



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



THÈSE

Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)
Ecole Doctorale RP2E n° 410 : Sciences et Ingénierie, Ressources, Procédés, Produits et
Environnement

Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés, LRGP UPR 3349 CNRS

Soutenue à huis-clos devant la commission d'examen le 14 février 2011

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR
de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité : Génie des Procédés
par

Pierre COULEAUD

Sujet :

**Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules
hybrides multifonctionnelles pour la thérapie
photodynamique ciblant neuropiline-1**

Membres du Jury :

Rapporteurs : **Mr LEMERCIER Gilles**
Mr SOUCHARD Jean-Pierre

Professeur, ICMR, UMR 6229, Reims
Professeur, IMRCP, UMR 5623, Toulouse

Examineurs : **Mr SOL Vincent**
Mme FROCHOT Céline
Mme BARBERI-HEYOB Muriel
Mr VANDERESSE Régis

MdC, LCSN, EA 1069, Limoges
DR CNRS, LRGP, UPR 3349, Nancy
HdR, CRAN, UMR 7039, Nancy
CR CNRS, LCPM, UMR 7568, Nancy

Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Invité : **Mr TILLEMENT Olivier**

Professeur, LPCML, UMR 5620, Lyon

Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés - Groupe BioProMo

CNRS UPR 3349

Nancy Université

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES EQUATIONS	13
LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
REMERCIEMENTS.....	19
INTRODUCTION GENERALE	27
CHAPITRE I : CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE	35
I. LE CANCER ET LE DEVELOPPEMENT TUMORAL	35
I.1. LE PROCESSUS DE CANCERISATION	36
I.1.1. Bref historique du concept de cancer	36
I.1.2. Description du développement tumoral.....	37
I.2. L'ANGIOGENESE TUMORALE.....	38
I.2.1. Définition de l'angiogenèse	38
I.2.2. Mécanisme de l'angiogenèse tumorale	39
I.3. LES FACTEURS ANGIOGENIQUES	42
I.3.1. Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	42
I.3.1.a. Définition	42
I.3.1.b. Expression du VEGF.....	44
I.3.1.c. Les récepteurs du VEGF.....	45
I.3.2. Les neuropilines	46
I.3.3. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$	47
I.3.4. Les métalloprotéinases matricielles, MMPs.....	48
II. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE : PDT.....	49
II.1. HISTORIQUE ET DEFINITION	49
II.2. LES MECANISMES PHOTOPHYSIQUES DE LA PDT.....	53
II.2.1. Interactions lumière - photosensibilisateur	53
II.2.2. Production des espèces réactives de l'oxygène (EROs)	55
II.2.3. Réactions de type I.....	56
II.2.4. Réactions de type II, production d'oxygène singulet	58
II.2.5. Facteurs influençant la balance entre réactions de type I ou II	58
II.3. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE LA PDT	59
II.3.1. Les effets directs	59
II.3.2. Les effets indirects	61
II.4. LES PHOTOSENSIBILISATEURS NATURELS ET DE 1^{ERE} GENERATION	62
II.4.1. Les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques	63
II.4.1.a. Les Psoralènes	63
II.4.1.b. Le bleu de méthylène	64

II.4.1.c. L'hypéricine	65
II.4.1.d. Le rose Bengale.....	65
II.4.2. La 1 ^{ère} génération de photosensibilisateurs	66
II.5. PHOTSENSIBILISATEURS DE 2 ^{ÈME} GENERATION ET CIBLAGE PASSIF	68
II.5.1. Vers des PS absorbant dans le rouge.....	69
II.5.2. Les PS de deuxième génération ayant reçu l'AMM en Europe.....	70
II.5.2.a. Le Foscan® ou <i>m</i> -THPC	70
II.5.2.b. L'acide aminolévulinique (ALA) et ses dérivés, précurseurs de la Protoporphyrine IX.....	71
II.5.2.c. La Visudyne, traitement de la DMLA	72
II.5.2.d. Récapitulatif des PS de 2 ^{ème} génération.....	73
II.5.3. Des techniques de synthèses bien définies.....	75
II.5.4. Modifications chimiques des PS	76
II.5.5. Différentes formulations des PS	78
II.5.5.a. Les liposomes	78
II.5.5.b. Les micelles	79
II.5.5.c. Les nanoparticules	81
II.5.6. Développement de la technique multiphotonique	82
II.5.6.a. Concept d'excitation biphotonique	82
II.5.6.b. Exemples des complexes de ruthénium.....	84
II.5.7. Conclusion sur les PS de 2 ^{ème} génération.....	87
II.6. PHOTSENSIBILISATEURS DE 3 ^{ÈME} GENERATION ET CIBLAGE ACTIF	88
II.6.1. Ciblage actif direct	89
II.6.1.a. Récepteurs à œstrogène	89
II.6.1.b. Récepteur de l'acide folique	90
II.6.1.c. Récepteurs des sucres : les lectines	91
II.6.1.d. Utilisation du métabolisme des cellules cancéreuses.....	91
II.6.2. Ciblage actif indirect	92
II.6.2.a. Ciblage des intégrines	93
II.6.2.b. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	94
II.6.2.c. Ciblage de neuropiline-1.....	96

CHAPITRE II : NANOPARTICULES MULTIFONCTIONNELLES ADRESSEES POUR UNE

THERAPIE PHOTODYNAMIQUE ANTIVASCULAIRE. PREUVE DE CONCEPT 101

I. CONTEXTE DE L'ETUDE.....	102
I.1. CIBLAGE D'UNE CHLORINE PAR LE PEPTIDE ATWLPPR	103
I.2. INTERET DES NANOPARTICULES ETUDIEES	106
II. ELABORATION, ETUDES PHOTOPHYSIQUE ET BIOLOGIQUE D'UNE NANOPARTICULE MULTIFONCTIONNELLE	110
II.1. LE PHOTSENSIBILISATEUR (PS).....	110
II.1.1. Généralités sur le PS choisi	110
II.1.2. Synthèse du photosensibilisateur.....	111
II.1.2.a. Synthèse de la porphyrine	111
II.1.2.b. Synthèse de la chlorine.....	112
II.2. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES	114
II.2.1. Propriétés photophysiques de la P1COOH.....	114
II.2.1.a. Propriétés d'absorption.....	114

II.2.1.b.	Propriétés d'émission de fluorescence	115
II.2.1.c.	Production d'oxygène singulet	118
II.2.2.	Propriétés photophysiques de la TPC	119
II.2.2.a.	Propriétés d'absorption.....	119
II.2.2.b.	Propriétés d'émission de fluorescence	119
II.2.2.c.	Production d'oxygène singulet	121
II.2.3.	Résumé des propriétés spectroscopiques des PS synthétisés – Critères de choix du PS	121
II.2.4.	Activation et dérivation de la TPC	122
II.3.	LES NANOPARTICULES.....	123
II.3.1.	Formation du cœur d'oxyde de gadolinium : Gd_2O_3.....	124
II.3.2.	Encapsulation des cœurs de Gd_2O_3 dans une couche de polysiloxane contenant la TPC	125
II.3.3.	Greffage de polymères hydrophiles en surface des nanoparticules	126
II.4.	LE PEPTIDE ATWLPPR – SYNTHESSES ET COUPLAGES	127
II.4.1.	Généralités sur les peptides et leur synthèse sur support solide.....	127
II.4.1.a.	Les peptides	127
II.4.1.b.	La synthèse peptidique sur support solide (SPPS).....	129
II.4.2.	Synthèse du peptide ATWLPPR pour notre étude	133
II.4.3.	Synthèse et couplage sur support solide	135
II.4.4.	Synthèse sur support solide du peptide protégé pour couplage aux nanoparticules en phase liquide	136
II.5.	COUPLAGE DU PEPTIDE SUR LES NANOPARTICULES EN PHASE LIQUIDE.....	139
II.5.1.	Etapes de purification par dialyse.....	139
II.5.2.	Etapes de purification par ultrafiltration.....	140
II.5.3.	1^{ers} essais : excès de peptide introduit.....	141
II.5.3.a.	Essai de 3 équivalents de peptide par fonction COOH	141
II.5.3.b.	Essai à 1,5 et 0,75 équivalents de peptide par fonction COOH	142
II.5.4.	Essais à 5 peptides par nanoparticule	142
II.5.5.	Analyse en chromatographie liquide haute performance des nanoparticules après couplage.....	143
III.	ETUDE PHOTOPHYSIQUE DES NANOPARTICULES AVANT ET APRES COUPLAGE DU PEPTIDE	145
III.1.	PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES DES NANOPARTICULES AVANT COUPLAGE DU PEPTIDE.....	145
III.1.1.	Spectre d'absorption.....	145
III.1.2.	Spectre d'émission de fluorescence	147
III.1.3.	Production d'oxygène singulet.....	148
III.1.4.	Paramètres pertinents pour la quantification des nanoparticules par spectrophotométrie	150
III.2.	ETUDE PHOTOPHYSIQUE APRES COUPLAGE DU PEPTIDE	151
III.2.1.	Spectre d'absorption.....	151
III.2.2.	Spectre d'émission de fluorescence et production d'oxygène singulet	152
III.2.3.	Mesure et quantification du peptide greffé en surface.....	154
III.3.	PRINCIPAUX RESULTATS BIOLOGIQUES <i>IN VITRO</i>.....	155
III.3.1.	Cytotoxicité à l'obscurité	155
III.3.2.	Phototoxicité.....	156
III.3.3.	Affinité moléculaire pour le récepteur NRP-1.....	158

CHAPITRE III : ETUDE D'UNE NANOPARTICULE OPTIMISEE POUR LA THERAPIE

PHOTODYNAMIQUE ET LE DIAGNOSTIC IRM. VERS UNE NANOPARTICULE IDEALE 163

I.	DESCRIPTION DE LA NANOPARTICULE « NANO-STAR »	164
I.1.	PARAMETRES MODIFIES	165
I.1.1.	Type de surfactants hydrophiles	165
I.1.2.	Epaisseur de la couche de silice	167
I.1.3.	Taille du cœur en Gd_2O_3	168
I.1.4.	Concentration en TPC	169
I.1.5.	Nature et concentration du peptide par nanoparticule	169
I.2.	OPTIMISATION DU TAUX DE GREFFAGE DE TPC DANS LA MATRICE DE POLYSILOXANE	170
I.2.1.	Présentation des nanoparticules étudiées et des études menées	170
I.2.2.	Etude spectroscopique à concentration de nanoparticules constante	171
I.2.2.a.	Spectroscopie UV-visible	171
I.2.2.b.	Propriétés d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet	173
I.2.3.	Etude spectroscopique des échantillons Nanos 10 et Nanos 20	176
I.3.	ETUDE DE PLUSIEURS TAUX DE GREFFAGE DE PEPTIDE – LIMITE DU GREFFAGE DE PEPTIDE EN SURFACE	177
I.3.1.	Synthèse et caractérisation photophysique des lots	178
I.3.2.	Etude de l'affinité moléculaire pour NRP-1 de trois lots de nanoparticules	178
I.4.	CONCLUSIONS – RESUME DES CARACTERISTIQUES DE LA NANOPARTICULE ETUDIEE	180
II.	ETUDE DE LA NANOPARTICULE NANO-STAR	181
II.1.	SYNTHESE DU PEPTIDE LWRPTPA PROTEGE	181
II.1.1.	Greffage du premier acide aminé	181
II.1.2.	Synthèse et caractérisation du peptide LWRPTPA	182
II.2.	ADAPTATION DU PROTOCOLE DE COUPLAGE ELABORE PRECEDEMMENT	182
II.3.	ETUDE PHOTOPHYSIQUE DES NANO-STARS AVANT ET APRES FONCTIONNALISATION PAR LE PEPTIDE ATWLPPR	185
II.3.1.	Spectroscopie UV-visible	185
II.3.2.	Spectroscopie d'émission de fluorescence	186
II.3.3.	Production d'oxygène singulet	186
II.3.4.	Fluorescence du tryptophane et estimation du taux de peptide greffé	188
III.	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES NANO-STARS	189
III.1.	MESURES DE TAILLE PAR DIFFRACTION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE (DLS)	189
III.2.	MESURES DE POTENTIEL ZETA, ζ	190
IV.	VALIDATION BIOLOGIQUE <i>IN VITRO</i> & <i>IN VIVO</i>	193
IV.1.	CYTOTOXICITE DES NANO-STARS	193
IV.2.	PHOTOCYTOTOXICITE	194
IV.3.	AFFINITE MOLECULAIRE POUR NEUROPILINE-1	196
IV.4.	PREMIERS ESSAIS D'IRM <i>IN VIVO</i>	197
V.	METHODOLOGIE DE PLAN D'EXPERIENCES, DEFINITION, INTERET	198
V.1.	DEFINITION	199
V.2.	APPLICATION A NOTRE ETUDE	201

