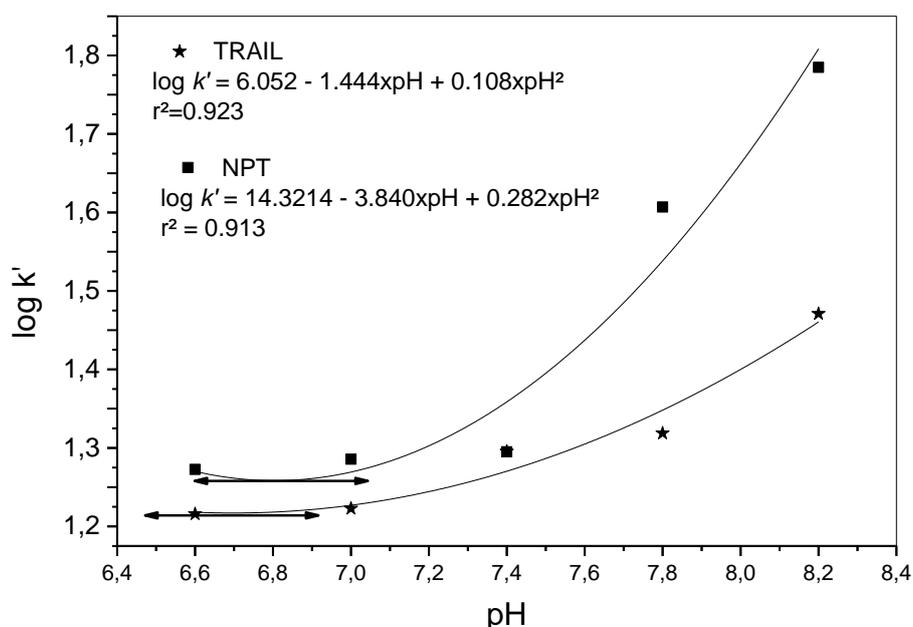


Figure III—9 Courbe représentative de la variation du $\log k'$ en fonction du pH pour TRAIL et NPT à la température $T = 298K$ pour la gamme de pH (6,6 à 8,2). Les résultats de la régression linéaire sont également donnés et sont représentés sur chaque courbe.

III.4 Discussion-Conclusion

Le mécanisme d'association de TRAIL ou NPT avec le récepteur DR5, a été analysé à toutes les conditions expérimentales du pH . En se référant aux résultats montrés dans le (Tableau III–1), les valeurs d'enthalpie ΔH° obtenues sont toujours négatives quel que soit le

pH, ce qui montre ainsi que les interactions de type Van der Waals et les liaisons hydrogène jouent un rôle majeur dans le mécanisme d'association TRAIL/DR5 [Hymowitz *et al.*; 2000].

La magnitude d'effet de chaleur ΔH sur la protonation correspondante de H^+ dans la formation du complexe TRAIL-DR5 ou NPT-DR5 a été déterminée en utilisant la relation suivante: $\Delta H = -2.3RT^2 \frac{\delta n_{H^+}}{\delta T}$ [13], et représentée dans la (Figure III-10) ci-dessous.

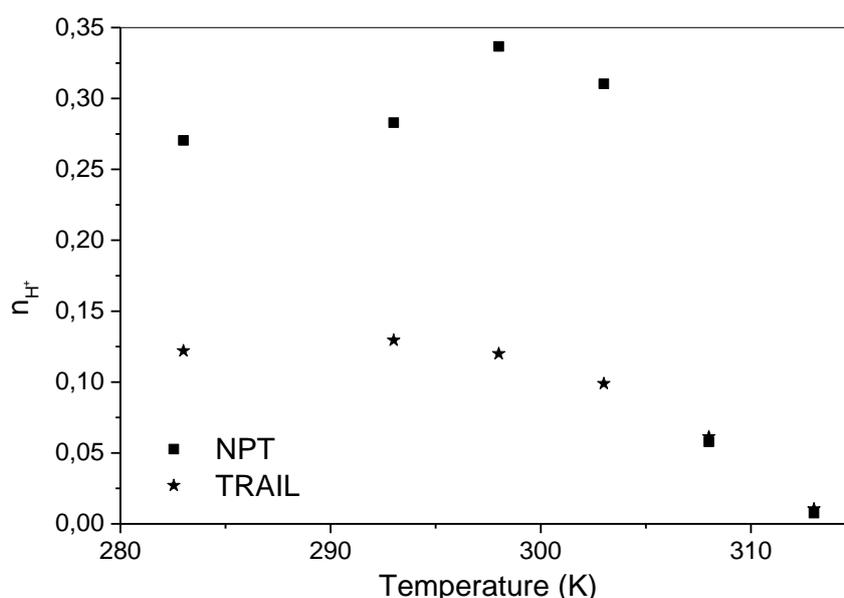


Figure III—10 Courbe représentative de l'influence de la température sur la protonation de TRAIL et NPT pour la gamme étudiée de pH (6,6 à 8,2).

Ainsi, la courbe ($\ln k'$ en fonction de ΔH° (Figure III-8)), représente une relation linéaire dans l'association de TRAIL ou NPT avec DR5. Cela signifie que le même mécanisme est responsable de la formation de complexes TRAIL/DR5 et NPT/DR5, sauf dans un domaine de pH égal compris entre 7,5 et 8,5. Concernant le complexe TRAIL/DR5, lorsque le pH a augmenté de 6,6 à 7,8 les valeurs de l'enthalpie ΔH° et de l'entropie $\Delta S^{\circ*}$ ont légèrement diminué (Tableau III-1) ainsi que les temps de rétention qui ont faiblement augmenté. En revanche, pour un intervalle de pH compris entre 7,8 et 8,2, les valeurs de ΔH° et de $\Delta S^{\circ*}$ ont fortement diminué. Par conséquent, nous pouvons dire une nouvelle fois que les interactions de type Van der Waals et les liaisons hydrogène sont prépondérantes dans ce mécanisme d'association et sont impliquées dans l'interface du complexe TRAIL /DR5, en formant un fort réseau de liaisons hydrogène. La formation des liaisons hydrogène a été

confirmée par les valeurs positives de n_{H^+} , ce qui indique que les protons ont été repris lors de la formation des liaisons. Ainsi, un résidu présent à la surface du DR5 ou de la molécule TRAIL a donc augmenté son pKa. En effet, la chaîne latérale formée d'imidazole du résidu histidine (His) possède une valeur de pKa approximativement égale à 6 et c'est un donneur de liaisons hydrogène. Ce dernier pourrait donc former une liaison hydrogène avec les acides aminés de la protéine de base de DR5, ce qui explique les valeurs observées de n_{H^+} .

Concernant le mécanisme d'association du complexe NPT/DR5, la (Figure III-7) montre que, pour toutes les valeurs de pH en fonction de l'équation de Van't Hoff, NPT a une plus grande affinité pour DR5 que le ligand TRAIL seul. Ces résultats sont aussi confirmés par les expériences sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses démontrant que le nanovecteur NPT est plus efficace que TRAIL seul dans le déclenchement d'apoptose par un facteur supérieur à 10 dans des nombreux types de cellules tumorales (voir chapitre IV) [Zakaria *et al.*; 2015]. Le (Tableau III-1) montre que le mécanisme d'association entre NPT et DR5 est également favorisé du point de vue enthalpie. Cela signifie que les interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène (caractérisées par des changements négatifs d'enthalpie) sont engagées à l'interface du complexe NPT/DR5, confirmant la formation d'un solide réseau de liaisons hydrogène. Lorsque le pH a diminué de 8,2 à 7,4 ; les valeurs d'enthalpie et d'entropie ont fortement diminué. Quand le pH baisse de 7,4 à 6,6 ; les valeurs d'enthalpie et d'entropie augmentent légèrement, mais restent toujours négatives. Ces résultats confirment la présence de liaisons de type van der Waals et de liaison hydrogène, mais également la formation d'interactions ioniques soulignées par la diminution du temps de rétention et le caractère hydrophobe de nanotubes de carbone.

L'interaction entre le ligand TRAIL et son récepteur DR5, qui dépend du pH (et donc la protonation), est due à la modification concomitante des valeurs de pKa des groupes d'acides aminés ionisables. Par ailleurs, la (Figure III-10) montre que les valeurs n_{H^+} varient lentement avec la température pour le complexe TRAIL/DR5 alors qu'elles sont fortement augmentées (de 0,0579 à 0,31) pour la gamme de température entre 308K à 303K. Cependant, le complexe NPT/DR5 n'a pas montré de variation importante des valeurs de n_{H^+} pour des températures appartenant à la gamme 303-283K. À 298K, les valeurs n_{H^+} sont égales à zéro pour un pH supérieur à 6,1 pour le complexe TRAIL/DR5 et 6,8 pour celui de DR5/NPT. Ce résultat suggère que les groupes ionisables concernés pourraient être le noyau imidazole d'un

acide aminé d'histidine avec un pKa d'environ 6. Il y a une protonation du résidu His de TRAIL seul et associé à NPT à un pH acide et rompt le réseau de liaisons hydrogène, ce qui conduit à sa déstabilisation. Ce résultat est cohérent avec les valeurs négatives élevées de ΔH° dans les complexes formés pour NPT et TRAIL. Un autre point est l'énergie d'ionisation obtenue dans ces deux types de complexes. Dans le complexe TRAIL/DR5, cette énergie augmente de 5,5 à 6,75 kJ/mole. Cependant, cette énergie, qui est plus élevée dans le cas du complexe NPT/DR5, est passée de 14 à 17 kJ/mol et est en faveur d'une forte protonation d'histidine dans le cas du complexe NPT.

L'efficacité du TRAIL est très élevée dans des conditions de pH proche de 8. Ce qui suggère la forte association du TRAIL greffé sur les SWCNTs et DR5 que TRAIL seul. Cette déstabilisation d'énergie observée par NPT est probablement cinétiquement favorable pour recruter plusieurs DR5 en même temps, et permet ainsi le déclenchement du processus apoptotique. En revanche, peu de travaux ont été effectués sur les études thermodynamiques d'interaction entre TRAIL et DR5. Cependant, dans des conditions pathologiques, y compris le cancer et l'inflammation, un changement de pH du milieu est observé et évolue vers un environnement extracellulaire acide (dans le cas du cancer) [Wike-Hooley *et al.*; 1985]. Dans ces conditions, il existe aussi un changement du type de mort cellulaire induit par TRAIL, et l'apoptose induite par TRAIL commute vers une nécrose régulée (un autre type de mort cellulaire) [Jouan-Lanhouet *et al.*; 2012].

En résumé, dans ce chapitre, une colonne bio-chromatographique a été développée pour étudier les paramètres thermodynamiques sur l'affinité de liaison entre une protéine proapoptotique TRAIL seul ou portée par le nanovecteur (NPT) et le récepteur de mort DR5. Dans ce but, DR5 a été immobilisé par l'intermédiaire des groupes amino sur un support chromatographique en utilisant la technique d'immobilisation covalente "*in situ*". Le docking des homo-trimères du TRAIL (chélaté avec un ion de Zn) pour trois molécules de DR5 (toutes les structures ont été relaxées dans du sérum physiologique), aboutit à une structure du complexe similaire à celle observée par cristallographie [Hymowitz *et al.*; 2000, Mongkolsapaya *et al.*; 1999]. A ce niveau, les calculs du docking ont donné des résultats très intéressants. Une analyse plus poussée et d'autres calculs seront nécessaires, tels que des études d'interactions par docking, entre le récepteur de mort DR4 avec TRAIL ou NPT, et de faire une comparaison avec les résultats obtenus avec DR5 afin d'en tirer les conclusions

adéquates qui s'imposent sur les propriétés thermodynamiques du complexe NPT et son impact sur les interactions avec les récepteurs de mort de TRAIL.

L'analyse des données thermodynamiques a révélé que le mécanisme d'association entre les deux complexes TRAIL/DR5 et NPT/DR5 est gouverné par l'enthalpie à toutes les valeurs de pH, montrant ainsi que les forces de Van der Waals et les liaisons hydrogène sont engagées à l'interface de ces complexes et confirmant un fort réseau de liaisons hydrogène dans le cas du complexe NPT/DR5.

Toutefois, la compensation de l'enthalpie-entropie a été présentée par une variation linéaire. Tous ces résultats ont montré que le mécanisme d'association des complexes NPT/DR5 et TRAIL/DR5 est sous la dépendance du pH. Ce qui montre que les interactions ioniques sont apparues également dans le processus de liaison. En outre, le nombre de protons engagés est nul à un pH d'environ 6,8 pour NPT et 6,1 pour TRAIL. Ces valeurs sont conformes à la protonation d'un résidu d'histidine en tant que cation d'imidazole. Egalement, les valeurs des énergies d'ionisation montrent une forte interaction entre les NPT et DR5 plus importante que dans le cas du TRAIL seul avec DR5, qui est sous-jacente à un effet accru d'efficacité de TRAIL sur le NPT.

Par conséquent, nos résultats montrent que l'efficacité du TRAIL nano-vectorisé est une nouvelle façon d'utiliser TRAIL dans la thérapie anti-cancéreuse.

III.5 Références Bibliographiques

- [Ashkenazi; 2002] Ashkenazi, A., Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2, 420-430.
- [Bagnost; 2010] Bagnost, T., Intérêt de l'arginase comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle. *Université de Franche-Comté* **2010**.
- [Bodmer *et al.*; 2000] Bodmer, J. L.; Meier, P.; Tschopp, J.; Schneider, P., Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (27), 20632-20637.
- [Cheng and Rosicky; 1998] Cheng, Y. C.; Rosicky, P. J., Surface topography dependence of biomolecular hydrophobic hydration. *Nature* **1998**, 392 (6677), 696-699.
- [Dokholyan; 2006] Dokholyan, N. V., Studies of folding and misfolding using simplified models. *Current Opinion in Structural Biology* **2006**, 16 (1), 79-85.
- [Ewing and Kuntz; 1997] Ewing, T. J. A.; Kuntz, I. D., Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *The Journal of Computational Chemistry* **1997**, 18 (9), 1175-1189.
- [Geneste *et al.*; 2014] Geneste, A.; Guillaume, Y. C.; Magy-Bertrand, N.; Lethier, L.; Gharbi, T.; André, C., The protease activity of transthyretin reverses the effect of pH on the amyloid- β protein/heparan sulfate proteoglycan interaction: a biochromatographic study. *The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, 97, 88-96.
- [Gupta *et al.*; 2013] Gupta, R. K.; Sharma, G.; Pandey, R.; Kumar, A.; Koch, B.; Li, P. Z.; Xu, Q.; Pandey, D. S., DNA/protein binding, molecular docking, and in vitro anticancer activity of some thioether-dipyrrinato complexes. *Inorganic Chemistry* **2013**, 52 (24), 13984-13996.
- [Hymowitz *et al.*; 2000] Hymowitz, S. G.; O'Connell, M. P.; Ultsch, M. H.; Hurst, A.; Totpal, K.; Ashkenazi, A.; de Vos, A. M.; Kelley, R. F., A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **2000**, 39, 633-650.
- [Jahn and Radford; 2005] Jahn, T. R.; Radford, S. E., The Yin and Yang of protein folding. *The FEBS Journal* **2005**, 272 (23), 5962-5970.
- [Jorgensen *et al.*; 1983] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79, 926-935.
- [Jouan-Lanhouet *et al.*; 2012] Jouan-Lanhouet, S.; Arshad, M. I.; Piquet-Pellorce, C.; Martin-Chouly, C.; Le Moigne-Muller, G.; Van Herreweghe, F.; Takahashi, N.; Sergent, O.; Lagadic-Gossmann, D.; Vandenabeele, P.; Samson, M.; Dimanche-Boitrel, M. T., TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death & Differentiation* **2012**, 19 (12), 2003-2014.
- [Kimberley and Screaton; 2004] Kimberley, F. C.; Screaton, G. R., Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Research* **2004**, 14 (5), 359-372.
- [Leite *et al.*; 2012] Leite, F. L.; Bueno, C. C.; Da Róz, A. L.; Ziemath, E. C.; Oliveira, O. N., Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic

- Force Microscopy. *The International Journal of Molecular Sciences* **2012**, 13 (10), 12773-12856.
- [**Massolini et al.; 2001**] Massolini, G.; Calleri, E.; De Lorenzi, E.; Pregolato, M.; Terreni, M.; Félix, G.; Gandini, C., Immobilized penicillin G acylase as reactor and chiral selector in liquid chromatography. *The Journal of chromatography A* **2001**, 921 (2), 147-160.
- [**Melander and Horvath; 1980**] Melander, W.; Horvath, C., *In high-performance liquid chromatography* Academic Press: New York, 1980; Vol. 2, p 113.
- [**Mongkolsapaya et al.; 1999**] Mongkolsapaya, J.; Grimes, J. M.; Chen, N.; Xu, X. N.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y.; Screaton, G. R., Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nature Structural & Molecular Biology* **1999**, 6, 1048-1053.
- [**Morris et al.; 1998**] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *The Journal of Computational Chemistry* **1998**, 19 (14), 1639-1662.
- [**Mukherjee et al.; 2005**] Mukherjee, S.; De, S.; Ghosh, Z.; Dasgupta, S., A docking interaction study of the effect of critical mutations in ribonuclease a on protein-ligand binding. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2005**, 33 (5), 335-343.
- [**Pellarin and Caflisch; 2006**] Pellarin, R.; Caflisch, A., Interpreting the aggregation kinetics of amyloid peptides. *The Journal of Molecular Biology* **2006**, 360 (4), 882-892.
- [**Ranatunga et al.; 2002**] Ranatunga, R.; Vitha, M. F.; Carr, P. W., Mechanistic implications of the equality of compensation temperatures in chromatography. *The Journal of Chromatography A* **2002**, 946 ((1-2)), 47-49.
- [**Sarr et al.; 2010**] Sarr, F. S.; André, C.; Guillaume, Y. C., A novel biochromatographic Oatp2 column to study the transmembrane transport of statins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 52 (1), 93-98.
- [**Schneider; 2007**] Schneider, O. Fonctionnement schématique d'une chromatographie HPLC. (accessed 10 mars).
- [**Shirley et al.; 2011**] Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O., Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **2011**, 6 (3), 311-323.
- [**Simona et al.; 2004**] Simona, F.; Tiana, G.; Broglia, R. A.; Colombo, G., Modeling the alpha-helix to beta-hairpin transition mechanism and the formation of oligomeric aggregates of the fibrillogenic peptide Abeta(12-28): insights from all-atom molecular dynamics simulations. *The Journal of Molecular Graphics & Modelling* **2004** 23 (3), 263-273.
- [**Sinha et al.; 2012**] Sinha, R.; Kundrotas, P. J.; Vakser, I. A., Protein Docking by the Interface Structure Similarity: How Much Structure Is Needed? *PLoS One* **2012**, 7 (2), e31349.
- [**Strodel et al.; 2007**] Strodel, B.; Whittleston, C. S.; Wales, D. J., Thermodynamics and Kinetics of Aggregation for the GNNQQNY Peptide. *The Journal of American Chemical Society* **2007**, 129 (51), 16005-16014.
- [**Tovchigrechko et al.; 2002**] Tovchigrechko, A.; Wells, C. A.; Vakser, I. A., Docking of protein models. *Protein Sciences* **2002**, 11 (8), 1888-1896.

- [Truneh *et al.*; 2000]** Truneh, A.; Sharma, S.; Silverman, C.; Khandekar, S.; Reddy, M. P.; Deen, K. C.; McLaughlin, M. M.; Srinivasula, S. M.; Livi, G. P.; Marshall, L. A.; Alnemri, E. S.; Williams, W. V.; Doyle, M. L., Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (30), 23319-23325.
- [Wike-Hooley *et al.*; 1985]** Wike-Hooley, J. L.; Van den Berg, A. P.; Van der Zee, J.; Reinhold, H. S., Human tumour pH and its variation. *The European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **1985**, 21 (7), 785-91.
- [Zakaria *et al.*; 2015]** Zakaria, A. B.; Picaud, F.; Rattier, T.; Pudlo, M.; Saviot, L.; Chassagnon, R.; Lherminier, J.; Gharbi, T.; Micheau, O.; Herlem, G., Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing. *Nano Letters* **2015**, 15 (2), 891-895.

**Chapitre IV Activité apoptotique du
nanovecteur NPT (tests *in vitro* sur des
modèles cellulaires)**

Table des matières

IV.1 INTRODUCTION	158
IV.2 RESULTATS – PARTIE 1.....	159
<i>IV.2.1 Différents modèles cellulaires étudiés</i>	<i>159</i>
<i>IV.2.2 Analyse des récepteurs par cytométrie en flux</i>	<i>159</i>
<i>IV.2.3 Différents tests in vitro : comparaison entre les activités de NPT et TRAIL.....</i>	<i>161</i>
IV.2.3.1 Test de viabilité cellulaire.....	161
IV.2.3.2 Test de Hoechst staining	164
IV.2.3.3 Test de marquage à l'Annexine V	166
IV.2.3.4 Analyse des éléments du complexe DISC	170
IV.3 RESULTATS – PARTIE 2.....	172
<i>IV.3.1 Modèles cellulaires étudiés</i>	<i>172</i>
<i>IV.3.2 Analyse des récepteurs</i>	<i>172</i>
<i>IV.3.3 Différentes expériences in vitro sur les lignées déficientes en récepteurs de TRAIL : effets des récepteurs agonistes</i>	<i>173</i>
IV.4 RESULTATS – PARTIE 3.....	177
<i>IV.4.1 Mécanismes de régulation de la mort induite par TRAIL</i>	<i>177</i>
<i>IV.4.2 N-glycosylation des récepteurs.....</i>	<i>178</i>
IV.4.2.1 Résultats obtenus sur les lignées d'ostéosarcome humain.....	178
IV.4.2.2 Résultats obtenus sur les lignées de mélanome murin	180
IV.5 DISCUSSION-CONCLUSION	183
IV.6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

Abréviations

7-AAD	7-Aminoactinomycine D
ADN	Acide désoxyribonucléique
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Caspase	Cysteinyl-aspartate-cleaving proteases
c-FLIP_{L-S-R}	Cellular Flice Inhibitory Protein Long-Short-Raji
DcR1/2	Decoy receptor 1/2
DD	Death Domain
DISC	Death inducing-signaling complex
DR4/5	Death receptor 4/5
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
IC50	Concentration inhibitrice médiane représente la concentration requise d'un médicament pour une inhibition à 50% <i>in vitro</i> .
PBS	Phosphate buffered solution
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL Receptor

IV.1 Introduction

Dans l'industrie émergente des nanotechnologies, les nanotubes de carbone (NTC) peuvent être utilisés pour l'ingénierie des nanovecteurs [Balasubramanian and Burghard; 2005, Battigelli *et al.*; 2013, De Juana and Pérez; 2013, Maggini *et al.*; 1993, Sozykin and Beskachko; 2013]. En raison de ses propriétés anti-tumorales, le ligand TRAIL a suscité un intérêt majeur en oncologie. En effet, la cytokine TRAIL est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses par liaison à des récepteurs de mort, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) sans endommager les cellules saines [Kelley *et al.*; 2001, Lawrence *et al.*; 2001]. Cependant, malgré les évidentes preuves d'activité anti-tumorale du TRAIL, les essais cliniques ont montré que l'utilisation du TRAIL seul, en monothérapie, n'était pas suffisante pour guérir les patients [Herbst *et al.*; 2010, Micheau *et al.*; 2013].

Dans ce contexte, les approches thérapeutiques actuelles visent à combiner le ligand TRAIL avec des stratégies de la chimiothérapie conventionnelle ou des thérapies ciblées afin de contourner les différentes résistances à l'apoptose induite par TRAIL. Ces dernières peuvent être dues à la présence des récepteurs antagonistes TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2), la protéine c-FLIP inhibitrice de caspase-8, ou à un défaut dans la voie mitochondriale [Jacquemin *et al.*; 2012, Merino *et al.*; 2006, Morizot *et al.*; 2011]. Alternativement, la mutagenèse ou multi-mérisation de TRAIL (ou dérivés de TRAIL), qui miment la liaison du TRAIL à la membrane native, sont explorées dans le but d'augmenter et d'améliorer l'efficacité thérapeutique du TRAIL [Gasparian *et al.*; 2009, Pavet *et al.*; 2010, Szegezdi *et al.*; 2011].

Récemment, des peptides multivalents mimétiques de TRAIL ou des nanocorps qui ciblent TRAIL-R2, ont été mis au point et ont montré une activité anti-tumorale destructrice supérieure à celle de leur homologue monovalent ou TRAIL [Huet *et al.*; 2014, Pavet *et al.*; 2010].

Suite à la synthèse et la caractérisation de notre nanovecteur formé de nanotubes de carbone fonctionnalisés avec TRAIL, nommé NPT, l'étape qui consiste à tester son activité biologique est primordiale. Cependant, ce nanovecteur possède un but principal de viser à

accroître la valence du TRAIL en améliorant l'apoptose induite par les deux récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2, par rapport à TRAIL soluble.

Dans ce chapitre, nous présentons les principaux résultats obtenus *in vitro*, qui décrivent l'activité anti-tumorale du nanovecteur NPT, par rapport à TRAIL soluble, sur différents modèles cellulaires cancéreux et validés ainsi par plusieurs techniques en biologie cellulaire.

IV.2 Résultats – Partie 1

IV.2.1 Différents modèles cellulaires étudiés

Plusieurs types de lignées cellulaires tumorales ont été étudiés : les lignées cellulaires squameuses humaines du cancer pulmonaire H1703, les lignées cellulaires hépatiques humaines (Hépatocarcinome HepG2, Hépatoblastome HUH et Adénocarcinome hépatique SK-Hep1). Cependant, le modèle cellulaire principal est la lignée d'Adénocarcinome humain du colon HCT116.

A noter que des lignées cellulaires (HCT116 et H1703), déficientes « Knock-Out » pour un seul récepteur de mort TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (DR4^{-/-} ou DR5^{-/-}) ou pour les deux récepteurs respectivement « Double Knock-Out DKO » ont été générées par la technologie TALEN à l'unité INSERM 866-Université de Bourgogne. Les TALENs « Transcription Activator-Like Effector Nuclease » sont l'association d'une *TALE* « transcription Activator-Like Effector », qui est une protéine capable de se lier de manière très spécifique à une séquence d'ADN (certains exons des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ont été ciblés), et d'une nucléase qui va cliver l'ADN.

IV.2.2 Analyse des récepteurs par cytométrie en flux

Avant de tester les effets anti-tumoraux du nanovecteur NPT et/ou du TRAIL sur les différents types de lignées cellulaires, l'analyse d'expression des récepteurs à la surface des cellules par cytométrie en flux a été nécessaire, que ce soit pour les récepteurs de mort (DR4 et DR5) ou pour les récepteurs antagonistes (DcR1 et DcR2).

Le marquage des récepteurs montre davantage que nos lignées cellulaires expriment bien les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Figure IV-1 A & B) sauf la lignée HCT116-DKO déficiente pour les deux types de récepteurs (Figure IV-1 B) Cependant, la plupart des lignées testées n'expriment pas ou peu des récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4 L'expression des récepteurs antagonistes est exclusive pour la lignée HUH qui exprime TRAIL-R3, et pour la lignée HepG2 qui exprime TRAIL-R4 (Figure IV-1 A).

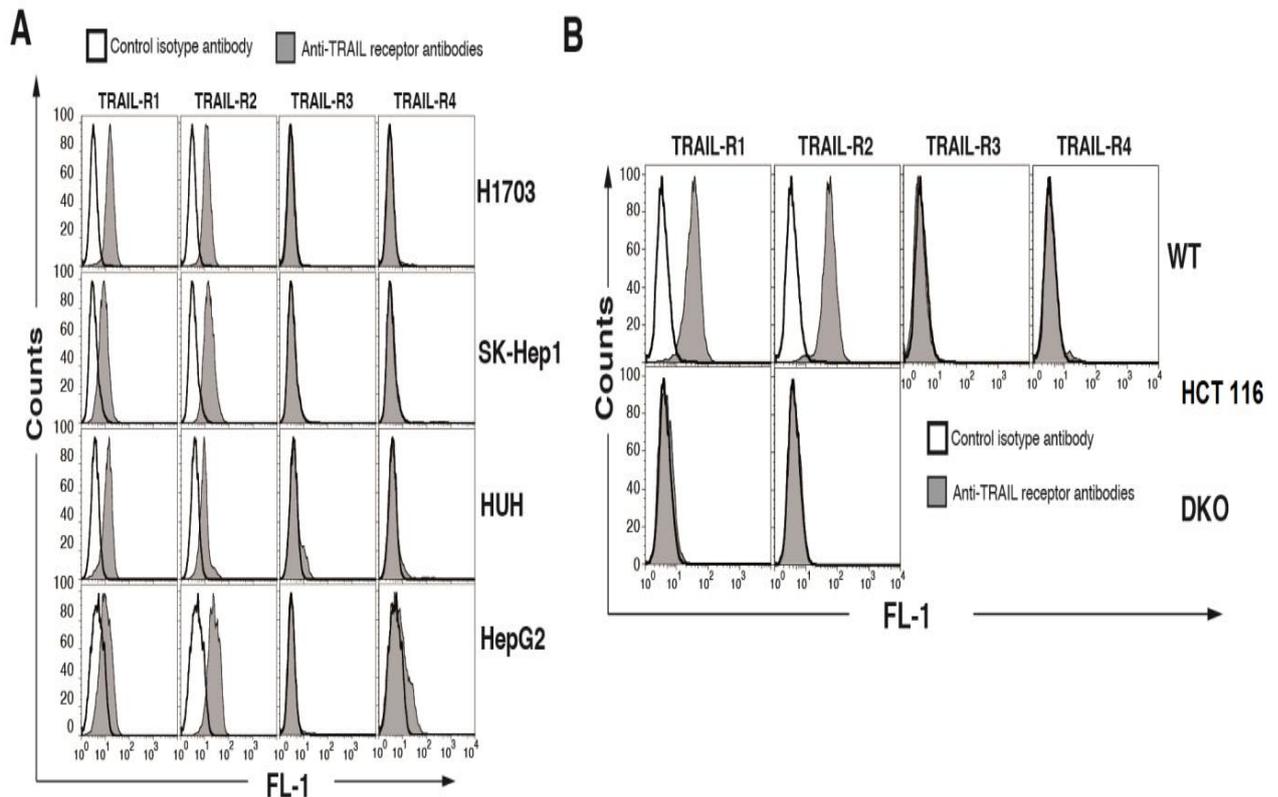


Figure IV—1 Analyse par cytométrie en flux d'expression des récepteurs de TRAIL (TRAIL-R1, R2, R3 et R4) dans les lignées cellulaires du carcinome pulmonaire H1703, dans les lignées cellulaires tumorales hépatiques, SK-Hep1, HUH et HepG2 (A), et dans les deux lignées du carcinome colorectal HCT116 : lignée parentale HCT116-WT et double déficiente pour les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ou HCT116-DKO (B). L'histogramme blanc représente l'anticorps de contrôle ou isotype (IgG). L'histogramme gris correspond au marquage des récepteurs de TRAIL.

IV.2.3 Différents tests *in vitro* : comparaison entre les activités de NPT et TRAIL

IV.2.3.1 Test de viabilité cellulaire

Afin d'évaluer l'activité pro-apoptotique du NPT *vis-à-vis* du TRAIL soluble, plusieurs lignées de cellules tumorales (Figure IV-2) ont été ensemencées dans des plaques à 96 puits. Une augmentation progressive de la concentration de TRAIL ou NPT a été présentée dans le milieu de culture. Ensuite, les plaques ont été lavées 16 heures après la stimulation avec du PBS, et les cellules vivantes adhérentes restantes ont été colorées avec du bleu de méthylène pour mesurer le taux de la viabilité cellulaire. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules présentes (Figure IV-2 A) et varie d'une façon dose-dépendante avec les traitements NPT ou TRAIL.

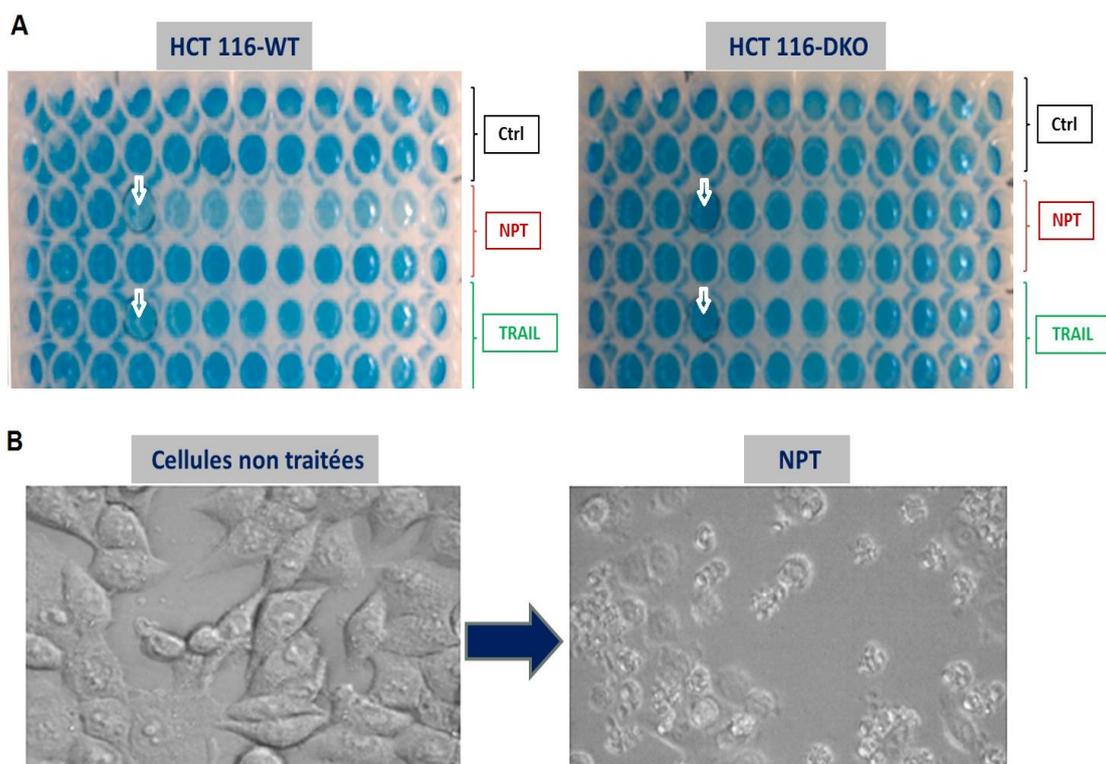


Figure IV—2 Des plaques à 96 puits ensemencées avec les deux lignées cellulaires HCT116-WT et HCT116-DKO et traitées avec des doses croissantes de NPT, TRAIL et les différents types de contrôles (Ctrl : nanotubes non fonctionnalisés). Les flèches blanches représentent les puits contenant une dose élevée des traitements NPT ou TRAIL (A). L'effet du traitement NPT sur des cellules HCT 116-WT a été observé sous microscope optique (x40) *versus* des cellules non traitées. Le profil apoptotique cellulaire induit par NPT est bien observé (bourgeonnement membranaire et formation des petits corps apoptotiques) (B).

En outre, les résultats obtenus par cette expérience montrent que les deux types de traitements NPT et TRAIL induisent une inhibition dose-dépendante de la viabilité cellulaire de toutes les lignées cellulaires d'Hépatocarcinome, c'est-à-dire SK-Hep1, HUH et HepG2, et de la lignée cellulaire de carcinome pulmonaire H1703 (Figure IV-3 A). Toutefois, et comme prévu, le nanovecteur NPT montre une meilleure activité cytotoxique que TRAIL soluble recombinant sur toutes les lignées de cellules cancéreuses testées.

Tandis qu'une dose de 88 ng/mL de TRAIL a été requise pour tuer 50% des cellules H1703 (Figure IV-3 A), l'IC₅₀ a été atteinte avec seulement une concentration de 8 ng/mL du NPT. Cela montre que l'action du NPT a été largement supérieure à celle du TRAIL pour induire l'apoptose de ces cellules. En d'autres termes, le NPT était donc 10 fois plus actif que TRAIL seul.

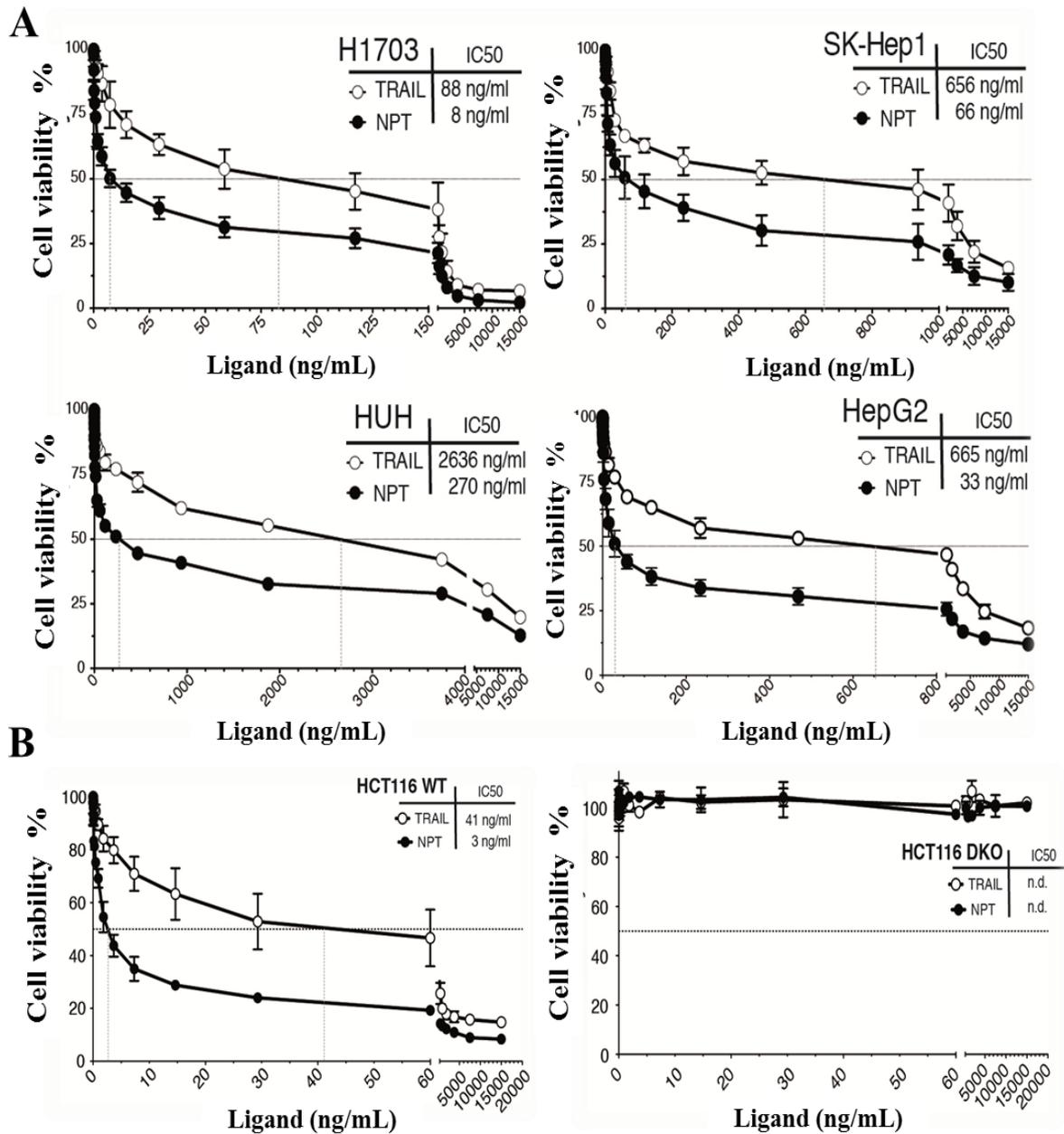


Figure IV—3 La viabilité cellulaire dans les cellules H1703, SK-Hep1, HUH et HepG2 (A) et dans les deux lignées HCT116-WT et HCT116-DKO (B) après une stimulation avec des concentrations croissantes de TRAIL ou NPT. La viabilité a été mesurée par la coloration au bleu de méthylène. Les données statistiques sont la moyenne \pm SD (n = 3).

En conclusion, les expériences réalisées sur les cellules d'Hépatocarcinome (SK-HEP1, HepG2 et HUH) ont montré que le NPT a été également de 10 à 20 fois plus efficace que TRAIL seul pour induire la mort cellulaire. L'IC50 estimée du TRAIL dans ces cellules a

varié de 650 à plus de 2600 ng/mL (**Figure IV-3 A**), tandis que l'IC₅₀ de NPT a varié de 33 à 230 ng/mL (**Figure IV-3 A**). Remarquablement, le gain de la fonction apoptotique obtenu avec TRAIL fonctionnalisé sur les SWCNTs (nommé nanovecteur NPT) dans les cellules HepG2, qui expriment les récepteurs antagonistes fonctionnels TRAIL-R4 en addition aux TRAIL-R1 et TRAIL-R2, a été d'environ 20 fois supérieur à celui du TRAIL soluble.

Afin de montrer que le gain de fonction du NPT provient uniquement de l'action de TRAIL et non pas des nanoparticules (nanotubes de carbone) elles-mêmes, nous avons profité d'une lignée de cellules de carcinome du côlon déficiente pour les deux récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2, nommée HCT116-DKO (**Figure IV-1 B**). Les cellules HCT116 parentales (HCT116 WT) expriment les deux récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (**Figure IV-1 B**) et sont sensibles à la mort cellulaire induite par TRAIL (**Figure IV-3 B**). La valeur d'IC₅₀ du TRAIL dans ces cellules a été déterminée comme étant d'environ 40 ng/mL. Cependant, TRAIL a été incapable de déclencher l'apoptose dans les cellules HCT116-DKO et la survie des cellules n'a pas donc été affectée quel que soit la dose du TRAIL. Egalement, le nanovecteur NPT a été incapable de réduire la viabilité cellulaire dans ces cellules (**Figure IV-3 B**), ce qui démontre la non-toxicité des nanoparticules ou nanotubes de carbone. En revanche, le NPT a été plus efficace que TRAIL soluble dans la réduction de la viabilité cellulaire dans les cellules WT comme dans les autres lignées de cellules cancéreuses testées. La valeur d'IC₅₀ du NPT a été estimée à 3 ng/mL, ce qui indique que le NPT est au moins 10 fois plus efficace que TRAIL soluble pour tuer les cellules HCT116 WT, alors que notre nanovecteur NPT et TRAIL soluble, ont été incapables de déclencher l'apoptose dans les cellules HCT116-DKO.

IV.2.3.2 Test de Hoechst staining

Afin de prouver à nouveau la meilleure capacité du nanovecteur NPT à induire la mort cellulaire par rapport à TRAIL seul, l'apoptose a été évaluée dans les cellules H1703 par le test de coloration Hoechst en utilisant une concentration fixe de TRAIL et NPT.

Ce test caractérise la mort cellulaire apoptotique en mettant en évidence la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire. Ce colorant (Hoechst 33342 (bisbenzimidazole H 33342)) se lie spécifiquement aux régions d'ADN bicaténaire riches en bases

azotées Adénine-Thymine et permet donc de visualiser par microscope, à l'aide d'un laser à argon, l'état de compaction ou de fragmentation de l'ADN génomique des cellules.

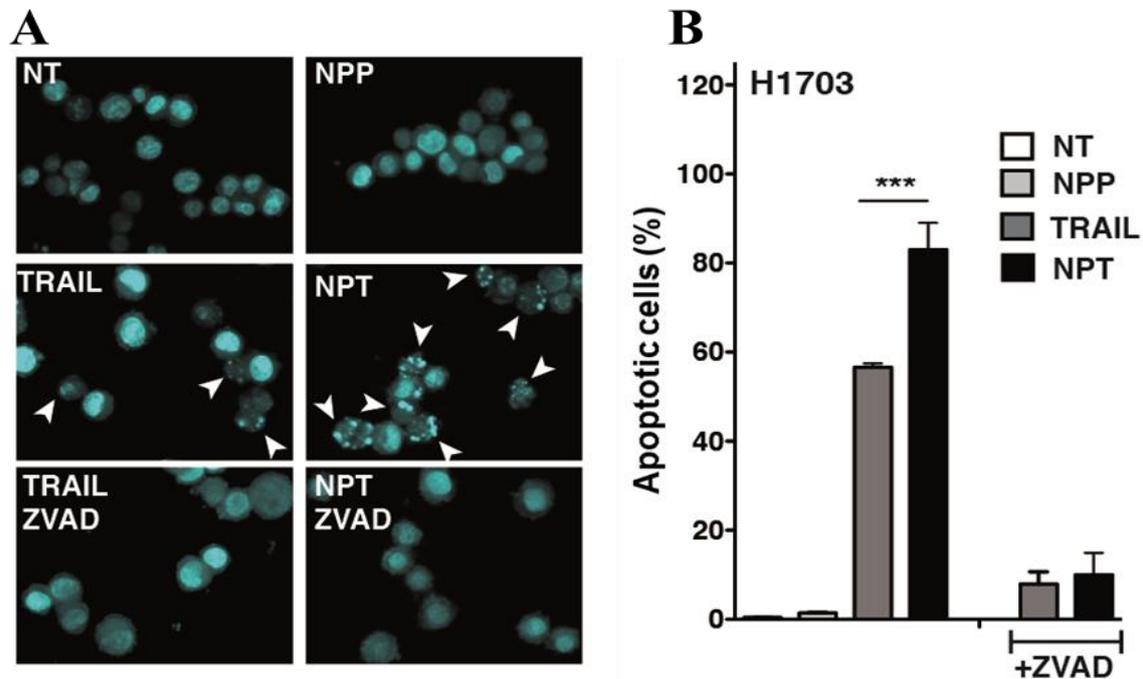


Figure IV—4 La coloration Hoechst des cellules H1703 traitées avec les mêmes concentrations de NPT et TRAIL (20 ng/mL): Enumération des noyaux apoptotiques (environ 300 cellules) de la lignée cellulaire H1703-WT. Les flèches blanches montrent les noyaux fragmentés ou condensés (A). Pourcentage de cellules apoptotiques : des cellules non traitées (NT) sont utilisées comme témoin. Les données sont la moyenne \pm SD (n = 3). Les différences entre les groupes sélectionnés ont été comparées par l'analyse non-paramétrique de la variance (ANOVA) avec le test de comparaison multiple *post hoc* Bonferonni, *** P < 0,001, comparativement à la stimulation de TRAIL seul et NPT sur les lignées cellulaires H1703 (WT) (B). NT: non-traité, NPP: nanotubes de carbone contrôles, ZVAD: Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl [O-méthyl] -fluorométhylketone).

Comme le montre la microscopie à fluorescence pour la coloration Hoechst, les deux traitements TRAIL et NPT induisent une fragmentation nucléaire, caractéristique de l'apoptose (Figure IV-4 A). L'inhibition de l'activation des caspases par l'inhibiteur pan-inhibiteur de caspase ZVAD, inhibe la fragmentation nucléaire induite par TRAIL et NPT. Cela montre que le NPT et TRAIL ont pu déclencher l'apoptose via TRAIL-R1 et TRAIL-R2. La quantification du pourcentage de cellules H1703 en apoptose lors de la stimulation par NPT montre clairement que l'activité pro-apoptotique de NPT est largement supérieure à TRAIL (Figure IV-4 B).

IV.2.3.3 Test de marquage à l'Annexine V

Ce test repose sur l'utilisation de l'Annexine V, qui est une protéine avoisinant les 36 KDa et possédant une forte affinité pour la phosphatidylsérine (PS). L'Annexine V peut-être couplée à un marqueur fluorescent et permet donc la détection précoce des cellules en apoptose. En effet, dans une cellule non-apoptotique, les PS membranaires sont situées dans le feuillet interne de la membrane et ne sont externalisées vers le feuillet externe membranaire que lorsque la cellule rentre en apoptose (Figure IV-5). Cela permet le marquage des cellules apoptotiques à l'Annexine V.

A noter que le marquage à l'Annexine V peut être mis en évidence également pour les cellules mortes par nécrose. Toutefois, une discrimination entre les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques est possible en ajoutant un marqueur de viabilité cellulaire comme le 7-aminoactinomycine D (7-AAD) utilisé conjointement avec l'Annexine V pendant le marquage. Le 7-AAD permet ainsi de différencier les cellules apoptotiques (simples positives à l'Annexine V) des cellules nécrotiques (doubles positives à l'Annexine V et au 7-AAD), correspondant à de l'apoptose tardive.

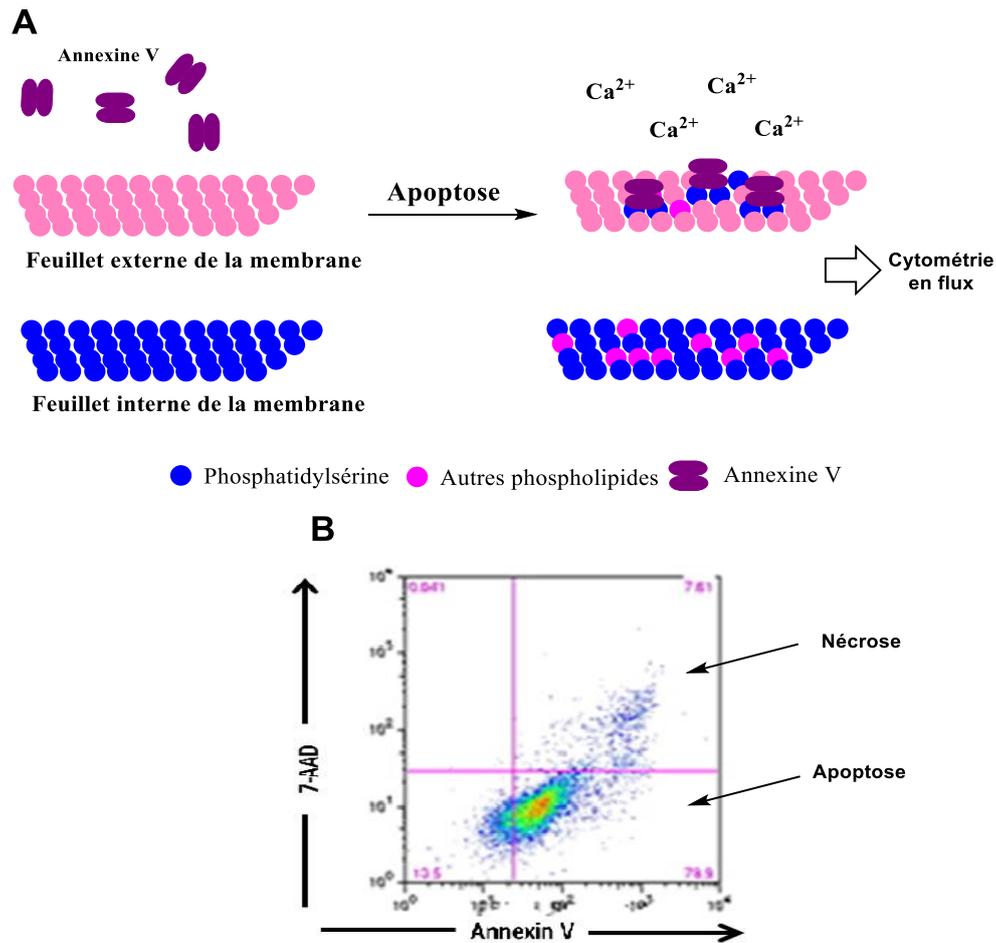


Figure IV—5 Principe de marquage à l'Annexine V : externalisation de la phosphatidylsérine (PS) et fixation de l'Annexine V en-dessus (A). Un exemple de marquage cellulaire à l'Annexine V par cytométrie en flux : les cellules normales ne sont pas marquées à l'Annexine V contrairement aux cellules apoptotiques et nécrotiques (B).

Ainsi, afin de montrer encore une fois, que l'efficacité du nanovecteur NPT est due uniquement à la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTS mais pas aux nanotubes eux-mêmes, une concentration fixe de TRAIL, NPT ou SWCNTS non fonctionnalisés avec TRAIL (NPP) a été utilisé pour évaluer l'apoptose dans les cellules H1703 par un marquage à l'Annexine V (voir [Annexe 3](#) pour les renseignements techniques).

Comme le montre la cytométrie en flux, les traitements NPT et TRAIL, contrairement aux NPP induisent l'apoptose des cellules H1703 avec un taux de 90 et 55% respectivement des cellules subissant l'apoptose, 6 heures après leur stimulation ([Figure IV-6 A](#)). Cependant, l'incubation des cellules en présence de l'inhibiteur des caspases pan-ZVAD, 30 min avant la

stimulation, a empêché l'apoptose induite à la fois par TRAIL et NPT (Figure IV-6 A) et les cellules restent donc vivantes.

L'analyse statistique a montré que l'apoptose induite dans ces cellules par le NPT a été significativement supérieure à celle induite par TRAIL soluble (Figure IV-6 B). Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée cellulaire HCT116 parentale (Figure IV-6 C), tandis que la lignée déficiente pour les récepteurs agonistes du TRAIL (HCT116-DKO) est restée insensible à la stimulation par TRAIL ou NPT (Figure IV-6 C). Cependant, les nanoparticules non-fonctionnalisées avec TRAIL, c'est-à-dire les SWCNTs-PSE (NPP), n'ont pas pu déclencher l'apoptose dans toutes les lignées cellulaires testées.

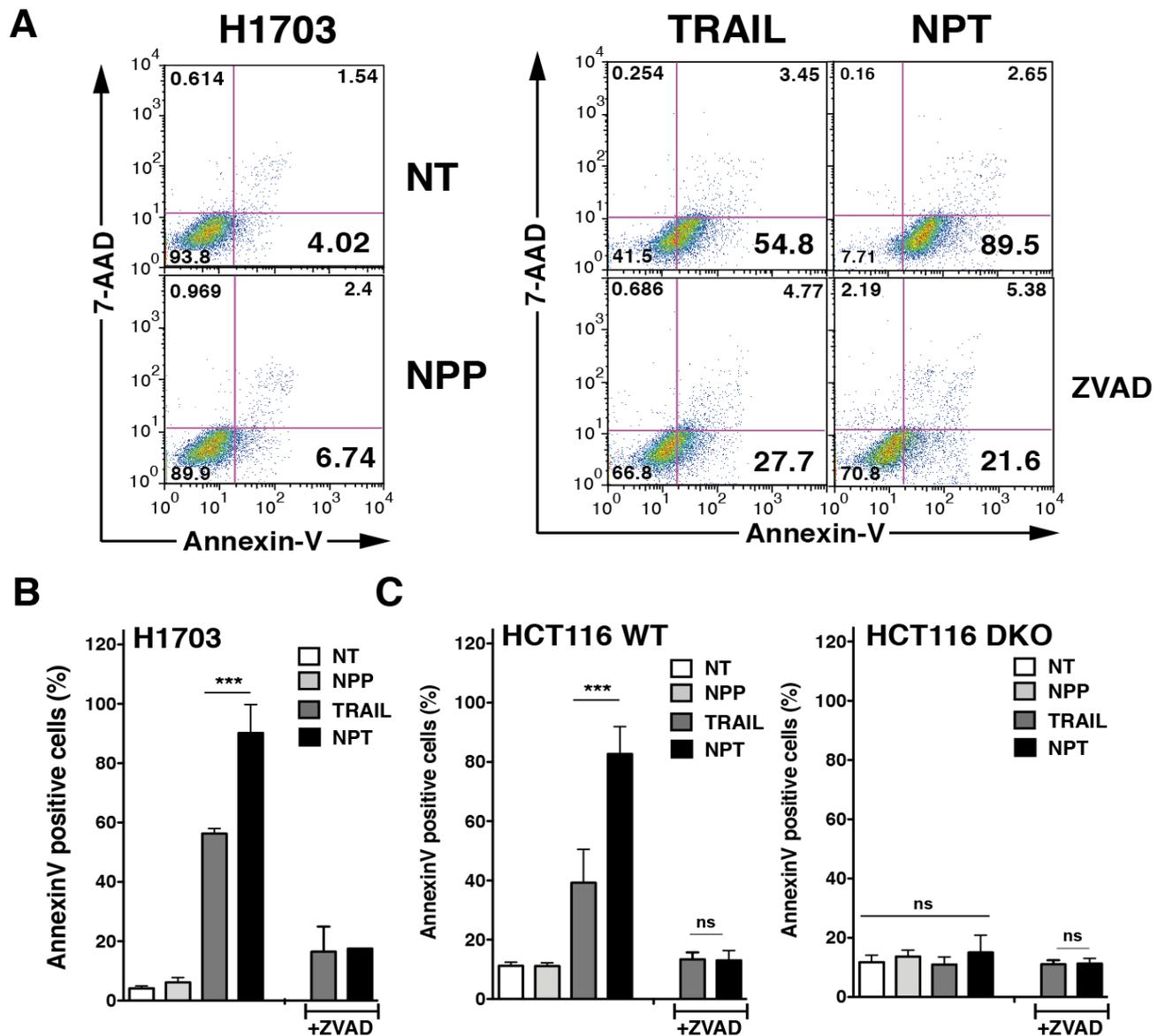


Figure IV—6 Analyse de la mort cellulaire par apoptose (Annexine V) et par nécrose (7-AAD) après un traitement par la même concentration de NPT et TRAIL (40 ng/mL) dans des lignées cellulaires HCT116 (WT et DKO) et (20 ng/mL) dans la lignée cellulaire H1703. Représentation schématique de l'un des résultats obtenus sur la lignée cellulaire H1703 avec le logiciel FlowJo (A). Pourcentage de cellules positives à l'Annexine V pour des lignées cellulaires H1703 (B). Pourcentage de cellules positives à l'Annexine V pour des lignées cellulaires HCT116 (WT et DKO) (C). Les différences entre les groupes sélectionnés ont été comparés en utilisant l'analyse non-paramétrique de la variance (ANOVA) avec le test de comparaison multiple *post hoc* Bonferonni, *** $P < 0,001$, comparativement à la stimulation de TRAIL seul et NPT, ns (non significative statistiquement). Les données sont la moyenne \pm SD ($n = 3$).

IV.2.3.4 Analyse des éléments du complexe DISC

Le complexe « Death Inducing signaling complex » ou DISC est un complexe multi-protéique formé par des membres de la famille des récepteurs de mort « Death receptors » ou récepteurs cellulaires induisant l'apoptose [Kischkel *et al.*; 1995]. Le ligand TRAIL trimérique se lie sur ses des récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et induit leur trimérisation. Ainsi, le complexe DISC est formé essentiellement du récepteur de mort, de la protéine adaptatrice FADD et de la Caspase 8 (voir chapitre I (Figure I-15)). Ainsi, il permet une transduction d'une cascade de signaux en aval aboutissants à l'apoptose.

L'analyse de la formation du DISC des récepteurs du TRAIL et son activation dans les cellules HCT116 stimulées par TRAIL ou NPT de 10 à 90 minutes (voir Annexe 3 pour les renseignements techniques) a révélé que NPT a légèrement augmenté le recrutement des caspase-8 et FADD aux récepteurs de TRAIL (Figure IV-7). D'une façon importante, et conformément à son activité supérieure pro-apoptotique, la stimulation par NPT induit une forte activation des caspases initiateuses, mise en évidence par l'augmentation des fragments de la caspase-8 p18 ou p12 de la caspase-10 (Figure IV-7). L'activation accrue des caspases initiateuses lors de la stimulation par NPT, par rapport à TRAIL, a également été mise en évidence par la disparition concomitante de la proforme c-FLIP_L et l'apparition de ses produits clivés p43 dans le complexe DISC (Figure IV-7). Ces résultats montrent que NPT induit une forte activation des caspases initiateuses dans le complexe DISC par rapport au TRAIL soluble.

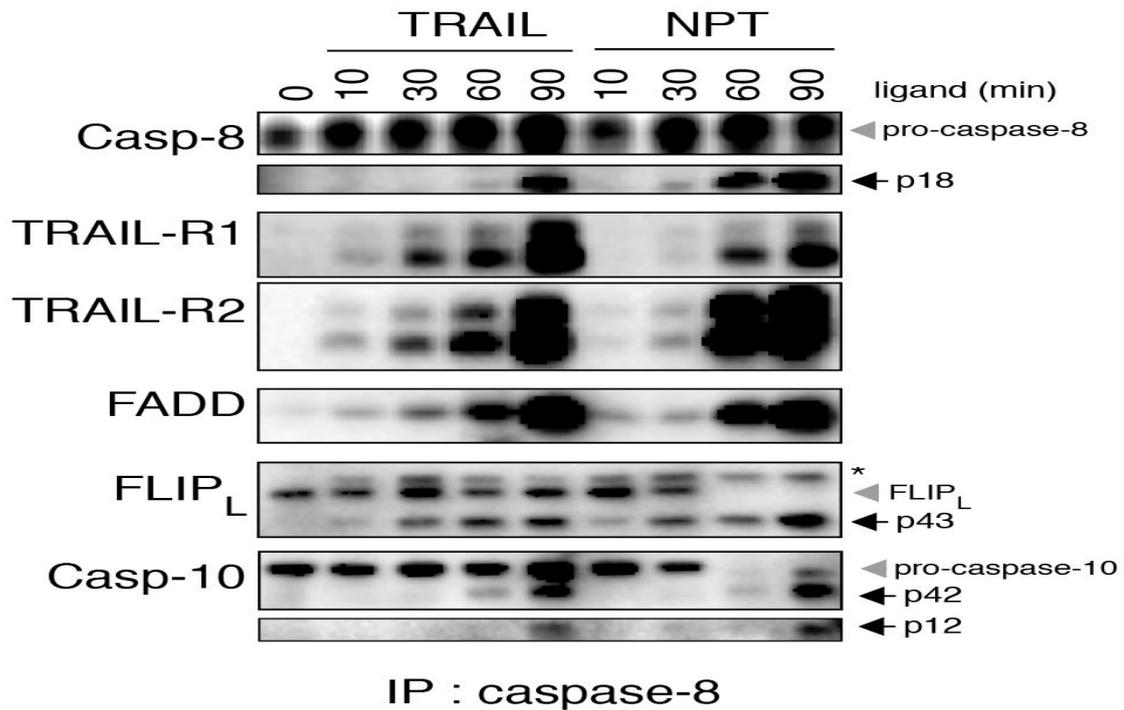


Figure IV—7 Immunoprécipitation (IP) de la caspase-8 et analyse de la formation du complexe DISC dans les cellules HCT116-WT stimulées avec une concentration de 2 µg/mL de His-hTRAIL ou NPT pendant les périodes indiquées (voir Annexe-3). Après la lyse des cellules dans un tampon contenant du NP40, le complexe DISC a été immunoprécipité en utilisant un anticorps anti-Caspase-8 et les protéines associées ont été analysées par Western blotting en utilisant des anticorps anti- DR4, DR5, FADD, FLIPL, Caspase-8 et Caspase-10 (Casp-8 et Casp-10). Les produits de clivage des Caspase et FLIP sont indiqués par des flèches noires, les protéines non clivées sont indiquées par des flèches grises. L'astérisque montre des bandes de coloration non spécifique. Les masses moléculaires sont indiquées en kDa.

Cette expérience d'immunoprécipitation (pull-down) de la Caspase-8 a également été réalisée pour délimiter davantage le mécanisme moléculaire impliqué dans le gain de fonction proapoptotique obtenu avec le nanovecteur NPT. Cette expérience plaide contre un gain d'affinité induite par la fonctionnalisation du TRAIL sur SWCNTS et montre que le NPT induit une meilleure activation de la caspase-8. Notre expérience concernant l'analyse de DISC, suggère que le gain d'affinité présente des impacts modestes sur la formation de DISC. En effet, si un peu plus de FADD et DR5 sont immunoprécipités avec la caspase-8, 60 minutes après la stimulation par NPT (Figure IV-7), aucune différence n'a été observée à l'exception de l'activation de la caspase initiateur durant la cinétique. Ce résultat est en faveur d'un changement qualitatif, et non quantitatif, dans la formation de DISC. Le nanovecteur

NPT est donc plus susceptible d'avoir un effet bénéfique sur l'agrégation du récepteur que sur son occupation.

IV.3 Résultats – Partie 2

IV.3.1 Modèles cellulaires étudiés

Dans cette partie des résultats, nous traitons deux modèles cellulaires : les lignées cellulaires squameuses humaines du cancer pulmonaire H1703 et les lignées d'adénocarcinome humain du colon HCT116. Le but est d'étudier l'activité apoptotique de notre nanovecteur NPT par rapport à TRAIL soluble sur les lignées cellulaires (HCT116 et H1703), déficientes « Knock-Out » pour un seul récepteur de mort TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (DR4^{-/-} ou DR5^{-/-}), qui ont été générées par la technologie TALEN.

IV.3.2 Analyse des récepteurs

Le niveau d'expression des récepteurs agonistes de TRAIL (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) dans ces lignées cellulaires a été étudié par cytométrie en flux (**Figure IV-8**). Cependant, l'analyse de l'expression des récepteurs antagonistes de TRAIL (TRAIL-R3 et TRAIL-R4) n'a pas été nécessaire parce qu'elle a été déjà effectuée pour les lignées parentales (voir paragraphe IV.2.2 et (**Figure IV-1**)).

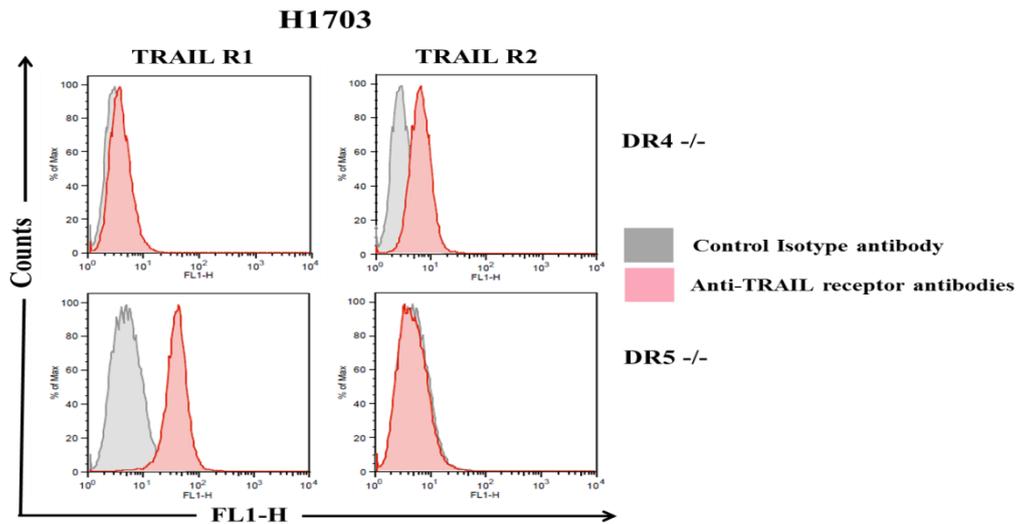


Figure IV—8 Analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression des récepteurs de TRAIL (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) dans les lignées cellulaires du carcinome pulmonaire H1703, déficientes en TRAIL-R1 (DR4-/-) ou TRAIL-R2 (DR5-/-). L'histogramme gris représente l'anticorps de contrôle ou isotype (IgG). L'histogramme rose correspond au marquage des récepteurs de TRAIL.

IV.3.3 Différentes expériences *in vitro* sur les lignées déficientes en récepteurs de TRAIL : effets des récepteurs agonistes

Les résultats obtenus à ce niveau indiquent que les deux lignées cellulaires H1703 et HCT116, déficientes pour le récepteur agoniste du TRAIL TRAIL-R2 ou (DR5-/-), restent sensibles à la stimulation par TRAIL. En effet, des concentrations de 85 ng/mL (Figure IV-9 B), et de 48 ng/mL (Figure IV-9 D) de notre nanovecteur NPT, ont été requises pour tuer 50% de ces cellules, respectivement. Cependant, des concentrations de 390 ng/mL et de 455 ng/mL de TRAIL ont été nécessaires pour aboutir au même effet (Figure IV-9 B et D). Ce résultat est intéressant sur le fait que la déficience en TRAIL-R2 ou DR5 n'empêche pas le gain de fonction pro-apoptotique obtenu avec NPT. Cela est plus efficace que TRAIL soluble, mais d'une façon moins importante, en comparaison avec les lignées cellulaires parentales déjà analysées dans le paragraphe IV.2.3.1. A noter que le récepteur agoniste TRAIL-R1 ou DR4 est toujours présent dans ces lignées cellulaires.

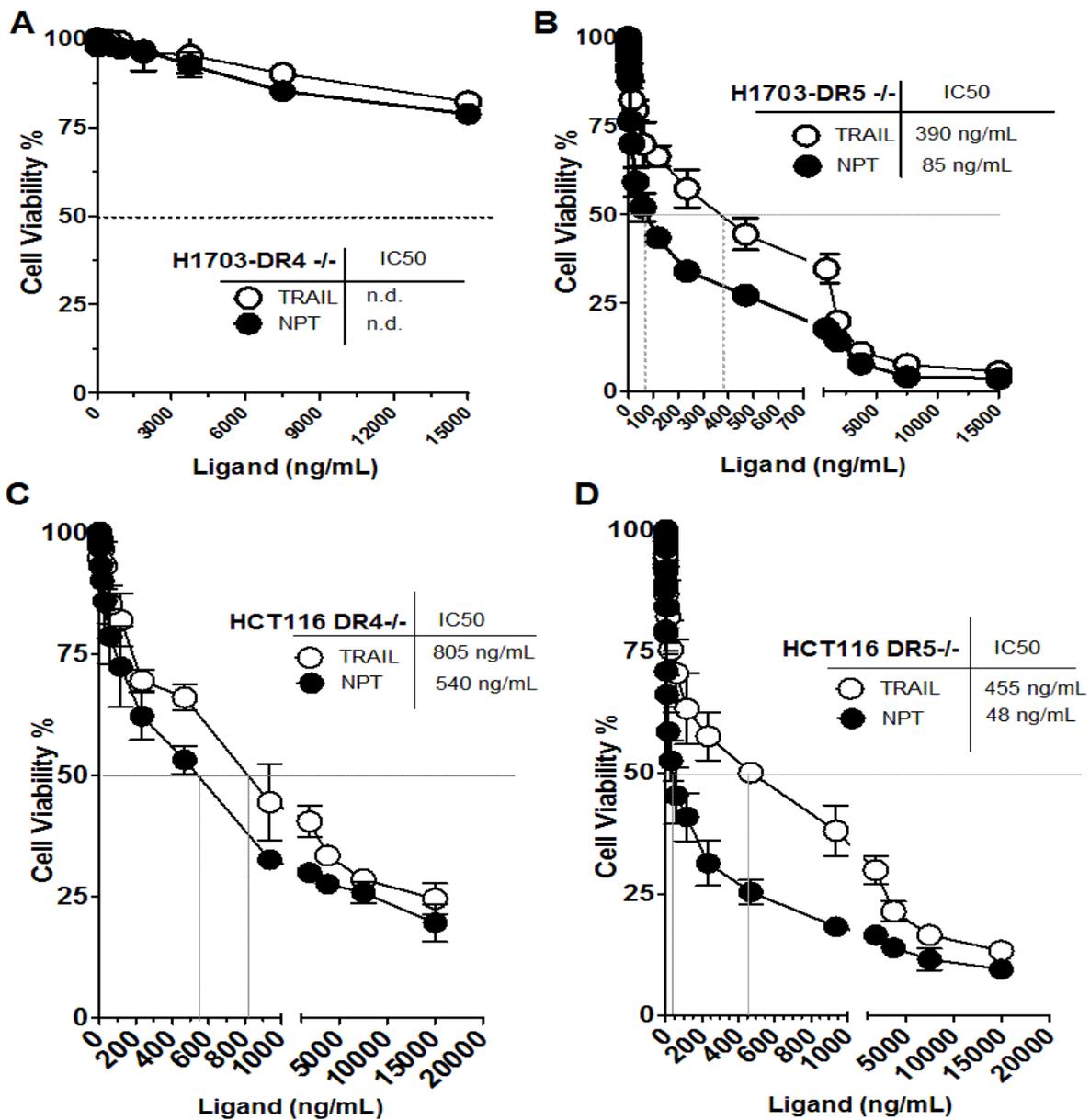


Figure IV—9 Viabilité cellulaire dans les cellules H1703, déficientes pour les récepteurs agonistes de TRAIL, TRAIL-R1 ou (DR4^{-/-}) (A) et pour TRAIL-R2 ou (DR5^{-/-}) (B), dans les cellules HCT116-DR4^{-/-} (C) et dans les lignées HCT116-DR5^{-/-} (D) après une stimulation avec des concentrations croissantes de TRAIL ou NPT. Ces cellules ont été générées par la technologie TALEN. La viabilité a été mesurée par la coloration au bleu de méthylène. Les données statistiques sont la moyenne \pm SD (n = 3).

En revanche, lorsque les cellules perdent l'expression du récepteur TRAIL-R1 ou DR4, les deux types de traitements, c'est-à-dire le NPT et TRAIL, perdent leur efficacité totale dans les lignées cellulaires H1703 DR4^{-/-}, qui deviennent résistantes à la signalisation apoptotique

induite par TRAIL (Figure IV-9 A). Cependant, l'IC50 de NPT est de 540 ng/mL par rapport à 805 ng/mL pour TRAIL dans la lignée cellulaire HCT116 déficiente pour TRAIL-R1 (Figure IV-9 C). Ainsi, nous pouvons dire que la sensibilisation induite par la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs, semble être strictement limitée au récepteur TRAIL-R1 ou DR4. Par conséquent, ce récepteur joue un rôle crucial dans le mécanisme apoptotique induit par TRAIL. Egalement, et encore une fois, aucune toxicité cellulaire n'a été obtenue avec les nanotubes seuls ou les nanotubes non fonctionnalisés avec TRAIL (NPP) incubés dans le milieu cellulaire.