CHAPITRE IV : OXYGENE SINGULET, PRODUCTION, MESURES ET CONTROLES 207

I.	L'OXYGENE SINGULET : HISTORIQUE, PRODUCTION, INHIBITION	207
I.1.	DECOUVERTE ET HISTOIRE.....	208
I.2.	MECANISMES PHOTOPHYSIQUES DE LA PRODUCTION D'¹O₂.....	210
I.2.1.	La photosensibilisation.....	210
I.2.2.	Formation du PS à l'état triplet.....	210
I.2.3.	Formation de l'oxygène singulet	211
I.3.	ACTION DE L'OXYGENE SINGULET – MECANISMES D'INHIBITION ET DE REACTIVITE	213
I.3.1.	Inhibition par voie physique – Exemple des caroténoïdes	214
I.3.2.	Réactivité de l'oxygène singulet par voie chimique	215
I.3.2.a.	Réactions de type Alder-ène.....	215
I.3.2.b.	Réactions de Diels-Alder.....	216
I.3.2.c.	Cycloaddition 1,2	216
I.3.3.	Action sur les biomolécules	217
II.	DETECTION DE L'OXYGENE SINGULET	218
II.1.	MESURE DIRECTE	218
II.1.1.	Mesure directe en solution.....	218
II.1.2.	Mesure directe <i>in vitro</i>	219
II.1.3.	Mesure directe <i>in vivo</i>	220
II.2.	MESURES INDIRECTES	221
III.	NOS DIFFERENTS TRAVAUX SUR LA DETECTION DE L'OXYGENE SINGULET POUR LA PDT.....	223
III.1.	ETUDES EFFECTUEES DANS LE CADRE DE COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES	223
III.1.1.	Etude de nanoparticules de silice mésoporeuses pour la thérapie photodynamique	223
III.1.2.	Etude de photosensibilisateurs glycosylés pour la thérapie photodynamique	226
III.1.3.	Etude de précurseurs porphyriniques pour des applications antimicrobiennes de la PDT.....	228
III.2.	EVALUATIONS DE DEUX SONDAS CHIMIQUES POUR LA DETECTION INDIRECTE.....	230
III.2.1.	Evaluation de l'APF avec la tétraphénylporphyrine.....	230
III.2.2.	Evaluation du couple RNO/imidazole avec le bleu de méthylène	233
IV.	DEVELOPPEMENT DES PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACONS (PMB).....	235
IV.1.	CONCEPT DE LA PDT UTILISANT UN <i>PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACON</i>.....	235
IV.2.	SYNTHESES ET ETUDE PRELIMINAIRE DU PMB CHOISI.....	236
IV.2.1.	Synthèse du <i>quencher</i>, 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)-β-carotène.....	238
IV.2.1.a.	Synthèse du bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (2).....	238
IV.2.1.b.	Réaction de Wittig – synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)-β-carotène ((4), Q-COOMe)	239
IV.2.1.c.	Saponification de ((4), Q-COOMe) – synthèse de 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)-β-carotène ((5), Q-COOH)	240
IV.2.2.	Synthèse du peptide GPLGIAGQK et couplage à la TPC.....	241
IV.2.2.a.	Synthèse du peptide sur support solide	241
IV.2.2.b.	Couplage GPLGIAGQK à la TPC sur phase solide.....	241

IV.2.3. Premiers essais d'inhibition en solution	243
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	247
ANNEXE MATERIELS & METHODES	255
ANNEXE « INTERDISCIPLINARITE ET TRAVAIL DE THESE », PAR J.-C. ANDRE ^{358, 359}	279
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	287

Liste des Figures

Figure 1 : Mortalité imputée au cancer. Unité exprimée pour 100 000 habitants (données OMS 2008).	35
Figure 2 : Papyrus Ebers	36
Figure 3 : Etapes de l'angiogenèse tumorale (tirée de la thèse de Loraine Tirand, 2003-2007 ¹⁵).....	41
Figure 4 : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale.	42
Figure 5 : Représentation en hélice α et feuillet β du VEGF monomère (a) et dimère (b). Les ponts disulfures sont représentés par des traits noirs ³⁰	43
Figure 6 : Interaction entre neuropiline-1 (NRP-1) et VEGF-R2/KDR pour la fixation du VEGF ₁₆₅	47
Figure 8 : Formule chimique de l'éosine Y.....	50
Figure 7 : Formule chimique de l'acridine.	50
Figure 9 : Structure chimique de l'hématoporphyrine.....	51
Figure 10 : Meyer-Betz. A gauche : après injection et exposition au soleil. A droite : cinq jours après injection, l'œdème est réduit, mais quelques lésions sur les mains et le visage subsistent.	51
Figure 11 : Diagramme de Perrin-Jablonski additionné des réactions avec l'oxygène et espèces oxygénées.....	53
Figure 12 : Réactions entre le PS à l'état triplet et un substrat.....	57
Figure 13 : Réactions radicalaires.....	57
Figure 14 : Réactions conduisant à la formation de l'anion superoxyde.....	57
Figure 15 : Réaction conduisant à la formation du peroxyde d'hydrogène.	58
Figure 16 : L' <i>Ammi majus</i> Linneaus et structures des psoralènes.....	64
Figure 17 : Structure chimique du bleu de méthylène.....	65
Figure 18 : Le <i>Millepertuis</i> et la structure chimique de l'hypéricine.	65
Figure 19 : La rose de Bengale et formule développée du rose de Bengale.....	66

Figure 20 : Formule développée du Photofrin.....	66
Figure 21 : Pénétration de la lumière dans les tissus. A gauche : spectres d'absorption des principales molécules endogènes. A droite : profondeur de pénétration théorique de la lumière dans un tissu selon la longueur d'onde (en nm).....	69
Figure 22 : Structure chimique du Foscan®.....	70
Figure 23 : Formule développée de l'ALA et de ses dérivés (R = H : ALA, R = CH ₃ : méthyl-ALA, R = C ₆ H ₁₁ : hexyl-ALA).....	71
Figure 24 : Schéma de la biosynthèse de la Protoporphyrine IX (PpIX) à partir d'ALA. Les enzymes et métabolites entrant en jeu se situent dans la mitochondrie (M) et le cytosol (C). D'après Hasan <i>et al.</i> , 2000 ¹⁴¹	71
Figure 25 : Formules développées de certains PS de deuxième génération.	74
Figure 26 : Synthèses générales pour les additions de type "2+2" : A ; "3+1" : B et "4+0" : C.	76
Figure 27 : Structures chimiques simplifiées des quatre porphyrines étudiées par Berg <i>et al.</i> , 1990 ¹⁵⁵	77
Figure 28 : Représentation schématique d'un liposome.....	78
Figure 29 : Représentation schématique d'une micelle.....	79
Figure 30 : Représentation schématique d'un dendrimère de PS.	80
Figure 31 : Représentations schématiques de nanoparticules non-biodégradables (A) et biodégradables (B)..	82
Figure 32 : Fluorescence émise avec excitation à 1 photon (1P) et à 2 photons (2P), d'après Soeller <i>et al.</i> 1999 ¹⁷⁰	83
Figure 33 : Diagramme d'énergie des principales orbitales moléculaires et les transitions résultantes pour un complexe octaédrique de Ru(II) ¹⁷⁷	85
Figure 34 : Exemple de structure chimique d'un complexe de Ru(II) polypyridinique.	86
Figure 35 : Diagramme de Jablonski simplifié pour un complexe de Ru(II) ; ω : absorption à 1 ou 2 photons, ISC : croisement inter-systèmes, k_r : constante de désexcitation radiative et K_{nr} ; constante de désexcitation non-radiative, tirée de G. Lemerrier <i>et al.</i> , C. R. Chimie 11 (2008) ¹⁷⁸	86
Figure 36: Stratégies de ciblage des PS vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ciblage passif : véhiculés par des liposomes (A), ou transportés par des nanoparticules (B). Ciblage actif : PS conjugués à une molécule de ciblage (anticorps, peptide, ligand spécifique, nanoparticule adressée, etc.) (C et D), d'après Barberi-Heyob <i>et al.</i> , 2007 ¹⁸⁴	88
Figure 37 : Formule développée du conjugué porphyrine-œstradiol.....	89
Figure 38 : Expression du récepteur à l'acide folique dans différents tissus	90
Figure 39 : Formule développée des molécules étudiées par Julien Gravier ¹⁹⁰	90
Figure 40 : Formule développée de conjugués porphyrine-polyamines, d'après Sol <i>et al.</i> , 2006 ²⁰¹	92
Figure 41 : Principe de la stratégie du <i>Photodynamic Molecular Beacon</i> (PMB).....	95
Figure 42 : Représentation schématique de la nanoparticule envisagée.	102
Figure 43 : Une chlorine (TPC) couplée à l'heptapeptide ATWLPPR <i>via</i> un bras espaceur Ahx.....	103
Figure 44 : Formule chimique du DOTAREM.	107

Figure 45 : Suivi temporel de la biodistribution de différentes nanoparticules. Vue du côté où la tumeur a été greffée ²³⁴ .	109
Figure 46 : Les deux isomères de la TPC.	111
Figure 47 : Schéma de synthèse de la P1COOH.	112
Figure 48 : Schéma de synthèse de la TPC.	113
Figure 49 : Profil HPLC du brut réactionnel obtenu (colonne C ₁₈ , détection par fluorescence, $\lambda_{exc.} = 420$ nm, $\lambda_{em.} = 650$ nm, gradient : de MeOH/eau, 75/25 à 100 % de MeOH en 15 min puis 15 min à 100 % de MeOH).	113
Figure 50 : Spectre UV de la P1COOH dans l'éthanol, [P1COOH] = 2,0 μ mol/L.	114
Figure 51 : Spectre d'émission de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol.	116
Figure 52 : Déclins de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol (bleue) et de l'excitation (rouge) ; Fonction d'autocorrélation (courbe du bas).	117
Figure 53 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet produit par la P1COOH (EtOH, $\lambda_{exc.} = 415$ nm).	118
Figure 54 : Spectre d'absorption de la TPC dans l'éthanol, [TPC] = 1,11 μ mol/L.	119
Figure 55 : Spectre d'émission de fluorescence de la TPC (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	120
Figure 56 : Déclins de fluorescence de la TPC dans l'EtOH (bleue) et de l'excitation (rouge) ; Fonction d'autocorrélation (courbe du bas).	120
Figure 57 : Spectre d'émission de l'oxygène singulet produit par la TPC (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	121
Figure 58 : Schéma de synthèse de la TPC-NHS (représentation pour un seul isomère).	122
Figure 59 : Schéma de synthèse de la TPC-APTES.	123
Figure 60 : Schéma général de synthèse des nanoparticules citées.	124
Figure 62 : Clichés (A) TEM et (B) HRTEM des cœurs de Gd ₂ O ₃ .	125
Figure 63 : Mesure de tailles des cœurs de Gd ₂ O ₃ par DLS.	125
Figure 64 : Représentation schématique des étapes de synthèse de NP-TPC-PEG.	127
Figure 65 : Structures générales des acides aminés. Le groupement amine est représenté en bleu, le groupement carboxylique en rouge et la chaîne latérale en vert.	128
Figure 66 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés notés R-COOH et R'-NH ₂ .	129
Figure 67 : Représentation schématique des étapes de déprotection et de couplage d'acides aminés sur support solide.	131
Figure 68 : Représentation schématique de la synthèse sur support solide.	132
Figure 69 : Acides aminés utilisés pour notre synthèse sur support solide.	132
Figure 70 : Schéma des deux voies de synthèse du peptide et de couplage aux nanoparticules.	134
Figure 71 : Mécanisme réactionnel de l'activation par HBTU/BtOH et couplage.	135
Figure 72 : Résine chlorotriyl-Arg(Pbf).	136

Figure 73 : Profil LC-MS d'un brut réactionnel de ATWLPPR protégé ($M = 1248$ g/mol) sur colonne C_{18} , avec le gradient de l'élution présentée en Figure 75 avec trois modes de détection : en haut, détection UV à 280 nm, au milieu, détection de m/z entre 1243 et 1253, en bas, détection de m/z entre 620 et 630.	137
Figure 74 : Spectres de masse du pic majoritaire ($t_R \sim 15$ min).	137
Figure 75 : Stratégie d'élution optimisée.	138
Figure 76 : Suivi de trois dialyses successives par spectroscopie UV-visible (volume prélevé équivalent, pour un volume de bain de dialyse équivalent).	141
Figure 77 : Chromatogramme de nanoparticules couplées à un excès de peptide après purification (bleu), de peptide libre (rouge) et un mélange des deux solutions (vert) (colonne C_{18} , 250x10 mm, élution : MeOH/eau, détection par fluorescence : $\lambda_{exc.} = 280$ nm, $\lambda_{em.} = 350$ nm).	144
Figure 78 : Spectres d'absorption normalisés de NP-TPC-PEG (rouge) et TPC libre (bleu) dans l'EtOH.	146
Figure 79 : Spectres d'émission de fluorescence de NP-TPC-PEG et de la TPC libre (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	147
Figure 80 : Haut : Déclins de fluorescence de NP-TPC-PEG dans l'EtOH (bleu) et de l'excitation (rouge); Bas : fonction d'autocorrélation.	148
Figure 81 : Spectre d'émission de l'oxygène singulet produit par NP-TPC-PEG (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	149
Figure 82 : Mesures de fluorescence du produit de dégradation de SOSG par action de l'oxygène singulet formé par photosensibilisation de NP-TPC-DTPA excitée à 420 nm (MeOH, $\lambda_{exc.} = 504$ nm, $\lambda_{em.} = 524$ nm).	150
Figure 83 : Mesures de la concentration en TPC dans quatre échantillons de NPs selon trois méthodes différentes.	151
Figure 84 : Comparaison des spectres UV dans l'EtOH.	152
Figure 85 : Comparaison des spectres d'émission de fluorescence (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	152
Figure 86 : Comparaison des spectres de luminescence de l'oxygène singulet (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).	153
Figure 87 : Comparaison des spectres d'émission du tryptophane dans ATWLPPR libre et NP-TPC-PEG-ATWLPPR (H_2O , $\lambda_{exc.} = 280$ nm).	154
Figure 88 : Courbes de survie cellulaire de MDA-MB-231 à l'obscurité en fonction de la concentration en TPC et de la concentration en Gd ; noir : NP-TPC-PEG, orange : NP sans TPC.	156
Figure 89 : Survie cellulaire de MDA-MB-231 à 24 h d'incubation (A : [TPC]= 0,1 μ mol/L, B : [TPC] = 1 μ mol/L ; blanc : NP sans PS, gris : NP-TPC-PEG, noir : NP-TPC-PEG-ATWLPPR ; barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, $n = 6$).	157
Figure 90 : Affinité pour le récepteur NRP-1 par test ELISA en fonction de la concentration en peptide (barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, $n = 3$).	159
Figure 91 : Représentation schématique des différents paramètres influençant les trois fonctionnalités de la nanoparticule « idéale » pris en compte par le plan d'expériences.	165
Figure 92 : Formules développées du DOTA (A) et du DTPA (B).	166
Figure 93 : Formules développées du DOTAREM® (A) et du MAGNEVSIT® (B).	166

Figure 94 : Distribution de tailles en volume dans l'eau par DLS ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$)	168
Figure 95 : Représentation schématique des quatre lots de nanoparticules testées dans cette étude.	170
Figure 96 : Représentation schématique des quatre lots de NPs à une même concentration en NPs.....	171
Figure 97 : Evolution de la concentration en TPC mesurée en fonction de la TPC théorique pour les quatre échantillons.....	172
Figure 98 : Spectres UV-visible des quatre lots de nanoparticules à la même concentration en nanoparticules dans l'éthanol.	173
Figure 99 : Emission de fluorescence mesurée pour la TPC libre et les solutions de nanoparticules ($\lambda_{exc} = 419 \text{ nm}$) en fonction de l'absorbance à 419 nm dans l'EtOH.	174
Figure 100 : Emission de l'oxygène singulet mesurée pour la TPC libre et les solutions de nanoparticules en fonction de l'absorbance dans l'EtOH.	175
Figure 101 : Représentation schématique des deux lots de nanoparticules (Nanos 10 et Nanos 20) à une concentration équivalente en TPC.....	176
Figure 102 : Intensité de fluorescence en fonction de l'absorbance pour quatre concentrations différentes des deux lots Nanos 10 et Nanos 20 (EtOH, $\lambda_{exc} = 419 \text{ nm}$).	177
Figure 103 : Résultats des tests ELISA pour les trois échantillons synthétisés.	179
Figure 104 : Résine chlorotrityle portant un atome de chlore.....	181
Figure 105 : Spectres UV-visible des Nano-Stars dans l'eau à trois étapes différentes du couplage : rouge : avant couplage ; vert : après couplage et avant purification ; violet : après couplage et purification.	184
Figure 106 : Spectres UV-visible de la TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (bleu) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (rouge) dans l'éthanol.	185
Figure 107 : Spectres d'émission de fluorescence de TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (rouge) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (bleu) (EtOH, $\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$).	186
Figure 108 : Spectres d'émission de l'oxygène singulet produit par la TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (rouge) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (bleu) (EtOH, $\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$).	187
Figure 109 : Mesures de fluorescence du produit de dégradation de SOSG par action de l'oxygène singulet formé par photosensibilisation de NP-TPC-DTPA excitée à 420 nm (MeOH, $\lambda_{exc} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 524 \text{ nm}$).	188
Figure 110 : Spectre de fluorescence du tryptophane du peptide greffé sur NP-TPC-DTPA-ATWLPPR.....	189
Figure 111 : Gauche : trois mesures d'une solution de nanoparticules par DLS ; droite : données statistiques de ces trois mesures.	190
Figure 112 : Mesures de potentiel Zêta en fonction du pH de la solution pour deux concentrations en NaCl différentes (PC72 : NP-TPC-DTPA).....	191
Figure 113 : Mesures de potentiel Zêta dans différentes conditions d'expériences (PC72 : NP-TPC-DTPA)....	192

Figure 114 : Cytotoxicité à l'obscurité sur la lignée MDA-MB-231 évaluée par MTT pour différentes concentrations en TPC pour les Nano-Stars témoin (sans TPC), les Nano-Stars sans peptide et les Nano-Stars avec peptide. (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=6)	194
Figure 115 : Photocytotoxicité évaluée par MTT sur la lignée MDA-MB-231 pour différentes concentrations en TPC et en fonction de la fluence appliquée (laser à colorant 652 nm) à partir du même lot (PC146). (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=6)	195
Figure 116 : Courbes de <i>binding</i> des NP-TPC-DTPA-ATWLPPR(en rouge) et NP-TPC-DTPA-LWRPTPA (en bleu). (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=3).....	196
Figure 117 : IRM en T1 au niveau de la zone tumorale : (A) avant injection des Nano-Stars, (B) quelques minutes après l'injection intraveineuse de Nano-Stars multifonctionnelles, pour des rats xénotransplantés en orthotopique par des cellules de glioblastome multiforme humain. Images coll. CRAN & U703.....	198
Figure 118 : Plans d'expériences factoriels complets et fractionnaires.	201
Figure 119 : Diagramme de Perrin-Jablonski.	211
Figure 120 : Transfert d'énergie selon Dexter.....	212
Figure 121 : Ordre énergétique des états de l'oxygène.....	212
Figure 122 : Représentation des orbitales moléculaires des états de l'oxygène.....	213
Figure 123 : Résumé des processus d'inhibition décrits par Foote <i>et al.</i> ³⁰⁷	215
Figure 124 : Réaction de Schenck entre l'oxygène singulet et un « ène ».	216
Figure 125 : Réaction de Diels-Alder entre l'oxygène singulet et un diène.	216
Figure 126 : Exemple de cycloaddition 1,2.....	217
Figure 127 : A : Photographies de la souris traitée et de la zone imagée ; B : Clichés effectués pendant le traitement PDT aux temps indiqués. D'après Niedre <i>et al.</i> , 2005 ³²³	221
Figure 128 : Structures chimiques des trois PS (7, 9 et 11) utilisés pour la synthèse des nanoparticules.	224
Figure 129 : Structures chimiques des di- et trimères étudiés. D'après Achelle <i>et al.</i> , 2010 ³⁴⁶	226
Figure 130 : Structure chimique des précurseurs de porphyrines testés ³⁴⁷	228
Figure 131 : Voie de synthèse du couplage covalent entre les porphyrines et la cellulose ³⁴⁷	229
Figure 132 : Réaction entre l'APF et l'oxygène singulet.....	230
Figure 133 : Evolution du rapport de fluorescence de la sonde (APF) en fonction du temps	232
Figure 134 : Spectres d'absorption obtenus dans D ₂ O pour le mélange MB, RNO/imidazole dans différentes conditions : courbes continues : avant excitation ; courbes en pointillés : après excitation ; courbe verte : MB/RNO/imidazole ; courbe rouge : MB/RNO/imidazole + NaN ₃	234
Figure 135 : Evolution de l'absorbance de la RNO observée par Liu <i>et al.</i> ³³¹	234
Figure 136 : Représentation schématisée du concept de PDT par un PMB. D'après Chen <i>et al.</i> , 2004 ²¹¹	236
Figure 137 : Représentation du <i>Photodynamic Molecular Beacon</i> envisagé	237
Figure 138 : Schéma de synthèse du caroténoïde acide (5).	238
Figure 139 : Substitution nucléophile entre le dérivé bromé et la triphénylphosphine.....	239
Figure 140 : Mécanisme de la réaction de Wittig (R représente le groupement caroténoïde).	239

Figure 141 : Spectre UV de Q-COOMe dans le dichlorométhane.....	240
Figure 142 : Schéma de synthèse du couplage de la TPC au peptide GPLGIAGQK sur support solide.....	242
Figure 143 : Spectre de masse du produit final obtenu.....	242
Figure 144 : Spectres UV, de fluorescence et d'émission d'oxygène singulet de TPC-GPLGIAGQK effectués dans le toluène.	243
Figure 145 : Spectres superposés des émissions de l'oxygène singulet produit par TPC-GPLGIAGQK en présence de différents taux de <i>quencher</i> introduit dans le toluène.....	244
Figure 146 : Représentation des différentes techniques de RMN 2D.	259
Figure 147 : Profil LC-MS d'ATWLPPR protégé, colonne C ₁₈ , 5µm (250 x 10 mm), détections : UV à 280 nm (haut), MS (ESI) : m/z entre 1243 et 1253 (milieu) et m/z entre 620 et 630 (bas).	266
Figure 148 : Chromatogramme HPLC de LWRPTPA protégé brut. Détection UV à 280 nm.....	269
Figure 149 : Spectres de masses (ESI) du pic majoritaire (LWRPTPA protégé) ; gauche : (M + 2)/2 = 625 g/mol ; droite : pic de l'ion moléculaire à 1249 g/mol.	270
Figure 150 : Spectre de masse (ESI) du brut réactionnel. Pic de l'ion moléculaire à 1483,9 Da.	273

Liste des tableaux

Tableau 1 : Collaborations au sein de l' « équipe PDT » à Nancy.	32
Tableau 2 : Collaborations extérieures.	32
Tableau 3 : Récapitulatif des molécules ayant eu l'AMM ou en cours d'obtention selon le pays et leurs indications, d'après Plaetzer <i>et al.</i> , 2009147.	73
Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients des différentes générations de PS.....	97
Tableau 5 : Principales caractéristiques de composition des nanoparticules étudiées.....	110
Tableau 6 : Coefficients d'extinction molaire des différentes bandes d'absorption de la P1COOH dans l'éthanol.....	115
Tableau 7 : Coefficients d'extinction molaire des différentes bandes d'absorption de la TPC dans l'éthanol.	119
Tableau 8 : Récapitulatif des principales caractéristiques de deux PS synthétisés.....	122
Tableau 9 : Récapitulatif des données spectroscopiques mesurées.	153
Tableau 10 : Principales données mesurées par spectroscopie UV dans l'éthanol.....	171
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des rendements quantiques mesurés dans l'éthanol.....	175
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des 13 lots de nanoparticules	202
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des collaborations dont les travaux sont décrits ci-après.....	223

Tableau 14 : Viabilité cellulaire sans irradiation, après irradiation ($\lambda_{exc.} = 630-680 \text{ nm}$, 6 mW.cm^2) et rendement quantique de formation d'oxygène singulet dans les nanoparticules mésoporeuses. D'après Hocine <i>et al.</i> , 2010 ³⁴² .	225
Tableau 15 : Propriétés photophysiques mesurées pour les composés 8 à 11, dans le dichlorométhane (TPA : <i>Two-Photon Absorption</i> , GM : Goeppert-Mayer). D'après Achelle <i>et al.</i> , 2010 ³⁴⁶ .	227
Tableau 16 : Tableau général des résultats. D'après Ringot <i>et al.</i> , 2011 ³⁴⁷ .	229
Tableau 17 : Quantités d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée.	264
Tableau 18 : Quantités d'agents de couplage, de <i>capping</i> et de solvant de lavages à ajouter.	264
Tableau 19 : Gradient d'élution pour la purification d'ATWLPPR protégé.	265
Tableau 20 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide ATWLPPR protégé.	266
Tableau 21 : Quantités d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée.	267
Tableau 22 : Quantités d'agents de couplage, de <i>capping</i> et de solvant de lavages à ajouter.	267
Tableau 23 : Gradient d'élution pour la purification d'ATWLPPR protégé.	268
Tableau 24 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide LWRPTA protégé.	269
Tableau 25 : Quantités d'acides aminés utilisées pour la synthèse de GPLGIAGQK.	272
Tableau 26 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide GPLGIAGQK.	272