En outre, d'autres expériences ont été effectuées sur ces lignées cellulaires déficientes pour l'un ou l'autre des récepteurs agonistes de TRAIL afin de prouver la meilleure capacité de notre NPT à induire l'apoptose par rapport à TRAIL seul. Dans ce but, l'apoptose a été évaluée dans les cellules H1703 et HCT116 déficientes pour les récepteurs TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (DR4^{-/-} et DR5^{-/-}), respectivement, par cytométrie en flux (marquage à l'Annexine V) et par la coloration Hoechst, en utilisant une concentration fixe de NPT et TRAIL. Comme prévu, les résultats obtenus pour les lignées cellulaires dépourvues en TRAIL-R2 (Figure IV-10 A, B et C) sont similaires à ceux obtenus pour les lignées parentales (voir paragraphes IV.2.3.2 et IV.2.3.3), mais d'une façon moindre, c'est-à-dire le taux d'apoptose obtenu sur ces lignées est plus faible que celui obtenu sur les lignées parentales. En revanche, la différence entre le potentiel pro-apoptotique du NPT par rapport à celui du TRAIL reste toujours significatif statistiquement. En outre, l'addition d'un inhibiteur de caspase pan-ZVAD a inhibé complètement l'induction d'apoptose soit avec TRAIL ou NPT dans ces lignées cellulaires. Ce qui prouve aussi que l'apoptose induite par TRAIL ou NPT est caspase-dépendante.

En revanche, la perte d'expression du récepteur TRAIL-R1 (DR4) a un impact majeur sur le potentiel apoptotique, à la fois pour la stimulation par NPT et TRAIL. Le nanovecteur NPT n'a pas été capable de stimuler suffisamment les cellules HCT116 déficientes pour DR4 (Figure IV-10 B), et aucune différence significative n'a été observée par rapport au TRAIL seul. De même, les cellules H1703 DR4^{-/-} n'ont pas répondu à la stimulation que ce soit avec NPT ou TRAIL et la majorité des cellules sont restées vivantes (Figure IV-10 A et C). Cela indique, encore une fois, l'importance de ce récepteur dans le processus de déclenchement d'apoptose. Ce résultat très prometteur nous a encouragés à étudier quelques mécanismes de

régulation du récepteur TRAIL-R1, tels que la glycosylation et voir si NPT est capable de restaurer la sensibilisation de certaines lignées résistantes à TRAIL.

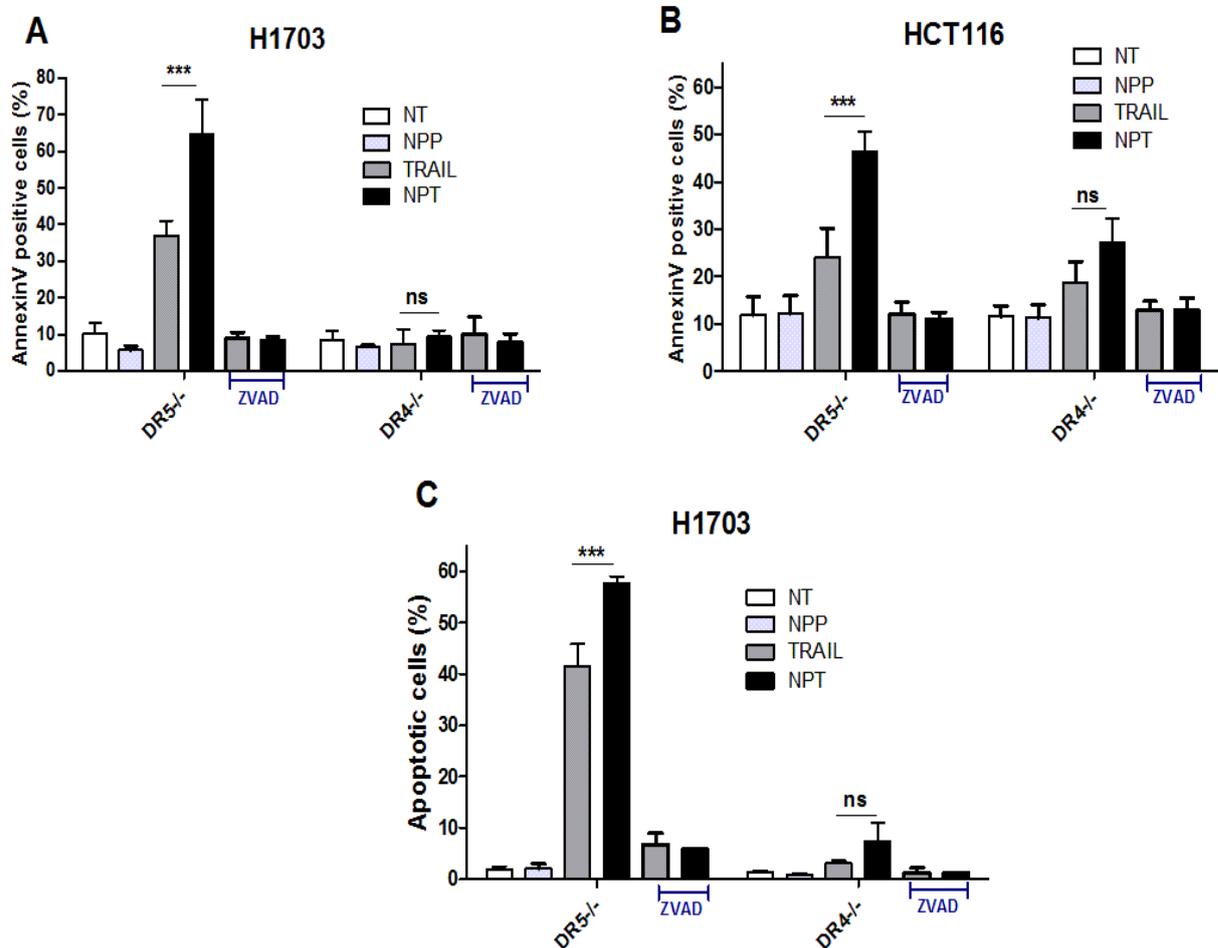


Figure IV—10 analyse de la mort cellulaire par apoptose (Annexine V et Hoechst) après un traitement de même concentration en NPT et TRAIL (40 ng/mL) dans des lignées de cellules HCT116 (DR4^{-/-} et DR5^{-/-}) et (20 ng/mL) dans les lignées cellulaires H1703 déficientes pour les mêmes récepteurs. Pourcentage de cellules positives à l'Annexine V pour les cellules H1703 et HCT116 (A) et (B). Pourcentage de cellules apoptotiques dans les lignées H1703 après un marquage Hoechst (C). Les différences entre les groupes sélectionnés ont été comparés en utilisant une analyse non-paramétrique de la variance (ANOVA) avec le test de comparaison multiple post hoc Bonferonni, *** P < 0,001, comparativement à la stimulation de TRAIL seul et NPT, ns (non significative statistiquement). Les données sont la moyenne ± SD (n = 3). NT: non-traité, NPP: nanotubes de carbone contrôles, ZVAD: Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl [O-méthyl]-fluorométhylketone).

IV.4 Résultats – Partie 3

IV.4.1 Mécanismes de régulation de la mort induite par TRAIL

La fixation du TRAIL sur ses récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 induit une signalisation apoptotique. Cette dernière est fortement régulée. En effet, cette signalisation est modulée à plusieurs niveaux en allant de la membrane plasmique vers la mitochondrie. La résistance à la signalisation d'apoptose s'explique par des phénomènes de dérégulation lors d'un mécanisme cancéreux.

Cependant, il a été reporté que des pertes d'expression des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 dans plusieurs types de cancer, tels que des mélanomes et des cancers ovariens [Bae *et al.*; 2008, Horak *et al.*; 2005], sont dues à des régulations épigénétiques. La restauration de la sensibilité de ces cellules à TRAIL est possible grâce à une réexpression des récepteurs [Horak *et al.*; 2005, Ozören *et al.*; 2000]. Egalement, des mutations inactivatrices des récepteurs agonistes que ce soit dans le domaine de mort DD [McDonald *et al.*; 2001] ou dans le site de liaison du ligand TRAIL [Fisher *et al.*; 2001] ont été reportées dans certains types de cancer et empêchent ainsi la transduction de la signalisation apoptotique.

En outre, les récepteurs antagonistes TRAIL-R3 et TRAIL-R4 régulent de façon négative l'apoptose induite par TRAIL [Jacquemin *et al.*; 2012, Merino *et al.*; 2006, Micheau *et al.*; 2013]. Ainsi, la composition du complexe d'initiation d'apoptose DISC devient désormais de plus en plus compliquée. Des protéines faisant partie du complexe DISC, régulent le signal d'apoptose. A ce niveau, la protéine régulatrice la plus décrite est la c-FLIP. Ses différentes isoformes (3 isoformes connues : c-FLIP_L, c-FLIP_S et c-FLIP_R) sont surexprimées dans de nombreux types de cancer [Morizot *et al.*; 2011, Shirley *et al.*; 2011]. Egalement, d'autres protéines de régulation agissent au niveau mitochondrial et aboutissent ainsi à une résistance cellulaire au signal apoptotique. Parmi ces protéines, nous pouvons citer les protéines de la famille Bcl-2 [Travert *et al.*; 2008] et les inhibiteurs de caspases IAPs [Galbán and Duckett; 2010].

IV.4.2 N-glycosylation des récepteurs

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'activation de la machinerie apoptotique due à l'interaction de TRAIL avec ses récepteurs agonistes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 est régulée par plusieurs facteurs. Par conséquent, l'expression et la fonctionnalité des récepteurs agonistes constituent donc le premier obstacle à la sensibilité à la mort cellulaire induite par TRAIL. Parmi les facteurs les plus importants de régulation de la signalisation apoptotique, des modifications post-traductionnelles des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 peuvent contrôler de manière importante leur activité.

Récemment, plusieurs études ont montré que la glycosylation des récepteurs TRAIL pourrait jouer un rôle crucial dans la voie de signalisation de cette cytokine. La O-glycosylation de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 augmente leur agrégation. Ce qui favorise la formation de DISC, le recrutement et l'activation de la caspase-8 conduisant à l'apoptose induite par TRAIL [Wagner *et al.*; 2007]. La palmitoylation de TRAIL-R1 renforce également sa capacité à induire l'apoptose [Rossin *et al.*; 2009]. En effet, il a été démontré aussi que TRAIL-R1 est N-glycosylé. Cette modification post-traductionnelle régule son pouvoir de déclencher l'apoptose [Yoshida *et al.*; 2007]. Egalement, des travaux antérieurs (non publiés) dans l'équipe de Dr. Micheau (INSERM 866-Université de Bourgogne), ont suggéré que la N-glycosylation des récepteurs aurait pu apparaître pour contrôler la fonction de TRAIL avant la O-glycosylation. Ainsi, puisque la N-glycosylation est connue pour sa fonction régulatrice des autres membres de la famille du TNF, y compris CD95/Fas [Shatnyeva *et al.*; 2011], nous avons pensé que cette modification post-traductionnelle pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de la mort cellulaire induite par TRAIL et sera notre cible dans cette partie des travaux de thèse.

IV.4.2.1 Résultats obtenus sur les lignées d'ostéosarcome humain

Afin de déterminer si la N-glycosylation de TRAIL-R1 est nécessaire pour l'apoptose induite par ce récepteur TRAIL-R1, plusieurs lignées cellulaires provenant d'un ostéosarcome humain (U2OS) ont été testées : la lignée cellulaire U2OS-Mock, qui exprime de faibles niveaux de TRAIL-R2 et est presque dépourvue de TRAIL-R1 (Figure IV-11 A), la lignée

U2OS, qui exprime le récepteur TRAIL-R1WT (Figure IV-11 B), ou un mutant de la N-glycosylation de celui-ci, N156A (mutation d'une asparagine en alanine) (Figure IV-11 C). L'agrégation efficace des récepteurs de TRAIL induit un meilleur engagement d'apoptose. Parmi les résultats obtenus (non publiés) à l'unité INSERM 866, la déficience dans la N-glycosylation des récepteurs agonistes de TRAIL altère le recrutement et l'activation de la caspase-10 dans le complexe DISC. Cela laisse de suggérer que la N-glycosylation peut stabiliser le DISC ou contribuer à sa disposition, permettant ainsi l'activation des caspases initiatrices. Effectivement, notre nanovecteur NPT a amélioré l'apoptose induite par cette cytokine dans les cellules d'ostéosarcome exprimant le récepteur TRAIL-R1 (Figure IV-11 B). Cependant, la mutation du site de la N-glycosylation de ce récepteur a abrogé le gain de fonction obtenu avec le NPT (Figure IV-11 C). Néanmoins, le nanovecteur NPT a été incapable de déclencher l'apoptose dans les cellules dépourvues du récepteur TRAIL-R1 (Figure IV-11 A).

Généralement, ces résultats indiquent que la modification post-traductionnelle du TRAIL-R1 par N-glycosylation, est nécessaire pour déclencher une signalisation apoptotique efficace, probablement grâce à sa capacité de favoriser ou de stabiliser la formation ou l'activation du complexe d'initiation d'apoptose DISC, mais pas l'agrégation du récepteur.

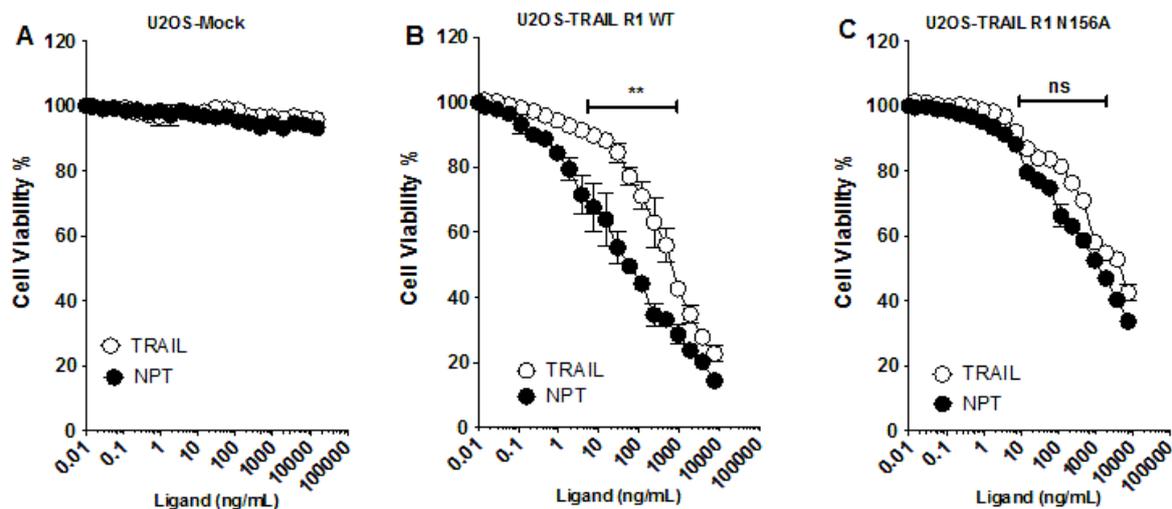


Figure IV—11 mutation du site unique de la N-glycosylation du TRAIL-R1 humain inhibe la mort cellulaire induite par TRAIL. Les lignées cellulaires U2OS sont stimulées par des concentrations croissantes de TRAIL ou NPT. Des cellules expriment un taux faible de TRAIL-R2 et sont presque dépourvues en TRAIL-R1 (A). Des cellules expriment le récepteur TRAIL-R1 (Wild-Type : WT) (B), ou portent une mutation pour le site de la N-glycosylation (N156) du

TRAIL-R1 (C). La viabilité a été mesurée par la coloration au bleu de méthylène. Les données statistiques sont la moyenne \pm SD (n = 3). La comparaison entre les groupes a été effectuée avec le Student's t-test. ** P <0,01 ; comparativement à la stimulation de TRAIL seul et NPT, ns (non significatif statistiquement). Les axes des X modifiés par rapport aux résultats précédents, sont à l'échelle logarithmique (Log 10).

A noter que nous avons évalué la viabilité cellulaire sur des lignées cellulaires du cancer colorectal humain HCT116 DKO double-déficientes pour les récepteurs agonistes du TRAIL, portant les mêmes genres de mutations au niveau du site de la N-glycosylation (résultats non montrés dans ce manuscrit). Nous avons obtenu des résultats cohérents et similaires à ceux obtenus avec les lignées d'ostéosarcome (U2OS).

IV.4.2.2 Résultats obtenus sur les lignées de mélanome murin

Le récepteur murin de TRAIL (noté mTRAIL-R), possède trois sites de N-glycosylation dans ses domaines de répétition riches en cystéine (CRD). Cependant, il est presque dépourvu de sites de O-glycosylation. Le but de cette partie est de vérifier si sa fonction apoptotique pourrait être régulée par la N-glycosylation. Pour aborder cette question, des analyses précédentes à nos travaux sur des lignées cancéreuses murines, à l'unité INSERM-866, ont prouvé que ce récepteur est N-glycosylé (résultats non publiés encore), et que les lignées tumorales murines présentent une forte résistance à l'apoptose induite à la fois, par TRAIL humain et murin.

Ainsi, afin de déterminer si la N-glycosylation du mTRAIL-R, pourrait expliquer la régulation de l'apoptose induite par TRAIL dans des cellules tumorales de souris, nous avons ensuite évalué si les trois sites putatifs de la N-glycosylation sont fonctionnels. Cependant, nos expériences ont été effectuées sur des lignées du mélanome murin B16 portant une à trois substitutions à des positions N99, N122 et/ou N150 et sur une lignée qui n'exprime pas le récepteur (Figure IV-12). Ensuite, la capacité de ces mutants de la N-glycosylation du récepteur mTRAIL-R à déclencher l'apoptose lors de la stimulation par TRAIL, et par le nanovecteur NPT, a été évaluée.

Les résultats obtenus montrent que la simple mutation du site de la N-glycosylation N99 (Figure IV-12 B) n'a pas inhibé la mort cellulaire induite par TRAIL (Figure IV-12 A). Nous n'avons donc pas obtenu une différence significative par rapport à la lignée qui exprime le récepteur mTRAIL-R parental. En revanche, la mutation simultanée des sites N99 et N122 était suffisante pour altérer l'apoptose induite par TRAIL (Figure IV-12 C). Le mutant complètement défectueux pour les trois sites de la N-glycosylation (N99/122 /150A) (Figure IV-12 D) a été aussi efficace que le mutant mTRAIL-R N99/122A pour inhiber la mort cellulaire induite par TRAIL. Ainsi, il est à tout à fait normal que la lignée de mélanome dépourvue en m-TRAIL-R soit totalement résistante à la stimulation par TRAIL et NPT (Figure IV-12 E).

Par conséquent, ces résultats obtenus suggèrent que la N-glycosylation joue un rôle régulateur puissant pendant l'apoptose induite par TRAIL dans des cellules tumorales murines. Ainsi, la fonctionnalisation du TRAIL sur des particules de nanotubes de carbone SWCNTS (NPT), n'a pas réussi à restaurer la sensibilité à la mort cellulaire induite par cette cytokine dans des cellules B16 exprimant une N-glycosylation défectueuse du récepteur mTRAIL-R, contrairement aux cellules B16 exprimant le mutant unique N99A ou le récepteur parental mTRAIL-R WT (Figure IV-12).

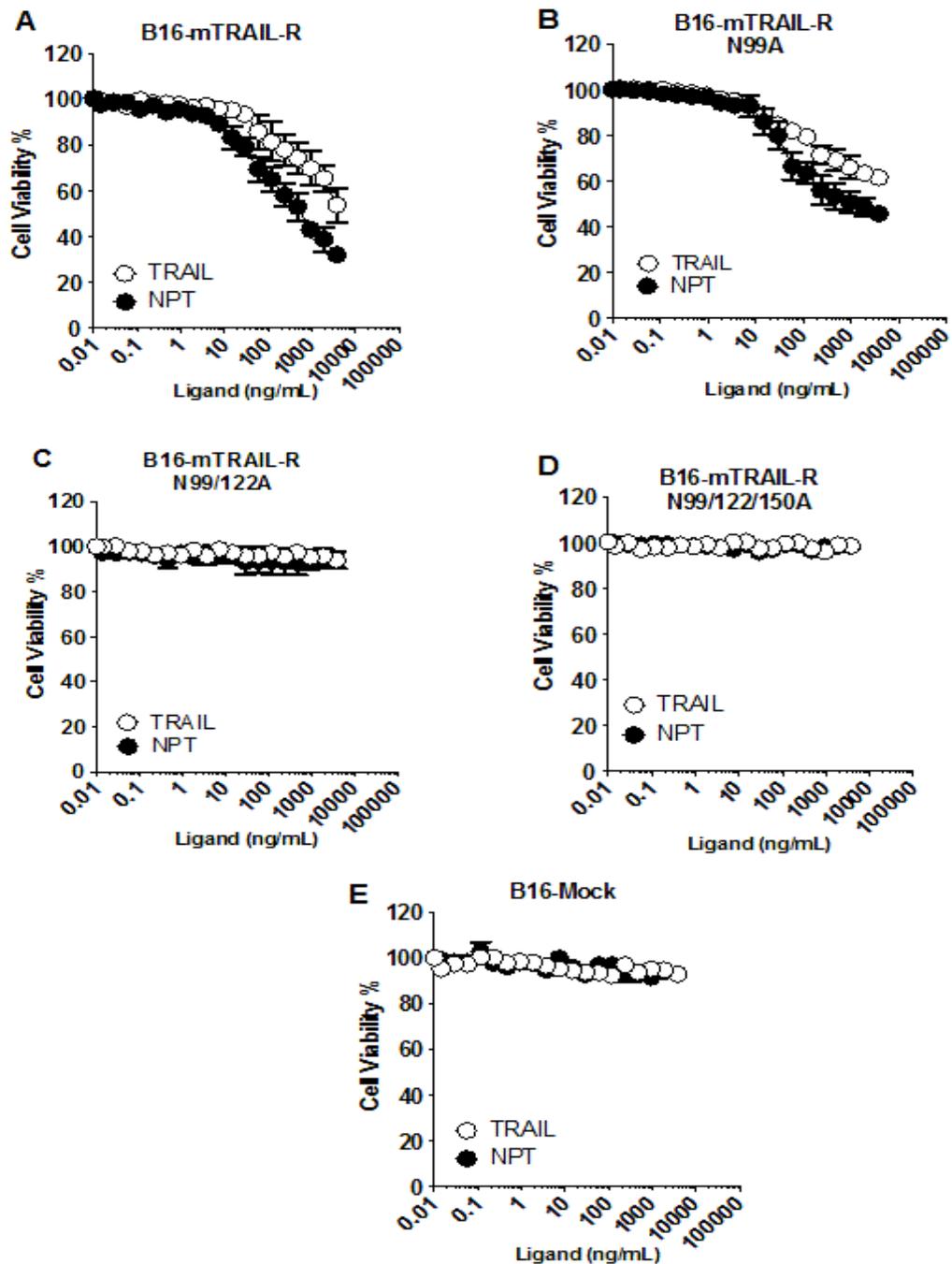


Figure IV—12 N-glycosylation régulant l’apoptose induite par le récepteur murin mTRAIL-R. Les lignées cellulaires B16 sont stimulées par des concentrations croissantes de TRAIL ou NPT. La sensibilité des cellules exprimant le récepteur mTRAIL-R (Wild-Type) (A), une simple mutation du site de la N-glycosylation N99 (B), une mutation simultanée pour les deux sites de la N-glycosylation N99 et N122 (C), une triple mutation des sites N99/122/150 (D) et celle des cellules dépourvues pour le récepteur mTRAIL-R (Mock) (E), a été mesurée par la coloration au bleu de méthylène. Les données statistiques sont la moyenne \pm SD ($n = 3$). La comparaison entre les groupes a été effectuée avec le Student’s t-test. ** $P < 0,01$; comparativement à la stimulation de TRAIL seul et NPT, ns (non significatif statistiquement).

IV.5 Discussion-Conclusion

Nos résultats obtenus sont cohérents avec ce qui a été évoqué précédemment montrant que la multimérisation du TRAIL [Huet *et al.*; 2014], d'une manière semblable à une membrane, est suffisante pour augmenter l'activité destructrice des cellules par TRAIL. Le greffage du TRAIL sur les nanotubes de carbone augmente efficacement la mort cellulaire induite par TRAIL dans divers types de cellules tumorales y compris HUH et HepG2. Il convient de noter que ces deux lignées cellulaires d'Hépatocarcinome expriment TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2), deux récepteurs antagonistes de TRAIL, dépourvus d'un domaine de mort (DD) fonctionnel, et connus pour inhiber l'apoptose induite par TRAIL d'une certaine magnitude [Jacquemin *et al.*; 2010, Merino *et al.*; 2006, Neumann *et al.*; 2014].

Cependant, l'inhibition de l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules HUH par le récepteur antagoniste TRAIL-R3 reste peu probable en raison du faible niveau d'expression de ce récepteur. Néanmoins, l'inhibition de l'apoptose induite par TRAIL par le second récepteur antagoniste TRAIL-R4 dans les cellules HepG2 a été bien étayée [Merino *et al.*; 2006]. Dans cette lignée cellulaire, et d'une façon intéressante, le NPT est de 20 fois plus efficace, comparativement à TRAIL, tandis que son efficacité est à peu près de 10 fois supérieure à TRAIL dans les autres lignées cellulaires.

Le gain de fonction dans ces cellules, ainsi que dans des cellules exprimant uniquement des récepteurs agonistes de TRAIL, peut s'expliquer par l'activation différentielle de la caspase-8 au niveau du complexe DISC. Comme nous l'avons montré ici, après l'expérience de l'immunoprécipitation de la caspase-8, l'activité du nanovecteur NPT est supérieure à celle du TRAIL soluble en raison de sa capacité à augmenter l'activation des caspases initiatrices (Figure IV-7).

En revanche, l'augmentation de l'efficacité de NPT n'a pas été associée à une augmentation de l'immunoprécipitation des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Ce qui suggère que la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs est peu susceptible d'affecter l'affinité du TRAIL pour ses récepteurs. Par contre, la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs est davantage susceptible d'imiter la liaison du TRAIL à la membrane et de favoriser fortement l'agrégation des récepteurs, conduisant à une meilleure activation des

caspases initiatrices. Si ce gain de fonction est suffisant pour surmonter la résistance engendrée par le récepteur antagoniste du TRAIL alors cela reste désormais une question ouverte. Mais le gain de fonction observé dans les cellules HepG2, qui expriment spontanément le récepteur antagoniste fonctionnel TRAIL-R4, et les conclusions antérieures déjà tirées par notre groupe à l'aide de traitements séquentiels associant la chimiothérapie et TRAIL [Morizot *et al.*; 2011], suggèrent que le NPT est susceptible d'être en mesure de surmonter cette résistance grâce à sa plus forte capacité à induire l'activation de la caspase-8. D'autres travaux seront nécessaires pour répondre à cette question.

Globalement, nous avons montré que nos nanovecteurs basés sur le greffage du TRAIL sur les nanotubes de carbone SWCNTS, peuvent augmenter considérablement l'activité anti-tumorale *in vitro* du TRAIL en raison de leur capacité à augmenter l'activation de la caspase-8. De même, nous montrons que l'apoptose induite par NPT est de 10 à 20 fois plus importante que celle obtenue avec TRAIL soluble dans une variété de lignées cellulaires tumorales différentes. Ainsi, le nanovecteur NPT reste très sélectif pour la signalisation de TRAIL. En effet, le NPT a été incapable de déclencher l'apoptose dans la lignée cellulaire HCT116 DKO déficiente pour les récepteurs agonistes de TRAIL et qui est généré par la technologie TALEN. En outre, aucune toxicité pertinente n'a été observée pour les nanotubes seuls utilisés avec ces cellules ou avec d'autres modèles de lignées cellulaires que nous avons étudiées [Zakaria *et al.*; 2015].

Malgré les preuves évidentes décrivant le rôle de la O-glycosylation pour un engagement efficace de l'apoptose déclenchée par TRAIL-R2 dans des cellules tumorales humaines [Wagner *et al.*; 2007], il reste difficile de savoir si cette modification post-traductionnelle régule également l'apoptose induite par TRAIL-R1. Cependant, il existe des sites putatifs de la N-glycosylation du récepteur murin unique mTRAIL-R sur des asparagines N99, N122, N156 et N150 contrairement à un seul site N156 sur le récepteur TRAIL-R1 humain.

En outre, nous avons montré davantage dans le modèle d'ostéosarcome humain que le NPT a favorisé l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules U2OS exprimant le récepteur TRAIL-R1 par rapport au TRAIL soluble. Cependant, le gain de fonction obtenu avec le NPT a été supprimé dans les cellules exprimant le mutant N156 du récepteur TRAIL-R1 N-

glycosylé. En outre, TRAIL fonctionnalisé sur les nanotubes de carbone (NPT) induit une apoptose dans les cellules du mélanome murin B16 exprimant un seul mutant N99 du récepteur mTRAIL-R. Sa capacité à induire l'apoptose était similaire à celle obtenue avec la lignée parentale exprimant le récepteur. En revanche, la mutation de la N-glycosylation du récepteur dans les deux sites N99/122 ou dans les trois sites N99/122/150 a rendu les cellules complètement résistantes à la stimulation d'apoptose induite à la fois par le nanovecteur NPT et TRAIL.

Compte tenu de la capacité des nanotubes de carbone SWCNTs à délivrer des médicaments ainsi qu'une propension à absorber les ondes électromagnétiques, la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs peut ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques fondées sur le nanovecteur NPT chargé du TRAIL, comme les thérapies photothermiques ou la sensibilisation de l'administration de médicaments.

IV.6 Références Bibliographiques

- [Bae *et al.*; 2008] Bae, S. I.; Cheriyaath, V.; Jacobs, B. S.; Reu, F. J.; Borden, E. C., Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **2008**, 27 (4), 490-498.
- [Balasubramanian and Burghard; 2005] Balasubramanian, K.; Burghard, M., Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small* **2005**, 1 (2), 180-192.
- [Battigelli *et al.*; 2013] Battigelli, A.; Menard-Moyon, C.; Da Ros, T.; Prato, M.; Bianco, A., Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, 1899-18920.
- [De Juana and Pérez; 2013] De Juana, A.; Pérez, E. M., Getting tubed: mechanical bond in endohedral derivatives of carbon nanotubes? *Nanoscale* **2013**, 5, 7141-7148.
- [Fisher *et al.*; 2001] Fisher, M. J.; Virmani, A. K.; Wu, L.; Aplenc, R.; Harper, J. C.; Powell, S. M.; Rebbeck, T. R.; Sidransky, D.; Gazdar, A. F.; El-Deiry, W. S., Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* **2001**, 7 (6), 1688-1697.
- [Galbán and Duckett; 2010] Galbán, S.; Duckett, C. S., XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death & Differentiation* **2010**, 17 (1), 54-60.
- [Gasparian *et al.*; 2009] Gasparian, M. E.; Chernyak, B. V.; Dolgikh, D. A.; Yagolovich, A. V.; Popova, E. N.; Sycheva, A. M.; Moshkovskii, S. A.; Kirpichnikov, M. P., Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5. *Apoptosis* **2009**, 14, 778-787.
- [Herbst *et al.*; 2010] Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P. J.; Gordon, M. S.; Novotny, W.; Goldwasser, M. A.; Tohnya, T. M.; Lum, B. L.; Ashkenazi, A.; Jubb, A. M.; Mendelson, D. S., Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *The Journal of clinical Oncology* **2010**, 28 (17), 2839-2846.
- [Horak *et al.*; 2005] Horak, P.; Pils, D.; Haller, G.; Pribill, I.; Roessler, M.; Tomek, S.; Horvat, R.; Zeillinger, R.; Zielinski, C.; Krainer, M., Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Molecular Cancer Research* **2005**, 3 (6), 335-343.
- [Huet *et al.*; 2014] Huet, H.; Growney, J.; Johnson, J. A.; Li, J. B., S. ; Ostrom, L.; Zafari, M.; Kowal, C.; Yang, G.; Royo, A.; Jensen, M.; Dombrecht, B.; Meerschaert, K. R. A.; Kolkman, J. A.; Cromie, K. D.; Mosher, R.; Gao, H.; Schuller, A.; Isaacs, R.; Sellers, W. R.; Ettenberg, S. A., Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *mAbs* **2014**, 6 (6), 1560-1570.
- [Jacquemin *et al.*; 2010] Jacquemin, G.; Shirley, S.; Micheau, O., Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **2010**, 67 (18), 3115-3130.
- [Jacquemin *et al.*; 2012] Jacquemin, G.; Granci, V.; Gallouet, A. S.; Lalaoui, N.; Morlé, A.; Iessi, E.; Morizot, A.; Garrido, C.; Guillaudeux, T.; Micheau, O., Quercetin-mediated

- Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. *Haematologica* **2012**, *97*, 38-46.
- [Kelley et al.; 2001]** Kelley, S. K.; Harris, L. A.; Xie, D.; Deforge, L.; Totpal, K.; Bussiere, J.; Fox, J. A., Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *299* (1), 31-38.
- [Kischkel et al.; 1995]** Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E., Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* **1995**, *14* (22), 5579-5588.
- [Lawrence et al.; 2001]** Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; Hooley, J.; Sherwood, S.; Pai, R.; Leung, S.; Khan, L.; Gliniak, B.; Bussiere, J.; Smith, C. A.; Strom, S. S.; Kelley, S.; Fox, J. A.; Thomas, D.; Ashkenazi, A., Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine* **2001**, *7* (4), 383-385.
- [Maggini et al.; 1993]** Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M., Addition of azomethine ylides to C60: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *The Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 9798-9799.
- [McDonald et al.; 2001]** McDonald, E. R. r.; Chui, P. C.; Martelli, P. F.; Dicker, D. T.; El-Deiry, W. S., Death domain mutagenesis of KILLER/DR5 reveals residues critical for apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(18): (18), 14939-14945.
- [Merino et al.; 2006]** Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O., Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular & Cellular Biology* **2006**, *26*, 7046-7055.
- [Micheau et al.; 2013]** Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F., Death receptors as targets in cancer. *The British Journal of Pharmacology* **2013**, *169* (8), 1723-1744.
- [Morizot et al.; 2011]** Morizot, A.; Merino, D.; Lalaoui, N.; Jacquemin, G.; Granci, V.; Iessi, E.; Lanneau, D.; Bouyer, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; Saas, P.; Garrido, C.; Micheau, O., Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death & Differentiation* **2011**, *18* (4), 700-711.
- [Neumann et al.; 2014]** Neumann, S.; Hasenauer, J.; Pollak, N.; Scheurich, P., Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *The Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (23), 16576-16587.
- [Ozören et al.; 2000]** Ozören, N.; Fisher, M. J.; Kim, K.; Liu, C. X.; Genin, A.; Shifman, Y.; Dicker, D. T.; Spinner, N. B.; Lisitsyn, N. A.; El-Deiry, W. S., Homozygous deletion of the death receptor DR4 gene in a nasopharyngeal cancer cell line is associated with TRAIL resistance. *The International Journal of Oncology* **2000**, *16* (5), 917-925.
- [Pavet et al.; 2010]** Pavet, V.; Beyrath, J.; Pardin, C.; Morizot, A.; Lechner, M. C.; Briand, J. P.; Wendland, M.; Maison, W.; Fournel, S.; Micheau, O.; Guichard, G.; Gronemeyer, H., Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Research* **2010**, *70*, 1101-1110.

- [Rossin *et al.*; 2009]** Rossin, A.; Derouet, M.; Abdel-Sater, F.; Hueber, A. O., Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *The Biochemical Journal* **2009**, *419* (1), 185-192, 2 p following 192.
- [Shatnyeva *et al.*; 2011]** Shatnyeva, O. M.; Kubarenko, A. V.; Weber, C. E.; Pappa, A.; Schwartz-Albiez, R.; Weber, A. N.; Krammer, P. H.; Lavrik, I. N., Modulation of the CD95-induced apoptosis: the role of CD95 N-glycosylation. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e19927.
- [Shirley *et al.*; 2011]** Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O., Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **2011**, *6* (3), 311-323.
- [Sozykin and Beskachko; 2013]** Sozykin, S. A.; Beskachko, V. P., Structure of endohedral complexes of carbon nanotubes encapsulated with lithium and sodium. *Molecular Physics* **2013**, *111*, 930-938.
- [Szegezdi *et al.*; 2011]** Szegezdi, E.; Reis, C. R.; Van der Sloot, A. M.; Natoni, A.; O'Reilly, A.; Reeve, J.; Cool, R. H.; O'Dwyer, M.; Knapper, S.; Serrano, L.; Quax, W. J.; Samali, A., Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL. *The Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2011**, *15*, 2216-2231.
- [Travert *et al.*; 2008]** Travert, M.; Ame-Thomas, P.; Pangault, C.; Morizot, A.; Micheau, O.; Semana, G.; Lamy, T.; Fest, T.; Tarte, K.; Guillaudeux, T., CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *The Journal of Immunology* **2008**, *181* (2), 1001-1011.
- [Wagner *et al.*; 2007]** Wagner, K. W.; Punnoose, E. A.; Januario, T.; Lawrence, D. A.; Pitti, R. M.; Lancaster, K.; Lee, D.; Von Goetz, M.; Yee, S. F.; Totpal, K.; Huw, L.; Katta, V.; Cavet, G.; Hymowitz, S. G.; Amler, L.; Ashkenazi, A., Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine* **2007**, *13* (9), 1070-1077.
- [Yoshida *et al.*; 2007]** Yoshida, T.; Shiraishi, T.; Horinaka, M.; Wakada, M.; Sakai, T., Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two pro-apoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncology Reports* **2007**, *18* (5), 1239-1242.
- [Zakaria *et al.*; 2015]** Zakaria, A. B.; Picaud, F.; Rattier, T.; Pudlo, M.; Saviot, L.; Chassagnon, R.; Lherminier, J.; Gharbi, T.; Micheau, O.; Herlem, G., Nanovectorization of TRAIL with Single Wall Carbon Nanotubes Enhances Tumor Cell Killing. *Nano Letters* **2015**, *15* (2), 891-895.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

TRAIL (*TNF-related apoptosis induced ligand*), représente un membre de la super-famille des cytokines (TNF- α). TRAIL est une protéine exprimée naturellement par des cellules immunitaires actives [Ehrlich *et al.*; 2003, Fanger *et al.*; 1999, Halaas *et al.*; 2000], et joue un rôle non négligeable dans les réponses induites par le système immunitaire en réponse à des maladies auto-immunes, infectieuses ou même cancéreuses [Falschlehner *et al.*; 2009, Micheau *et al.*; 2013].

En thérapie, TRAIL suscite un intérêt majeur croissant, parce que cette cytokine est capable d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales sans avoir des effets indésirables sur les cellules saines [Kelley *et al.*; 2001, Lawrence *et al.*; 2001]. Cependant, les mécanismes exacts de régulation de l'induction apoptotique par TRAIL sont ainsi de plus en plus complexes. Ils agissent à plusieurs niveaux, au niveau des récepteurs, suite à une fixation du TRAIL sur des différents types de récepteurs : récepteurs de mort ou agonistes (TRAIL-R1, 2 nommés DR4, 5) ou sur les récepteurs antagonistes (TRAIL-R3, 4 nommés DcR1, 2). A ce niveau, dans le cas du cancer, la régulation de la mort induite par TRAIL se fait soit par une perte d'expression [Bae *et al.*; 2008, Horak *et al.*; 2005] ou de fonction [Fisher *et al.*; 2001, McDonald *et al.*; 2001] des récepteurs agonistes dans certaines tumeurs ; soit par les récepteurs antagonistes, dépourvus d'un domaine de mort intracellulaire efficace, et qui empêchent la signalisation apoptotique. DcR1 et DcR2 empêchent l'engagement du complexe d'initiation d'apoptose *Death-inducing signaling complex* (DISC) : DcR1 séquestre TRAIL dans les rafts lipidiques, cependant DcR2 inhibe l'activation des caspases initiateuses d'apoptose. [Merino *et al.*; 2006, Morizot *et al.*; 2011, Shirley *et al.*; 2011]. En outre, la signalisation apoptotique peut-être régulée en aval par différentes protéines, lors de la formation du complexe DISC (par exemple la principale protéine régulatrice du DISC (c-FLIP) surexprimée dans nombreux types de cancer [Morlé *et al.*; 2015]. Ainsi, elle peut avoir lieu au niveau mitochondrial par une surexpression des protéines de la famille Bcl-2 [Travert *et al.*; 2008] ou par une surexpression des inhibiteurs de caspases IAPs [Galbán and Duckett; 2010] conduisant à une résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL.

Cependant, et malgré les preuves évidentes de l'activité anti-tumorale du TRAIL, les essais cliniques ont montré que l'utilisation du TRAIL ou de l'un de ses dérivés seul en monothérapie, n'a pas été suffisante pour guérir les patients [Herbst *et al.*; 2010, Micheau *et al.*; 2013]. Par conséquent, le premier point clef des thérapies actuelles est de combiner TRAIL avec la chimiothérapie conventionnelle ou la thérapie ciblée pour, d'une part, enlever

la résistance permettant aux cellules tumorales d'échapper à la mort cellulaire induite par TRAIL, due aux récepteurs antagonistes ou aux autres mécanismes intracellulaires de résistance [Jacquemin *et al.*; 2012]. Et d'autre part, des molécules multimériques de TRAIL [Pavet *et al.*; 2010], et d'autres (anticorps ciblant TRAIL-R2 par exemple) [Huet *et al.*; 2014] ont été utilisées, pour augmenter, soit l'activité thérapeutique effectrice de TRAIL, ou pour re-sensibiliser des cellules résistantes à TRAIL [Morizot *et al.*; 2011, Morlé *et al.*; 2015].

Par ailleurs, les nanotechnologies et plus particulièrement les nanoparticules (NP), sont en plein essor à l'ère actuelle, et sont de plus en plus utilisées comme des nanovecteurs de principes actifs dans le domaine bio-médical surtout dans la thérapie anti-cancéreuse. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'un nano-système à base des nanotubes de carbone mono-parois ou SWCNT, permettant de véhiculer le principe actif (TRAIL dans notre cas).

Ainsi, nous avons présenté *dans le premier chapitre* de ce manuscrit une recherche bibliographique sur les trois éléments clefs principaux : les nanoparticules (essentiellement développées et utilisées ces dernières décennies), les nanotubes de carbone (ses différentes propriétés, utilisations dans une vaste gamme d'applications surtout notre domaine d'intérêt, *c'est-à-dire* le domaine médical) et finalement TRAIL (définitions, propriétés, utilisations et son implication majeure dans le défi actuel du traitement anti-cancéreux pour la santé publique).

Suite aux données bibliographiques, une conception réelle du projet a été proposée *dans le deuxième chapitre* de ce travail. En outre, une méthode de fonctionnalisation non-covalente de ces SWCNTs par la molécule acide pyrènebutanoïque N-hydroxysuccinimide ester (PSE), qui est capable de s'adsorber à la surface des nanotubes *via* des interactions π - π stacking. Cette étape représente un carrefour ultime pour tous les objectifs ultérieurs de cette thèse. En effet, nous avons bien réussi à synthétiser le nanovecteur NPT depuis la coupure des nanotubes dans le mélange acide jusqu'à l'addition de la protéine TRAIL.

Les caractérisations ont fourni des renseignements complémentaires avant et après l'addition du ligand TRAIL. Cependant, les spectroscopies RAMAN (vibrations de SWCNT avec un taux suffisant du PSE capables de produire des changements détectables de RBM et de la bande G), infra-rouges (signal intense observé entre 1700 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} et indique

clairement la présence du PSE sur les SWCNTs), ainsi que l'analyse XPS (spectre montrant des pics d'oxygène O1S stable de 14% et de carbone C1S qui diminue de 86% à 81% en partant de SWCNT coupés vers les SWCNTs fonctionnalisés avec le PSE) ont bien prouvé la présence de la fonctionnalisation des SWCNTs par le PSE par l'intermédiaire des liaisons π - π stacking. A noter que ces mesures expérimentales ont été suivies à la plateforme ARCEN (Laboratoire interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB)).

A ce niveau et afin de corroborer nos résultats expérimentaux, une optimisation géométrique théorique a été effectuée par la théorie de densité fonctionnelle (DFT) corrigée par des forces de Van der Waals des SWCNTs fonctionnalisés pour bien localiser la géométrie d'adsorption du PSE. La différence d'énergie obtenue entre les nanotubes SWCNTs et les nanotubes SWCNT-PSE, est suffisamment élevée pour conclure sans ambiguïté sur le type d'adsorption par π - π stacking sur les parois latérales des nanotubes de carbone puisque la molécule peut adapter sa structure et sa géométrie pour favoriser le π - π stacking. Egalement, la physico-adsorption du PSE sur la paroi latérale des SWCNTs a été étudiée par le mécanisme de transfert de charge. Les variations de charge électroniques intra- et inter-moléculaires spatiales aboutissent aux dipôles électrostatiques induits par l'interaction π - π . Nous avons montré par évidence que les électrons sont bien positionnés autour de leurs positions atomiques sans un partage covalent entre les deux molécules. Ce qui affirme donc une physico-adsorption entre le PSE et le SWCNT.

La caractérisation prouvant la présence de la protéine TRAIL sur les SWCNTs-PSE a été faite essentiellement par un protocole immuno-histochimique suivi d'une observation microscopique au microscope électronique à transmission (MET) en collaboration avec les centres de microscopie à l'INRA et à la plateforme ARCEN –Université de Bourgogne. Les différentes observations nous ont permis d'avoir un taux de greffage du TRAIL d'environ 80% sur les nanotubes. Ainsi, d'autres types d'observations ont été également effectués, avec une analyse élémentaire à l'échelle atomique des éléments (fer, phosphore, azote, carbone, oxygène et le soufre surtout que c'est un bon indicateur de la présence des ponts disulfures dans les échantillons contenant la protéine TRAIL), présents dans chaque échantillon par microscopie électronique à transmission (STEM) et par une analyse dispersive d'énergie (EDS) à l'institut Jean Lamour-Université de Lorraine. Les résultats obtenus à ce niveau sont

très prometteurs et encourageants surtout que nous avons pu trouver également les traces du TRAIL par ce moyen d'analyse.

Ensuite, et après avoir caractérisé le nanovecteur NPT par les différentes méthodes citées plus-haut, nous avons utilisé le NPT dans nos expériences. *Dans le troisième chapitre* de ce rapport de thèse, l'étude expérimentale porte sur l'immobilisation du récepteur de mort TRAIL-R2 ou DR5 sur une colonne chromatographique par un greffage covalent. La chromatographie liquide à haute performance (CHLP) repose sur la circulation d'une phase mobile formée du solvant, qui doit porter le ligand injecté dans le support chromatographique vers la phase stationnaire contenant le récepteur. Ce dernier doit interagir à son tour avec le ligand retenu par la colonne jusqu'à sa sortie et sa détection en terme d'un signal renseignant sur son temps de rétention. Le but de la CHLP est d'étudier l'affinité et les paramètres thermodynamiques (pH, température...) du ligand TRAIL et du complexe NPT *vis-à-vis* du récepteur DR5. Comme il n'existe pas trop de données en littérature, nos résultats de chromatographie sont considérés comme un point de départ pour les études énergétiques d'interaction TRAIL-DR5 : Le NPT est beaucoup plus retenu (7,82 min) que TRAIL seul (2,48 min) pour la même concentration (15 μ M) et à la même force ionique de la phase mobile (0,05M). Notez que les nanotubes non fonctionnalisés n'ont pas été retenus car ils sont hydrophobes, n'ayant donc aucune affinité avec la colonne et sont sortis donc au même temps mort de la colonne (c'est le temps de la première perturbation à partir de la ligne basale), considéré à 0.13 min. A partir des courbes de Van't Hoff linéaires dans notre cas, nous pouvons dire que le mécanisme d'association entre TRAIL, NPT avec DR5 est indépendant de la température.

Ainsi, les paramètres thermodynamiques enthalpiques ΔH° et entropiques ΔS° ont été calculés et leurs valeurs ont été toujours négatives pour toutes les conditions du pH, ce qui montre que les interactions de type Van der Waals et les liaisons hydrogènes sont majoritaires dans le mécanisme d'association TRAIL/DR5. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment par [Hymowitz *et al.*; 2000].

TRAIL interagit avec son récepteur DR5 par deux voies d'interactions : les interactions à longues et à courtes portées. Les longues portées sont considérées comme des interactions primaires, qui se déroulent essentiellement par des interactions hydrophobes. En revanche, les interactions à courtes portées font partie des interactions secondaires, et

comprennent essentiellement les forces de Van der Waals et les liaisons hydrogène, qui sont prépondérantes dans les mécanismes d'association TRAIL/DR5. Par ailleurs, un changement de mécanisme d'association entre TRAIL, NPT avec DR5, est sous la dépendance du pH. Pour un domaine de pH (6,6-7,8), les valeurs de ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$ ont légèrement diminué. Par contre, ces valeurs ont fortement diminué pour un intervalle de pH compris entre 7,8 et 8,2. La formation des liaisons hydrogène a été confirmée par des valeurs positives de n_{H^+} , ce qui indique que les protons ont été repris lors de la formation des liaisons.

L'interaction entre TRAIL et son récepteur DR5, est dépendante du pH, et due à la modification des valeurs de pKa des acides aminés ionisables. En effet, à une température de 298K, les valeurs n_{H^+} , sont égales à zéro pour un pH supérieur à 6,1 pour le complexe TRAIL/DR5 et 6,8 pour le complexe NPT/DR5. Ce résultat suggère que le noyau imidazole du résidu histidine, ayant une valeur de pKa = 6, pourrait être ionisable. La protonation du résidu *His* se rompt à un pH acide, ce qui valide cette suggestion sont les valeurs négatives des enthalpies ΔH° et entropie $\Delta S^{\circ*}$. Le second point est l'énergie d'ionisation qui est plus élevée dans le cas du complexe NPT/DR5 (14-17 kJ/mol) par rapport au complexe TRAIL/DR5 (5,5-6,75 kJ/mol). D'où, nous pouvons dire que les meilleures conditions pour une interaction TRAIL/DR5 existent vers un pH proche de 8.

Cependant, un autre but existe dans ce chapitre. Il s'agit d'une étude énergétique des interactions TRAIL/DR5 *via* des logiciels de docking. Pourtant, ces logiciels fonctionnent selon le modèle clef-serrure (key-lock) pour un ligand donné (TRAIL) et un récepteur donné (DR5). Par conséquent, une corrélation entre les résultats théoriques obtenus par Docking et expérimentaux obtenus par la CHLP, représente notre objectif principal de ce chapitre. L'interface TRAIL/DR5 a été déjà décrite dans la littérature [Ashkenazi; 2002, Hymowitz *et al.*; 2000, Mongkolsapaya *et al.*; 1999]. Mais, notre étude montre en plus, la forte stabilité du trimère de TRAIL par rapport aux autres oligomères de TRAIL, l'impact d'ions zinc sur la forte stabilité du trimère de TRAIL et sa nécessité pour une meilleure activité biologique. Par ailleurs, plusieurs questions se posent à ce niveau : quels sont les paramètres dynamiques si les autres récepteurs (DR4, DcR1 et DcR2) sont fixés sur la colonne ? Le mécanisme d'interaction serait-il le même ?

Enfin, le *quatrième chapitre* a été dédié pour étudier l'activité biologique proapoptotique du NPT vis-à-vis du TRAIL seul, sur plusieurs modèles des lignées tumorales

sensibles ou pas à TRAIL en collaboration avec l'unité INSERM-866 à l'Université de Bourgogne. Dans ce but, plusieurs démarches expérimentales (test de viabilité cellulaire, marquage cellulaire à l'Annexine V et à l'hoechst) ont été suivies.

Nos résultats obtenus montrent que le taux de greffage de TRAIL sur les SWCNTs, a été suffisant pour augmenter considérablement l'apoptose cellulaire par TRAIL. Cependant, le gain de fonction apoptotique obtenu par le NPT, a été presque 10 fois supérieur à celui de TRAIL seul sur la plupart des lignées testées (lignées tumorales colorectales, pulmonaires..). A noter que le gain de fonction obtenu avec NPT a été de presque 20 fois plus efficace sur les lignées tumorales hépatiques exprimant les récepteurs antagonistes, et le NPT a été capable de surmonter la résistance de ces cellules à TRAIL. L'activation différentielle de la caspase 8 au sein du DISC, pourrait-être un élément explicatif de ce résultat. Ainsi, l'expérience d'immuno-précipitation (pull-down) de la caspase8, a montré une activation plus importante des caspases initiatrices dans le cas de NPT par rapport à TRAIL seul. Par contre, cette expérience n'a pas montré une augmentation de la précipitation des récepteurs dans le cas du NPT. L'importance de ce résultat obtenu vient du fait que la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs, n'affecte pas son affinité pour les récepteurs, et favorise fortement l'agrégation des récepteurs, aboutissant à une meilleure activation des caspases initiatrices. Cependant, ni TRAIL ni NPT, n'ont été capables de déclencher l'apoptose dans les lignées cellulaires générées par la technologie de TALEN et déficientes pour les deux récepteurs agonistes de TRAIL (DKO). Ainsi, les nanoparticules seules, c'est-à-dire les nanotubes de carbone n'ont pas montré aucun effet toxique dans n'importe quel modèle cellulaire étudié.

Ensuite, plusieurs questions ont été posées : quels sont les mécanismes de régulation de l'induction apoptotique du TRAIL ? Et à quels niveaux agissent-ils? Les travaux qui focalisent sur ces points sont nombreux actuellement. La régulation de la signalisation apoptotique du TRAIL, pourrait avoir lieu au niveau des récepteurs, au sein des protéines formant le complexe d'initiation d'apoptose DISC et au niveau mitochondrial. Par ailleurs, il existe des modifications post-traductionnelles par O-glycosylation du TRAIL-R2 [**Wagner *et al.*; 2007**] pour un meilleur déclenchement d'apoptose, et reste cependant difficile de savoir si cette modification régule aussi l'apoptose déclenchée par TRAIL-R1. En revanche, il a été démontré que le récepteur TRAIL-R1 est N-glycosylé [**Yoshida *et al.*; 2007**], et il existe un seul site de cette modification par N-glycosylation pour le récepteur humain (N156) et

plusieurs sites putatifs (N99, 122, 150 et 156) dans le récepteur murin m-TRAIL R1. Alors la question qui se pose : quel est l'effet de la N-glycosylation des récepteurs sur l'induction d'apoptose ? et la mutation des sites de N-glycosylation du récepteur ?

Nous avons montré davantage dans un modèle d'ostéosarcome humain que le NPT augmente fortement l'activité apoptotique du TRAIL, qui sera considérablement allégée lors d'une mutation du site de N-glycosylation des récepteurs. Ainsi, une restauration de la sensibilité cellulaire à l'induction apoptotique a été obtenue dans un modèle de mélanome murin quand les cellules expriment le récepteur sauvage m-TRAIL R1. Le gain de fonction apoptotique obtenu avec le NPT, a été supprimé avec une seule mutation du récepteur (N156). Une résistance à la stimulation apoptotique pour à la fois TRAIL et NPT, a été obtenue par la mutation de deux ou trois sites de N-glycosylation. Ce qui montre nettement l'implication de cette modification post-traductionnelle du TRAIL-R1 dans le déclenchement d'apoptose, et selon des résultats précédents obtenus à l'unité INSERM, TRAIL-R1 s'intervient avant le récepteur TRAIL dans le processus apoptotique induit par TRAIL.

Pour conclure, la possibilité d'utiliser un type de nanovecteur biocompatible (SWCNTs), qui pourrait délivrer et changer les caractéristiques modestes en monothérapie du TRAIL, a abouti à des résultats très prometteurs. Par cette stratégie nous avons réussi à augmenter la biodisponibilité du TRAIL au site d'action en permettant l'amélioration d'efficacité destructrice des cellules tumorales.

Dans ce contexte, et compte tenu des larges propriétés des nanotubes de carbone (délivrer des médicaments, absorber des ondes magnétiques), la fonctionnalisation du TRAIL sur les SWCNTs dans ce travail de thèse, pourrait-être une preuve de concept pour des travaux ultérieurs, et des nouvelles approches thérapeutiques basées sur le nanovecteur NPT, telles que les thérapies photodynamiques par exemple.

Pour la suite de ce projet, et vu le rendement important d'apoptose obtenu *in vitro* sur les lignées tumorales testées, nous proposons de passer à la stratégie des expériences basées sur des modèles murins transgéniques. Cela consiste à injecter les lignées tumorales humaines *in vivo*, suivre la prolifération tumorale, tester directement les effets thérapeutiques du nanovecteur NPT par rapport à TRAIL seul et de faire une corrélation avec les résultats obtenus *in vitro* afin de comprendre le comportement de ces nanoparticules chargées du

TRAIL dans les organismes vivants, leur bio-distribution et surtout leur toxicité. Tous ces paramètres nécessitent d'être beaucoup mieux investigués à l'avenir.

Références bibliographiques

- [Ashkenazi; 2002] Ashkenazi, A., Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2, 420-430.
- [Bae *et al.*; 2008] Bae, S. I.; Cheriya, V.; Jacobs, B. S.; Reu, F. J.; Borden, E. C., Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **2008**, 27 (4), 490-498.
- [Ehrlich *et al.*; 2003] Ehrlich, S.; Infante-Duarte, C.; Seeger, B.; Zipp, F., Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* **2003**, 24 (6), 244-253.
- [Falschlehner *et al.*; 2009] Falschlehner, C.; Schaefer, U.; Walczak, H., Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* **2009**, 127 (2), 145-154.
- [Fanger *et al.*; 1999] Fanger, N. A.; Maliszewski, C. R.; Schooley, K.; Griffiths, T. S., Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine* **1999**, 190 (8), 1155-1164.
- [Fisher *et al.*; 2001] Fisher, M. J.; Virmani, A. K.; Wu, L.; Aplenc, R.; Harper, J. C.; Powell, S. M.; Rebbeck, T. R.; Sidransky, D.; Gazdar, A. F.; El-Deiry, W. S., Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clinical Cancer Research* **2001**, 7 (6), 1688-1697.
- [Galbán and Duckett; 2010] Galbán, S.; Duckett, C. S., XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death & Differentiation* **2010**, 17 (1), 54-60.
- [Halaas *et al.*; 2000] Halaas, O.; Vik, R.; Ashkenazi, A.; Espevik, T., Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *The Scandinavian Journal of Immunology* **2000**, 51 (3), 244-250.
- [Herbst *et al.*; 2010] Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P. J.; Gordon, M. S.; Novotny, W.; Goldwasser, M. A.; Tohnya, T. M.; Lum, B. L.; Ashkenazi, A.; Jubb, A. M.; Mendelson, D. S., Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *The Journal of clinical Oncology* **2010**, 28 (17), 2839-2846.
- [Horak *et al.*; 2005] Horak, P.; Pils, D.; Haller, G.; Pribill, I.; Roessler, M.; Tomek, S.; Horvat, R.; Zeillinger, R.; Zielinski, C.; Krainer, M., Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Molecular Cancer Research* **2005**, 3 (6), 335-343.
- [Huet *et al.*; 2014] Huet, H.; Gowney, J.; Johnson, J. A.; Li, J. B., S.; Ostrom, L.; Zafari, M.; Kowal, C.; Yang, G.; Royo, A.; Jensen, M.; Dombrecht, B.; Meerschaert, K. R. A.; Kolkman, J. A.; Cromie, K. D.; Mosher, R.; Gao, H.; Schuller, A.; Isaacs, R.; Sellers, W. R.; Ettenberg, S. A., Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction. *mAbs* **2014**, 6 (6), 1560-1570.
- [Hymowitz *et al.*; 2000] Hymowitz, S. G.; O'Connell, M. P.; Ultsch, M. H.; Hurst, A.; Totpal, K.; Ashkenazi, A.; de Vos, A. M.; Kelley, R. F., A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **2000**, 39, 633-650.

- [Jacquemin *et al.*; 2012]** Jacquemin, G.; Granci, V.; Gallouet, A. S.; Lalaoui, N.; Morlé, A.; Iessi, E.; Morizot, A.; Garrido, C.; Guillaudeux, T.; Micheau, O., Quercetin-mediated Mcl-1 and survivin downregulation restores TRAIL-induced apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma B cells. *Haematologica* **2012**, *97*, 38-46.
- [Kelley *et al.*; 2001]** Kelley, S. K.; Harris, L. A.; Xie, D.; Deforge, L.; Totpal, K.; Bussiere, J.; Fox, J. A., Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *299* (1), 31-38.
- [Lawrence *et al.*; 2001]** Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; Hooley, J.; Sherwood, S.; Pai, R.; Leung, S.; Khan, L.; Gliniak, B.; Bussiere, J.; Smith, C. A.; Strom, S. S.; Kelley, S.; Fox, J. A.; Thomas, D.; Ashkenazi, A., Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature Medicine* **2001**, *7* (4), 383-385.
- [McDonald *et al.*; 2001]** McDonald, E. R. r.; Chui, P. C.; Martelli, P. F.; Dicker, D. T.; El-Deiry, W. S., Death domain mutagenesis of KILLER/DR5 reveals residues critical for apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(18): (18), 14939-14945.
- [Merino *et al.*; 2006]** Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O., Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular & Cellular Biology* **2006**, *26*, 7046-7055.
- [Micheau *et al.*; 2013]** Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F., Death receptors as targets in cancer. *The British Journal of Pharmacology* **2013**, *169* (8), 1723-1744.
- [Mongkolsapaya *et al.*; 1999]** Mongkolsapaya, J.; Grimes, J. M.; Chen, N.; Xu, X. N.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y.; Screaton, G. R., Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nature Structural & Molecular Biology* **1999**, *6*, 1048-1053.
- [Morizot *et al.*; 2011]** Morizot, A.; Merino, D.; Lalaoui, N.; Jacquemin, G.; Granci, V.; Iessi, E.; Lanneau, D.; Bouyer, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; Saas, P.; Garrido, C.; Micheau, O., Chemotherapy overcomes TRAIL-R4-mediated TRAIL resistance at the DISC level. *Cell Death & Differentiation* **2011**, *18* (4), 700-711.
- [Morlé *et al.*; 2015]** Morlé, A.; Garrido, C.; Micheau, O., Hyperthermia restores apoptosis induced by death receptors through aggregation-induced c-FLIP cytosolic depletion. *Cell Death and Disease* **2015**, *6*, e1633.
- [Pavet *et al.*; 2010]** Pavet, V.; Beyrath, J.; Pardin, C.; Morizot, A.; Lechner, M. C.; Briand, J. P.; Wendland, M.; Maison, W.; Fournel, S.; Micheau, O.; Guichard, G.; Gronemeyer, H., Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Research* **2010**, *70*, 1101-1110.
- [Shirley *et al.*; 2011]** Shirley, S.; Morizot, A.; Micheau, O., Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **2011**, *6* (3), 311-323.
- [Travert *et al.*; 2008]** Travert, M.; Ame-Thomas, P.; Pangault, C.; Morizot, A.; Micheau, O.; Semana, G.; Lamy, T.; Fest, T.; Tarte, K.; Guillaudeux, T., CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *The Journal of Immunology* **2008**, *181* (2), 1001-1011.
- [Wagner *et al.*; 2007]** Wagner, K. W.; Punnoose, E. A.; Januario, T.; Lawrence, D. A.; Pitti, R. M.; Lancaster, K.; Lee, D.; Von Goetz, M.; Yee, S. F.; Totpal, K.; Huw, L.; Katta, V.; Cavet, G.;

Hymowitz, S. G.; Amler, L.; Ashkenazi, A., Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine* **2007**, *13* (9), 1070-1077.

[Yoshida *et al.*; 2007] Yoshida, T.; Shiraishi, T.; Horinaka, M.; Wakada, M.; Sakai, T., Glycosylation modulates TRAIL-R1/death receptor 4 protein: different regulations of two proapoptotic receptors for TRAIL by tunicamycin. *Oncology Reports* **2007**, *18* (5), 1239-1242.

A1 Protocoles expérimentaux et théoriques du chapitre II

Abréviations

Fe	Fer
Hz	Heurtz
Pa	unité pascalle
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
TEM	Transmission electron microscopy
W	Watt

A1.1 Produits chimiques et matériaux

Les SWCNTs ont été produits par la catalyse en phase gazeuse (procédé HiPco) avec un diamètre individuel égal à $(1 \pm 0,2 \text{ nm})$ et une longueur individuelle qui varie entre 100 nm et 1000 nm (la longueur SWCNTS médiane était d'environ 600 nm) donnés par Unidym. Selon le fournisseur, le contenu de Fe élémentaire étaient d'environ 5 à 15% en poids. Tous les réactifs chimiques étaient calibrés analytiquement et ont été utilisés tels que reçus de Sigma Aldrich. L'eau distillée a été utilisée dans toutes les expériences.

A1.2 Procédures expérimentales

A1.2.1 Processus de coupure des SWCNTs

10 mg de SWCNTS purifié ont été mis en suspension dans un mélange de 80 ml à 3: 1 d'un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide nitrique (96% et 69% respectivement). La suspension a été soniquée dans un bain d'eau (modèle Elmasonic S30H, 50-60 Hz, 280W) pendant 4 h, puis agité vigoureusement pendant 12 h. Ces deux étapes ont été répétées une fois. La température a été maintenue inférieure à 35 ° C. La suspension résultante a ensuite été diluée avec 300 mL d'eau. Les nanotubes SWCNT-COOH ont été recueillis à travers une membrane PTFE avec 0,2 μm de diamètre. Les SWCNTs ont ensuite été lavées à l'eau jusqu'à obtenir un pH neutre et séchés sous vide pendant 2 h [Liu *et al.*; 1998, Shuba *et al.*; 2012]. L'efficacité de la procédure de coupe a été vérifiée à l'aide des images de TEM. L'efficacité de la procédure de coupe des nanotubes a été contrôlée par la microscopie électronique à transmission (TEM) conduisant à une médiane de SWCNTS égale à 400 nm.

A1.2.2 Préparation du PSE-SWCNT

5 mg de SWCNTS ont été mélangés avec 15 mg de PSE dans le DMF (7 ml). Les mélanges ont été soniqués dans un bain d'eau (modèle Elmasonic S30H, 50-60 Hz, 280W) pendant 20 min et agités vigoureusement pendant 1 h (Figure A1-1). Les SWCNTs ont été

recueillis à travers une membrane PTFE avec 0,2 μm de diamètre, puis rincés soigneusement trois fois avec du DMF et séchés sous vide pendant 2 h [Chen *et al.*; 2001].

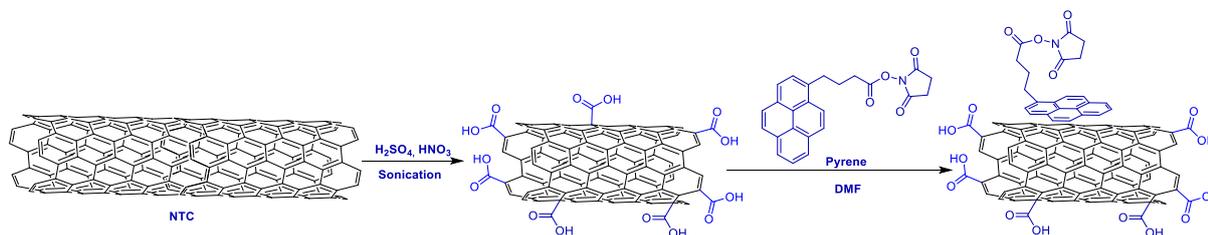


Figure A 1—1 Schéma du processus pour obtenir les SWCNTS-PSE nanotubes. (d'après [Chen *et al.*; 2001]).

A1.2.3 Préparation du nanovecteur Pegylé aboutissant à NPT

La préparation de SWCNT-PSE PEGylé et sa fonctionnalisation avec TRAIL ont été effectuées comme suit. 1 mg de SWCNTS-COOH a été mélangé avec 3 mg de pyrène acide butyrique N-hydroxysuccinimide ester (PSE) dans du DMF (3 ml). Cette solution a été soniquée dans un bain d'eau comme ci-dessus pendant 20 minutes, sous une agitation vigoureuse pendant 1 h. Les nanotubes SWCNTS-PSE résultants ont été recueillis à travers une membrane de 0,2 μm de PTFE, puis rincés soigneusement trois fois avec du tampon phosphate de sodium PBS (0,01 M; pH 8) et séchés. Ensuite, les SWCNTs-PSE ont été mélangés avec un tampon de phosphate de sodium PBS (0,01 M; pH 8), plus 20 mM de EDC et 50 mM de sulfo-NHS, et incubés pendant 1 h à la température ambiante tout en agitant. Ensuite, 1 mM de préparation de PEG ramifié 2500-NH₂ a été ajoutée afin de permettre la dispersion des SWCNTs en solution aqueuse, et la solution a été incubée pendant une nuit à la température ambiante tout en agitant. Enfin, le PEG non lié a été éliminé par filtration à travers une membrane de 0,2 μm de PTFE, et les nanotubes PEGylés SWCNT-PSE-PEG- ont été dispersés à nouveau dans l'eau [Heister *et al.*; 2012]. Ensuite, 20 mM d'EDC et 50 mM de sulfo-NHS ont été ajoutés à la solution contenant l'EP-SWCNTS PEG et le mélange a été agité pendant 1 h. Après cela, la protéine His-TRAIL (2 mg / mL) a été ajoutée et l'échantillon a été incubé pendant une nuit à la température ambiante tout en agitant. Le lendemain, TRAIL non lié a été éliminé par filtration à travers une membrane de 0,2 μm de PTFE et la résultante

SWCNTS-PSE-PEG-TRAIL a été lavée deux fois à l'eau, puis dispersée dans du solvant tampon phosphate de sodium PBS (0,01 M; pH 8). Notez que tous les échantillons SWCNTS-PSE-PEG-TRAIL synthétisés (NPT) ont été analysés par microscopie TEM.

A1.2.4 Estimation du taux de TRAIL sur NPT

L'estimation de la concentration moyenne de TRAIL greffé sur des nanotubes a été déduite de la quantité libre restante et récupérée après la fonctionnalisation, contenue dans les trois solutions de lavage, après la mesure de la teneur en protéines par un test de dosage protéique (test DC-assay) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), un dosage de Lowry modifié, selon les instructions du fabricant. Le degré de fonctionnalisation de SWCNTS-PSE avec TRAIL a atteint 78% avec une concentration estimée de 800 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Cette concentration a également été estimée par une analyse statistique basée sur le traitement des images obtenues par TEM de SWCNTS fonctionnalisés avec TRAIL. La surface couverte de TRAIL par rapport à l'ensemble de la surface de nanotubes accessibles, a été calculée en supposant une forme cylindrique parfaite pour le SWCNTS (environ 125 600 Å^2). Ensuite, nous rapprochons la surface occupée par la molécule TRAIL comme une sphère de rayon $R = 35 \text{ \AA}$ (3850 Å^2). Le rapport des deux surfaces TRAIL sur (SWCNTS), était à peu près égal à 33, et représente le nombre maximum de TRAIL pour obtenir une couverture complète (100%). L'analyse statistique des images de TEM a conduit à une moyenne de 26 molécules de TRAIL par SWCNTS (± 2). Ainsi, nous pouvons déduire de cette analyse statistique, que la couverture de TRAIL sur SWCNTS correspondait à 80% de la quantité initiale du TRAIL ajoutée au mélange réactionnel au début de la fonctionnalisation, une valeur correspondant au dosage protéique de Lowry décrit ci-dessus. Ces deux méthodes sont donc en plein accord.

A1.3 Structures et caractérisations

A1.3.1 Microscopie électronique

A1.3.1.1 Microscopie électronique (STEM)

La structure du SWCNTS-PSE a été observée à la température ambiante par microscopie électronique à transmission (STEM) à l'université de Lorraine, en utilisant un microscope JEOL ARM200F équipé d'un correcteur CS-sonde. Afin de réduire les dommages d'irradiation, le microscope a été exploité à 80 kV. Les images prises avec un champ clair ou Bright-field (BF) ont été enregistrées simultanément avec un temps de pixelisation de 64 μ s pour 1024x1024 pixels. Le demi-angle convergent de la sonde était de 25 mrad et les collections des semi-angles du détecteur de BF étaient de 11 mrad. La dispersion fonctionnalisée des SWCNTs ont été placés goutte à goutte sur des grilles de carbone troués. Puis, l'échantillon a été regardé sous vide à 37 °C (5.10^7 Pa) pendant 24 heures afin d'éliminer les composés organiques volatils adsorbés, qui peuvent être décomposés par le faisceau d'électrons et donc contaminés l'échantillon avec du carbone amorphe au cours de l'observation.

A1.3.1.2 Microscopie électronique (TEM)

Un autre type de microscopie a été utilisé à l'université de Bourgogne. Un protocole d'immuno-histochimie bien spécifique, permettant l'observation du TRAIL sur les nanotubes, a été mis en place. Ce protocole nécessite l'utilisation des anticorps dirigés contre TRAIL et une amplification du signal avec l'argent.