Liste des équations

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer.	115
Équation 2 : Rendement quantique de fluorescence ; où ϕ_f et ϕ_{f0} sont les rendements quantiques du produit analysé et de la référence choisie, I_f et I_{f0} leurs intensités de fluorescence mesurées et DO et DO_0 leurs densités optiques mesurées, n et n_0 les indices de réfraction des solvants.	116
Équation 3 : Formule utilisée pour la déconvolution.	117
Équation 4 : Rendement quantique de production d'oxygène singulet ; où ϕ_Δ et $\phi_{\Delta 0}$ sont les rendements quantiques du produit analysé et de la référence choisie, I et I_0 leurs intensités de luminescence mesurées et DO et DO_0 leurs densités optiques mesurées.	118
Équation 6 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer.	255
Équation 7 : Formule utilisée pour le calcul des rendements quantiques de fluorescence.	256
Équation 8 : Formule utilisée pour le calcul des rendements quantiques de production d'oxygène singulet.	257

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
Φ_{Δ}	Rendement quantique de production d'oxygène singulet
Φ_f	Rendement quantique de fluorescence
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADMDMA	Acide 9,10-anthracènediyl-bis-(méthylène) dimalonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADPA	Acide disodium 9,10-anthracènedipropionique
Ahx	Acide aminohexanoïque
ALA	Acide lémunolévulinique
Ala	Alanine
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANET	<i>Anti-neovascular Therapy</i>
APA	Acide 9-anthracènepropionique
APF	3'-p-(aminophényl) fluorescéine
APTES	Aminopropyltriéthoxysilane
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATR-FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
BBQ	<i>Black Berry Quencher</i>
BDT	Bilirubin ditaurate
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BPE	<i>bis</i> (2,2'-biphénylène)
BtOH	Hydroxybenzotriazole
CAV	Centre Alexis Vautrin
CMOS	Laboratoire de Chimie Moléculaire et Organisation des Solides
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COSY	CORrelation SpectroscopY
CRAN	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
Cy5	Cyanine 5
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCPR	Département de Chimie Physique des Réactions
DCM	Dichlorométhane
DEG	Diéthylèneglycol
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMA	9,10-diméthylanthracène
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	N,N-diméthylformamide

DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DOTA	1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide
DPBF	1,3 diphenylisobenzofurane
DRUV	Spectroscopie UV-visible de réflexion diffuse
DTPA	Diéthylène triamine penta acide
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
EROs	Espèces Réactives de l'Oxygène
EtOH	Ethanol
FCLA	3,7-Dihydro-6-[4-[2-[N'-(5-fluorescéinyl)thiouréido]éthoxy]phényl]-2-méthylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
Fmoc	Fluorénylméthylloxycarbonyl
HBTU	Hexafluorophosphate de O-benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HpD	Dérivés de l'hématoporphyrine
HPH	3'-p-(hydroxyphényl) fluorescéine
HPLC	Chromatographies Liquide Haute Performance
HRTEM	Microscopie électronique à transmission haute résolution
HUVEC	<i>Human Umbilical Vascular Endothelial Cells</i>
I_n	Intensité de fluorescence
i.v.	Intraveineux
IC	Conversion interne
IDL	Intervalle Drogue Lumière
IRM	Imagerie de Résonance Magnétique
ISC	Croisement intersystème
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LCPM	Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules
LCSN	Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
Leu	Leucine
LPCML	Laboratoire de Physico-chimie des Matériaux Luminescents
LRGP	Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MB	Bleu de méthylène
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MeOH	Méthanol
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MMPs	Métalloprotéinases Matricielles

MSN	<i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
MT-MMPs	MMPs associées à la membrane
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMM	N-méthylmorpholine
NMP	N-méthylpyrrolidone
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NPs	Nanoparticules
NRP	Neuropiline
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P1COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-4,5-dihydro benzofuran-5-sulfonyl
PDT	Thérapie Photodynamique
PEG	Polyéthylèneglycol
PFP	Pentafluorophénol
pH	Potentiel hydrogène
PMB	<i>Photodynamic Molecular Beacon</i>
PpIX	Protoporphyrine IX
Ppm	Parties par million
Pro	Proline
PS	Photosensibilisateur
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
p-TSH	<i>para</i> -Toluènesulfonhydrazide
Q	<i>Quencher</i>
Q-COOH	<i>Quencher</i> caroténoïde acide, 7'-Apo-7'-(4-carboxy)-β-carotène
Q-COOMe	<i>Quencher</i> caroténoïde ester méthylique, 7'-Apo-7'-(4- carbométhoxyphényl)-β-carotène
RBITC	Rhodamine B isothiocyanate
RGD	Peptide arginine-glycine-acide aspartique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNO	N,N diméthyl-4-nitrosoaniline
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
rpm	Rotations par minute
RSR	Recherche Socialement Responsable
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RV	Relaxation Vibrationnelle
SEMA3A	Sémaphorine 3A
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
T1	Relaxation longitudinale
T2	Relaxation transversale
TBNS	Tribenzène sulfonique
tBu	<i>tertio</i> -butyle
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photo Counting</i>

TEOS	Tétraéthoxysilane
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
TGA	Thermogravimétrie
Thr	Thréonine
TK	Tyrosine Kinase
TOCSY	<i>TOtal Correlation SpectroscopY</i>
TPC	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine
TPP	Tétraphénylporphyrine
Trp	Tryptophane
u-PA	Activateur du plasminogène de type urokinase
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
VTP	<i>Vascular Targeted Photodynamic Therapy</i>

Remerciements

Voici donc la classique, et néanmoins indispensable, section dédiée aux remerciements envers les personnes qui ont accompagné ce travail et le travailleur-thésard que je fus.

Les premiers remerciements, par ordre protocolaire, vont au directeur des laboratoires qui m'a accueilli. En effet, lors de mon passage, feu le DCPR est devenu le LRGP regroupant d'autres laboratoires de l'ENSIC, sous l'impulsion du CNRS (avec plus ou moins de tact). Bref, merci à Gabriel Wild pour son accueil dans le laboratoire, nos discussions et les parties de belote d'entre midi et deux.

Mon arrivée et mon acclimatation au paysage lorrain, que je redoutais, ont été grandement facilitées par la contribution de nombreuses personnes dont mes chefs (officiels ou non) et mes collègues de bureau/bistrot.

Ma directrice de thèse, Céline Frochot, a été d'un grand soutien et d'une amitié certaine. Tant sur le plan doctoral que personnel, nous avons pu partager de nombreux moments agréables au fil des colloques, au détour d'un spectrophotomètre ou autour d'un verre. Si nous étions plutôt d'accord sur le plan scientifique, les discussions concernant les modalités de remodelage du monde étaient plus houleuses mais tout aussi agréables. Une directrice de thèse au programme surchargé mais qui tend à ne pas oublier qu'elle encadre des thésards (ce qui est plutôt rare) et ce sans oublier le facteur humain (ce qui est encore plus rare..., le facteur humain n'ayant aucun lien avec le sacrosaint facteur h du CNRS). Alors Céline, merci pour tout.

Autre directrice de thèse qui m'a beaucoup apporté, Muriel Barberi. La biologiste de la PDTeam, qui apporte toujours sa bonne humeur et sa vision pertinente lors des réunions. La communication chimico-biologique a énormément

évolué durant ces 3 années et j'ai l'impression qu'on s'en est plutôt très bien sorti. Merci Muriel pour ce que tu m'as apporté : de la rigueur, l'ouverture vers la bio comme continuité du travail de chimiste. Le CNRS ne sait jamais reconnaître les talents de certains scientifiques, c'en est désolant.

Enfin un troisième directeur, non officiel mais très présent auprès de moi dans le labo et en dehors : Régis Vanderesse ou le chimiste (peptidiste plus exactement) « *old school* », disons à l'ancienne, de la PDTeam. Qualificatif pas du tout péjoratif, plutôt un compliment car cela implique une vision de la chimie très pointue sur le plan théorique et une excellente pratique de la chimie, alliant simplicité, logique, intelligence et un peu de bricolage. Mais au-delà de l'aspect « père chimique », Régis a aussi été une personne très importante pour moi hors labo. Nous partageons la passion de la (bonne) musique et j'espère que ton ordinateur dans le labo n'a pas fini de faire résonner les Brassens, Brel, Pink Floyd, Atahualpa Yupanqui ou autre Léo Ferré. Reste une énigme : un album de Johnny dont je te fais grâce. Alors Régis, merci pour tout ce que tu m'as appris autour d'une paillasse et autour d'un comptoir...

Autre personne importante : Sébastien Hupont. Tu m'as tout de suite accueilli et fais partager tes connaissances concernant la complexe machinerie du labo. Mais tu as aussi été très présent en dehors du labo, notamment pour m'aider à faire démarrer mes vieilles carlingues que le froid nancéien n'épargnait pas. Et puis pour tout le reste bien entendu, merci à toi Seb.

Je tiens à remercier aussi très chaleureusement Marie-Laure Viriot (ma première directrice de thèse en fait). Merci pour tes conseils avisés, je sais ce que tu as apporté au laboratoire auparavant et merci pour tes qualités humaines.

Autre aîné du laboratoire qui m'a apporté beaucoup : Jean-Claude André (ou JCA). Merci pour toutes ces discussions autour de la recherche socialement responsable, je regrette de ne pas avoir pu creuser plus cet aspect mais je sais ta ténacité et espère que tu pourras faire évoluer certaines choses. Nos anniversaires au

laboratoire étaient toujours des moments très agréables autour d'une vision commune et de partage des bonnes choses.

Ensuite merci à tous les autres membres du laboratoire qui m'ont aidé dans ce travail. Je pense particulièrement à Nathalie, notre très chère secrétaire, à Malik autre secrétaire de talent.

Je pense aussi à Philippe qui a intégré le laboratoire et la PDTeam avec brio et qui, je le sais, apportera de nombreuses solutions dans le labo avec intelligence et humanité. Merci Philippe pour tes coups de mains, tes précieuses aides et les discussions autour d'un café ou autre.

Puis tous les autres membres du labo que l'on retrouve souvent au café, aux pots, etc. PAG, Olivier, Hervé, Eric, Alain, Amélie, Thibault, Guillaume et plus particulièrement Fadi.

Ensuite merci tous ceux que j'ai croisés au CAV : Marlène, Hamanou, Vadim, Gaëlle, Thierry, Noémie et bien entendu Denise. Merci Denise d'avoir réussi à coopérer avec un chimiste (ça n'était pas gagné !) et j'espère que tu auras pris autant de plaisir à travailler avec moi comme ce le fut pour moi. Je te souhaite bon courage pour la suite.

Merci à tous les membres du LCPM avec qui j'ai échangé scientifiquement ou non (Emmanuelle, Olivier, Jacques, Marie...) et merci à la bande de loustics (appelés aussi doctorants et post-docs) qu'abrite le LCPM pour les parties de foot à la pep' (Florent, Pasquale, Zhou, Max, Ralph, Jin...) et les aides précieuses au labo.

Un remerciement tout spécial pour Ezatul (ou Leen) pour son amitié et ses aides. Bon courage pour la suite, en espérant vous voir du côté de la Malaisie...

Merci aussi à tous ceux que nous avons rejoint, suite à l'agrégation des labos, « les gens de l'ENSAIA » : Isabelle, Fabrice, Xavier, Caroline, Mathilde...

Enfin, restent les compagnons de bureau, les compères de paillasse et autres accompagnateurs de rades. Les principaux dans cette catégorie étant Marco, Ludo et Vincent. Tous dans un style différent ne refusaient que rarement d'aller s'en jeter un

petit après le boulot et surtout étaient présents au labo pour des conseils avisés (ou non), des aides non négligeables et pour l'ambiance générale du labo qu'on a tenté de conserver au fil des changements. Je pense notamment à la présence de fond sonore (de qualité) dans les bureaux et dans le labo. Nous n'avons pas pu concrétiser nos désirs d'amélioration de notre univers de travail : point de machine à Kebab dans le bureau, point de filet de volley, point de tireuse à bières, point de hamac pour la biblio, point de golf 18 trous dans le bureau, ô doux rêves. Merci les gars, certains matins paraissaient être un vrai calvaire mais on assurait toujours. Ensuite sont arrivés des renforts (un peu plus calmes sous certains aspects) que je souhaite remercier aussi : Aymeric et Albert.