Dans ce but, les différents échantillons (nanotubes de carbone contrôles, nanotubes de carbone fonctionnalisés avec ou sans TRAIL greffé) ont été déposés sur des grilles de carbone revêtues d'un film de collodion. Les grilles ont été fraîchement préparées sur place avant l'observation au microscope, et ont un diamètre de 3,05 mm, et un volume d'échantillon de 10 μ L / grille a été déposé. Une solution de blocage (TBS 10 mM, BSA acétylée (BSA-c) 0,5% de AURION, la glycine à 0,1%, sérum normal de chèvre (NGS) à partir AURION 10%) a été

ajoutée sur chaque grille pendant 30 minutes, suivie de cinq lavages avec de la solution de rinçage TBS / BG (TBS 10 mM, BSA 0,5-c%, glycine 0,1%). Ensuite, un anticorps polyclonal anti-lapin dirigé contre la queue poly-histidine du TRAIL (anti-histidine) (1/100) (His-sonde H-15, Santa Cruz Biotechnology) dilué dans du TBS a été déposé pendant 1 h. Les grilles ont été rincées cinq fois avec du TBS / BG et incubées avec l'anticorps secondaire GAR (un anti-anticorps de lapin IgG de chèvre conjuguée à des particules d'or d'un diamètre de 1 nm pour la microscopie électronique, à partir de AURION (Wageningen, Pays-Bas), (1/100) était déposé pendant 1 heure suivi par 5 lavages avec du TBS / BG. Ensuite, une étape de fixation avec une solution de glutaraldéhyde à 2% pendant 7,5 min a été effectuée et suivie d'un rinçage cinq fois à l'eau distillée. Enfin, le signal a été amplifié avec de l'argent (AURION R-GENT SE, microscopie électronique) pendant 21 min à l'obscurité. Les grilles ont ensuite été rincées 5 fois à l'eau distillée et séchées pendant 1 h avant l'analyse au microscope (JEOL JEM-2100F microscope fonctionnant à 200 kV et équipé d'une ultra-haute résolution avec une pièce polaire qui pourrait atteindre une résolution de point à point de 0,19 nm) fonctionnant à 80 kV.

A1.3.2 Caractérisations spectroscopiques

Les spectres Raman de SWCNTS, SWCNTS-COOH et SWCNTS-PSE ont été mesurées en utilisant un spectromètre Renishaw inVia micro-Raman. L'excitation de laser a été fournie par la ligne 633 nm 20 mW d'un laser hélium-néon. Une puissance de laser réduite (0,125 mW sur l'échantillon) a été nécessaire pour éviter un échauffement ou de brûlure des nanotubes. Un objectif de microscope (x50) a été utilisé et le temps d'acquisition était de 10 s. L'intensité de tous les spectres de Raman a été étalonnée par rapport à l'intensité de la bande de graphite (G-bande) situé à $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$.

Les spectres ATR-IR ont été effectués sur Spectrum65 PerkinElmer équipé avec le module ATR en utilisant un cristal de Ge.

La spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS) des expériences a été réalisée en utilisant un spectromètre VG Escalab220i XL rotatif comprenant une source de rayons X à l'anode (Al K α), un monochromateur avec cristal de quartz, un analyseur hémisphérique et un

détecteur multi-canal. Le vide dans la chambre d'analyse a été d'environ 10 à 10 mbar. La largeur de la fente a été de 0,8 mm et l'angle de décollage a été de 90 °.

A1.4 Simulation moléculaire

A1.4.1 Relaxation de la géométrie

Le SWCNTS zigzag modélisé a été construit selon un réseau de graphène (l'indice du pliage de vecteur $n = 17$, $m = 0$), enroulé en un cylindre sans soudure moléculaire [Johnson; 2009] avec une longueur de période de 29,85 Å le long de son axe longitudinal. L'influence de la fonctionnalisation carboxylique finale du SWCNTS expérimental était supposée être négligeable dans cette partie théorique [Kraszewski *et al.*; 2013]. Pour tenir compte de l'agrégation possible entre les nanotubes, les calculs sur un système composé de deux nanotubes adjacents ont également été réalisés. La distance entre ces deux tubes a été optimisée en premier, avant l'adsorption des espèces moléculaires.

Les simulations des matériaux à l'échelle nanométrique (PSE, SWCNTS et SWCNTS-PSE) sont basées sur la théorie fonctionnelle de la densité (DFT) [Hohenberg and Kohn; 1964, Kohn and Sham; 1965], de normes de conservation pseudo-potentielles d'établissement [Morrison *et al.*; 1993], grâce à l'emballage Quantum Espresso [Giannozzi *et al.*; 2009]. Tous les calculs concernant l'optimisation de la géométrie, ont été effectués en utilisant des pseudo-potentiels BLYP et des corrections Van der Waals (grimme-d2) avec un niveau de la théorie d'échange-corrélation du potentiel [Grimme; 2006]. Notez que LDA est connu pour fournir des erreurs sur l'énergie de liaison par autant que 20 à 30% [Jones and Gunnarsson; 1989], ainsi que son échec de ne pas à reproduire les états électroniques de matériaux fortement corrélés.

Pour cette raison, nous avons optimisé le système avec l'hybride fonctionnelle B3LYP (utilisée pour calculer les spectres), combinée à des corrections de dispersion, et comme celle proposée par Grimme. Pendant les calculs périodiques, les itérations du champ auto-cohérent (SCF) ont convergé lorsque l'écart absolu entre l'énergie des valeurs propres à l'étape d'EFC actuelle et précédente était inférieur à 10^{-6} Ry. La valeur de 16 Ry a été prise pour le critère de coupure d'énergie cinétique. La première zone de Brillouin dans l'espace k est discrétisée avec

des grilles sélectionnées comme (2, 2, 1). Pour comparer les uns des autres et d'éviter les effets de taille, les trois systèmes moléculaires (PSE, SWCNTS et SWCNTS-PSE) ont utilisé la même cellule orthogonale de l'unité ($a = 30,00 \text{ \AA}$, $b = 30,00 \text{ \AA}$, $c = 29,85 \text{ \AA}$). L'optimisation de la géométrie à une température électronique de 298,15 K avait un critère de convergence de $5 \cdot 10^{-3}$ Hartree/Bohr. Une fois optimisés, les spectres Raman et infrarouge du PSE ont été calculés en utilisant le paquet gaussien 09 [Frish and al.; 2009] au niveau B3LYP/6-311 ++ G * niveau de la théorie.

Afin de souligner l'interaction entre la molécule PSE et la paroi de SWCNTS, la fonction de localisation électronique (ou ELF) la représentation a été utilisé. L'ELF est basé sur la paire probabilité Hartree-Fock d'électrons à spin parallèles et peut être calculé en théorie fonctionnelle d'excès de la densité d'énergie cinétique due à la répulsion de type Pauli [Kohout *et al.*; 2008, Savin *et al.*; 1992]. Cette fonction produit facilement des motifs compréhensibles, imagée d'information de liaison chimique et est largement utilisé pour décrire et visualiser la liaison chimique dans les molécules et les solides [Fuentelba *et al.*; 2007]. L'ELF est une mesure de la probabilité de trouver un électron proche d'un autre électron avec la même rotation en rapport avec le principe d'exclusion de Pauli [Becke and Edgecombe; 1990, Ooi *et al.*; 2006, Savin and Silvi; 1994].

L'ELF est représenté comme un tracé de contour dans l'espace réel, où les différents contours correspondent à des valeurs numériques allant de 0,0 à 1,0. La limite supérieure correspond à la localisation parfaite (c'est à dire de la liaison chimique) et la valeur 0,5 correspond à électrons comme une probabilité d'une paire de gaz (idem pas de liaison chimique).

A1.4.2 Calcul PDOS du SWCNT-PSE

La densité projetée d'états (PDOS) sur les atomes C, et sur ceux d'O ont été calculés sur un système détendu après une itération de l'EFC, en tenant compte des ensembles de base atomiques et en activant à la fois, les calculs de la bande et du DOS avec la même k-espace utilisée dans l'étape d'optimisation de la géométrie .

A1.5 Références Bibliographiques

- [Becke and Edgecombe; 1990] Becke, A. D.; Edgecombe, K. E., A simple measure of electron localization in atomic and molecular systems *The Journal of Chemical Physics* **1990**, *92*, 5397-5403.
- [Chen *et al.*; 2001] Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D.; Dai, H. J., Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *The Journal of American Chemical Society* **2001**, *123*, 3838-3839.
- [Frisch and al.; 2009] Frisch, M. J.; al., e., Gaussian 09 Revision D.1, Gaussian Inc. wallingford, CT **2009**.
- [Fentealba *et al.*; 2007] Fentealba, P.; Chamorro, E.; Santos, J. C., Theoretical aspects of chemical reactivity. Elsevier, Ed. 2007.
- [Giannozzi *et al.*; 2009] Giannozzi, P.; Baroni, S.; Bonini, N.; Calandra, M.; Car, R.; Cavazzoni, C.; Ceresoli, D.; Chiarotti, G. L.; Cococcioni, M.; Dabo, I.; Dal Corso, A.; De Gironcoli, S.; Fabris, S.; Fratesi, G.; Gebauer, R.; Gerstmann, U.; Gougoussis, C.; Kokalj, A.; Lazzeri, M.; Martin-Samos, L.; Marzari, N.; Mauri, F.; Mazzarello, R.; Paolini, S.; Pasquarello, A.; Paulatto, L.; Sbraccia, C.; Scandolo, S.; Sclauzero, G.; Seitsonen, A. P.; Smogunov, A.; Umari, P.; Wentzcovitch, R., QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *The Journal of physics : Condensed Materials* **2009**, *21*, 395502-395521.
- [Grimme; 2006] Grimme, S., Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *The Journal of Computational Chemistry* **2006**, *27* (15), 1787-1799.
- [Heister *et al.*; 2012] Heister, E.; Neves, V.; Lamprecht, C.; Silva, S. R. P.; Coley, H. M.; McFadden, J., Drug loading, dispersion stability, and therapeutic efficacy in targeted drug delivery with carbon nanotubes *Carbon* **2012**, *50* (2), 622-632.
- [Hohenberg and Kohn; 1964] Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Reviews B* **1964**, *136*, 864-871.
- [Johnson; 2009] Johnson, R. R. Nanotube Builder 1.0: A plug-in to generate carbon nanotubes within Visual Molecular Dynamics.
- [Jones and Gunnarsson; 1989] Jones, R. O.; Gunnarsson, O., The density functional formalism, its applications and prospects. *Reviews of Modern Physics* **1989**, *61*, 689-746.
- [Kohn and Sham; 1965] Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Reviews A* **1965**, *140*, 1133-1138.
- [Kohout *et al.*; 2008] Kohout, M.; Pernal, K.; Wagner, F. R.; Grin, Y., Electron localizability indicator for correlated wavefunctions. III: singlet and triplet pairs. *Theoretical Chemistry Accounts* **2008**, *119* (5-6), 413-420.
- [Kraszewski *et al.*; 2013] Kraszewski, S.; Duverger, E.; Ramseyer, C.; Picaud, F., Theoretical study of amino derivatives and anticancer platinum drug grafted on various carbon nanostructures. *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *139* (17), 174704.
- [Liu *et al.*; 1998] Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E., Fullerene pipes *Science* **1998**, *280* (5367), 1253-1256.

- [Morrison *et al.*; 1993]** Morrison, I.; Bylander, D. M.; Kleinman, L., Nonlocal Hermitian norm-conserving Vanderbilt pseudopotential. *Physical Reviews B* **1993**, *47*, 6728-6731.
- [Ooi *et al.*; 2006]** Ooi, A.; Rairkar, L.; Lindsley, J.; Adams, B., Electronic structure and bonding in hexagonal boron nitride *The Journal of physics : Condensed Materials* **2006**, *18* (1), 97-115.
- [Savin *et al.*; 1992]** Savin, A.; Flad, H. J.; Flad, J.; Preuss, H.; Von Schnering, H. G., On the Bonding in Carbosilanes. *angewandte Chemie international Edition* **1992**, *31*, 185-187.
- [Savin and Silvi; 1994]** Savin, A.; Silvi, B., Classification of chemical bonds based on topological analysis of electron localization functions. *Nature* **1994**, *371*, 683 - 686.
- [Shuba *et al.*; 2012]** Shuba, M. V.; Paddubskaya, A. G.; Kuzhir, P. P.; Maksimenko, S. A.; Ksenevich, V. K.; Niaura, G.; Seliuta, D.; Kasalynas, I.; Valusis, G., Soft cutting of single-wall carbon nanotubes by low temperature ultrasonication in a mixture of sulfuric and nitric acids. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 495714-495723.

A2 Protocoles expérimentaux du chapitre III

Abréviations

BSA	Bovin Serum albumin
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
DSC	N,N'-Disuccinimidyl carbonate
FFT	transformation de Fourier rapide ou « <i>Fast Fourier Transform</i> » est un algorithme de calcul
PBS	Phosphate buffered saline
TIP3P	un modèle d'eau ou un modèle de solvation avec trois sites d'interactions, correspondant aux trois atomes de la molécule d'eau (H ₂ O : 1 atome d'oxygène chargé négativement relié à 2 atomes d'hydrogène chargés positivement)

A2.1 Produits chimiques et matériels

Le produit principal réactif de la colonne chromatographique, c'est-à-dire le récepteur soluble DR5 humain « sTRAIL Receptor-2 » (fragment extracellulaire uniquement), et le sodium azide ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le ligand ou la protéine recombinante His-TRAIL, a été produit dans l'équipe OM-INSERM 866 à l'Université de Bourgogne (voir l'annexe3-partie A3.1 pour le protocole détaillé de la production du TRAIL).

L'eau CLHP utilisée dans nos expériences est obtenue à partir d'un système de purification d'eau Elgastat (Odil, Talant, France) équipé d'une cartouche à osmose inverse, puis dégazée par sonification. La dihydrogéo-phosphate de sodium (NaH_2PO_4) et le phosphate disodique d'hydrogène (Na_2HPO_4) utilisés pour la préparation des phases mobiles, ont été obtenus de Merck-Prolabo (Paris, France). Les phases mobiles constituées du tampon PBS sont identiques pour toutes les expériences réalisées, et formées d'un mélange $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ à 0.05M et d'eau CHLP.

A2.2 Equipements

Les expériences chromatographiques ont été réalisées avec le système CLHP, qui comprend une pompe LC-10ATvp de chez Shimadzu (Champs-sur-Marne, France), une valve d'injection Rheodyne 7725 (Cotati, CA, USA) équipée d'une vanne d'éjection d'échantillon de 20 μl , et d'un détecteur Shimadzu SPD-10A UV-vis (Noisiel, France).

Les données de rétention du TRAIL et du NPT sont obtenues grâce à une colonne « silice Uptisphere[®] 120 Å 3 μm NH₂ column », qui a été fournie par Interchim (Montluçon, France). La colonne chromatographique utilisée possède les dimensions suivantes : une longueur de 25 mm et de diamètre interne de 4,6 mm (L: 25 mm, ID: 4,6 mm), et constituée de particules de silice avec une taille de 120 Å et de pores de 3 μm de diamètre. La préparation de la colonne DR5 par la technique *in situ* est décrite dans le paragraphe suivant A2.3.

A2.3 Fixation du récepteur DR5 sur la colonne chromatographique

Comme il n'existe pas de colonne commerciale, ceci nous a conduits à mettre au point une nouvelle colonne chromatographique constituée de particules de silice sur lesquelles est greffé le récepteur DR5. La technique d'immobilisation « *in-situ* » consiste à utiliser directement une colonne contenant déjà le support chromatographique constitué de particules de silice propylamine, puis ensuite de faire circuler la protéine d'intérêt [Girelli and Mattei; 2005].

L'immobilisation « *in-situ* » du récepteur DR5 a été effectuée sur des particules de support constituées de silice propylamine (particules de silice greffées avec des groupements NH₂). Le récepteur DR5 a été immobilisé à partir de son groupement amine présent sur la partie protéique sur des particules de silice de propylamine. L'immobilisation covalente du DR5 a été réalisée tel le protocole suivant. Tout d'abord, cette immobilisation covalente des groupements amine nécessite l'activation des particules de silice propylamine en présence de DSC (utilisé pour enlever les autres groupements imine résiduels). Dans un premier temps, la colonne NH₂ a été lavée avec de l'acétonitrile au débit de 0,5 mL/min. Ensuite, la phase stationnaire a été activée en continu avec une solution de 1.125g de DSC dans 50 mL d'acétonitrile pendant 20 h dans un circuit fermé à la même vitesse d'écoulement suivi d'un lavage d'abord avec 60 mL d'acétonitrile, puis avec 60 mL du tampon phosphate (PBS) (1 mM, pH = 7,240). Une solution de 100 µg ou 0,1 mg de la protéine DR5 a été dissoute dans 10 mL d'un tampon phosphate (1 mM, pH = 7,4) et la solution résultante a été mise en circulation à travers la colonne en continu à faible débit (0,3 mL/min) dans un circuit fermé sous une pression de 11bar. Après 48 heures d'immobilisation, la colonne a été lavée avec 100 mL du tampon phosphate (20 mM, pH = 7,4) pendant 2 heures sous une pression de 17 bar, 100 mL d'une solution de NaCl (0,5 M) et enfin avec 100 mL de glycine (0,2 M) sous une pression de 21bar pendant 2 heures pour bloquer les groupes actifs restants. Enfin, la colonne a été rincée et ensuite stabilisée avec du tampon phosphate (50 mM, pH = 7,4). La masse totale de DR5 immobilisée (78,52 µg) dans la colonne NH₂, a été déterminée par un dosage protéique classique de type DC-assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette) par rapport à une gamme d'étalonnage avec la protéine BSA, de la solution du DR5 restante après l'arrêt de la

réaction [Sarr *et al.*; 2010]. Les principales réactions chimiques qui se produisent tout au long du greffage du DR5 sur les particules de silice propylamine sont détaillées dans le **Schéma A2-1** ci-dessous.

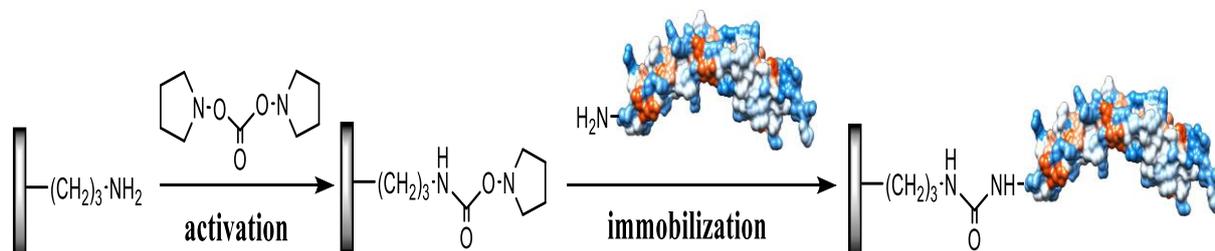


Schéma A2-1: Procédure de fixation du récepteur DR5 sur les particules de silice activées par des groupements aminopropyle suivant notre technique d'immobilisation *in situ*.

A2.4 Conditions expérimentales

Le milieu d'étude (phase mobile) utilisée pour la colonne DR5 a été créé avec une force ionique de 50 mM dans un tampon phosphate (PBS). Afin d'étudier l'effet du pH sur la rétention du TRAIL et NPT, nous avons changé ce paramètre thermodynamique successivement : le pH de la phase mobile a été modifié dans une gamme des conditions expérimentales de (6,6; 7; 7,4; 7,8; 8,2 et 9). En outre, les expériences ont été effectuées sur un intervalle de température 10-40 °C, c'est-à-dire allant de 283 à 313 K (283, 293, 298, 303, 308, 313 K) pour chaque condition du pH. Le débit de la colonne, sauf indication contraire, a été fixé à 0,5 mL/min pour les différentes éluions des protéines. Pour chaque pH du milieu d'étude et à chaque température de la colonne, 1-5 μ L des différents échantillons (TRAIL et NPT) à 15 μ M ont été injectés successivement dans le système chromatographique. Les injections ont été répétées au minimum trois fois et la détection des molécules étudiées à la sortie de la colonne a été réalisée à une longueur d'onde de 220 nm. La rétention des molécules étudiées sur la colonne DR5 représentée par le facteur de rétention k' (k'_{TRAIL} et k'_{NPT}) a été déterminée. A chaque condition étudiée, la solution de la phase mobile (PBS) a été injectée pour déterminer le temps mort t_0 . Ces conditions ont été nécessaires pour mesurer le temps de rétention de nos molécules injectées (TRAIL et NPT) dans le système. A noter que les mesures expérimentales ont été effectuées également à une autre force ionique de la

phase mobile 10 mM. Cependant, lorsque la colonne n'a pas été en cours d'utilisation, elle a été stockée à 4°C dans une solution à 0,01% d'azide de sodium.

A2.5 Détermination des données chromatographiques

La rétention des molécules injectées dans le support chromatographique a été évaluée en utilisant le facteur de rétention $k' = (t-t_0)/t_0$, où t est le temps de rétention du soluté injecté et t_0 le temps mort de la colonne déterminé en utilisant le pic de la phase mobile ou d'une autre manière t_0 a été calculé à partir de la première perturbation de la ligne de base après l'injection d'une solution non retenue par la colonne.

D'autres informations sur le mécanisme d'association du complexe TRAIL-DR5 ont été ensuite évaluées à partir de l'analyse des résultats obtenus autour de l'effet de la température sur la rétention de TRAIL et NPT par la colonne [Fornstedt *et al.*; 1997, Miyabe; 2002]. La dépendance du facteur de rétention en fonction de la température est donnée par la relation suivante:

$$\ln k' = \left(\frac{-\Delta H^\circ}{RT} \right) + \Delta S^{\circ*}$$

avec

$$\Delta S^{\circ*} = \frac{\Delta S^\circ}{R} + \varphi$$

où ΔH° et ΔS° sont respectivement l'enthalpie et l'entropie du transfert de TRAIL ou des molécules NPT à partir du solvant vers la phase stationnaire équipée avec le récepteur DR5, T est la température absolue et R est la constante des gaz. Étant que la phase stationnaire équipée avec le récepteur DR5, les molécules de soluté et les propriétés du solvant sont indépendantes de la température, ainsi que ΔH° et ΔS° , qui ne dépendent pas de la température, la courbe de van't Hoff linéaire est obtenue. À partir de la pente et l'interception de cette courbe, ΔH° et $\Delta S^{\circ*}$ peuvent être calculées. Lorsque les conditions opératoires varient, $\Delta S^{\circ*}$ (sans unité) varie de manière identique à ΔS° puisque φ est une constante. Les différentes équations utilisées pour faire le calcul sont bien détaillées dans le chapitre 3.

A2.6 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant l'analyse non-paramétrique de la variance (ANOVA) entre les points de chaque courbe pour TRAIL et NPT. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel ORIGIN Pro-9 (Origin lab Co, MA, USA). Au niveau de 0,05, la pente est significativement différente de zéro.

A2.7 Les simulations théoriques par Docking

Les calculs par la modélisation moléculaire, le docking et le scoring, ont été effectués en utilisant les logiciels NAMD et Hex 8 [Macindoe *et al.*; 2010, Phillips *et al.*; 2005, Ritchie and Venkatraman; 2010]. Les fichiers modèles construits pour TRAIL humain et DR5 ont été appuyés sur des structures cristallographiques des protéines (Pdb ID 1D4V) [Mongkolsapaya *et al.*; 1999], et ont été optimisés par une minimisation d'énergie (ME) en utilisant le champ de force charmm27 de CHARMM telle que transposée dans le paquet NAMD. Enfin, les énergies de Gibbs des différentes protéines qui interagissent avec elles-mêmes ont été calculées par un docking protéine-protéine en utilisant le logiciel Hex.

Afin de valider l'alignement séquence-structure dans le but d'éliminer les faux contacts dérivés de la modélisation par homologie et atteindre une réalisation d'une bonne structure de départ, le modèle a été soumis à une procédure de minimisation d'énergie à l'aide d'un logiciel NAMD par l'intermédiaire du champ de force charmm27. La structure initiale a été placée dans une boîte de solvant ($100 \times 100 \times 100 \text{ \AA}^3$ pour TRAIL et DR5, respectivement). La boîte a été remplie avec de l'eau (30860 et 31126 molécules pour TRAIL et DR5, respectivement), Na^+ (87 et 94 pour TRAIL et DR5, respectivement) et Cl^- (89 et 88 pour TRAIL et DR5, respectivement) à la concentration physiologique. Chaque structure a été placée au centre d'une boîte cubique tronquée remplie avec le modèle moléculaire de l'eau de type TIP3P. Tous les atomes ont été soumis à 500,000 étapes de minimisation d'énergie par l'algorithme de gradient conjugué pour éliminer les contacts de van der Waals. Concernant le nanovecteur NPT, la minimisation d'énergie a été réalisée dans des conditions limites périodiques et a été calculée dans la condition isobare-isotherme. La convergence de la

simulation a été analysée en termes de l'énergie potentielle, et de déviation racine carrée moyenne (RMSD) de la structure du modèle initial.

Cependant, les études du Docking ont été effectuées pour évaluer la capacité de prédiction du TRAIL (sous des formes monomères et oligomères) et la formation du complexe DR5-TRAIL, comme la montre dans nos expériences. Le Docking protéine-protéine entre les modèles optimisés, a été atteint pour les grosses molécules en regroupant les scores triées par l'énergie et en utilisant la procédure de macro-échantillonnage. La recherche de la meilleure solution a été réalisée en prenant en compte à la fois la forme et l'interaction électrostatique de la protéine dans une grille 3D FFT, en combinaison avec d'autres paramètres du Docking par défaut.

A2.8 Références Bibliographiques

- [Fornstedt *et al.*; 1997] Fornstedt, T.; Sajonz, P.; Guiochon, G., Thermodynamic Study of an Unusual Chiral Separation, Propranolol Enantiomers on an Immobilized Cellulase. *The Journal of American Chemical Society* **1997**, *119*, 1254-1264.
- [Girelli and Mattei; 2005] Girelli, A. M.; Mattei, E., Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *The Journal of Chromatography B* **2005**, *819* (1), 3-16.
- [Macindoe *et al.*; 2010] Macindoe, G.; Mavridis, L.; Venkatraman, V.; Devignes, M. D.; Ritchie, D., Hexserver: An FFT-Based Protein Docking Server Powered by Graphics Processors. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38*, W445-449.
- [Miyabe; 2002] Miyabe, K., Characteristics and mechanism of surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography using various alkyl ligand bonded silica gels. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 2126-2132.
- [Mongkolsapaya *et al.*; 1999] Mongkolsapaya, J.; Grimes, J. M.; Chen, N.; Xu, X. N.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y.; Screaton, G. R., Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nature Structural & Molecular Biology* **1999**, *6*, 1048-1053.
- [Phillips *et al.*; 2005] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *The Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1781-1802.
- [Ritchie and Venkatraman; 2010] Ritchie, D. W.; Venkatraman, V., Ultra-Fast Fft Protein Docking on Graphics Processors. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2398-2405.
- [Sarr *et al.*; 2010] Sarr, F. S.; André, C.; Guillaume, Y. C., A novel biochromatographic Oatp2 column to study the transmembrane transport of statins. *The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *52* (1), 93-98.

A3 Protocoles expérimentaux du chapitre IV

Abréviations

BSA	Bovin Serum albumin
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EFS	Etablissement Français du sang
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

A3.1 Protocole de production du TRAIL

Le ligand TRAIL étiqueté d'une queue poly-histidinique (His-tagged TRAIL), utilisé dans nos expériences, a été produit à partir d'une culture bactérienne à l'INSERM 866 et contrôlé par la technique SDS-PAGE. Les bactéries E. Coli (clone OM 402) contiennent le gène du TRAIL non exprimé. L'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) est utilisé pour induire l'expression de protéines recombinantes (TRAIL) placées sous le contrôle du promoteur **lac** au niveau bactérien. Les bactéries portant un plasmide contenant le gène d'intérêt sont cultivées en absence d'IPTG jusqu'à ce que la densité cellulaire atteigne un niveau suffisant. Ainsi, l'addition d'IPTG dans la culture permet d'induire la production de la protéine (TRAIL) au moment désiré (Figure A3-1 A). Ensuite, la seconde étape est une lyse bactérienne par un tampon de lyse contenant la lysozyme qui agit comme une hydrolase et détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycane la constituant.

La troisième étape de la production du His-TRAIL consiste à isoler et à purifier la protéine dans les conditions natives. Elle a été faite sur une matrice de résine Ni-NTA (Quiagen 1018244) préalablement équilibrée dans le tampon de lyse contenant (50 mM de phosphate de sodium (NaH_2PO_4) pH 8, 300 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 10 mM de β -mercaptoéthanol), suivie d'un lavage dans un tampon contenant (50 mM de phosphate de sodium (NaH_2PO_4) pH 8, 300 mM de NaCl, 30 mM d'imidazole, 10 mM de β -mercaptoéthanol), et de différentes éluions dans un tampon contenant (50 mM de phosphate de sodium (NaH_2PO_4) pH 8, 300 mM de NaCl, 250 mM d'imidazole, 10 mM de β -mercaptoéthanol).

Puis, l'électrophorèse par la technique SDS-PAGE, nous a permis l'identification de la bande de notre protéine d'intérêt. En effet, la masse moléculaire du His-TRAIL se situe vers 32 kDa. En outre, le premier gel (Figure A3-1 A) montre une bonne induction protéique dans deux cultures bactériennes différentes (dans cette figure), les filtrats résultants sont ensuite mélangés ensemble pour former un seul lot, appelé batch. Egalement, le second gel (Figure A3-1 B) montre pour ce batch les différentes éluions du His-TRAIL produit.

Ensuite, TRAIL filtré a été dosé par trois méthodes différentes : un dosage protéique classique de type DC-assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) par rapport à une gamme d'étalonnage avec la protéine BSA. La deuxième méthode consiste à doser le batch obtenu sur

un gel par la technique SDS-PAGE par une série de dilutions de notre batch par rapport à une série de dilutions d'un TRAIL standard ou contrôle, et les différentes bandes ont été analysées avec un système d'imagerie « Chemi-Doc » (Bio-RAD) par l'intermédiaire d'un logiciel Image Lab. La troisième méthode par la spectrophotométrie Nano-drop, permet aussi la détermination de la concentration du batch His-TRAIL. Les différentes techniques ont abouti à une concentration de 2 mg/mL de notre production en His-TRAIL. A la fin, la bio-fonctionnalité du TRAIL a été testée sur des cellules *in vitro* afin de s'assurer de son activité avant de l'utiliser dans les différentes expérimentations.

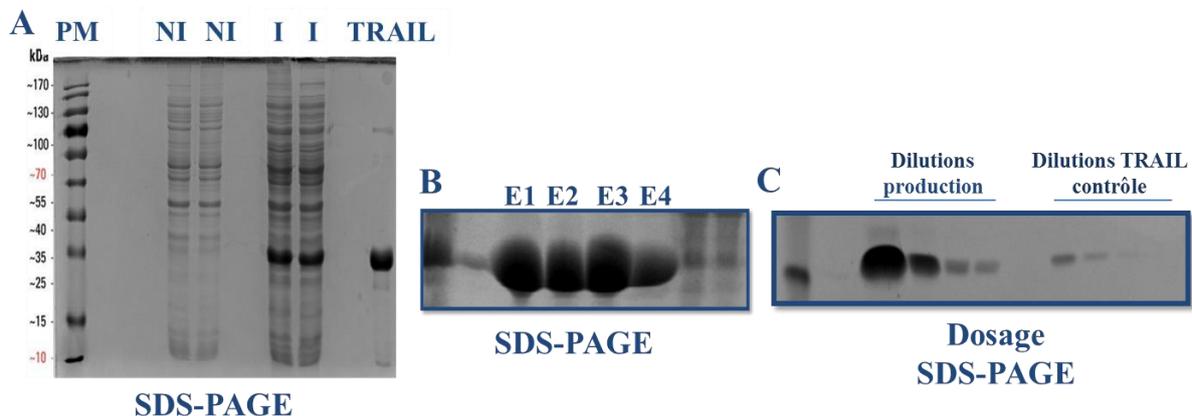


Figure A 3—1 Production du TRAIL recombinant par culture bactérienne. La migration protéique a eu lieu par la technique SDS-PAGE. Ensuite, les gels ont été colorés au bleu de coomassie : le premier gel correspond à une bonne induction protéique par l'IPTG dans les bactéries *E. Coli*, par rapport aux échantillons pris avant l'induction (I) et sont désignés par le terme non-induits (NI) (A). Le second gel correspond aux différentes éluions du TRAIL dans un seul batch (B). Le troisième gel correspond aux différentes bandes de dilutions du TRAIL produit par rapport à celles du TRAIL contrôle (C). Les bandes protéiques en kDa ont été identifiées par rapport à un marqueur du poids moléculaire (Thermo Scientific). NI : Non induits par IPTG ; I : Induits par l'IPTG ; E1, E2, E3, E4 : Différentes éluions de His-TRAIL produit.

A noter que toutes les étapes de production, purification, dosage et activité cellulaire du ligand TRAIL (His-tagged TRAIL) ont été effectuées à l'unité INSERM 866-Université de Bourgogne selon un protocole précédemment décrit [Schneider; 2000].

A3.2 Produits chimiques et anticorps

Les anticorps anti-TRAIL R1 (B-K32), anti-TRAIL R2 (B-K29), anti-TRAIL R3 (B-H47) et anti-TRAIL R4 (B-R36), ont été obtenus à partir de Diaclone (Besançon, France).

L'anticorps secondaire Alexa-488 couplé-goat anti-mouse a été obtenu à partir de Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). L'inhibiteur pan-caspase (z-VAD-fmk) a été acheté chez Alexis (Coger, Paris, France). Le kit de marquage Annexine (Annexine V-FITC, 7-AAD et le tampon de liaison « binding buffer » (10x)) provenait de Pharmingen (BD Biosciences, Californie).

A3.3 Lignées cellulaires et culture cellulaire

Les lignées cellulaires d'adénocarcinome du côlon HCT116 ont été cultivées dans un milieu « High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium » (Lonza, Levallois-Perret, France) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Lonza), dans des conditions de culture avec 5% CO₂. Les lignées cellulaires squameuses humaines du cancer pulmonaire H1703 et d'hépatocarcinome HepG2 ont été cultivées en milieu RPMI (Dutsher Dominique, Brumath, France) contenant 10% de sérum bovin fœtal dans des conditions de culture avec 5% CO₂. Les différentes lignées cellulaires d'hépatoblastome humain HUH, d'ostéosarcome humain U2OS et de mélanome murin B16 ont été cultivées dans un milieu DMEM « Dulbecco's modified Eagle's medium » (Lonza) contenant 10% du sérum bovin fœtal dans des conditions de culture avec 5% CO₂.

Les lignées cellulaires HCT116, H1703, B16, U2OS et SK-Hep1 ont été achetées auprès de la collection de culture de type américain (ATCC). Cependant, les lignées cellulaires HUH et HepG2 sont des dons d'EFS Bourgogne-Franche-Comté (Besançon, France).

A3.4 Mesure de la viabilité cellulaire

Dans des plaques à 96 puits, 40x10³ cellules par puits ont été incubées à 37 °C pendant 16 h avec 5% de CO₂, et traitées par des concentrations croissantes de His-TRAIL ou de nanovecteur NPT variant de 0 à 15x10³ ng/mL. La viabilité cellulaire a été mesurée par une coloration au bleu de méthylène après fixation des cellules au PFA (2%). La densité

optique (DO) a été mesurée à 630 nm par spectrophotométrie UV-visible [Merino *et al.*; 2006].

A3.5 Marquage d'apoptose à l'Annexine V

L'apoptose a été déterminée par la détection d'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) après un co-marquage à l'Annexine V-FITC/7-AAD. Les analyses ont été réalisées par la technique de cytométrie en flux (FACS Calibur). L'apoptose est déterminée selon le pourcentage de cellules présentant une coloration positive par rapport à des cellules non traitées considérées comme témoin. Chaque expérience a été réalisée de manière indépendante au moins trois fois. Pour résumer, 300×10^3 cellules ont été cultivées pendant une nuit en milieu complet (High-glucose DMEM pour les lignées HCT116 et RPMI pour les lignées H1703). Le lendemain, les cellules ont été prétraitées (ou non) avec 20 μ M d'un inhibiteur des caspases (zVAD-fmk) pendant 1h, avant leur stimulation par His-TRAIL ou NPT pendant 6 h. Ensuite, les cellules ont été trypsinées, centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, lavées dans du PBS (1X), centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min et colorées à l'AnnexineV et 7-AAD, selon les instructions du fabricant. L'acquisition comprend un minimum de 10 000 cellules.

A3.6 Marquage d'apoptose par Hoechst

La fragmentation nucléaire a été évaluée par une coloration à l'aide d'un marqueur Hoechst (Hoechst 33342, Life Technologies) en déterminant le pourcentage de noyaux condensés ou fragmentés provenant d'au moins 300 cellules par condition. Les cellules (5×10^5) ont été cultivées pendant une nuit dans un milieu complet (RPMI pour les lignées H1703). Le lendemain, les cellules ont été prétraitées (ou non) avec 20 μ M d'un inhibiteur des caspases (zVAD-fmk) pendant 1h, avant leur stimulation par His-TRAIL ou NPT pendant 8 h. Ensuite, les cellules ont été trypsinées, centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min, incubées pendant 15 min dans une solution de désagrégation et de comptage cellulaire « Cell disaggregation and counting solution » (Accumax: Interchim, Montluçon, France)/PBS (V/V).

Après centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min, les cellules ont été fixées pendant une nuit dans une solution de 200 μ L (PBS (1X) + PFA (1%) + Hoechst (1 mM)) à 4 °C à l'obscurité. Ensuite, la fragmentation nucléaire a été évaluée et quantifiée en utilisant un microscope à fluorescence inversée (Leica DMIRB), couplé à un dispositif AxioCam. Les photos ont été prises et enregistrées avec le logiciel AXIO-Vs 40 V 4.8.2.0 Carl Zeiss MicroImagin GmbH.

A3.7 Immuno-précipitations

Afin d'analyser le complexe DISC, les cellules (50×10^6) ont été stimulées avec 2 μ g/mL en His-hTRAIL ou NPT dans 6 mL du milieu complet, pendant les durées indiquées (0, 30, 60 et 90 minutes) à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS à 4°C (Dominique Dutscher), et lysées dans 1 mL de tampon de lyse contenant 1% de détergent (NP40 1% (Nonidet P40, Sigma-Aldrich), 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl et 10% de glycerol) en présence des inhibiteurs de protéases (pepstatineA 2,5 mg/mL, aprotinine 10 mg/mL, inhibiteur de trypsine 2,5 mg/mL, leupeptine 5 mg/mL, Roche, France) pendant 20 min, puis centrifugées pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4°C. Les lysats ont été nettoyés au préalable avec une Sepharose 6B (Sigma-Aldrich) pendant 1h à 4°C sous une douce agitation, et immunoprécipités à 4°C pendant la nuit avec la protéine G Sepharose (Amersham Biosciences, Les Ullis, France) en présence de 2 μ g d'un anticorps anti-Caspase8 (Santa Cruz C-20). Ensuite, les billes ont été lavées trois fois et les immunoprécipités ont été élués dans un tampon « loading buffer » (Tris-HCl 63 mM, SDS 2%, phenol red 0,03%, glycérol 10%, DTT 100 mM, pH 6,8), bouillis pendant 5 min et traités pour l'immunoblotting.

A3.8 Western-blotting

Les immunoprécipités ont été résolus par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et transférés sur des membranes en nitrocellulose (Bio-Rad). Les sites des liaisons non spécifiques ont été bloqués par une incubation des membranes dans du PBS contenant 0,5% de Tween 20 et 5% de lait en poudre.

Ensuite, les immunoblots ont été incubés avec les anticorps primaires spécifiques suivants : anti-FLIP NF6 (Adipogen), FADD (BD Transduction Laboratories), Caspase-8 et 10 (MBL), DR4, DR5 (Merck Millipore), puis incubés avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort. Les membranes ont ensuite été révélées avec ECL (Advansta, Western Bright Quantum, Western blotting detection kit) par la méthode de chimioluminescence amplifiée selon le protocole du fabricant. La chimioluminescence a été détectée avec un système d'imagerie « Chemi-Doc » (Bio-Rad). Finalement, les résultats ont été analysés avec le logiciel Image Lab.

A3.9 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant l'analyse non-paramétrique de la variance (ANOVA) avec le test de comparaison multiple *post hoc* Bonferonni. La valeur de P *** <0,001 était considérée comme significative. Les résultats obtenus avec le nanovecteur NPT ont été comparés par rapport à ceux obtenus avec TRAIL. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Prism 5.0a (GraphPad Software, San Diego, CA.).

A3.10 Références Bibliographiques

- [Merino *et al.*; 2006] Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O., Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular & Cellular Biology* **2006**, *26*, 7046-7055.
- [Schneider; 2000] Schneider, P., Production of recombinant TRAIL and TRAIL receptor: Fc chimeric proteins. *Methods in Enzymology* **2000**, *322*, 325-345.

Nanovectorization of TRAIL with single wall carbon nanotubes enhances tumor cell killing

*Al Batoul ZAKARIA^a, Fabien PICAUD^a, Thibault RATTIER^b, Marc PUDLO^a, Florent DUFOUR^b,
Lucien SAVIOT^c, Rémi CHASSAGNON^c, Jeanine LHERMINIER^d, Tijani GHARBI^a, Olivier
MICHEAU^{b#}, Guillaume HERLEM^{a#}.*

^a Laboratoire de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique, EA 4662, UFR Sciences & Techniques, CHU Jean Minjot, Université de Franche-Comté, 25030 Besançon cedex, France

^b INSERM, UMR866, Lipides Nutrition Cancer, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 Bd Jeanne d'Arc, Dijon, F-21079 France

^c Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS Université de Bourgogne, 9 Av. A. Savary, BP 47 870, F-21078 Dijon Cedex, France

^d Centre de Microscopie INRA/UB, UMR 1347 Agroécologie, AgroSup/INRA/UB, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes-ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France.

ABSTRACT: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or Apo2L) is a member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This type II transmembrane protein is able to bound specifically to cancer cell receptors (i.e. TRAIL-R1 (or DR4) and TRAIL-R2 (or DR5)) and to induce apoptosis without being toxic for healthy cells.

[#] email addresses : guillaume.herlem@univ-fcomte.fr, Tel.: (33)81662067 (G. Herlem), omicheau@u-bourgogne, Tel.:(33)380393468 (O. Micheau).

Since membrane-bound TRAIL induces stronger receptor aggregation and apoptosis than soluble TRAIL, we proposed here to vectorize TRAIL using single walled carbon nanotubes (SWCNTs) to mimic membrane TRAIL.

Owing to their exceptional and revolutionary properties, carbon nanotubes, especially SWCNTs, are used in a wide range of physical or, now, medical applications. Indeed due to their high mechanical resistance, their high flexibility and their hydrophobicity, SWCNTs are known to rapidly diffuse in an aqueous medium such as blood, opening the way of development of new drug nanovectors (or nanocarriers).

Our TRAIL-based SWCNTs nanovectors proved to be more efficient than TRAIL alone death receptors in triggering cancer cell killing. These NPTs increased TRAIL pro-apoptotic potential by nearly 20 fold in different Human tumor cell lines including colorectal, non-small cell lung cancer or hepatocarcinomas. We provide thus a proof-of-concept that TRAIL nanovector derivatives based on SWCNT may be useful to future nanomedicine therapies.

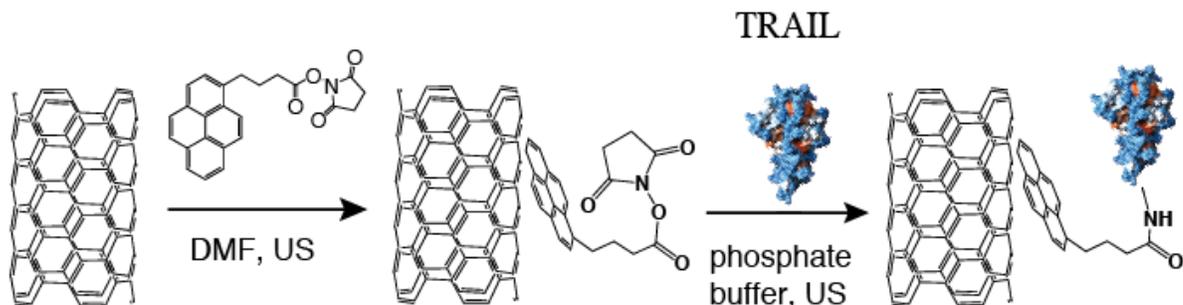
KEYWORDS: carbon nanotubes; nanovector; TRAIL; death receptor; nanomedicine; cancer therapy

In the emerging industry of nanotechnologies, carbon nanotubes (CNTs) can be used for nanovector engineering.¹⁻⁵ Due to its antitumor properties without any damage for healthy cells, TRAIL ligand has attracted major interest in oncology. Indeed, it is able to induce cancer cell apoptosis by binding to TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5) receptors (known as death receptors). But, despite clear evidence of antitumoral activity, clinical trials demonstrated that the use of TRAIL or TRAIL derivatives alone was not sufficient to cure patients.^{6,7}

In this context, current therapeutic approaches aim at combining TRAIL with conventional chemotherapy or targeted therapies to circumvent different resistances to TRAIL-induced apoptosis due to the presence of the antagonist receptors TRAIL-R3 (DcR1) and TRAIL-R4 (DcR2), the caspase-8 inhibitor c-FLIP or to a defect in the mitochondrial pathway.⁸⁻¹⁰ Alternatively, mutagenesis or multimerization of TRAIL (or TRAIL derivatives) to mimic native membrane-bound TRAIL are explored to increase TRAIL efficacy.¹¹⁻¹³

Multivalent TRAIL mimetic peptides or nanobodies targeting anti-TRAIL-R2 have recently been developed and have sparked superior killing activity than their monovalent counterpart or TRAIL.^{13, 14} Herein, we proposed to synthesize novel nanovectors based on SWCNT functionalized with TRAIL via noncovalent 1-pyrenebutanoic acid N-hydrosuccinimid ester (PSE) as shown on Scheme 1.¹⁵ These TRAIL-based nanovectors (noted NPT thereafter) are intended to increase TRAIL valency and to enhance apoptosis induced by both TRAIL-R1 and TRAIL-R2, as compared to soluble TRAIL.

Scheme 1. Illustration of chemical reactions used for TRAIL grafting on SWCNT



Before delivering NPT on cancer cell lines, the mean concentration of grafted TRAIL on nanotubes was estimated by Lowry's protein quantification ⁷ and statistical analysis based on images processing from TEM (see S.I. for details). The degree of SWCNT-PSE functionalization with TRAIL was about 80%, corresponding to a final concentration of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The resulting functionalized nanotubes were analyzed by TEM for the presence of TRAIL and compared to shortened SWCNT (Figure 1A and 1B).

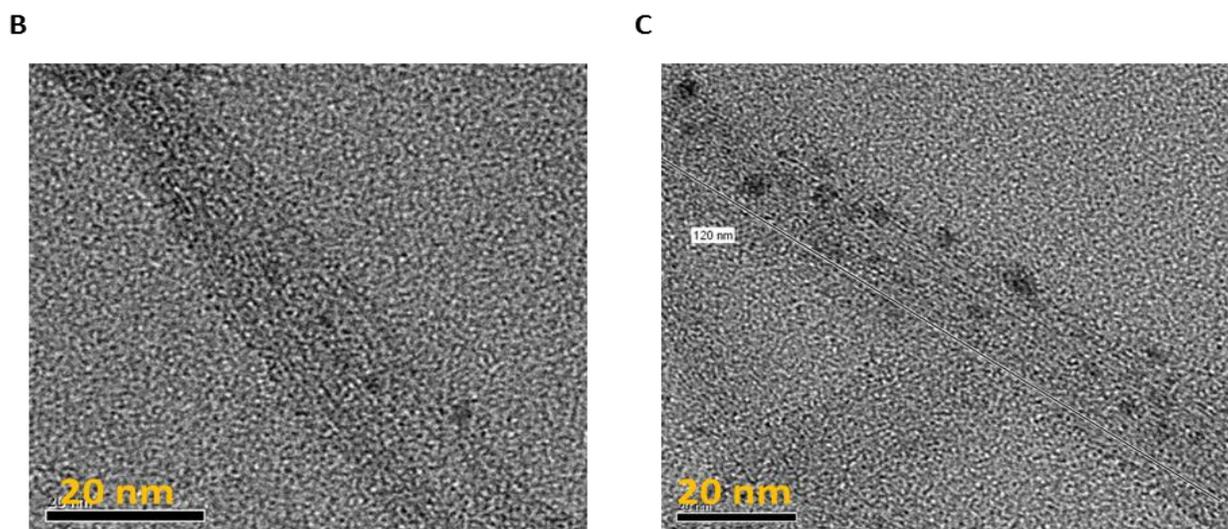


Figure 1. (A) TEM of SWCNT-PSE, and (B) TEM of TRAIL coated SWCNT bundle.

To assess the pro-apoptotic activity of NPT as compared to TRAIL, several tumor cell lines expressing TRAIL-R1 and TRAIL-R2, but little to no TRAIL-R3 or TRAIL-R4 (Figure 2A) were seeded in 96-well plates. A progressive increase of the TRAIL (or NPT) concentration was submitted to the culture medium. 16 hours after the stimulation, plates were washed and remaining viable cells were stained with methylene blue to measure cell viability. Both NPT and TRAIL induced a dose dependent inhibition of the cell viability of all the hepatocarcinoma cell lines, *i.e.* SK-Hep1, HUH and HepG2, and of the non-small cell lung carcinoma cell line H1703 (Figure 2B). However, as expected, TRAIL-based nanovectors (NPT) displayed better cytotoxic activity than recombinant soluble TRAIL for all tested cancer cell lines.

While 88 ng/mL TRAIL was required to kill 50 % of H1703 cells, the IC₅₀ was reached with only 8 ng/mL NPT, demonstrating that NPT action was largely superior than TRAIL one in inducing apoptosis of these cells. NPT was thus 10 fold more potent than soluble TRAIL.

The experiments carried on Hepatocarcinoma cells (SK-HEP1, HepG2 and HUH) showed that NPT was also 10 to 20 fold more efficient than TRAIL to induce cell death. IC₅₀ estimated for TRAIL in these cells ranged from 650, to more than 2600 ng/mL (Figure 2B) while NPT IC₅₀ ranged from 33 to 230 ng/mL (Figure 2B). Remarkably, the gain of function obtained with TRAIL functionalized on SWCNT in HepG2 cells, which expresses the functional antagonist receptor TRAIL-R4 in addition to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 was around 20 fold as compared to soluble TRAIL.

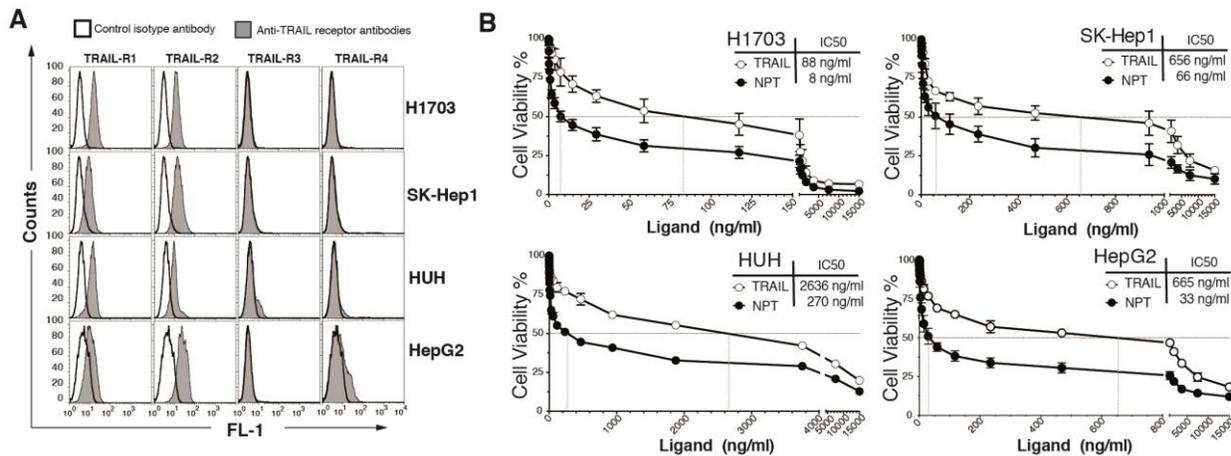


Figure 2. (A) Flow cytometric analysis of TRAIL receptor expression in the non-small lung carcinoma cell line H1703 and in the hepatocarcinoma cell lines, SK-Hep1, HUH and HepG2. The white histogram represents the isotype control antibody (IgG). The grey histogram corresponds to TRAIL receptor staining. (B) Cell viability in H1703, SK-Hep1, HUH and HepG2 cells after stimulation with increasing concentrations of TRAIL or NPT. Viability was measured by methylene blue staining. Data are the mean \pm SD (n=3).

To prove again the better ability of NPT to induce cell death compared to TRAIL alone, apoptosis was assessed in H1703 cells by Hoechst and Annexin-V staining using a fixed concentration of TRAIL and NPT. As shown by fluorescent microscopy for Hoechst staining, both TRAIL and NPT induced nuclear fragmentation, a hallmark of apoptosis (Figure 3A). Inhibition of caspase activation by the pan-caspase inhibitor ZVAD inhibited nuclear fragmentation-induced by TRAIL and NPT, demonstrating that NPT was able to trigger apoptosis via TRAIL-R1 and TRAIL-R2, like TRAIL. Quantification of H1703 undergoing apoptosis upon NPT stimulation clearly demonstrates that NPT is superior to TRAIL (Figure 3B).

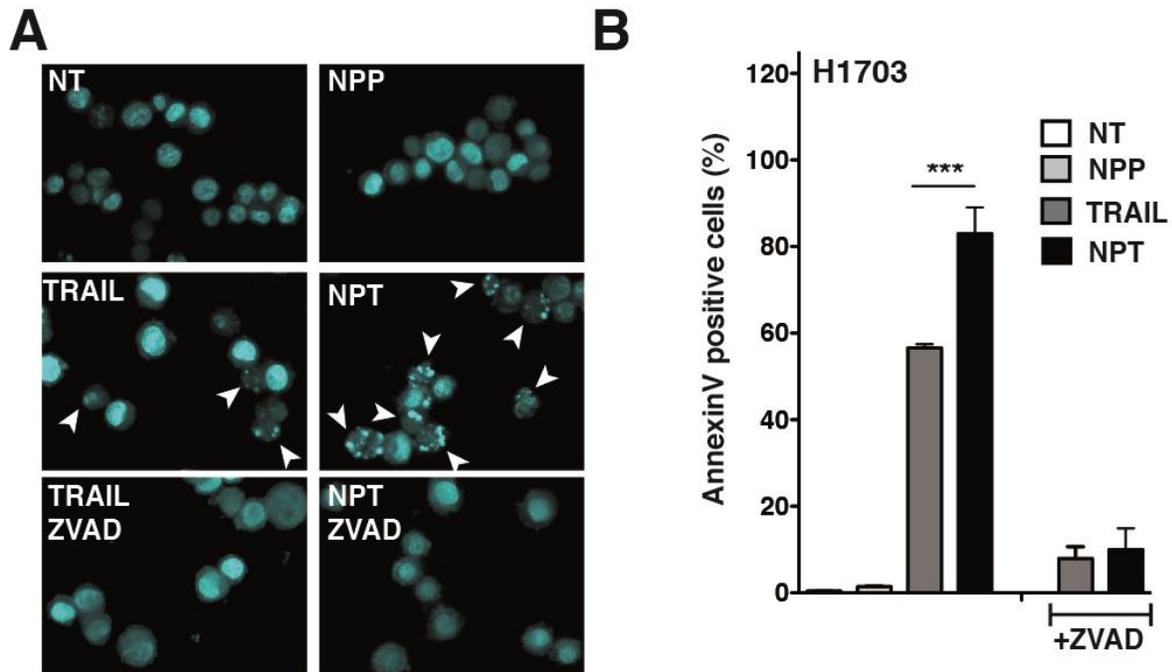


Figure 3. (A) Hoechst staining of H1703 cells after treatment with the same concentrations of NPT and TRAIL (20 ng/mL): Enumeration of apoptotic nuclei (about 300 cells) of H1703-WT cell line. The white arrows show fragmented or condensed nuclei. (B) Percentage of apoptotic cells. Untreated cells (NT) are used as control. Data are the mean \pm SD (n=3). Differences between selected groups were compared to non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferonni *post hoc* multiple comparison test, ***P < 0.001, compared to TRAIL stimulation alone and NPT in H1703 (WT) cell lines. NT: Non-treated, NPP: Control Carbon nanotubes, ZVAD: Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone).

In order to demonstrate that the gain of function of NPT was only due to TRAIL and not to nanoparticles themselves, we took advantage of a colon carcinoma cell line in which both agonist receptors were knocked-out (paper in preparation). Parental HCT116 cells (HCT116 WT) express

TRAIL-R1 and TRAIL-R2 (Figure 4A) and are sensitive to TRAIL-induced cell death (Figure 4B). TRAIL IC₅₀ value in these cells was determined close to 40 ng/mL. Using HCT116 cells (HCT116 DKO) deficient in TRAIL-R1 and TRAIL-R2, TRAIL was unable to trigger apoptosis and thus cell survival was not affected whatsoever the amount of TRAIL. In these cells, NPT was also unable to reduce cell viability (Figure 4B) demonstrating the non-toxicity of the nanoparticles. However in WT cells, as in the other cancer cell lines tested here, NPT was more efficient than TRAIL in reducing cell viability. Its IC₅₀ value was estimated at 3 ng/mL, indicating that NPT was at least 10 fold more efficient than soluble TRAIL to kill HCT116 WT cells, while it remained unable to trigger apoptosis in TRAIL receptor deficient HCT116 cells (DKO), like TRAIL itself.

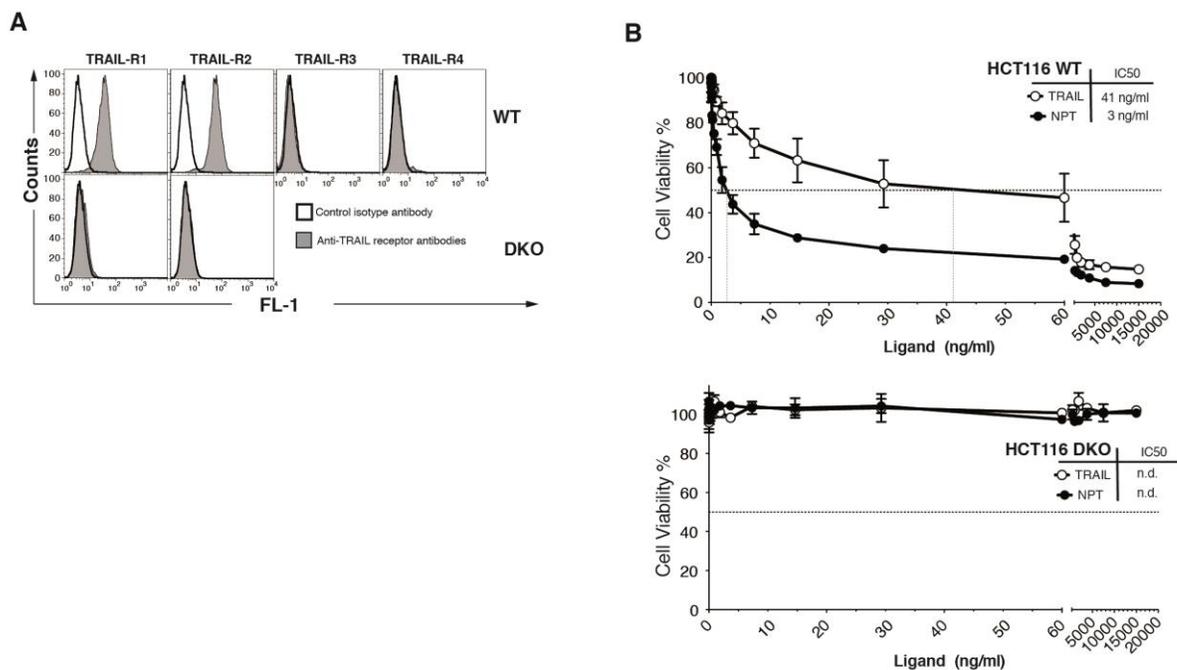


Figure 4. (A) Flow cytometric analysis of TRAIL receptor expression in the Human colon adenocarcinoma cell lines, HCT116 WT and HCT116 DKO. The white histogram represents the isotype control antibody (IgG). The grey histogram corresponds to TRAIL receptor staining. (B) Cell

viability in HCT116 WT and HCT116 DKO cells after stimulation with increasing concentrations of TRAIL or NPT. Viability was measured by methylene blue staining. Data are the mean \pm SD (n=3).

To further demonstrate that the efficacy of NPT is solely due to TRAIL functionalization on SWCNT but not to the nanotubes themselves, a fixed concentration of TRAIL, NPT or non-functionalized SWCNT (NPP) was used to assess apoptosis in H1703 cells by Annexin-V staining. As shown by flow cytometry, NPT and TRAIL but not NPP induced apoptosis in H1703 with 90 and 55 % cells undergoing apoptosis 6 hours after stimulation, respectively (Fig. 5A). Incubation of the cells in the presence of the pan-caspase inhibitor ZVAD, 30 min prior stimulation, prevented apoptosis induced TRAIL and NPT (Fig. 5A). Statistical analysis demonstrated that in these cells, apoptosis induced by NPT was significantly superior than that induced by TRAIL (Fig. 5B). Similar results were obtained with the parental HCT116 cell line (Figure 5C), while the TRAIL-deficient derivative (HCT116-DKO) remained insensitive to either TRAIL or NPT (Figure 5C). Irrespective of the cell line, non-functionalized nanoparticles SWCNT-PSE (NPP) were unable to trigger apoptosis. Analysis of TRAIL receptor DISC formation and activation in HCT116 cells stimulated with TRAIL or NPT for 10 to 90 minutes revealed that NPT slightly increased caspase-8 and FADD recruitment to TRAIL receptors (Figure 5D). Importantly, consistent with its superior pro-apoptotic activity, NPT stimulation induced stronger activation of initiator caspases, as evidenced by the increase in caspase-8 p18 or caspase-10 p12 fragments (Figure 5D). Increased activation of initiator caspases upon NPT stimulation, as compared to TRAIL, was also evidenced by the concomitant disappearance of c-FLIP_L proform and the appearance of its p43 cleaved products within the DISC (Figure 5D). These results demonstrate that NPT induces stronger initiator caspase activation within the TRAIL DISC than soluble TRAIL.

Our findings are consistent with earlier reports demonstrating that TRAIL multimerization,¹⁴ in a membrane-like manner is sufficient to increase TRAIL cell killing activity. The grafting of TRAIL on carbon nanotubes efficiently increased TRAIL-induced cell death in various tumor cell types, including HUH and HepG2. It should be noted that these two hepatocarcinoma cell lines express TRAIL-R3 (DcR1) or TRAIL-R4 (DcR2), two TRAIL antagonist receptors lacking a functional death domain, and known to inhibit apoptosis induced by TRAIL to some extent.^{8,16,17}

Inhibition of TRAIL-induced apoptosis in HUH cells by TRAIL-R3 remain, however, unlikely due to the low expression level of this receptor. Yet impairment of TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-R4 in HepG2 cells has been documented.⁸ Interestingly, NPT was 20 fold more efficient in this cell line, as compared to TRAIL while its efficiency was roughly of 10 fold in the other cell lines. The gain of function in these cells as well as in cells expressing only agonist TRAIL receptors may be explained by the differential activation of caspase-8 at the DISC level. As demonstrated here after a caspase-8 pull-down, NPT was superior to TRAIL owing to its ability to increase initiator caspase activation (Figure 5D). Increased efficacy of NPT was, however, not associated with increased TRAIL-R1 and TRAIL-R2 pull-down, suggesting that TRAIL functionalization on SWCNT is unlikely to affect TRAIL affinity for its receptors. In contrast, functionalization of TRAIL on SWCNT is more likely to mimic membrane-bound TRAIL and favors higher order of receptor aggregation, leading to better initiator caspase activation. Whether this gain of function is sufficient to overcome TRAIL antagonist receptor-mediated resistance remains an open question. But the gain of function observed in HepG2 cells, which express spontaneously functional TRAIL-R4, and earlier findings from our group, using sequential treatments associating chemotherapy and TRAIL,⁹ suggest that NPT are likely to be able to overcome this resistance thanks to stronger ability to induce caspase-8 activation. Further work will be needed to address this question.

Altogether, we provide here a proof-of-concept that nanovectors based on TRAIL grafted onto SWCNT, can significantly increase TRAIL anti-tumor activity *in vitro*, owing to their ability to increase caspase-8 activation. Likewise, we demonstrate that apoptosis induced NPT is 10 to 20 fold more potent than soluble TRAIL in a variety of tumor cell lines of different origin. Importantly, NPT remained highly selective for TRAIL signaling. Indeed, NPT was unable to trigger apoptosis in the TRAIL receptor-deficient cell line HCT116, generated by the TALEN technology. Moreover, no relevant toxicity due to the nanotubes alone was observed with these cells or other cell line models that we have studied. Given the ability of SWCNT to deliver drugs or to absorb electromagnetic waves, TRAIL functionalized SWCNT may pave the way to novel therapeutic approaches such as NPT-based photothermal therapies or NPT-based TRAIL sensitizing drug delivery.

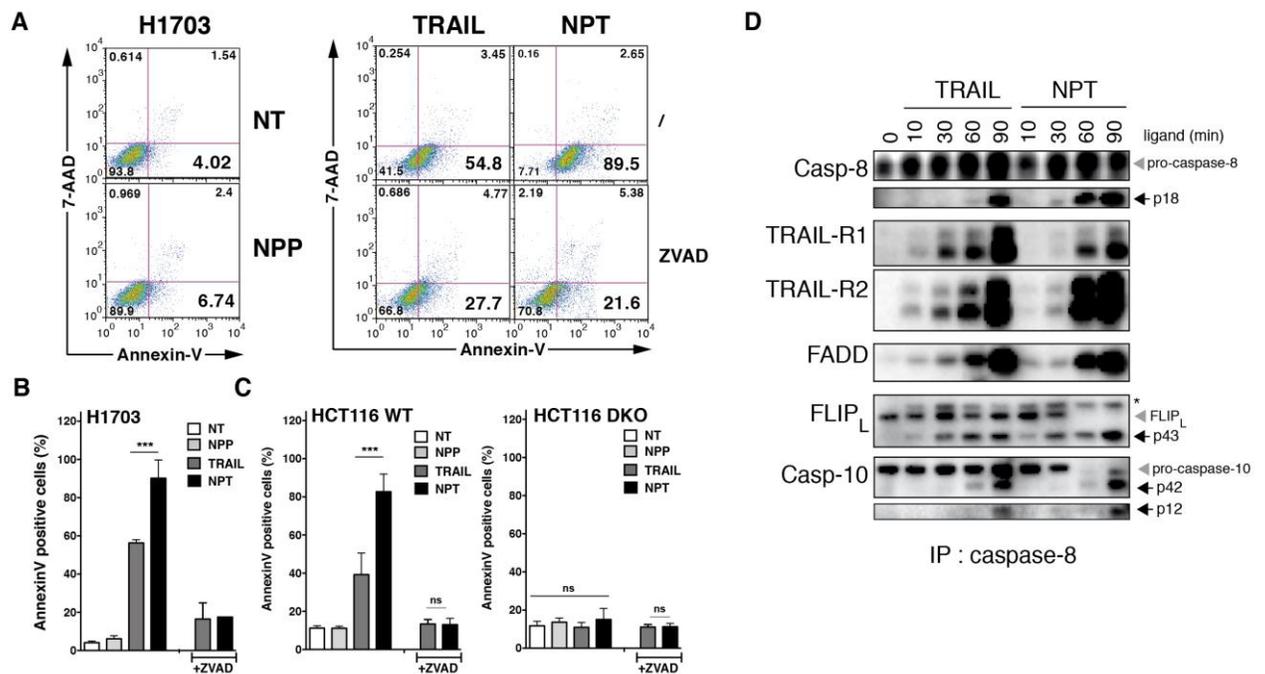


Figure 5. Analysis of cell death by apoptosis (annexin-V) and necrosis (7-AAD) following treatment by the same concentration of NPT and TRAIL (40 ng/mL) in HCT116 cell lines (WT and

DKO) and (20 ng/mL) in H1703 cell line. (A) Schematic representation of one result obtained on H1703 cell line with FlowJo software. (B) Percentage of Annexin-V positive cells for H1703 cell lines. (C) Percentage of Annexin-V positive cells for HCT116 cell lines (WT and DKO). Differences between selected groups were compared using non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferonni *post hoc* multiple comparison test, ***P < 0.001, compared to TRAIL stimulation alone and NPT, ns (not statistically significant). Data are the mean \pm SD (n=3). (D) Immunoprecipitation of caspase-8 and analysis of DISC formation in HCT116-WT cells stimulated with 2 μ g/mL His-hTRAIL or NPT for the indicated time periods (see Materials and Methods). After cell lysis in NP40-containing buffer, the DISC was immunoprecipitated (IP) using an anti-caspase-8 antibody and associated proteins were analyzed by Western blotting using antibodies to DR4, DR5, FADD, FLIP_L, Caspase-8 and -10 (Casp-8 and Casp-10). Caspase and FLIP cleavage products are indicated by black arrowheads, uncleaved proteins are shown by grey arrowheads. The asterisk shows nonspecific staining bands. Molecular masses are indicated in kDa.

ACKNOWLEDGMENTS

This present work was financially supported by the PRES between the Universities of Burgundy and Franche-Comté, France. We gratefully acknowledge support by the University Hospital CHU Jean Minjoz. The authors also wish to thank the Regional Council of Franche-Comte for financial support and the ARCEN center of microscopy (Dijon, France). OM team was supported by grants from the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC Labex, the Conseil Regional de Bourgogne, the ANR (SphingoDR) and the University of Bourgogne. TR was supported by an ANR (HSPathies) fellowship. We are indebted to DIACLONE (Besançon, France) for excellent anti-TRAIL receptor antibodies.

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

- (1) Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. *J Am Chem Soc* **1993**, 115, 9798-99.
- (2) Balasubramanian, K.; Burghard, M. *Small* **2005**, 1, 180-92.
- (3) Battigelli, A.; Menard-Moyon, C.; Da Ros, T.; Prato, M.; Bianco, A. *Adv Drug Delivery Rev* **2013**, 65, 1899-18920.
- (4) De Juan, A.; Perez, E. M. *Nanoscale* **2013**, 5, 7141-48.
- (5) Sozykin, S. A.; Beskachko, V. P. *Mol Phys* **2013**, 111, 930-938.
- (6) Herbst, R. S.; Eckhardt, S. G.; Kurzrock, R.; Ebbinghaus, S.; O'Dwyer, P. J.; Gordon, M. S.; Novotny, W.; Goldwasser, M. A.; Tohny, T. M.; Lum, B. L.; Ashkenazi, A.; Jubb, A. M.; Mendelson, D. S. *J Clin Oncol* **2010**, 28, 2839-46.
- (7) Micheau, O.; Shirley, S.; Dufour, F. *Br J Pharmacol* **2013**, 169, 1723-44.
- (8) Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O. *Mol Cell Biol* **2006**, 26, 7046-55.
- (9) Morizot, A.; Merino, D.; Lalaoui, N.; Jacquemin, G.; Granci, V.; Iessi, E.; Lanneau, D.; Bouyer, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; Saas, P.; Garrido, C.; Micheau, O. *Cell Death Differ* **2011**, 18, 700-11.
- (10) Jacquemin, G.; Granci, V.; Gallouet, A. S.; Lalaoui, N.; Morlé, A.; Iessi, E.; Morizot, A.; Garrido, C.; Guillaudeux, T.; Micheau, O. *Haematologica* **2012**, 97, 38-46.
- (11) Szegezdi, E.; Reis, C. R.; van der Sloot, A. M.; Natoni, A.; O'Reilly, A.; Reeve, J.; Cool, R. H.; O'Dwyer, M.; Knapper, S.; Serrano, L.; Quax, W. J.; Samali, A. *J Cell Mol Med* **2011**, 15, 2216-31.
- (12) Gasparian, M. E.; Chernyak, B. V.; Dolgikh, D. A.; Yagolovich, A. V.; Popova, E. N.; Sycheva, A. M.; Moshkovskii, S. A.; Kirpichnikov, M. P. *Apoptosis* **2009**, 14, 778-87.
- (13) Pavet, V.; Beyrath, J.; Pardin, C.; Morizot, A.; Lechner, M.-C.; Briand, J.-P.; Wendland, M.; Maison, W.; Fournel, S.; Micheau, O.; Guichard, G.; Gronemeyer, H. *Cancer Res* **2010**, 70, 1101-10.
- (14) Huet, H.; Gowney, J.; Johnson, J. A.; Li, J.; Bilic, S.; Ostrom, L.; Zafari, M.; Kowal, C.; Yang, G.; Royo, A.; Jensen, M.; Dombrecht, B.; Meerschaert, K. R. A.; Kolkman, J. A.; Cromie, K. D.; Mosher, R.; Gao, H.; Schuller, A.; Isaacs, R.; Sellers, W. R.; Ettenberg, S. A. *mAbs* **2014**, DOI:10.4161/19420862.2014.975099.
- (15) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 3838-39.
- (16) Jacquemin, G.; Shirley, S.; Micheau, O. *Cell Mol Life Sci* **2010**, 67, 3115-30.
- (17) Neumann, S.; Hasenauer, J.; Pollak, N.; Scheurich, P. *J Biol Chem* **2014**, 289, 16576-87.