J'en ai fini avec les remerciements des lorrains... en espérant avoir oublié personne ! Si c'était le cas, tant pis...

Un grand merci enfin à ma famille qui a supportée le destin lorrain qui m'a gagné... Merci maman et papa pour leur soutien à toute épreuve et à mes frères pour leur aide qu'ils ne soupçonnent sûrement pas. Et merci à mon grand-père.

Ainsi que tous mes potes du Limouzi, pour leur présence infaillible lors de mes retours en terre limousine où l'embuscade n'était jamais bien loin !

Enfin cette aventure n'aurait jamais été possible sans l'aide précieuse d'Eva, avec qui nous avons tenu bon tout ce temps entre les nombreux trains, les weekends trop courts et les semaines trop longues. Merci pour ce qu'Edgar Morin définit comme **le comble de l'union de la folie et de la sagesse**.

Grandmercé a totes !

« Il faut savoir s'instruire dans la gaité. Le savoir triste est un savoir mort. L'intelligence est joie »

Voltaire

« La science ne consiste pas seulement à savoir ce qu'on doit ou peut faire mais aussi à savoir ce qu'on pourrait faire quand même bien on ne doit pas le faire »

Umberto Eco

Introduction générale

Introduction générale

La thérapie photodynamique (PDT) peut être proposée comme stratégie thérapeutique anticancéreuse locorégionale à visée curative ou palliative basée sur l'interaction entre la lumière, un photosensibilisateur et l'oxygène. Après irradiation lumineuse du tissu néoplasique à traiter, le photosensibilisateur présent est excité électroniquement et *in fine* passe à un état triplet susceptible d'engendrer des réactions de photo-oxydation conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est classiquement décrit comme étant l'acteur principal responsable des réactions cytotoxiques. L'intérêt croissant pour la PDT est en partie dû à sa sélectivité : seuls les tissus qui ont simultanément incorporé le photosensibilisateur et qui sont exposés à la lumière sont sujets aux réactions cytotoxiques générées par ce traitement. Malgré cet aspect attractif, le nombre de photosensibilisateurs disponibles cliniquement reste très limité. Une conception rationnelle de photosensibilisateurs adaptés aux applications thérapeutiques passe nécessairement par un effort soutenu **d'élaboration de nouveaux composés et l'étude de leurs propriétés physico-chimiques, toxicologiques, photophysiques et biologiques.**

Une stratégie prometteuse à ce jour est la **VTP (*Vascular Targeted PDT*)**. Il ne s'agit pas d'avoir un effet de mort directe des cellules néoplasiques, mais d'éradiquer la tumeur en visant ses vaisseaux sanguins nourriciers. La potentialisation des effets vasculaires de la PDT peut être envisagée en détruisant les vaisseaux sanguins de phénotype angiogénique. Notre approche consiste à cibler l'endothélium vasculaire en couplant le photosensibilisateur avec des peptides ligands spécifiques de récepteurs transmembranaires fortement impliqués dans la vascularisation tumorale (un co-récepteur du VEGF, la neuropiline-1). Des travaux antérieurs de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse ont montré qu'un photosensibilisateur couplé à un

heptapeptide ligand reconnaissait effectivement neuropiline-1, mais avec une affinité diminuée par rapport au peptide seul. Une amélioration de l'incorporation intracellulaire et une meilleure activité photodynamique de la molécule photoactivable conjuguée ont été démontrées sur des cellules endothéliales surexprimant NRP-1. Chez des souris porteuses d'un gliome malin humain, l'agent photosensibilisant couplé s'accumule au niveau de l'endothélium tumoral et induit, après traitement, un retard de croissance tumorale statistiquement significatif. Néanmoins, des améliorations peuvent et doivent être apportées à cette stratégie pour réduire les phénomènes non spécifiques résultant d'une part, du caractère hydrophobe et agrégé du conjugué rendu moins affin pour sa cible et d'autre part, d'une capture importante par le système réticulo-endothélial.

Une solution pour pallier ces facteurs limitant est **d'utiliser une nanoplateforme multifonctionnelle**, permettant le couplage de photosensibilisateurs et de peptides d'adressage. Ceci a fait l'objet de mon projet de thèse.

L'élaboration de nouveaux composés pour des applications en thérapie photodynamique nécessite un travail **interdisciplinaire** car il s'agit d'un mode de traitement des cancers faisant intervenir une molécule (*chimie*) qui, sous l'action de la lumière (*photophysique*), va réagir avec l'oxygène présent dans les tissus pour former de l'oxygène singulet et d'autres espèces réactives de l'oxygène conduisant à la destruction des tissus cancéreux (*biologie*).

J'ai effectué ma thèse principalement au **Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés, LRGP, UPR 3349 CNRS** dans l'équipe Bioprocédés – Biomolécules, sous la direction du Dr Céline Frochot mais de façon plus large, au sein d'une équipe pluridisciplinaire, appelée « **équipe PDT** », composée de trois laboratoires nancéiens :

- ★ le **Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés, LRGP, UPR 3349**, (Dr Céline Frochot, directrice de thèse) pour la synthèse des photosensibilisateurs, l'adressage des nanoparticules et l'étude photophysique,
- ★ le **Laboratoire de Chimie-Physique des Macromolécules, LCPM, UMR 7568** (Dr Régis Vanderesse) pour la synthèse des peptides,
- ★ le **Centre de Recherches en Automatique de Nancy, CRAN, UMR 7039** pour la part située sur le site du Centre Alexis Vautrin (CAV) (Dr Muriel Barberi-Heyob, co-directrice de thèse) pour la partie biologie.

Le présent travail a été réalisé en étroite collaboration avec un quatrième laboratoire spécialiste dans les nanomatériaux qui est le **Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, LPCML, UMR 5620**, dirigé par le Pr Olivier Tillement, pour la synthèse des nanoparticules.

Les Tableau 1 et

Tableau 2, à la fin de cette introduction, présentent les personnes ayant participé à ce travail de thèse interdisciplinaire.

Dans le but d'améliorer le ciblage des néovaisseaux par des photosensibilisateurs adressés, mon sujet de thèse a donc consisté à étudier **la potentialité de l'adressage de nanoparticules hybrides, fonctionnalisées par des peptides, pour une thérapie photodynamique antivasculaire**. Au-delà du phénomène de mode qui accompagne les recherches concernant les nanotechnologies dans les différentes thématiques scientifiques ces dix dernières années, les nanoparticules possèdent des caractéristiques particulières très intéressantes et prometteuses que nous discuterons au cours ce manuscrit.

Dans un premier chapitre, je tenterai de donner au lecteur une vue globale de la problématique du cancer, en insistant sur le processus de l'angiogenèse tumorale. Ce

premier chapitre sera consacré aussi à la définition de la thérapie photodynamique (PDT), ainsi qu'aux mécanismes photophysiques et aux récents développements de la PDT. Deux revues (Bechet, Couleaud *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 2008 et Couleaud *et al.*, *Nanoscale*, 2010, en fascicule annexe), sur l'utilisation des nanoparticules en PDT et les applications des nanoparticules de silice en PDT permettront de conclure ce chapitre.

Le second chapitre exposera la synthèse, l'étude photophysique et biologique de nanoparticules de diamètre hydrodynamique de l'ordre de 10 à 15 nm, composées d'un cœur d'oxyde de gadolinium (permettant une détection par imagerie de résonance magnétique, IRM), d'une couche de polysiloxane encapsulant de façon covalente un photosensibilisateur (pour des applications en PDT), de surfactants hydrophiles (pour assurer la furtivité des nanoparticules) et fonctionnalisées par le peptide ATWLPPR ciblant un co-récepteur au récepteur au VEGF, neuropiline-1. Ce chapitre, qui représente « en temps » la partie la plus importante de mon travail de recherche, est la preuve de la faisabilité de l'élaboration d'une nanoparticule multifonctionnelle pour la PDT antivasculaire, guidée par IRM. Il a conduit à une publication expérimentale (Couleaud, Bechet *et al.*, *Nanomedicine*, 2011).

Le troisième chapitre portera sur la stratégie envisagée pour élaborer une « nanoparticule » idéale pour la PDT guidée par IRM. Je présenterai comment optimiser la composition des nanoparticules pour favoriser à la fois, **l'efficacité photodynamique**, le **ciblage du récepteur** et la **qualité du signal IRM**. Cette étude débouche sur la mise en place d'un plan d'expériences permettant de définir la ou les combinaison(s) de paramètres constitutifs de la nanoparticule qui lui assure(nt) les meilleurs résultats concernant ses trois fonctionnalités que sont le ciblage, la PDT et le diagnostic IRM.

Enfin, un quatrième chapitre sera consacré à **l'oxygène singulet**. Cette espèce réactive de l'oxygène est l'un des principaux acteurs dans le processus cytotoxique de la PDT. Je décrirai, en détail, les processus de production d'oxygène singulet par voie photonique ainsi que les différents moyens de détection et de mesure. Nos travaux relatifs à ces mesures, en collaboration avec différents laboratoires français seront résumés et les publications incluses en annexe (Brevet *et al.*, *Chemical Communications*, 2009 ; Hocine *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010 ; Achelle *et al.*, *European Journal of Organic Chemistry*, sous presse ; Ringot *et al.*, *Biomacromolecules*, sous presse). Enfin, je décrirai brièvement une stratégie relativement nouvelle en PDT pour produire de l'oxygène singulet sélectivement au niveau tumoral, utilisant des l'activité enzymatique d'enzymes, surexprimées lors du processus angiogénique. Une revue bibliographique sera incluse (Verhille *et al.*, *Current Medicinal Chemistry*, 2010) et l'étude préliminaire, à laquelle j'ai participé, sera décrite.

La conclusion générale de ce travail mettra l'accent sur les principaux résultats en ouvrant sur des perspectives dont certaines sont déjà explorées dans l'équipe PDT et les laboratoires associés. Enfin, une discussion sur l'utilisation de nanoparticules à grande échelle viendra conclure ce travail afin de recentrer le travail de recherche dans le cadre social auquel il appartient (travail en cours au LRGP en coopération avec d'autres partenaires).

★ **Tableau 1 : Collaborations au sein de l' « équipe PDT » à Nancy.**

Laboratoire	Thésards et permanents	Action	Publications
LRGP UPR 3349	Céline Frochot (D.R.) Jean-Claude André (D.R.) Philippe Arnoux (I.E.) Marc Verhille (Thésard) Aymeric Seve (Thésard)	Synthèse de photosensibilisateurs. Etudes photophysiques. Adressage des nanoparticules. Recherche socialement responsable.	Revues : Bechet, Couleaud <i>et al.</i> , 2008, <i>Trends in Biotechnology</i> . Verhille <i>et al.</i> , 2010, <i>Current Medicinal Chemistry</i> . Publications : Couleaud, Bechet <i>et al.</i> , 2011, <i>Nanomedicine</i> . Couleaud <i>et al.</i> , 2010, <i>Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia</i> .
LCPM UMR 7568	Régis Vanderesse (C.R.) Ezatul Kamarulzaman (Thésarde)	Synthèses peptidiques	
CRAN-CAV UMR 7039	Muriel Barberi-Heyob (C.R.) Denise Bechet (Thésarde) Marlène Pernot (Thésarde) Hamanou Benachour (Post- doctorant)	Etudes biologiques	

★ **Tableau 2 : Collaborations extérieures.**

Laboratoire	Thésards et permanents	Action	Publications
LPCML UMR 5620 (Lyon)	Olivier Tillement (Pr.) Stéphane Roux (Pr.) François Lux (MdC) Anne-Charlotte Faure (Thésarde) Maxime Saint-Jean (A. I.)	ANR PCV Nano- VTP (2008-2011) Synthèses des nanoparticules	Couleaud, Bechet <i>et al.</i> , 2011, <i>Nanomedicine</i> .
LCSN EA 1069 (Limoges)	Pierre Krausz (Pr) Vincent Sol (MdC) Cyril Ringot (Thésard)	Elaboration et étude antimicrobienne de fibres de coton couplées à des PS	Ringot <i>et al.</i> , soumise.
CMOS UMR 5253 (Montpellier)	Jean-Olivier Durand (Pr) David Brevet (Post-doctorant)	Elaboration et étude biologique de nanoparticules de silice mésoporeuse glycosylées	Revue : Couleaud <i>et al.</i> , 2010, <i>Nanoscale</i> . Publications : Brevet <i>et al.</i> , 2008, <i>Chemical Communications</i> . Hocine <i>et al.</i> , 2010, <i>International Journal of Pharmaceutics</i> .
UMR 176 Institut Curie (Paris)	Philippe Maillard (Pr) Sylvain Achelle (Thésard)	Elaboration et études biologiques de photosensibilisateurs glycosylés absorbant en biphoton	Achelle <i>et al.</i> , sous presse, <i>European Journal of Organic Chemistry</i> .

Chapitre I :

Contexte général de l'étude

Chapitre I : Contexte général de l'étude

I. Le cancer et le développement tumoral

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, soit 13% de la mortalité mondiale. A titre d'information, voici dans la Figure 1, une donnée de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2008 sur la mortalité due au cancer dans le monde.

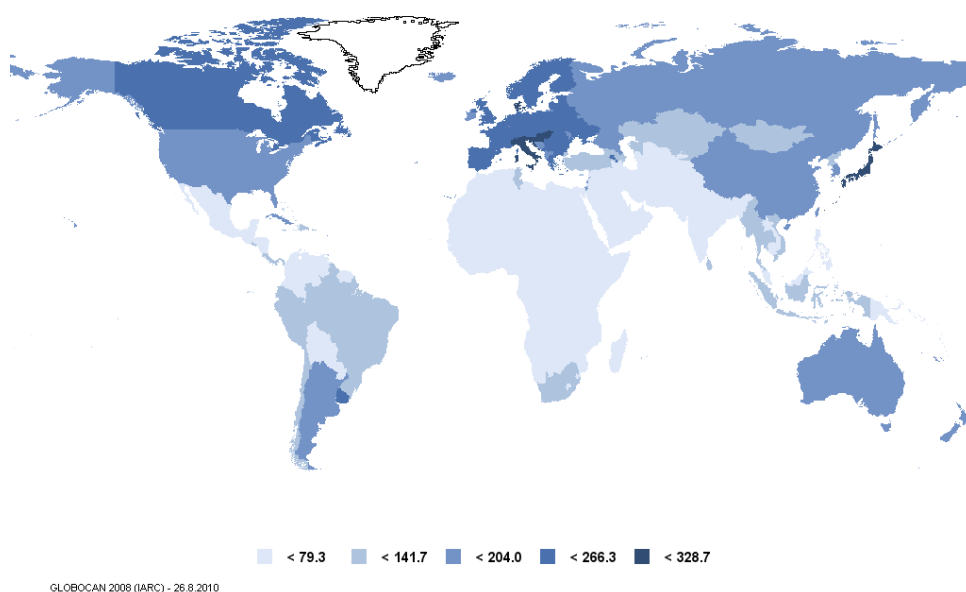


Figure 1 : Mortalité imputée au cancer. Unité exprimée pour 100 000 habitants (données OMS 2008).

I.1. Le processus de cancérisation

I.1.1. Bref historique du concept de cancer

Le mot **cancer** est un mot latin venant du mot grec *karkinos* qui signifie **crabe**. Le premier document faisant référence au cancer est le **Papyrus Ebers**¹ (du nom de son traducteur, l'allemand Georg Moritz Ebers en 1875) et qui aurait été rédigé entre le XVI^{ème} et le XIV^{ème} siècle avant notre ère et qui montre que le cancer était déjà connu des **Egyptiens**.

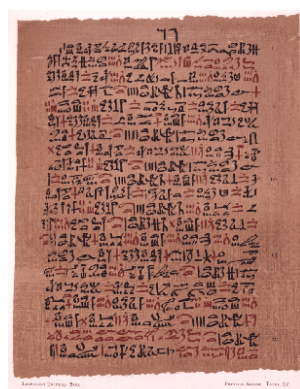


Figure 2 : Papyrus Ebers

Le papyrus présenté dans la Figure 2 montre que le cancer était **connu des Egyptiens**. Le papyrus Ebers est écrit en égyptien hiératique et représente la plus volumineuse compilation de connaissances médicales de cette époque connues à ce jour. Le parchemin de 110 pages, long de 20 mètres, décrit plus de 700 formules magiques et remèdes. Il contient d'innombrables incantations ayant pour but de détourner les démons qui causent les maladies, mais il démontre aussi une longue tradition de connaissances empiriques et d'observations. Concernant le cancer, on peut y lire : « face à une tumeur contre le dieu Xenus...tu ne feras rien contre ça ». Le seul traitement disponible à cette époque était la cautérisation. Les Egyptiens étaient cependant capables de faire la différence entre une tumeur bénigne et une tumeur maligne.

Il faut attendre le IV^{ème} siècle avant Jésus-Christ pour qu'**Hippocrate** donne la première définition de ce mal. Il le nomme « carcinome » ou « squirre », que le latin traduira en cancer en raison de l'aspect de sa propagation, ressemblant à des pattes de crabe. Hippocrate le définit comme une **tumeur dure, non inflammatoire, ayant tendance à la récurrence et à la généralisation, amenant une issue fatale.**

Le mot cancer prend à la fin du XV^{ème} siècle en français le sens de tumeur maligne (on trouve aussi cancre ou chancre). Ce nouveau sens est justifié par Henri de Mondeville (1260-1320) puis par Ambroise Paré (1509-1590) par l'aspect d'une masse centrale d'où rayonnent des veines gonflées ou des ramifications, comme des pattes, par l'adhérence de la tumeur qui s'accroche aux tissus voisins comme avec des pinces ; au début du XIX^{ème} siècle, Récamier fera en outre remarquer que le cancer, comme le crabe ou l'écrevisse, reconstitue un fragment de chair arraché.

I.1.2. Description du développement tumoral

D'un point de vue métabolique, le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases.

Dans le paragraphe suivant, nous nous attacherons à définir et expliciter les phases métaboliques indispensables au développement tumoral. Il ne s'agit pas de rentrer dans une définition exhaustive du processus de cancérisation, mais plutôt d'insister sur certains points clefs qui seront autant de leviers pour améliorer ou imaginer des thérapies anti-tumorales.

L'apparition de cellules cancéreuses, appelée carcinogenèse, est un processus séquentiel qui fait intervenir l'accumulation progressive de mutations génétiques, après exposition à un (des) carcinogène(s) endogène(s) ou exogène(s), d'origine

chimique, physique ou virale, conduisant à l'activation de certains oncogènes et/ou l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (étapes d'**initiation** et de **promotion** du cancer)². En parallèle à ces changements génétiques, les cellules cancéreuses induisent des changements profonds dans le tissu voisin normal (étape de **progression**). A ce stade, le cancer est infraclinique : c'est une masse de cellules qui survit dans l'organisme ; l'environnement des cellules cancéreuses, appelé *stroma* tumoral, est dit non coopératif : il ne fournit pas aux cellules cancéreuses les nutriments qu'un plus important développement requerrait. Cette phase est critique dans le développement clinique du cancer : si le *stroma* reste non-permissif, le cancer n'évolue pas ou très lentement. Cependant, si le développement tumoral se poursuit, la tumeur entre dans un état dit d'hypoxie et intervient l'angiogenèse tumorale^{3, 4}.

I.2. L'angiogenèse tumorale

I.2.1. Définition de l'angiogenèse

L'**angiogenèse** est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle intervient au cours du développement embryonnaire, et joue ensuite un rôle fondamental chez l'enfant et l'adulte, dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta)⁵, la réparation tissulaire (cicatrisation), l'ossification endochondrale⁶, la reperméabilisation des thromboses, ou encore l'adaptation musculaire à l'exercice physique⁷. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques⁸. Lorsqu'un dysfonctionnement des mécanismes du contrôle de l'angiogenèse survient, elle peut être impliquée dans le développement et la progression de maladies variées, notamment inflammatoires⁴, comme les rétinopathies diabétiques, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les hémangiomes, le sarcome de Kaposi, les glaucomes, l'arthrite rhumatoïde,

l'athérosclérose, le psoriasis, l'obésité, le cancer⁹, et probablement la maladie d'Alzheimer¹⁰.

Malgré l'abondance de facteurs pro-angiogéniques dans différents tissus, le taux de renouvellement chez un adulte non malade des cellules endothéliales, cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins, est relativement faible (de l'ordre de 1000 jours). Les cellules endothéliales sont maintenues dans un état de quiescence par la présence concomitante de facteurs anti-angiogéniques endogènes. De plus, inducteurs et inhibiteurs coexistent souvent dans les tissus présentant une angiogenèse consécutive. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'il existe un équilibre naturel entre facteurs pro- et anti-angiogéniques et que le processus d'angiogenèse résulte d'un déséquilibre entre ces facteurs.

I.2.2. Mécanisme de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse peut se faire par bourgeonnement ou par intussusception (élargissement et séparation de vaisseaux déjà formés)¹¹. Nous détaillerons ici l'angiogenèse par bourgeonnement, qui est la plus largement répandue.

Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire, qui interagissent pour former des néovaisseaux. Les cellules endothéliales capillaires¹² sont les principaux acteurs de ce mécanisme, mais d'autres composants des vaisseaux tels que les péricytes ou la matrice extracellulaire (MEC) interviennent également¹³.

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inférieure à 1 ou 2 mm³, est indépendante de l'angiogenèse et l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple³. On parle de **phase dormante** ou **avasculaire**. Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active. La croissance tumorale ralentit, du fait d'un équilibre entre prolifération cellulaire et mortalité cellulaire.

Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. Dans les tissus, on estime que la limite de diffusion de l'oxygène correspond à une distance de 100-150 μm entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à environ 3-5 couches de cellules autour d'un vaisseau. Les carcinomes *in situ* peuvent rester à l'état dormant pendant plusieurs années, mais ils peuvent aussi acquérir ensuite un phénotype angiogénique. Ce « *switch* » **angiogénique** résulte de la rupture de l'équilibre préexistant entre facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques, en faveur de ces derniers déclenchant l'angiogenèse tumorale¹⁴.

L'angiogenèse va permettre la croissance de la tumeur en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa prolifération, en sécrétant des facteurs qui, à leurs tours, stimulent la croissance des cellules cancéreuses⁴. Les étapes de ce processus sont résumées dans la Figure 3. La première étape est l'étape d'initiation, qui est le signal donné par les cellules tumorales de leur état d'hypoxie. Le rôle du VEGF est ici fondamental car il est le facteur de croissance sécrété le plus important dans cette étape d'initiation. C'est lui qui vient activer les cellules endothéliales qui vont ensuite poursuivre le processus angiogénique. La deuxième étape est la dégradation de la membrane basale. Ces dégradations sont assurées par différentes protéines comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou l'*urokinase plasminogen activator* (u-PA) et la t-PA (*tissue plasminogen activator*). Durant la migration, les bourgeons poursuivent leur migration en s'allongeant vers la source du stimulus angiogénique (effet chimiotactique). Ils sont guidés par les péricytes. Cette étape nécessite la destruction de la matrice extracellulaire. Le plasminogène est la principale protéine plasmatique extravasée dans le milieu périvasculaire. Elle est transformée en plasmine sous l'action des activateurs tissulaires u-PA & t-PA. La plasmine ensuite active les MMP sécrétées par les cellules endothéliales situées à l'extrémité du bourgeon. Plasmine & MMP (principalement 9 et 2) dégradent les protéines de la MEC. Les étapes 3 et 4 sont des étapes de migration et de prolifération des cellules

endothéliales qui vont former les nouveaux vaisseaux sanguins vers la tumeur. Enfin, une dernière étape dite de remodelage vasculaire permet de finaliser la formation du nouveau vaisseau comportant cellules endothéliales et membrane basale¹⁵.

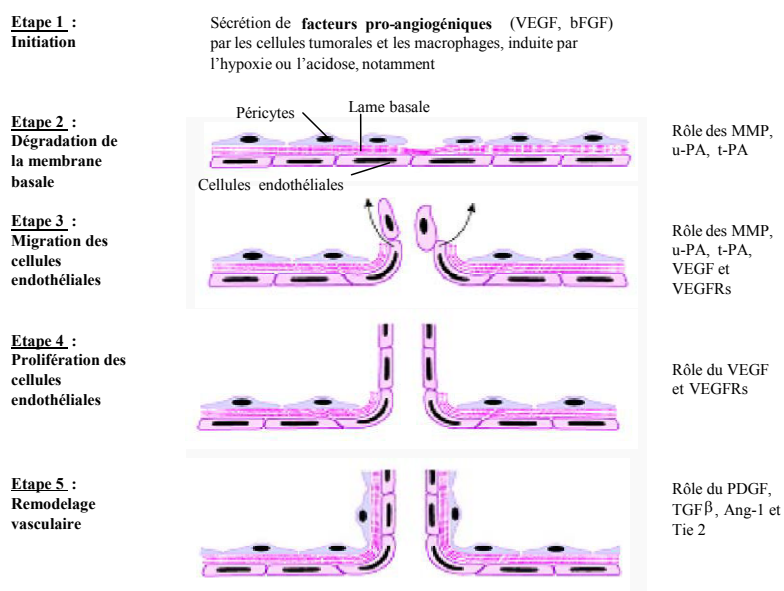


Figure 3 : Etapes de l'angiogenèse tumorale. 1 : Activation des cellules endothéliales par le VEGF sécrété par les cellules tumorales. 2 : Détachement des péricytes et dégradation de la membrane basale. 3 : Migration des cellules endothéliales vers la tumeur. 4 : Prolifération des cellules endothéliales. 5 : Formation de néovaisseaux, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales (tirée de la thèse de Loraine Tirand, 2003-2007¹⁵).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires du processus angiogénique sont induits par l'action coordonnée de facteurs **pro-angiogéniques**. Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent, les *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) et leurs récepteurs, les *Fibroblast Growth Factors* (FGF) et leurs récepteurs, les angiopoïétines, Tie-1, Tie-2, les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs et les activateurs du plasminogène. Des régulateurs négatifs endogènes comme la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine, et le facteur plaquettaire-4 ont été rapportés. Les

intégrines jouent aussi un rôle considérable dans ce processus, en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire.