Supporting Information

Nanovectorization of TRAIL with single wall carbon nanotubes enhances tumor cell killing

Al Batoul ZAKARIA^a, Fabien PICAUD^a, Thibault RATTIER^b, Marc PUDLO^a, Florent DUFOUR^b, Lucien SAVIOT^c, Rémi CHASSAGNON^c, Jeanine LHERMINIER^d, Tijani GHARBI^a, Olivier MICHEAU^{b#}, Guillaume HERLEM^{a#}.

^a Laboratoire de Nanomédecine, Imagerie et Thérapeutique, EA 4662, UFR Sciences & Techniques, CHU Jean Minjoz, Université de Franche-Comté, 25030 Besançon cedex, France

^b INSERM, UMR866, Lipides Nutrition Cancer, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 Bd Jeanne d'Arc, Dijon, F-21079 France

^c Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB), UMR 6303 CNRS Université de Bourgogne, 9 Av. A. Savary, BP 47 870, F-21078 Dijon Cedex, France

^d Centre de Microscopie INRA/UB, UMR 1347 Agroécologie, AgroSup/INRA/UB, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes-ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France.

[#] email addresses : guillaume.herlem@univ-fcomte.fr, Tel.: (33)381662067 (G. Herlem), omicheau@u-bourgogne, Tel.:(33)380393468 (O. Micheau).

Experimental

Ligand production, chemical products and antibodies: His-tagged TRAIL was produced and used as described previously.¹ Regarding functionalization experiments, all the chemicals were of analytical grade and used as received from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ultra-pure water (Milli-Q-Millipore) was used in all experiments. Anti-TRAIL R1 (B-K32), anti-TRAIL R2 (B-K29), anti-TRAIL R3 (B-H47) and anti-TRAIL R4 (B-R36) antibodies were obtained from Diaclone (Besançon, France). Alexa-488 coupled-goat anti-mouse was from molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The pan-caspase inhibitor (z-VAD-fmk) was purchased from Alexis (Coger, Paris, France). The kit for Annexin-marking (Annexin V-FITC, 7-AAD, binding buffer (10x) was from Pharmingen (BD Biosciences, California).

Single-Walled Carbon nanotubes functionalization with TRAIL: Single-Walled Carbon nanotubes (SWCNT) obtained from Unidym were produced by gas-phase catalysis (HiPco process) with an individual diameter equal to 1 ± 0.2 nm and an individual length ranging between 100 nm and 1000 nm (SWCNT median length was around 600 nm) as given by Unidym. Purified SWCNTs were suspended in a 3:1 mixture of concentrated sulfuric and nitric acid (96 % and 69 % respectively). Suspension was sonicated in a water bath (Elmasonic model S30H, 50-60 Hz, 280 W) for 4 h, and then vigorously stirred for 12 h. These two steps were repeated once. Temperature was maintained below 35°C. The resulting suspension was then diluted with 300 mL of water. The resulting nanotubes (SWCNT-COOH) were collected through a 0.2 μ m PTFE membrane, and washed with water until reaching neutral pH and dried under vacuum for 2 h.²

The effectiveness of the cutting procedure was controlled by transmission electron microscope (TEM) imagery leading to median length of SWCNT equal to 400 nm.

Preparation of PEGylated SWCNT-PSE and functionalization with TRAIL was performed as follows. 1 mg of SWCNT-COOH was mixed with 3 mg of pyrene butyric acid N-hydroxysuccinimide ester (PSE) in DMF (3 mL). This solution was sonicated in a water bath as above for 20 min and vigorously stirred for 1 h. The resulting SWCNT-PSE nanotubes were collected through a 0.2 μm PTFE membrane, then thoroughly rinsed three times with sodium phosphate buffer PBS (0.01 M; pH 8), and dried. Next, SWCNT-PSE were mixed with sodium phosphate buffer PBS (0.01 M; pH 8) plus 20 mM EDC and 50 mM sulfo-NHS, and incubated for 1 h at room temperature while stirring. Next, 1 mM preparation of branched PEG 2500-NH₂ was added in order to allow dispersion of SWCNT in aqueous solution, and the solution was incubated overnight at room temperature while stirring. Finally, unbound PEG was removed by filtration through a 0.2 μm PTFE membrane, and the PEGylated nanotubes SWCNT-PSE-PEG dispersed again in water.³ Next, 20 mM EDC and 50 mM sulfo-NHS were added to the solution containing SWCNT-PSE-PEG and the mixture was stirred for 1 h. After that, the protein His-TRAIL (2 mg/mL) was added and the sample incubated over night at room temperature while stirring. Unbound TRAIL was removed by filtration through a 0.2 μm PTFE membrane and the resulting SWCNT-PSE-PEG-TRAIL was washed twice in water. Note that all the synthesized SWCNT-PSE-PEG-TRAIL (NPT) samples were analyzed by TEM microscopy.

Estimation of the mean concentration of grafted TRAIL on nanotubes was inferred from the remaining free TRAIL recovered after functionalization, contained in the three washing solutions, after measuring protein content with the DC protein-assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), a modified Lowry assay, according to the manufacturer's instructions. The degree of SWCNT-PSE functionalization with TRAIL reached 78% with an estimated concentration of 800 $\mu\text{g/mL}$. This concentration was also estimated by statistical analysis based on images processing obtained from the TEM of SWCNT functionalized with TRAIL (Figure 1B). Calculation of the surface covered with TRAIL compared to the whole accessible nanotube surface was calculated assuming a perfect cylindrical shape for the SWCNT (around 125600 \AA^2). Then, we approximated the surface occupied by a TRAIL molecule as a sphere of radius $R=35 \text{ \AA}$ (3850 \AA^2). The ratio of the two surfaces (SWCNT over TRAIL) was about equal to 33, which represents the maximum number of TRAIL to obtain a full coverage (100%). The statistical analysis of the TEM images led to an average of 26 TRAIL molecules per SWCNTs (± 2). As inferred from this statistical analysis, TRAIL coverage on the SWCNT corresponded to 80% of the TRAIL added in the reaction mixture at the onset of the functionalization, a value corresponding to the Lowry protein assay described above. These two methods were thus in full agreement.

Cell lines & Cell culture: HCT116 Human colon adenocarcinoma cell lines were cultured with high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza). The H1703 Human squamous non-small cell lung cancer and hepatocarcinoma HepG2 cell lines were cultured in RPMI medium (Dominique Dutsher, Brumath, France) containing 10% fetal bovine serum. The Human Hepatoblastoma cell line HUH was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza) containing 10% fetal

bovine albumin. HCT116, H1703 and SK-Hep1 cell lines were purchased from the American type culture collection (ATCC). HUH & HepG2 cell lines are gifts from EFS Bourgogne–Franche-Comté (Besançon, France).

Measurement of cell viability: In 96-well plates, 40×10^3 cells per well were incubated at 37°C for 16 h with 5% CO_2 and increasing concentrations of his-hTRAIL or nanovector (NPT) from (0 to 15×10^3 ng/mL). Cell viability was measured by methylene blue after fixation of cells by PFA (2%). Optical density (OD) was measured at 630 nm by UV-visible spectrophotometer.⁴

Annexin-V staining methodology: Apoptosis was determined by detection of phosphatidylserine externalization after co-labeling with Annexin V-FITC /7-AAD. Analyses were performed on a cytometer (FACS calibur). Apoptosis is displayed as the percentage of cells presenting a positive staining compared to non-treated cells as control. Each experiment was carried out independently at least three times. Briefly, 300×10^3 cells were cultured overnight in complete medium. Next day, cells were pretreated or not with $20 \mu\text{M}$ zVAD-fmk for 1h before stimulating cells with His-TRAIL or NPT for 6 h. Then, cells were trypsinated, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, washed in PBS (1X), centrifuged at 1500 rpm for 5 min and stained for Annexin-V and 7-AAD, according to the manufacturer's instructions. The acquisition included a minimum of 10 000 cells.

Hoechst analysis: Nuclear fragmentation was assessed via Hoechst staining by determining the percentage of condensed or fragmented nuclei from at least 300 cells per conditions. 5×10^5 cells were cultured overnight in complete medium. Next day, cells were pretreated or not with 20 μM zVAD-fmk for 1 h before stimulating cells with His-TRAIL or NPT for 8 h. Cells were then trypsinated, centrifuged at 1 500 rpm for 5 min, incubated for 15 min in a cell disaggregation and coating solution (Accumax: Interchim, Montluçon, France)/PBS (V/V). After centrifugation at 1 500 rpm for 5 min, cells were fixed overnight in a 200 μL solution (PBS (1X) + PFA (1%) + Hoechst (1 mM)) at 4°C in the dark. Nuclear fragmentation was assessed and quantified using an inverted fluorescence microscope (Leica DMIRB) coupled to an AxioCam device. Pictures were taken and saved with AXIO-Vs 40 V 4.8.2.0 Carl Zeiss MicroImagin GmbH software.

Spectroscopic measurements: Raman spectra of SWCNT, SWCNT-COOH and SWCNT-PSE were measured using a RenishawinVia micro-Raman spectrometer. The excitation laser was provided by the 633 nm line of a 20 mW helium-neon laser. A reduced laser power (0.125 mW on the sample) was required to avoid heating or burning the nanotubes. An x50 microscope objective was used and the acquisition time was 10 s. The intensity of all the Raman spectra were normalized to the intensity of the graphite band (G-band) located at $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$.

ATR-IR spectra were performed on Spectrum65 PerkinElmer equipped with ATR module using a Ge crystal.

Experimentally, the three most important Raman active vibrational modes giving rise to the G-band (G for graphite), the D-band (Disorder induced band) and the radial breathing modes (RBM) are visible in the Raman spectra (Fig. S1a). From micro Raman spectroscopy, many

changes during the functionalization process can be observed such as upshift (2.2 cm^{-1}) and spectrum shape variation contrary to bulk Raman studies.⁵ In a less extent, some useful information can be extracted from ATR-IR spectra Fig. S1b. Comparison between bare and modified SWCNT highlights important differences such as the presence of -OH groups (broad peak between 3000 and 3600 cm^{-1} in the SWCNT-PSE spectra). Contrary to Raman scattering of PSE generating fluorescence, the IR-active signal of PSE is visible and very intense (between 1700 cm^{-1} and 1800 cm^{-1}), and can be related to the weak interaction between PSE and the SWCNT.

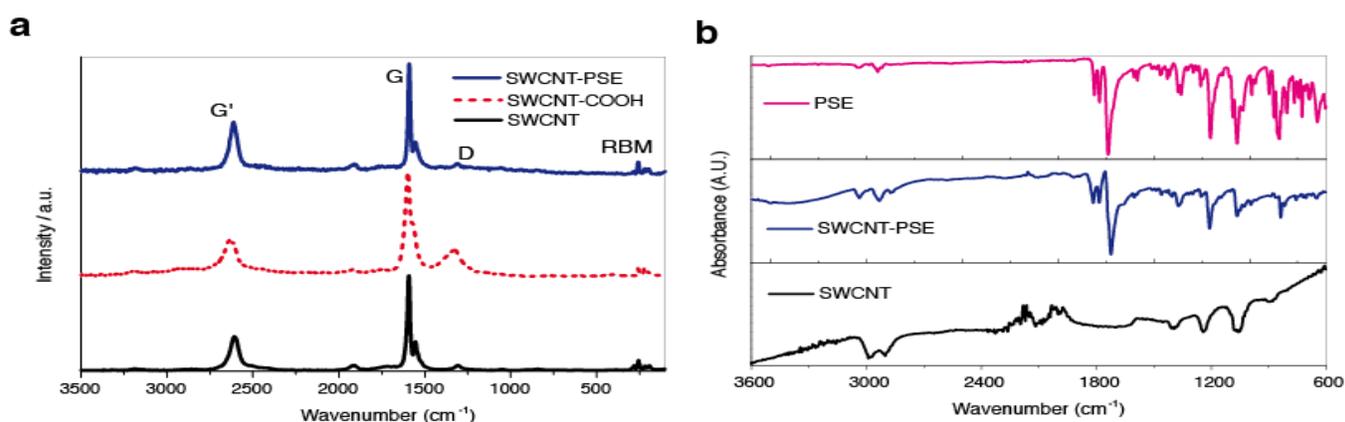


Fig. S1. (a) Raman spectra of SWCNT, SWCNT-COOH and SWCNT-PSE showing the presence of the D, G (G^+ and G^-), and G' bands. (b) Experimental IR spectra of SWCNT, SWCNT-PSE and PSE.

Transmission Electronic Microscopy (TEM): The different samples (control carbon nanotubes, functionalized carbon nanotubes with and without grafted TRAIL) deposited on collodion coated carbon grids were freshly prepared on site before observation (diameter 3.05 mm): $10\text{ }\mu\text{L}/\text{grid}$. A blocking solution (TBS 10 mM , acetylated BSA (BSA-c) 0.5% from AURION, glycine 0.1% ,

Normal goat serum (NGS) from AURION 10%) was added on each grid for 30 min, followed by 5 washings with the rinsing solution TBS/BG (TBS 10 mM, BSA-c 0.5%, glycine 0.1%). Then a polyclonal anti-histidine anti-rabbit antibody (1/100) (His-probe H-15, Santa Cruz Biotechnology) diluted in TBS was deposited for 1 h. Grids were rinsed 5 times with TBS/BG and incubated with the secondary GAR antibody (a Goat anti-rabbit IgG antibody coupled with gold particles of 1nm diameter for Electronic Microscopy, from AURION (Wageningen, The Netherlands), (1/100) was deposited for 1 hour followed by 5 washings with TBS/BG. Then, a fixing step with a solution of glutaldehyde 2% during 7.5 min was performed and followed by rinsing 5 times with distilled water. Finally, the signal was amplified with silver (AURION R-GENT SE, Electronic Microscopy) for 21 min in the dark. Grids were next rinsed 5 times with distilled water and dried for 1 h before analysis under the microscope (JEOL JEM-2100F microscope operating at 200 kV and equipped with a ultra-high resolution pole piece achieving a point- to-point resolution of 0.19 nm) operating at 80 kV.

Immunoprecipitations: For DISC analysis, 50×10^6 cells were stimulated with 2 $\mu\text{g/ml}$ of His-hTRAIL (or NPT) in 6 mL of complete medium, for the indicated times at 37°C. Cells were then washed with PBS 4°C (Dominique Dutscher), and lysed in 1 mL lysis buffer containing 1% of detergent (NP40 1% (Nonidet P40, Sigma-Aldrich), 20 mM of Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM of NaCl, and 10% of glycerol) in the presence of protease inhibitors (pepstatin A 2.5 mg/mL, aprotinin, 10 mg/mL trypsin inhibitor 2.5 mg/mL leupeptin, 5 mg/mL, Roche, France) for 20 min, then centrifuged for 15 minutes at 13 000 rpm at 4°C. Lysates were pre-cleared with Sepharose 6B (Sigma-Aldrich) for 1 h at 4°C with gentle shaking, and immunoprecipitated at

4°C overnight with G-protein Sepharose beads (Amersham Biosciences, Les Ullis, France) in the presence of 2 µg of anti-Caspase-8 antibody (Santa Cruz C-20). Beads were then washed three times, and immunoprecipitates were eluted in loading buffer (Tris-HCl 63 mM, SDS 2%, phenol red 0.03%, glycerol 10%, DTT 100 mM, pH 6.8), boiled for 5 min and processed for immunoblotting.

Western blotting: Immunoprecipitates were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose (Bio-Rad) membranes. Nonspecific binding sites were blocked by incubation in PBS containing 0.5% Tween 20 and 5% powdered milk. Immunoblots were then incubated with the following specific primary antibodies FLIP NF6 (Adipogen), FADD (BD Transduction Laboratories), Caspase-8 &10 (MBL), DR4, DR5 (Merck Millipore), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The membranes were then revealed with ECL (Advansta, WesternBright Quantum, Western blotting detection kit) by the enhanced chemiluminescence method according to the manufacturer's protocol. The chemiluminescence was detected with an imaging system 'Chemi-Doc' (Bio-Rad). Then, the results were finally analyzed with the Image Lab software.

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using the non-parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferonni *post hoc* multiple comparison test. P value ***<0.001 was considered significant. NPT results were compared with TRAIL ones. All statistical analyses were performed using Prism 5.0a software (GraphPad Software, San Diego, CA.).

References

- (1) Schneider, P. *Methods in enzymology* **2000**, 322, 325-45.
- (2) Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. *Science* **1998**, 280, 1253-56.
- (3) Heister, E.; Neves, V.; Lamprecht, C.; Silva, S. R. P.; Coleya, H. M. C.; McFadden, J. *Carbon* **2012**, 50, 622-32.
- (4) Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, 26, 7046-55.
- (5) Karachevtsev, V. A.; Stepanian, S. G.; Glamazda, A. Y.; Karachevtsev, M. V.; Eremenko, V. V.; Lytvyn, O. S.; Adamowicz, L. *J Phys Chem C* **2011**, 115, 21072-82.

Nanovector Formation by Functionalization of TRAIL Ligand on Single-walled Carbon Nanotube: Experimental and Theoretical Evidences

Al Batoul ZAKARIA¹, Fabien PICAUD¹, Eric DUVERGER², Xavier DEVAUX³, Eric DELABROUSSE¹, Tijani GHARBI¹, Olivier MICHEAU⁴, Guillaume HERLEM¹

¹ Laboratoire de NanoMédecine, Imagerie et Thérapeutique EA 4662, UFR Sciences & Techniques, CHU Jean Minjoz, Université de Franche-Comté, 25030 Besançon cedex, France

² Institut FEMTO-ST, UMR CNRS 6174, Département MN2S, Pôle Universitaire, 4 place Tharradin, BP 71427, 25211 Montbéliard Cedex, France

³ Institut Jean Lamour, UMR 7198 CNRS - Université de Lorraine, Parc de Saurupt, CS 50840, 54011 Nancy cedex, France

⁴ INSERM, UMR866, Lipides Nutrition Cancer, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université de Bourgogne, 7 Bd Jeanne d'Arc, Dijon, F-21079 France

The synthesis and the characterization of a novel nanovector based on oxidized single-walled carbon nanotubes (SWCNT) functionalized with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via noncovalent 1-pyrenebutanoic acid N-hydrosuccinimid ester (PSE) is described. Experimental noncovalent functionalized SWCNT by PSE are compared to full DFT theoretical

¹ To whom all correspondence should be addressed : guillaume.herlem@univ-fcomte.fr

predictions. For this, several experimental techniques are gathered to prove the well functionalization of oxidized SWCNT by π - π stacking such as micro Raman and XPS spectroscopy analysis coupled to full-DFT calculations. Scanning transmission electron microscopy (STEM) coupled to energy dispersive spectroscopy (EDS) underline the presence of TRAIL ligands on the nanovector.

KEYWORDS

π stacking, nanovector, SWCNT, DFT, XPS, STEM

1. Introduction

In the emerging industry of nanotechnologies, carbon nanotubes (CNTs) can be considered as building blocks, thanks to their outstanding electronic and mechanical properties, and can be used in a wide range of applications [1]. Amongst CNTs, single wall carbon nanotubes (SWCNT) present the best geometrical mechanical constraints and can be twisted, flattened, and bent without breaking their carbon backbone. Their functionalization is governed by surface chemistry of both the sidewall comprising graphene framework, and the caps made of five-membered ring structure. In reality, these two distinct regions contain defects formed during synthesis like the so-called Stone-Wales defect which favors their chemical modification [2]. The main milestones are limited mostly to the opening of the tube caps and the formation of functional groups at defect sites along the sidewalls. The resulting functionalized SWCNT via these routes basically retain their pristine electronic and mechanical properties [3].

Functionalization of SWCNT can be divided into chemical (covalent) and physical (noncovalent) methods [4]. In contrast to the covalent modification of CNTs [5-8], noncovalent functionalization by π - π stacking is an attractive synthetic route in mild condition. It offers the possibility of tethering functional groups to graphene without disturbing the electronic network. In this context, the physisorption of small aromatic molecules such as polymer wrapping, surfactants, biopolymers and endohedral SWCNT is a good proof to certify this noncovalent attachment and improving the solubility of the SWCNT quite remarkably [9,10]. Indeed, CNTs tend to aggregate due to their strong aromaticity via van der Waals interactions, yielding the formation of strong bundles of CNTs that dissociate with difficulty [11].

In this study, we developed a novel nanovector based on the functionalization of **oxidized** SWCNT with a therapeutic ligand via the 1-pyrenebutanoic acid N-hydrosuccinimid ester (PSE)

through carboxiimide based coupling procedure [12]. In this purpose, we examined in detail the different steps of the nanovector synthesis by coupling spectroscopic analyzes and molecular simulations. The choice of the SWCNT was guided by its hydrophobicity despite the drawback to form bundles, and leading to interesting diffusion coefficient of about 10^4 nm²/s in physiological medium [13]. SWCNT were shortened by chemical oxidation (noted SWCNT-COOH) in view of their internalization in cells. Indeed, the effective stability of the SWCNT functionalization including defects on nanotube sidewall comes from acid treatment. To do it, Raman spectroscopy was carried out to study the interaction between PSE and SWCNT through the modification of the three main Raman active vibration modes upon the complexation of SWCNT by PSE. XPS analyzes were done to detect the functional groups, the percentage of various atomic concentrations and the chemical shift imposed by the functional groups on the CNTs atoms. The differences in the spectroscopic results have been evaluated in relation to the oxidation and functionalization states of the SWCNT to identify unambiguously their features. Finally, DFT calculations were used with van der Waals correction to best describe the physical adsorption on the sidewall of the SWCNT. These methods give accurate geometries for the SWCNT-PSE complex where π - π stacking occurs between the pyrene moiety of PSE and the SWCNT surface. Projected density of states (PDOS) calculations reinforces the observations made by XPS analyzes and show that the spectra are strongly influenced by the density of states of the carbon on the sidewall.

2. Experimental

2.1 Chemicals and materials

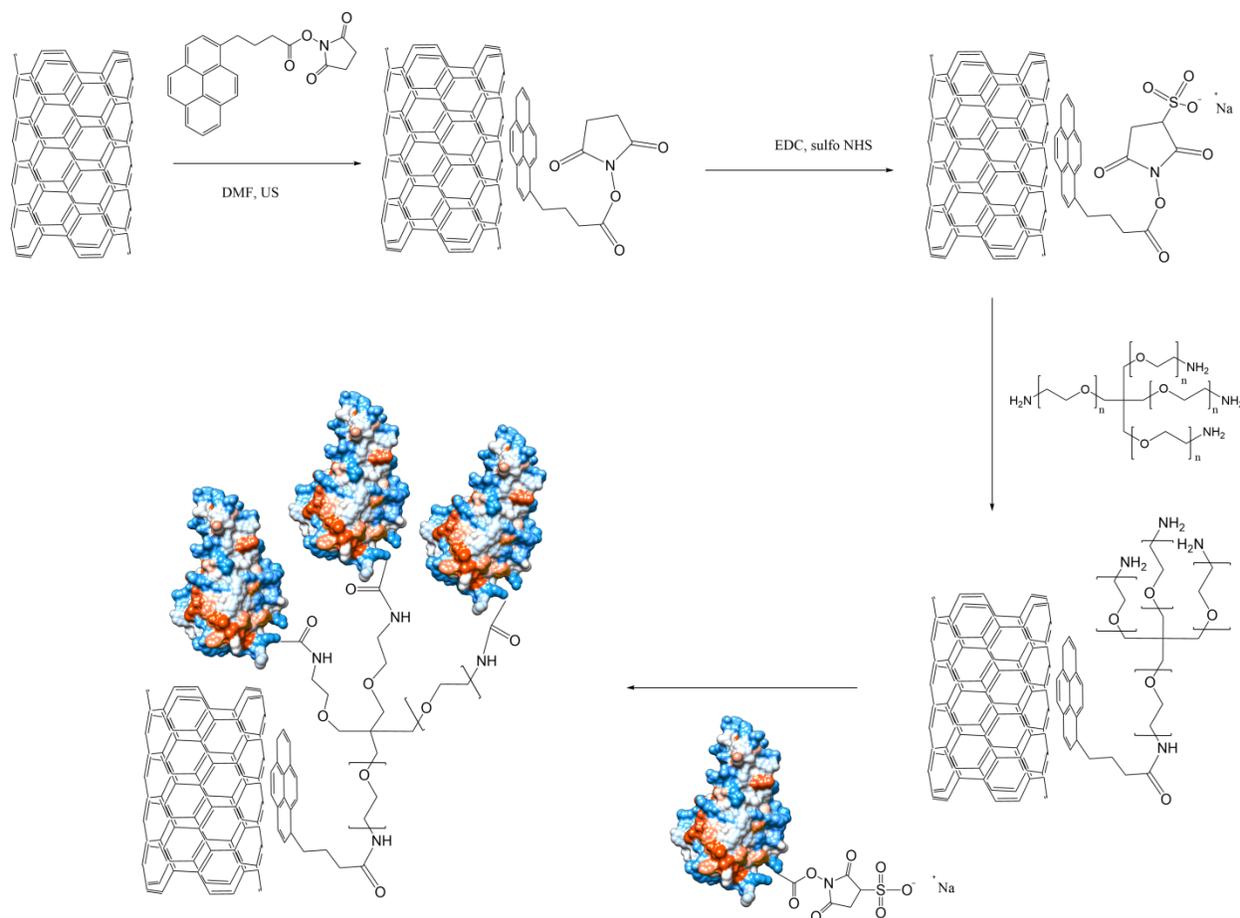
The SWCNT were produced by gas-phase catalysis (HiPco process) with an individual diameter equal to 1 ± 0.2 nm) and an individual length ranged between 100 nm and 1000 nm (the SWCNT median length was approximately 600 nm) as given by Unidym. According to the provider, the contents of elemental Fe were about 5-15 wt%. All the chemical reagents were analytical grade and were used as received from Sigma Aldrich. Distilled water was used in all experiments.

2.2 Methods

Nanovector synthesis. The detail of this synthesis is given elsewhere [14]. Briefly, purified SWCNT are cut in a 3:1 mixture of concentrated sulfuric and nitric acid (96% and 69% respectively), and sonicated in a water bath (Elmasonic model S30H, 50-60Hz, 280W) for 4h, and then vigorously stirred for 12h. These two steps are repeated once at temperature less than 35°C. The resulting suspension is then diluted with water and the SWCNT-COOH nanotubes, collected through 0.2 μ m PTFE membrane, washed with water until pH neutral, dried under vacuum for 2h, and the cutting procedure was verified using TEM imagery [15,16].

The preparation of SWCNT-PSE consists in mixing SWCNT with PSE in DMF. The mixture is sonicated in a water bath for 20 min, vigorously stirred for 1h (Scheme 1), collected through 0.2 μ m PTFE membrane, then thoroughly rinsed three times with DMF and dried under vacuum for 2h [12]. SWCNT-PSE is mixed with sodium phosphate buffer PBS (0.01 M; pH 8) plus EDC / sulfo-NHS, and incubated for 1 h at room temperature while stirring. Branched PEG (4-arm, amine terminated, average $M_n \sim 10,000$) is added to disperse carbon nanotubes, and the solution is incubated overnight at room temperature under stirring. Unreacted PEG is eliminated by filtering, and the PEGylated nanotubes are dispersed again in water [17]. EDC / sulfo-NHS are added to

the solution while stirring for 1 h. Then, His-TRAIL protein (2 mg/mL) is added and the solution is incubated overnight at room temperature while stirring. Unreacted TRAIL is removed by filtration, and the resulting SWCNT-PSE-PEG-TRAIL is washed twice in water.



Scheme 1 – Schematic assembly of the nanovector from pi-pi stacking of PSE to TRAIL grafting.

The structure of SWCNTs-PSE was observed at room temperature by scanning transmission electron microscopy (STEM) using a microscope JEOL ARM200F equipped with a CS-probe corrector, and associated with EDS microprobe. In order to reduce the irradiation damages the microscope was operated at 80 kV. Bright-field (BF) images were simultaneously registered with

a pixel time of 64 μs for 1024x1024 pixels. The convergent semi-angle of the probe was of 25 mrad, and the collection semi-angles of BF detector was 11 mrad. Dispersion functionalized SWCNTs were placed dropwise onto holey carbon grids. Then the sample was out-gazed in vacuum at 37°C (5.10^{-7} Pa) during 24h to eliminate adsorbed organic volatile compounds that could be decomposed by the electron beam and contaminate the sample with amorphous carbon during the observation.

Renishaw inVia micro-Raman spectrometer was used to measure Raman spectra of SWCNT, SWCNT-COOH and SWCNT-PSE. The laser excitation at 633 nm was provided by a 20 mW helium-neon laser and a reduced laser power (0.125 mW) was required to avoid heating the samples. An x50 microscope objective was used with an acquisition time of 10 s. The intensity of all the resulting Raman spectra were normalized to the intensity of the graphite band (G-band) located at about 1590 cm^{-1} [14].

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) experiments were carried out using a VG Escalab220i XL spectrometer comprising a rotating anode X-ray source (Al $K\alpha$), a quartz crystal monochromator, a hemispherical analyzer and a multi-channel detector. The vacuum in the analysis chamber was approximately 10^{-10} mbar. The slit width was 0.8 mm and the takeoff angle was 90°.

The modeled zigzag SWCNT was built according to a graphene lattice (folding vector indices $n=17, m=0$) rolled up into a seamless molecular cylinder [18], with a periodic length of 21.27 Å along its longitudinal axis (340 carbon atoms). The influence of the carboxylic functionalization at the end of the experimental SWCNT was supposed to be negligible in this theoretical part [19]. A PSE (48 atoms) molecule was then added on the surface of the SWCNT. To take into account

the possible aggregation between the nanotubes, calculations on a system made of two adjacent nanotubes were also performed. The distance between these two tubes was optimized first, before adsorbing any molecular species.

Nano-scale material (PSE, SWCNT and SWCNT-PSE) simulations are based on density functional theory (DFT) [20,21], norm-conserving pseudopotentials [22], thanks to the Quantum Espresso package.[23] All calculations concerning geometry optimization were performed using BLYP pseudopotentials (ultrasoft) and van der Waals correction (grimme-d2) level of theory for the exchange-correlation potential [24], Notice that LDA is known to provide errors on the binding energy by as much as 20-30% [25], as well as failing in reproducing the electronic states of strongly correlated materials.

For this reason, we optimized the system with the hybrid functional B3LYP (used to calculate the spectra), combined to dispersion corrections, as proposed by Grimme. During the periodic calculations, the self-consistent field (SCF) iterations converged when the absolute deviation between the eigenvalue energy at the current and previous SCF step was less than 10^{-6} Ry. The value of 16 Ry was taken for the kinetic energy cutoff criterion. The first Brillouin zone in the k-space was discretized with grids set as (2, 2, 1). To compare each other and avoid size effects, the three molecular systems (PSE, SWCNT and SWCNT-PSE) used the same orthogonal unit cell ($a=30.00$ Å, $b=30.00$ Å, $c=21.27$ Å). The geometry optimization at an electronic temperature of 298.15 K had a convergence criterion of $5 \cdot 10^{-3}$ Hartree/Bohr. Once optimized, the Raman and IR spectra of PSE were calculated using the Gaussian 09 package at the B3LYP/6-311++G* level of theory [26].

In order to highlight the interaction between the PSE molecule and the SWCNT sidewall, electron localization function (i.e. ELF) representation has been used. ELF is based on the

Hartree-Fock pair probability of parallel spin electrons and can be calculated in density functional theory from the excess kinetic energy density due to Pauli-repulsion [27,28]. This function produces easily understandable, pictorially informative patterns of chemical bonding and is widely used to describe and visualize chemical bonding in molecules and solids [29]. The ELF is a measure of the probability of finding an electron near another electron with the same spin related to the Pauli Exclusion Principle [30-32]. The ELF is represented as a contour plot in real space, where different contours correspond to numerical values ranging from 0.0 to 1.0. The upper limit corresponds to perfect localization (i.e. chemical bonding) and the value 0.5 corresponds to electron-gas-like pair probability (i.e. no chemical bonding). The projected density of states (PDOS) on C, et O atoms were calculated on a relaxed system after a SCF iteration taking into account the atomic basis sets and activating both band and DOS calculations with the same k-space as in the geometry optimization step.

3. Results and discussions

Despite defects introduced by sonication of SWCNT in concentrated nitric acid/sulfuric acid and dissolution in DMF, short carbon nanotubes were preferred for nanovector fabrication [33]. Typical high-resolution STEM-BF images of the SWCNT-PSE complex are shown in Fig. 1. Most of SWCNTs are aggregated in small bundles of few tubes that appear coated with a few nm -thick layer of PSE, but coated isolated tubes were also observed. Fig 1a shows a coated isolated SWCNT. The tube walls appear well defined and straight on the both sides. Around the CNT wall a second layer appears on the micrograph as a dotted line less defined. This is due to the first layer of PSE molecules that are in close interaction with the SWCNTs. The mean distance between this second layer and the tube wall is about 0.35 nm. A second dotted line was also

systematically observed on the external tubes of a bundle. It indicates that the aromatic molecules were adsorbed only on the free surfaces of the SWCNTs. Fig 1b shows a high-resolution micrograph of a bundle of 3 SWCNTs coated with PSE. The coated bundle seems to be encased in an array of piled small flakes. Tiny contrasts periodically arranged at short distance are clearly visible on the SWCNTs. These contrasts can only be due to the periodic network of the tube, superposed with PSE molecule that should stack with a certain periodicity, keeping the arrangement underlying tube.

We use these first functionalization steps to vectorize TRAIL ligand against death receptors on cancer cells. Gradually, as the chemical functionalization of the SWCNT becomes more complex such as PEGylation where fluorescence occurs, Raman spectroscopy is not helpful. Consequently, we focused our study on the nanovector characterization when vibrational spectroscopy was possible and also because of the lack of information in the literature on noncovalent functionalization of SWCNT. Labelled TRAIL on nanovectors with polyclonal anti-histidine anti-rabbit antibody coupled to gold particles (black spots with about 10 nm diameter) are directly observed by TEM (Fig. 1c), showing a good degree of SWCNT functionalization with TRAIL. Statistical analyses were performed and showed that an amount of 80% of TRAIL coverage was obtained on most of SWCNT. This lead to increased efficiency of vectorized TRAIL compared to TRAIL alone [14].