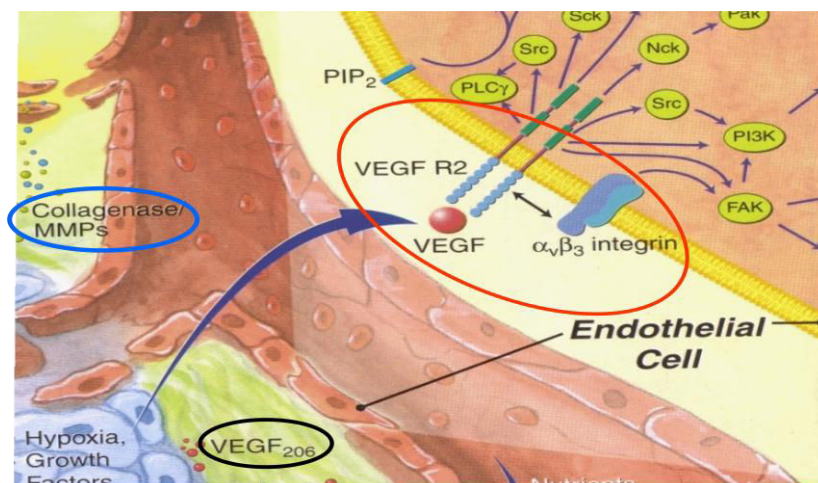


Figure 4 : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale.

Dans la Figure 4, les principales molécules intervenant dans l'angiogenèse à différents stades sont entourées. Nous allons détailler ci-après leur rôle et leur potentiel comme cibles thérapeutiques anticancéreuses. Nous nous intéresserons, au cours de cette thèse, plus particulièrement au VEGF et ses récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales de phénotype angiogénique ainsi qu'aux MMPs.

I.3. Les facteurs angiogéniques

I.3.1. Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

I.3.1.a. Définition

Le VEGF est également connu sous le nom de VPF (*Vascular Permeability Factor*) ou vasculotropine. En effet, Senger *et al.* en 1983, furent les premiers à en présenter la capacité d'induction de la perméabilisation vasculaire, et appelèrent cette molécule alors non identifiée « *tumor vascular permeability factor* »¹⁶. En 1989, Ferrara et Henzel rapportèrent l'isolation d'un mitogène spécifique des cellules endothéliales, qu'ils

appelèrent « *vascular endothelial growth factor* »¹⁷. Cette même année, il fut démontré que le VEGF et le VPF étaient en fait la même molécule^{18, 19}.

Le VEGF est synthétisé par les cellules tumorales, mais également par les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules musculaires lisses, les ostéoblastes et divers autres types cellulaires^{16, 20-23}. L'expression du VEGF est régulée par une variété de *stimuli*, dont le plus important est l'hypoxie survenant au sein du développement de la tumeur²⁴⁻²⁶.

Le gène du VEGF humain est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3)²⁷ et organisé en huit exons, séparés par sept introns^{28, 29}. L'épissage alternatif de son ARNm aboutit à la formation de plusieurs isoformes, les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés (nommés respectivement VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆). Le VEGF₁₆₅ en est la forme la plus abondante²⁹.

Structurellement, le VEGF est une protéine comportant huit résidus cystéine formant des ponts disulfures¹⁴. Six de ces résidus sont impliqués dans la formation de trois liaisons intramoléculaires, les deux autres sont à l'origine de la formation de deux liaisons disulfure entre deux monomères de VEGF (Figure 5), aboutissant à la formation du VEGF homodimère³⁰.

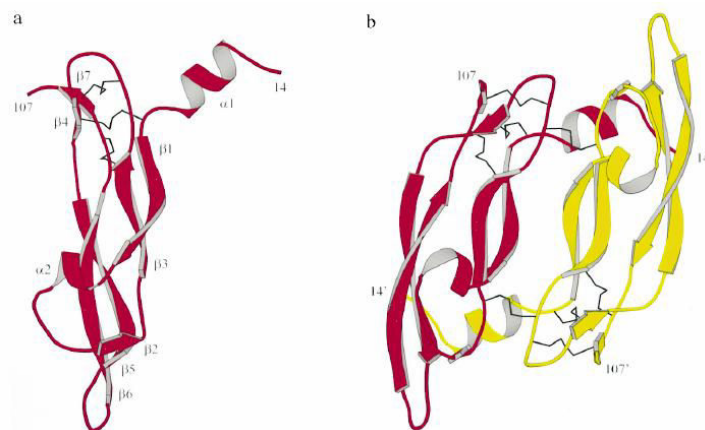


Figure 5 : Représentation en hélice α et feuillet β du VEGF monomère (a) et dimère (b). Les ponts disulfures sont représentés par des traits noirs³⁰.

Le VEGF est probablement le régulateur le plus important de l'angiogenèse dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques.

I.3.1.b. Expression du VEGF

L'expression du VEGF par les cellules tumorales est corrélée avec la densité microvasculaire de la tumeur, son pouvoir métastasant, et est associée à un état de développement tumoral avancé dans de nombreux types de tumeurs solides et hématologiques³¹. Le rôle crucial du VEGF dans la néo-angiogenèse est illustré par les études de modèles tumoraux employant des anticorps neutralisant le VEGF qui préviennent la néovascularisation et ainsi inhibent la croissance tumorale et les métastases³². Ainsi, de nombreuses tumeurs surexpriment les récepteurs au VEGF³³.

Le VEGF présente une importance capitale dans le processus d'expansion tumorale et de métastases. C'est un facteur mitogène spécifique des cellules endothéliales. Il intervient dans la sécrétion et l'activation des protéases impliquées dans la dégradation de la MEC. Il agit comme un facteur de survie des cellules endothéliales en inhibant l'apoptose et il est essentiel à la mobilisation des précurseurs de la moelle osseuse et des cellules endothéliales. Le VEGF induit la prolifération de ces dernières, stimule leur migration. Il augmente la perméabilité vasculaire, inhibe la différenciation des cellules dendritiques, induit le facteur tissulaire et la migration des monocytes^{21, 34}.

En se liant à des récepteurs situés en majeure partie à la surface des cellules endothéliales, le VEGF induit une transduction du signal responsable de la prolifération et la migration de ces cellules.

Par ailleurs, les cellules endothéliales vasculaires des vaisseaux immatures requièrent des signaux de survie, en l'absence desquels une apoptose est induite³⁵⁻³⁷.

Le VEGF accroît également la perméabilité vasculaire *in vivo*^{16, 38}, avec une activité environ 50 000 fois supérieure à celle de l'histamine³⁹, ce qui provoque l'extravasation de protéines plasmatiques, comme la fibrine. Il se constitue alors un

gel de fibrine extracellulaire, qui forme un substrat pour la croissance endothéliale vasculaire⁴⁰.

Le VEGF induit également la synthèse de différentes cytokines impliquées dans l'angiogenèse et l'**inflammation** et, peut déclencher une **réponse immunitaire**, en agissant sur le développement des cellules dendritiques et la production de lymphocytes B⁴¹, la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques⁴², et la migration des monocytes par chimiotactisme⁴⁰.

I.3.1.c. Les récepteurs du VEGF

Les VEGFR-1, VEGFR-2 sont des récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK). Ces récepteurs à activité TK possèdent un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance et la fixation du ligand et sont composés de sept domaines à immunoglobuline (*Ig-like*), une région transmembranaire unique et un domaine intracytoplasmique à activité TK. Le VEGFR-1 est impliqué dans la **migration** des cellules endothéliales, la migration des monocytes/macrophages⁴³ et le recrutement des cellules souches hématopoïétiques⁴⁴.

Le VEGFR-1 peut former des hétérodimères avec le VEGFR-2, et ces hétérodimères sont à l'origine de la transduction de signaux différents de ceux médiés par les homodimères de VEGFR-1 ou de VEGFR-2^{45, 46}.

D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont été identifiés. Il s'agit des neuropilines (NRPs), qui sont considérées comme jouant un rôle de co-récepteurs des isoformes du VEGF liant l'héparine^{47, 48}.

Nous allons décrire, dans les paragraphes suivants, d'autres acteurs de l'angiogenèse qui nous intéresse comme éventuelles cibles pour la thérapie photodynamique.

I.3.2. Les neuropilines

Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle clef dans le développement des systèmes neuronaux et vasculaires. Les neuropilines sont des récepteurs de la famille des sémaphorines de classe 3, facteurs de la guidance axonale et des récepteurs de la famille du VEGF, facteurs de l'angiogenèse. Ce sont des récepteurs de 130 à 140 kDa (à activité non-tyrosine kinase)⁴⁸ composés d'un domaine extracellulaire de 840 résidus d'acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 25 résidus acides aminés et d'un domaine cytoplasmique de 40 résidus acides aminés.

La neuropiline a été observée pour la première fois sur certains axones au cours du développement embryonnaire du Xénope, « *Xenopus* », à l'aide d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique des neurones « A5 »⁴⁹. En 1997, deux équipes rapportèrent qu'il s'agissait d'un récepteur de SEMA3A, une des sémaphorines (SEMA) de classe 3^{50, 51}. Un homologue de la neuropiline ayant plus tard été identifié et nommé neuropiline-2 (NRP-2), la neuropiline fut renommée neuropiline-1 (NRP-1). Au départ, la neuropiline a été décrite comme un médiateur de la guidance axonale mais il a été démontré par la suite, que ces récepteurs sont également impliqués dans le développement des vaisseaux sanguins, dans l'angiogenèse tumorale et la progression tumorale en agissant comme récepteur du VEGF₁₆₅⁵².

Par ailleurs, des études ont montré que l'expression de la NRP-1 au niveau des cellules cancéreuses favorisait l'angiogenèse tumorale^{53, 54}.

La présence de la NRP-1 augmente la liaison du VEGF₁₆₅ à VEGFR-2⁵⁵, et potentialise les effets mitogéniques et chimiotactiques médiés par le VEGFR-2^{48, 56, 57}. NRP-1 fonctionne comme un co-récepteur au VEGFR-2 qui favorise la fixation du VEGF₁₆₅, ce qui induit une augmentation de la migration des cellules endothéliales (Figure 6).

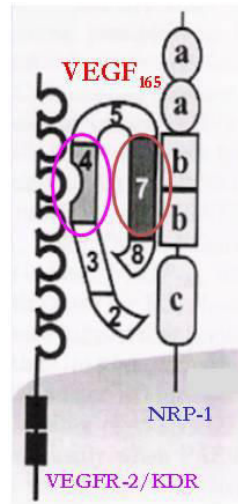


Figure 6 : Interaction entre neuropiline-1 (NRP-1) et VEGF-R2/KDR pour la fixation du VEGF₁₆₅.

I.3.3. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$

Les intégrines sont des récepteurs membranaires qui sont exprimés sur les cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse et non exprimés sur les cellules endothéliales quiescentes⁵⁸. Les intégrines sont des protéines exprimées par les cellules adhérentes et reconnaissant certains constituants de la matrice extracellulaire. Ce sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités α et β transmembranaires associées pour former 24 intégrines différentes. Certaines intégrines (par exemple $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ou $\alpha_v\beta_1$) jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse et peuvent ainsi être utilisées comme cible pour des stratégies antivasculaires. Les intégrines, dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, interviennent aussi dans la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, qui sont des processus nécessaires à la formation de ramifications vasculaires. L'équipe de Reynolds *et al.* a remis en cause l'implication simple de cette intégrine dans l'angiogenèse et propose un modèle plus complexe, qui donne un rôle de régulateur pro- ou anti-angiogénique selon les conditions⁵⁹⁻⁶¹. Bien que le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ne soit pas,

à ce jour, totalement élucidé, l'intérêt pour ce récepteur provient du fait qu'il est surexprimé par les cellules endothéliales et par de nombreuses lignées tumorales.