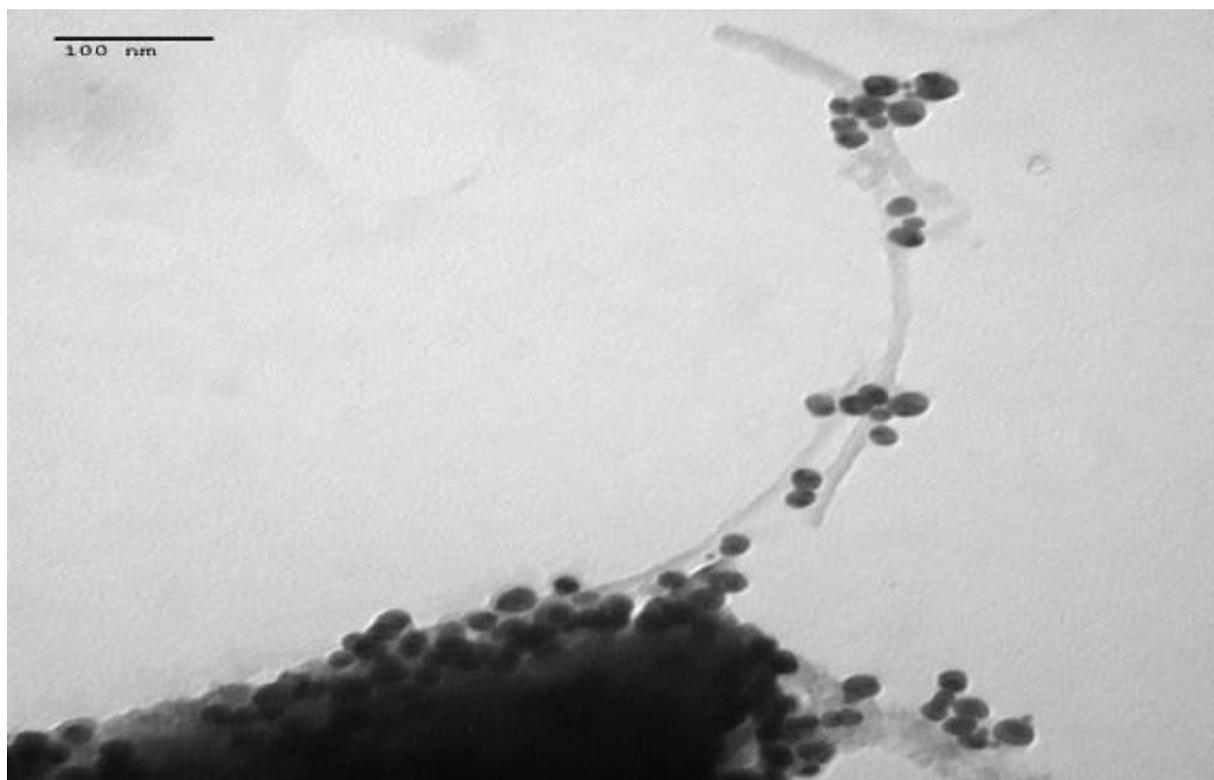
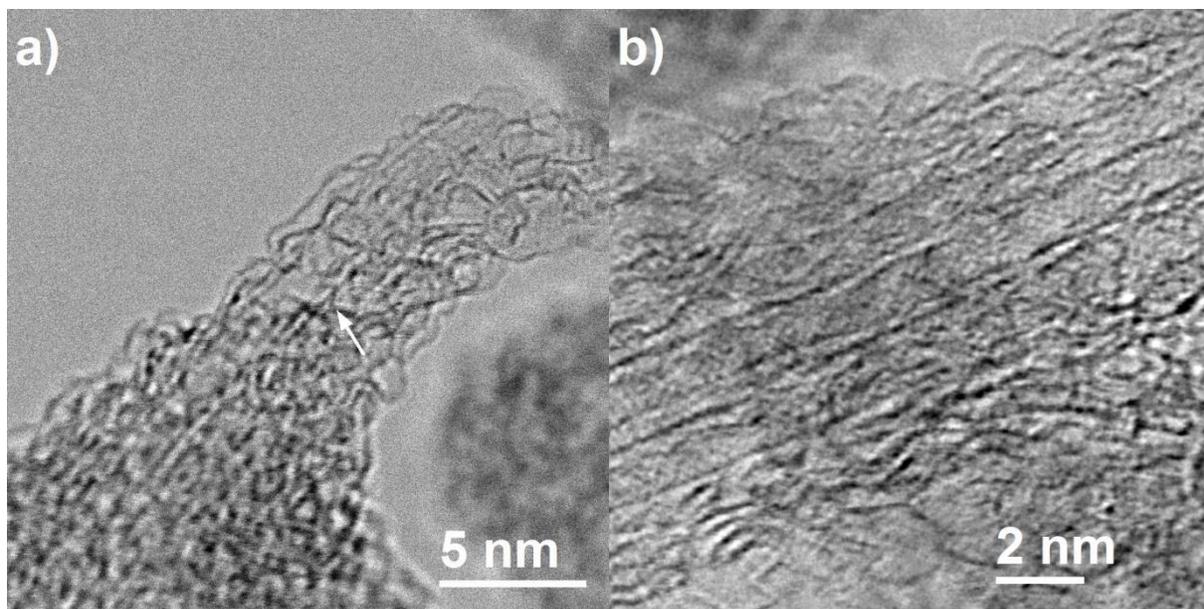


Fig. 1. a) Coated isolated SWCNT. The arrow points out the tube. b) HR-STEM of SWCNT-PSE. (c) TEM image of the labelled TRAIL with gold nanoparticle on the nanovector and amplified signal with silver.

As expected, their assembly into bundles markedly affects the electronic structure of SWCNT. The interaction between the carbon atoms of the sidewall and the pyrene moiety involves significant changes on spectroscopic data. SWCNT are able to withstand quite high incident laser power levels, giving a reproducible Raman signal over large periods of time (>30 min) without noticeable photodegradation under ambient conditions. Theoretically, the number of Raman and infrared-active phonon modes depends exclusively on the chiral indices and can be deduced from the analysis of the point groups of zigzag SWCNT yielding 8 Raman-active and 3 IR-active modes. As observed previously, the three most important Raman active vibrational modes giving rise to the G-band (G for graphite), the D-band (Disorder induced band) and the radial breathing modes (RBM) are visible.[6,14]. The characteristic D-band present between 1250 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} , and due to sp^2 (and sp^3)-hybridized carbon material, is enhanced when disorder in the carbon network appears. Once G-bands have been normalized to the same intensity (Fig. 2), it is easier to compare and follow the variation of the D-band intensities from the bare SWCNT to the functionalized SWCNT. The Raman spectrum of SWCNT-COOH displays high D-band intensity at 1320 cm^{-1} as compared to SWCNT. This result indicates that acidic treatment increases the sp^3 character of the SWCNT-COOH, and introduces carboxylic groups on defect sites. The passage from SWCNT-COOH to SWCNT-PSE (D-band at 1308 cm^{-1}) could be directly connected to the decrease of the D-band intensity. The variation of the D/G ratio in this case underlines the stabilizing role of the PSE π - π stacking on the damaged SWCNT-COOH.

Finally, the G-band, ranged between 1500 cm^{-1} and 1600 cm^{-1} , deals with the tangential stretching modes and depends strongly on the nanotube chirality. If the group theory predicts six Raman-active modes for chiral nanotubes, coming from their perfect cylindrical symmetry, we

observe experimentally only two main G-bands. One sharp peak (denoted as G+) is located at 1591.9 cm^{-1} for the bare SWCNT (and displaced at 1590.1 cm^{-1} and 1597.5 cm^{-1} for the SWCNT-PSE and the SWCNT-COOH respectively) and another one, a side peak (G-), at 1554.3 cm^{-1} (same value for the SWCNT-PSE and 1574.0 cm^{-1} for the SWCNT-COOH). It has been shown that these spectra with high (G+) and low (G-) frequency and intensity components highlight a semiconducting behavior [34] for the three kinds of SWCNT. In addition, the displacements and enhancements of the G bands when the SWCNT-COOH becomes SWCNT-PSE could be clearly attributed as the signature of the PSE presence on the sidewall of the SWCNT. Plotting the theoretical spectrum of the optimized PSE, we observe the PSE contribution to the Raman signature of the SWCNT-PSE complex in Fig. 2 where its presence is clearly underlined by specific peaks at about 1236 cm^{-1} , around 1400 cm^{-1} and 1623 cm^{-1} . Notice that IR spectroscopy is not as relevant as Raman for SWCNT studies. But, as shown previously it remains interesting when fluorescence occurs (case with PSE). Indeed, the PSE band is visible and very intense, and denotes clearly the weak interaction of PSE and SWCNTs [14].

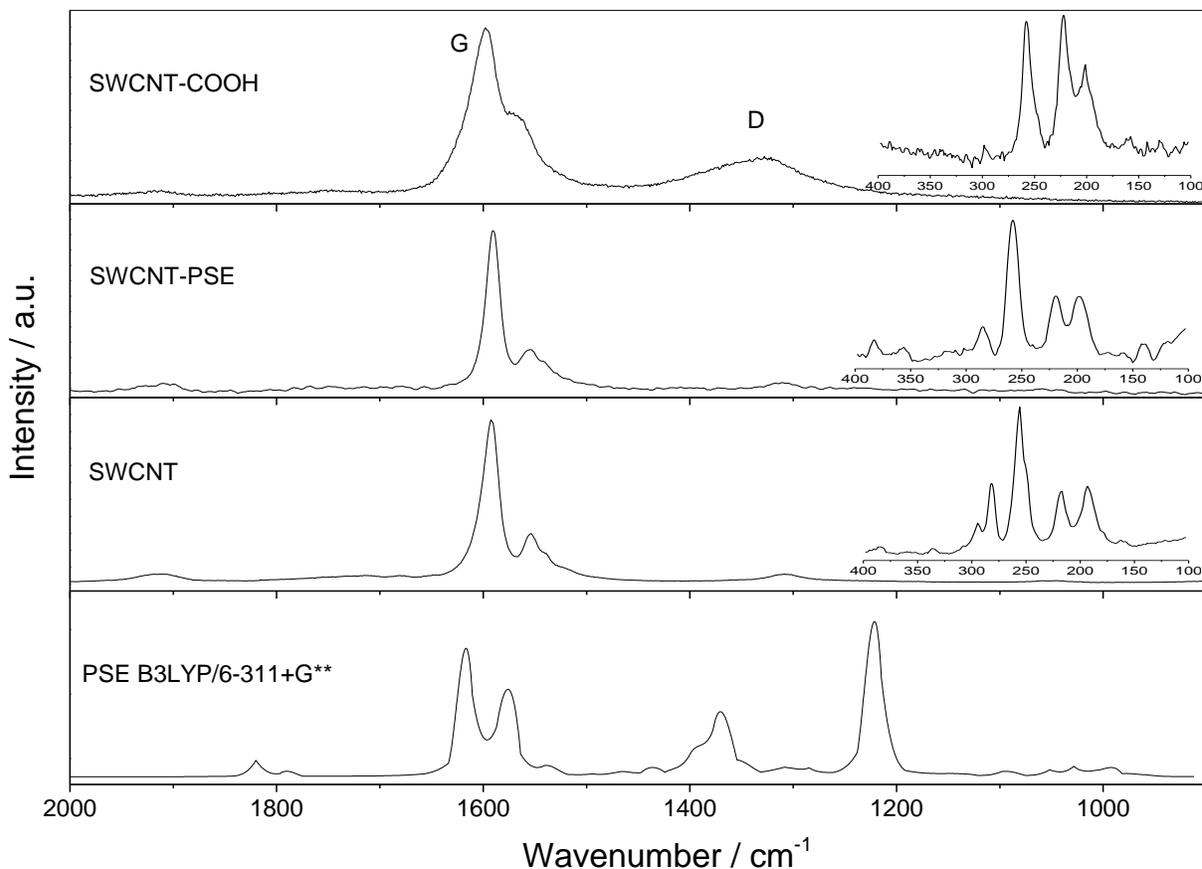


Fig. 2 – Raman spectra of SWCNT, SWCNT-COOH and SWCNT-PSE show the presence of the G and D main features at high wavenumbers. RBM regions are depicted in the inset for the three experimental SWCNTs in lower wavenumber range. Theoretical PSE spectra is given for comparison with experimental one.

The peak areas of the D and G bands for SWCNT, SWCNT-COOH and SWCNT-PSE has been compared in Table 1 to estimate the level of defects at several steps of the synthesis. The ratio of D / G bands gives an estimate of the relative level of defects present in the corresponding sample materials, showing an increase of defects generated after acid treatment, and then a decrease of the ratio value after adding PSE. From micro Raman spectroscopy, many changes during the

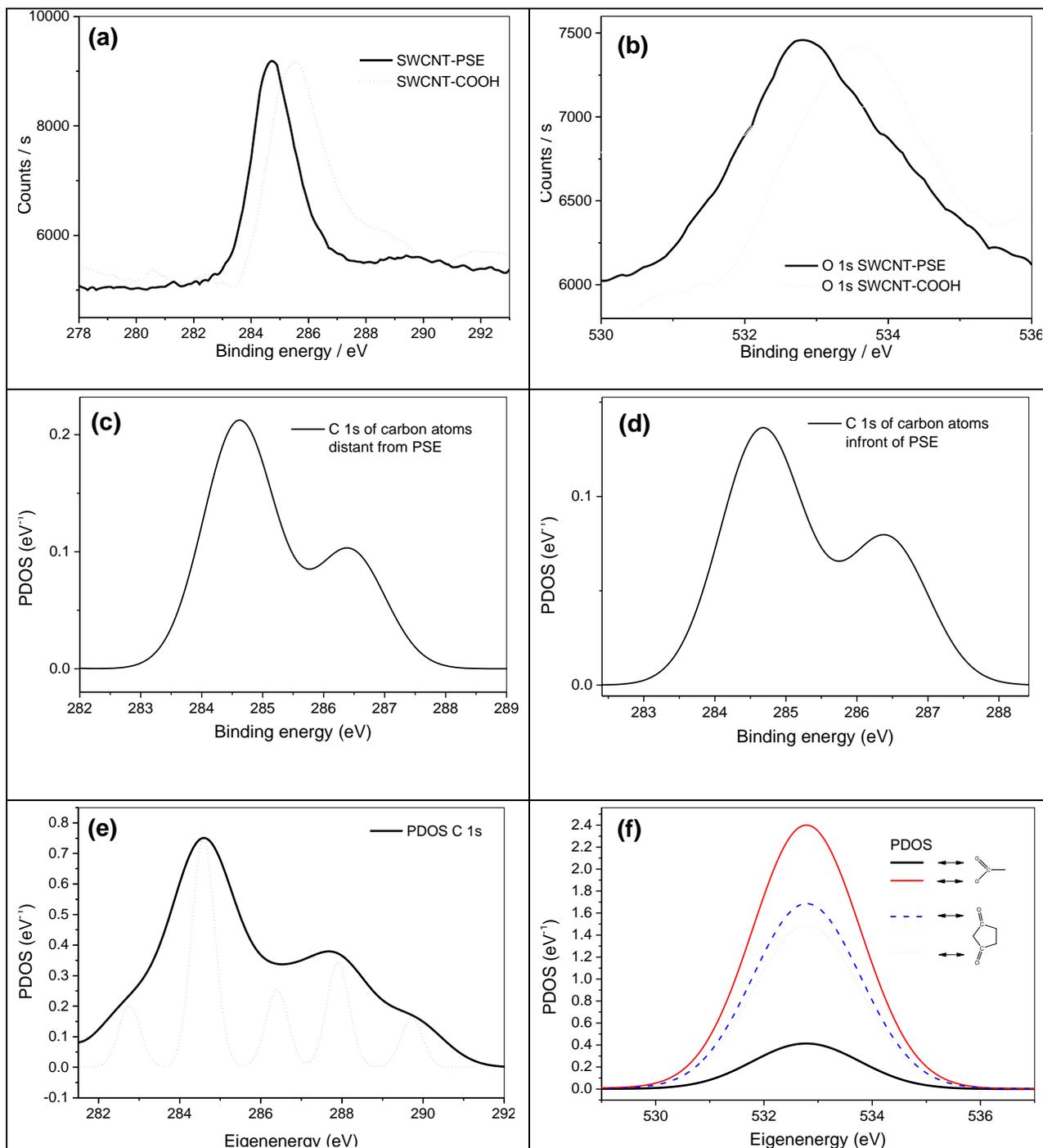
functionalization process can be observed such as upshift and spectrum shape variation contrary to bulk Raman studies [35]. A small shift of 2.6 cm^{-1} of the RBM region has been also observed between oxidized SWCNT and SWCNT-PSE cases. While small, this could be interpreted as a modification of the mean SWCNT diameter due to the PSE adsorption.

	D band	G band	ration
SWCNT	2.189	6.638	0.330
SWCNT-COOH	9.782	8.747	0.522
SWCNT-PSE	2.172	5.245	0.414

Table 1. Integrated areas of D and G bands plus the ratio of D/G bands, estimating the relative level of defects generated in the SWCNT sidewall.

The XPS spectrum (Fig. 3a) shows distinct carbon peaks, representing the major constituents of the SWCNT-PSE complex. The main peak structure for the C 1s at a binding energy (BE) of 284.7 eV and its prominent raised bump at 289.3 eV is similar to that reported in the literature [36]. Indeed, the functionalized nanotubes have been previously shortened in an oxidative acid and therefore have carboxylic functional groups attached to their ends. Thus, oxygen of the carboxylate and ketone groups is responsible for the XPS O 1s peak at 532.9 eV as displayed on Fig 3b. Following XPS analysis, oxygen content remains stable around 14 at. % from SWCNT-COOH to SWCNT-PSE. But unlike the O 1s peak of the SWCNT-COOH, the SWCNT-PSE one is well-defined suggesting favorable stabilization of the damaged nanotube after acidic treatment by charge transfer from π -stacked PSE. Besides, the carbon content tends to diminish in aid to nitrogen atom when the SWCNT-COOH are functionalized with PSE (C 1s 86 at. % for

SWCNT-COOH compared to C 1s: 81 at. % (N 1s: 5 at. %) for SWCNT-PSE). This small amount of nitrogen measured by XPS could be, to the best of our knowledge, interpreted as a low PSE coverage on the oxidized SWCNT.



--	--

Fig. 3 - XPS spectra of SWCNT-COOH and SWCNT-PSE for (a) C 1s and (b) O 1s core binding energies. PDOS of SWCNT-PSE for C 1s region of carbon atoms (c) distant from PSE and (d) in front of PSE, and (e) effect of SWCNT length. (f) O 1s region.

To corroborate the experimental results, we have performed density functional optimization including Van der Waals forces of the functionalized SWCNT in order to first well localize the adsorption geometry of the PSE and then, to extract from these full quantum data, those allowing us to plot the different spectra of the systems. In our DFT calculations, we have chosen to take an infinite length along the SWCNT axis in order to favor the π - π stacking since the entire lattice bonds become equivalent. This approximation can be accepted since the concentration of PSE in experiments remains extremely low when compared to the SWCNT length. Our first calculations focused on the exact position of the adsorbed PSE. Indeed, the presence of bundles in the experimental set up could lead to adsorption in the groove sites (i.e. in the space between two adjacent tubes), in the sidewall of the SWCNT or in the interstitial channel (i.e. in the space between three adjacent tubes) which was neglected here due to the molecule size. The PSE molecule adopts preferentially the π - π stacking on the sidewall (Fig. 4a) of the SWCNT [37]. The geometrical parameters are in agreement with the experiments. The C-C bond was found equal to 1.42 ± 0.02 Å (Fig. 4b) and the gap between the pyrene moiety and the sidewall was 3.02 Å. The energy difference between the sidewall position and the groove site position is sufficiently high to conclude unambiguously on the unique π - π stacking adsorption (-2.050 eV on the sidewall compared to -1.420 eV in the groove site. While the groove site could be favored in some particular cases [38,39], the specific geometry of PSE, cannot lead to a fully optimized

geometry when adsorbed between two SWCNT. Indeed, the opposite curvature of the two SWCNT in this site is the main feature responsible for the inappropriate adsorption of the PSE. On the contrary, when PSE is placed on the sidewall of SWCNT, the molecule can adapt its structure and geometry to optimize the π - π interaction. Note that the value of the interaction energy is in quite agreement with previous work (-1.5 eV for (5,5) SWCNT).[40] The low binding energy observed in the case of the PSE adsorbed on the sidewall of SWCNT is mainly due to the position of the HOMO (-9.626 eV) under the chemical potential (-4.252 eV). In the literature it mainly came from the mixing of the HOMO (or LUMO) orbital with the SWCNT orbital. The strength of this hybridization can be deduced from the geometrical orientation of the HOMO and LUMO orbitals with respect to the SWCNT surface. As shown in Figs. 4c and 4d some wave functions along the tube circumference are allowed, whereas they remain continuous along the infinite SWCNT axis. Note that when finite size effects take place, some modulations of the electronic structure of the SWCNT could happen leading to quantum confinement and thus discretization of the energy levels [41-43]. In our case, the size of the periodic SWCNT was chosen to avoid such events. Physisorption of PSE on the sidewall of SWCNT was also investigated from the charge transfer mechanism. Charge density differences between the isolated PSE plus the isolated SWCNT and the SWCNT-PSE complex were plotted on Fig. 4e. It shows that the π - π interaction between the two molecules induced strong intra electronic charge reorganization on the PSE between the pyrene moiety (i.e. decrease) and the succinimide group (i.e. increase) as well as on the SWCNT sidewall. All the spatial intra and intermolecular electronic charge variation gives electrostatic dipoles induced by the π - π interaction.

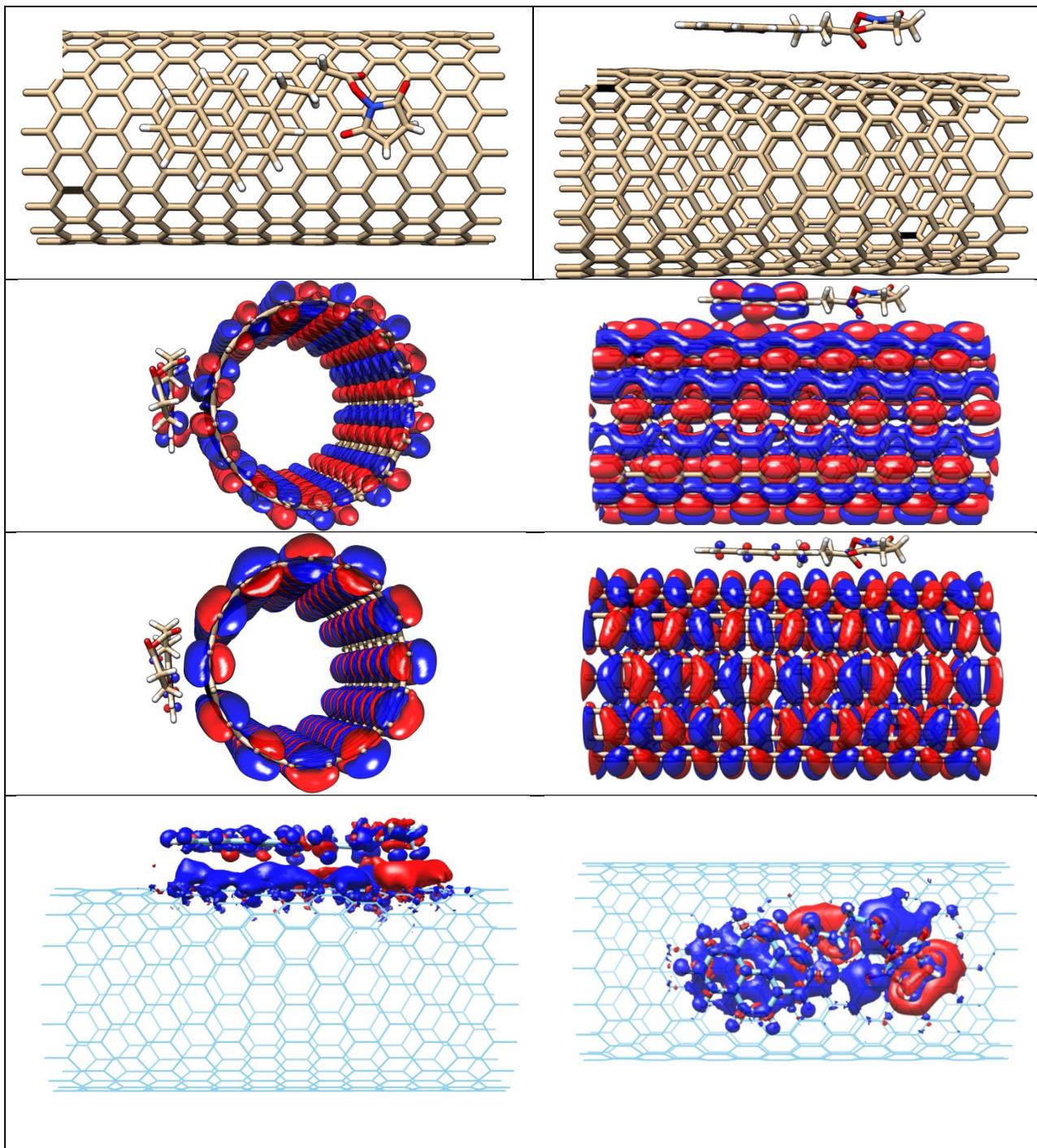


Fig. 4 – (a) Optimized geometry between SWCNT and PSE and (b) height gap between PSE and sidewall. (c) HOMO and (d) LUMO molecular orbitals (Blue and red colors indicate the bonding and antibonding orbitals, respectively) and (e) difference of charge density map (Blue and red

colors indicate the decrease and increase of total charge density, respectively). (c) HOMO and (d) LUMO molecular orbitals (Blue and red colors indicate the bonding and antibonding orbitals, respectively) and (e) difference of charge density map (Blue and red colors indicate the decrease and increase of total charge density, respectively).

ELF has been plotted in Figure 5 centered on the three main electronic localization observed in the complete system (i.e. planes containing N, O and C of the PSE respectively). From it, we show clearly that electrons are well positioned around their atomic position with no covalent sharing between the two molecules. This corroborates a physical interaction between the PSE and the SWCNT.

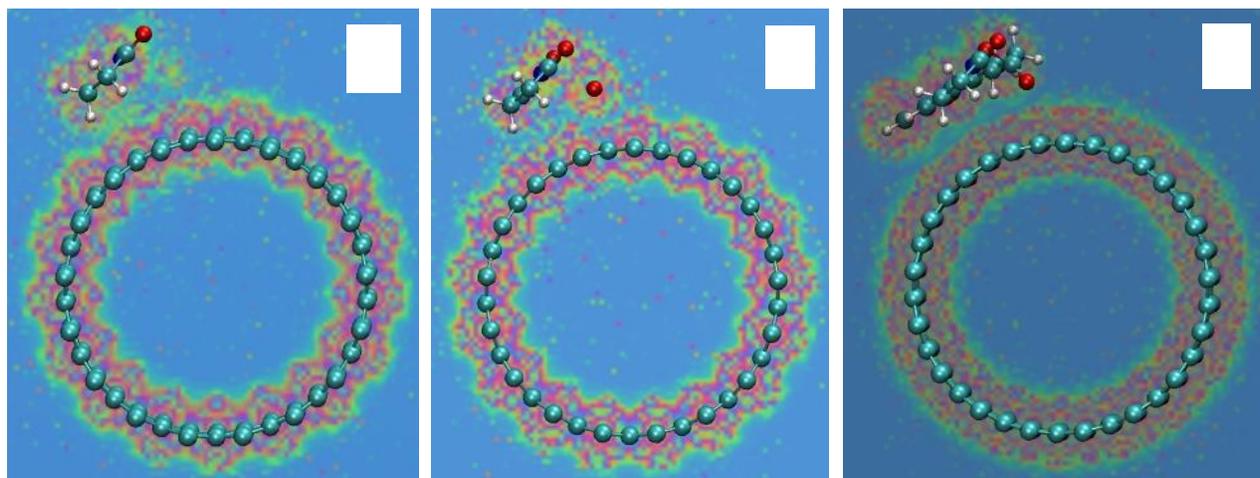


Fig. 5: (a) ELF distribution localized on the plane containing N of the PSE. (b) ELF distribution localized on the plane containing O of the PSE and (c) ELF distribution localized on the plane containing C of the PSE. The perfect localization (i.e. ELF represented in red) indicating chemical bonding is clearly centered on the atom position of each molecule.

Since XPS results have to be interpreted with care because of the presence of multiple species with different bindings (sp^2 and sp^3 carbon atoms), DOS calculation is a useful technique in this case. But rather than calculating the binding energy of a molecule which is the difference between the total energies of the initial (neutral) and the final (ionic) states, eigenvalues are usually calculated for the molecular orbitals of the neutral molecule based on Koopmans' approximation. In this way, the eigenvalues ε_n are related to the adiabatic binding energy E_{bin} of the frozen molecular orbitals by the expression

$$-\varepsilon_n = E_{bin} + E_R$$

where E_R is the relaxation energy.

The PDOS of C 1s from the SWCNT (Fig. 3c) with a length of 21.27 Å (similar to that of PSE) has a similar envelope than the XPS spectrum of carbon atoms from sidewall (Fig. 3a), but not in front of PSE. For carbon atoms in front of PSE molecule, the small peak height tends to increase to reach half the height of the most intense peak (Fig. 3d). For a SWCNT with a length of 29.85 Å, there is a broadening of the spectrum (Fig. 3e) with the occurrence of satellite peaks. Note that we have verified that the contribution of the C 1s peak from pyrene moiety is quite negligible. Concerning the O 1s peak (Fig. 3f), the profile is simpler than that of C 1s and is in very good agreement with the experimental spectrum (Fig. 3b) too. Moreover, the large charge deviation from the pyrene moiety towards the succinimide group could indicate a strong adsorption of the PSE on the SWCNT sidewall. This result, which could be interpreted by XPS spectroscopy as a downshift of 0.8 eV can be related to relocation of the electrons from the SWCNT sidewall to the PSE molecule and especially to the succinimide moiety.[44] This shift in the XPS spectra has been also observed as an upshift during functionalization of the SWCNT by hydrogen atoms

which leads to hybridization of the C 1s from sp^2 to sp^3 [45]. Here, the downshift indicates a reinforcement of the sp^2 hybridization when SWCNT-COOH becomes SWCNT-PSE. If we combine this effect to the sudden apparition/disappearance of the D band in the Raman spectra, we can conclude on the PSE adsorption by π -stacking which increases the sp^2 character of C 1s and limit the D band. Note also that the lowest distance (3.02Å) between the adsorbed PSE and the SWCNT could not reasonably lead to chemical bonding between the two molecules. The small overlapping between the orbitals of SWCNT and PSE, and ELF analysis showing clearly no electron sharing can be thus directly inferred to π - π stacking interaction.

4. Conclusions

As demonstrated above, noncovalent functionalization affects the constitution of SWCNT bundles when the attached functional groups act as stacking modifiers. **Micro**-Raman microscopy reveals important details about the vibrational of SWCNT, which cannot be accessed by bulk Raman spectra. Physisorbed PSE on SWCNT was sufficient to produce detectable shifts of the RBM and G-band. As for the XPS analysis, the experimental C 1s and O 1s core levels are in good agreement with the calculated PDOS. The major computational influence comes from the size of the investigated systems, that is to say the SWCNT length and the number of PSE molecules. Despite its limitations, DFT gives theoretical results close to experiments for systems involving π -stacking interactions. The shifts observed experimentally in the different spectra have been clearly characterized by our theoretical calculations as coming from the physisorbed PSE molecules on the SWCNT sidewall. The resulting TRAIL-based nanovector shows a coverage rate of the SWCNT surface by the ligand of about 80%.

Acknowledgements

This present work was financially supported by the PRES between the Universities of Burgundy and Franche-Comté, France. We gratefully acknowledge support by the University Hospital CHU Jean Minjoz. Computations have been performed on the supercomputer facilities of the Mesocentre de calcul de Franche-Comte, France. The authors also wish to thank the Regional Council of Franche-Comte for financial support and the ARCEN center of microscopy (Dijon, France).

REFERENCES

- [1] M.F.L. De Volder, S.H. Tawfick, R.H. Baughman, A. John Hart, *Science* 339 (2013) 535.
- [2] S. Yang, S. Yu, M. Cho, *Carbon* 55 (2013) 133.
- [3] L. Sun, G.L. Warren, J.Y. O'Reilly, W.N. Everett, S.M. Lee, D. Davis, D. Lagoudas, H.J. Sue, *Carbon* 46 (2008) 320.
- [4] N. Karousis, N. Tagmatarchis, D. Tasis, *Chemical reviews* 110 (2010) 5366.
- [5] M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, *J Am Chem Soc* 115 (1993) 9798.
- [6] K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small* 1 (2005) 180.
- [7] A. Battigelli, C. Menard-Moyon, T. Da Ros, M. Prato, A. Bianco, *Advanced drug delivery reviews* 65 (2013) 1899.
- [8] M. Burghard, *Surface Science Reports* 58 (2005) 1.
- [9] A. De Juan, E.M. Perez, *Nanoscale* 5 (2013) 7141.
- [10] S.A. Sozykin, V.P. Beskachko, *Mol. Phys.* 111 (2013) 930.
- [11] S.D. Bergin, V. Nicolosi, P.V. Streich, S. Giordani, Z. Sun, A.H. Windle, P. Ryan, N.P.P. Niraj, Z.T.T. Wang, L. Carpenter, W.J. Blau, J.J. Boland, J.P. Hamilton, J.N. Coleman, *Adv. Mater.* 20 (2008) 1876.
- [12] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J Am Chem Soc* 123 (2001) 3838.
- [13] J. Judkins, H.H. Lee, S. Tung, J.-W. Kim, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9 (2013) 1065.
- [14] A.B. Zakaria, F. Picaud, T. Rattier, M. Pudlo, L. Saviot, R. Chassagnon, J. Lherminier, T. Gharbi, O. Micheau, G. Herlem, *Nano letters* (2015).
- [15] J. Liu, A.G. Rinzler, H. Dai, J.H. Hafner, R.K. Bradley, P.J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C.B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.S. Shon, T.R. Lee, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Science* 280 (1998) 1253.
- [16] M.V. Shuba, A.G. Paddubskaya, P.P. Kuzhir, S.A. Maksimenko, V.K. Ksenevich, G. Niaura, D. Seliuta, I. Kasalynas, G. Valusis, *Nanotechnology* 23 (2012) 495714.
- [17] E. Heister, V. Neves, C. Lamprecht, S.R.P. Silva, H.M.C. Coleya, J. McFadden, *Carbon* 50 (2012) 622.
- [18] M.B. Lerner, J. Dailey, B.R. Goldsmith, D. Brisson, A.T.C. Johnson, *Biosensors and Bioelectronics* 45 (2013) 163.
- [19] S. Kraszewski, E. Duverger, C. Ramseyer, F. Picaud, *J. Chem. Phys.* 139 (2013) 174704.
- [20] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys Rev B* 136 (1964) 864.
- [21] W. Kohn, L.J. Sham, *Phys. Rev. A* 140 (1965) 1133.
- [22] I. Morrison, D.M. Bylander, L. Kleinman, *Physical review. B, Condensed matter* 47 (1993) 6728.
- [23] P. Giannozzi, S. Baroni, N. Bonini, M. Calandra, R. Car, C. Cavazzoni, D. Ceresoli, G.L. Chiarotti, M. Cococcioni, I. Dabo, A.D. Corso, S.d. Gironcoli, S. Fabris, G. Fratesi, R. Gebauer, U. Gerstmann, C. Gougoussis, A. Kokalj, M. Lazzeri, L. Martin-Samos, N. Marzari, F. Mauri, R. Mazzarello, S. Paolini, A. Pasquarello, L. Paulatto, C. Sbraccia, S. Scandolo, G. Sclauzero, A.P. Seitsonen, A. Smogunov, P. Umari, R.M. Wentzcovitch, *Journal of Physics: Condensed Matter* 21 (2009) 395502.
- [24] S. Grimme, *Journal of Computational Chemistry* 27 (2006) 1787.
- [25] R.O. Jones, O. Gunnarsson, *Reviews of Modern Physics* 61 (1989) 689.
- [26] M.J. Frisch, e. al., *Gaussian, Inc., Wallingford CT* (2009).

- [27] M. Kohout, K. Pernal, F.R. Wagner, Y. Grin, *Theor. Chem. Acc.* 119 (2008) 413.
- [28] A. Savin, H.J. Flad, J. Flad, H. Preuss, H.G. von Schnering, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (1992) 185.
- [29] P. Fuentealba, E. Chamorro, J.C. Santos, *Theoretical Aspects of Chemical Reactivity*, Elsevier, 2007.
- [30] A.D. Becke, K.E. Edgecombe, *J. Chem. Phys.* 92 (1990) 5397.
- [31] A. Ooi, L. Rairkar, J. Lindsley, B. Adams, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) 97.
- [32] A. Savin, B. Silvi, *Nature* 371 (1994) 683.
- [33] T.J. Simmons, J. Bult, D.P. Hashim, R.J. Linhardt, P.M. Ajayan, *ACS Nano* 3 (2009) 865.
- [34] A. Jorio, M.A. Pimenta, A.G. Souza, R. Saito, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, *New J. Phys.* 5 (2003) 1.
- [35] V.A. Karachevtsev, S.G. Stepanian, A.Y. Glamazda, M.V. Karachevtsev, V.V. Eremenko, O.S. Lytvyn, L. Adamowicz, *J Phys Chem C* 115 (2011) 21072.
- [36] T.I.T. Okpalugo, P. Papakonstantinou, H. Murphy, J. McLaughlin, N.M.D. Brown, *Carbon* 43 (2005) 153.
- [37] W. Fan, R. Zhang, *Sci. Chin. Ser. B Chem.* 51 (2008) 1203.
- [38] M. Arab, F. Picaud, M. Devel, C. Ramseyer, C. Girardet, *Phys. Rev. B* 69 (2004) 165401.
- [39] M. Arab, F. Picaud, C. Ramseyer, M.R. Babaa, F. Valsaque, E. McRae, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 054709.
- [40] Y. Zhang, S. Yuan, W. Zhou, J. Xu, Y. Li, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (2007) 2366.
- [41] U.J. Kim, X.M. Liu, C.A. Furtado, G. Chen, R. Saito, J. Jiang, M.S. Dresselhaus, P.C. Eklund, *Physical review letters* 95 (2005) 157402.
- [42] V. Meunier, P. Senet, P. Lambin, *Phys. Rev. B* 60 (1999) 7792.
- [43] A. Rubio, D. Sanchez-Portal, E. Artacho, P. Ordejon, J.M. Soler, *Phys. Rev. Lett.* 82 (1999) 3520.
- [44] J.E. Yang, Y. Gao, W. Zhang, P. Tang, J. Tan, A.H. Lu, D. Ma, *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 3785.
- [45] A. Nikitin, H. Ogasawara, D. Mann, R. Denecke, Z. Zhang, H. Dai, K. Cho, A. Nilsson, *Physical review letters* 95 (2005) 225507.