I.3.4. Les métalloprotéinases matricielles, MMPs

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de macromolécules capables d'influencer profondément la fonction cellulaire et l'architecture tissulaire. Plusieurs processus biologiques, tels que la migration et la différenciation cellulaires, ainsi que la morphogenèse et le remodelage tissulaire, sont étroitement dépendants d'interactions avec la matrice extracellulaire. Parmi ces interactions, deux facteurs semblent essentiels pour l'angiogenèse : l'adhérence cellules-matrice extracellulaire *via* les intégrines, et la protéolyse extracellulaire réalisée par les métalloprotéinases matricielles (*matrix metalloproteinases* ou MMPs) et les activateurs du plasminogène⁶².

Les MMPs forment une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes qui interviennent dans différents types de processus cellulaires comme le développement d'organes, l'ovulation, l'implantation du fœtus dans l'utérus, l'embryogenèse, et l'angiogenèse⁶³. Elles sont excrétées par un éventail de tissus de connexion et de cellules pro-inflammatoires. Ces enzymes sont exprimées comme des zymogènes qui sont successivement activées par des enzymes protéolytiques. Les MMPs sont actives à pH neutre et nécessitent la présence d'ions Ca^{2+} pour avoir une meilleure efficacité.

Vingt-six MMPs humaines sont connues et classifiées en fonction de leur spécificité. Elles peuvent être classées en 2 groupes : les MMPs sécrétées et les MMPs associées à la membrane (MT-MMPs). Les MT-MMPs sont caractérisées par un domaine transmembranaire et intracellulaire supplémentaires. Les MMPs sécrétées comprennent les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), les gélatinases (gélatinase A : MMP-2, gélatinase B : MMP-9), les stromélysines (stromélysine-1 :

MMP-3, stromélysine-2 : MMP-10, stromélysine-3 : MMP-11) et les autres MMPs (matrilysine, MMP-7, ...)⁶⁴.

Les MMPs jouent un rôle important dans des processus physiologiques et pathologiques du corps humain. Elles agissent comme médiateurs dans la modélisation, et la dégradation des composants de l'espace extracellulaire. On remarque qu'une augmentation du niveau de MMPs provoque la croissance du nombre de cellules cancéreuses, causant l'invasion tumorale et la formation de métastases⁶⁵.

Les MMPs peuvent ainsi être utilisées comme entités de clivage enzymatique spécifique, comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre IV.

Nous avons vu, d'une façon non exhaustive, différents éléments, intervenant dans l'angiogenèse tumorale, qui sont autant de cibles potentielles pour une thérapie photodynamique antivasculaire.

II. La Thérapie Photodynamique : PDT

II.1. Historique et définition

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens l'utilisaient déjà combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau.

Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab⁶⁶ décrit pour la première fois le phénomène phototoxique : l'association d'un colorant (l'acridine en Figure 8) et de lumière (les deux éléments pris séparément n'ayant pas d'action) entraîne la mort d'organismes vivants : les paramécies.

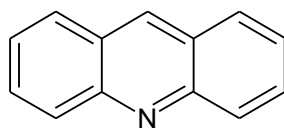


Figure 7 : Formule chimique de l'acridine.

En 1903, Jesionek et von Tappeiner (alors professeur de Raab), traitent un cancer cutané par application topique d'éosine (Figure 8) suivie d'une exposition à la lumière blanche⁶⁷. En 1904, von Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « **d'action photodynamique** »^{68, 69}.

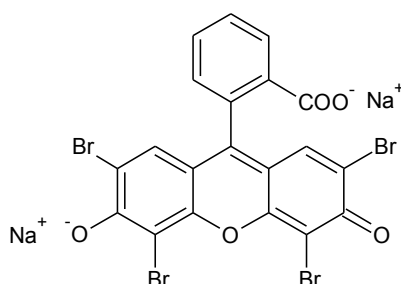


Figure 8 : Formule chimique de l'éosine Y.

Cette supposition sera confirmée en 1909 par Hasselbach qui rédigera le premier rapport sur le caractère phototoxique de l'hématoporphyrine Hp (l'un des constituants du sang) en travaillant sur des souris.

La PDT est donc un processus qui nécessite trois paramètres fondamentaux : une molécule photosensible appelée photosensibilisateur (PS), un rayonnement lumineux et de l'oxygène. La présence simultanée de ces trois composants permet d'engendrer des réactions de photo-oxydation entraînant la destruction des tissus biologiques. On parle alors d'effet **phototoxique**. Cela ouvre des champs de développement importants et notamment pour les traitements anticancéreux. Les interactions lumière-matière qui régissent l'effet photodynamique seront développées dans le Chapitre 4.

Afin de prouver que les résultats de phototoxicité mis en évidence chez la souris peuvent s'appliquer à l'Homme, Friedrich Meyer-Betz se livra en 1912 à une

expérience sur lui-même en s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine (Figure 9), dont la formule est présentée en Figure 10. Tant qu'il resta non exposé au soleil, aucune réaction ne se produisit, mais lors de l'exposition à la lumière du soleil, une réaction eut lieu, entraînant une hyperpigmentation de la peau et un œdème généralisé, symptômes d'une hypersensibilité à la lumière dont il souffrira pendant plusieurs semaines.

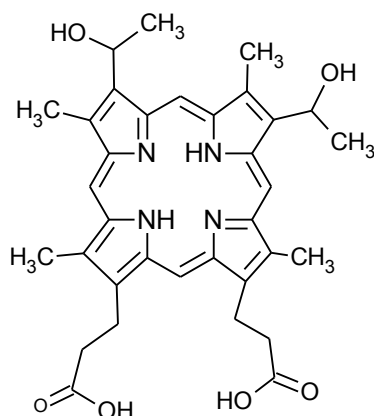


Figure 9 : Structure chimique de l'hématoporphyrine.

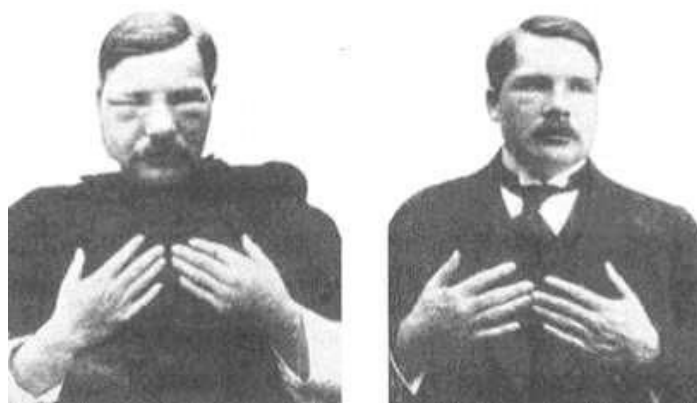


Figure 10 : Meyer-Betz. A gauche : après injection et exposition au soleil. A droite : cinq jours après injection, l'œdème est réduit, mais quelques lésions sur les mains et le visage subsistent.

En 1924, Policard met en évidence la fluorescence spontanée de tumeurs exposées à la lumière ultraviolette⁷⁰, phénomène interprété comme étant dû à l'accumulation de l'hématoporphyrine endogène (biosynthétisée par le corps) dans

les cellules tumorales. En 1942, Auler et Banzer, s'appuyant sur les travaux de Policard, découvrent les propriétés sensibilisatrices de l'hématoporphyrine.

En 1948, Figge⁷¹ confirme l'affinité de cette substance pour les tissus tumoraux et suggère la possibilité d'utiliser l'hématoporphyrine pour localiser les zones tumorales chez l'Homme.

En 1955, une série d'expériences réalisées par Schwartz⁷² prouve que l'hématoporphyrine commerciale n'est pas un produit pur et tente de la purifier. Il constate que le produit pur est moins sélectif au niveau tumoral que le produit commercial.

En 1961, Lipson⁷³ propose de purifier l'hématoporphyrine par un lavage avec un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique. Le produit obtenu, est appelé HpD pour « *Hematoporphyrin Derivative* ».

Dans les années soixante-dix et quatre-vingt, l'équipe dirigée par Dougherty va permettre un développement sans précédent de ce qu'il convient d'appeler dorénavant la Thérapie Photodynamique. Il utilise notamment avec succès l'HpD couplée à une lampe à arc à xénon pour soigner des tumeurs mammaires implantées chez la souris. Puis en 1978, il réalise les premiers essais chez l'Homme qui donnent des résultats encourageants⁷⁴. Toujours pionnier dans ce domaine, il remplacera par la suite la lampe à arc par le laser qui permet d'irradier précisément la zone à traiter. Entre 1983 et 1985, il identifie les fractions actives de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisantes au mélange initial (l'éther et l'ester de dihématoporphyrine)⁷⁵. En 1985, une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD est commercialisée sous l'appellation Photofrin II. En 1993, son utilisation en routine est autorisée au Canada pour le cancer de la vessie puis en 1995 aux Etats-Unis pour le traitement des formes avancées de cancer de l'œsophage. En France, le Photofrin est autorisé depuis 1996 pour le traitement des cancers du poumon et de l'œsophage.

Voyons à présent les mécanismes photophysiques impliqués dans la thérapie photodynamique.

II.2. Les mécanismes photophysiques de la PDT

La PDT fait intervenir une molécule photosensible, la lumière et l'oxygène. Les mécanismes photophysiques entrant en jeu sont représentés à l'aide du diagramme de Perrin-Jablonski présenté dans la Figure 11.

II.2.1. Interactions lumière - photosensibilisateur

Tout d'abord, voyons rapidement les interactions lumière - PS en commençant par l'absorption de photons et les voies de relaxations possibles, avant d'aborder la production des espèces cytotoxiques qui en découlent. La formation d'oxygène singulet sera plus longuement décrite dans le Chapitre 4, consacré à la détection et au contrôle de la formation d'oxygène singulet.

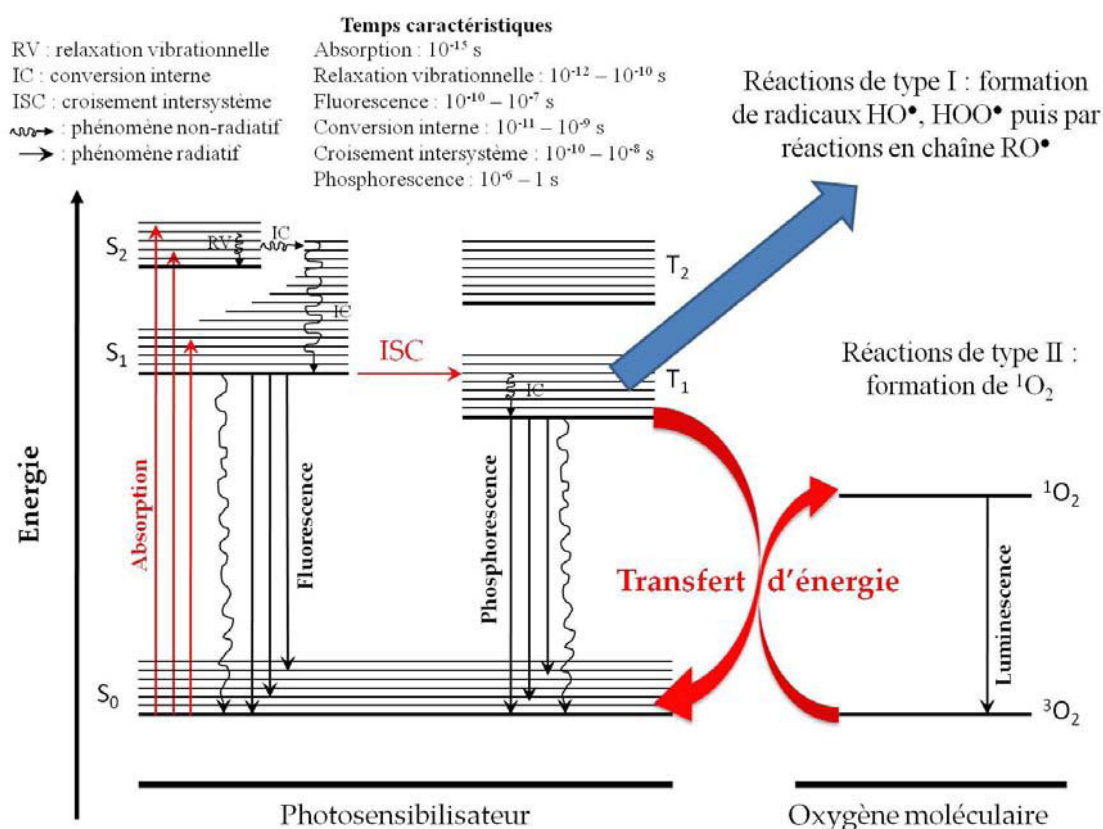


Figure 11 : Diagramme de Perrin-Jablonski additionné des réactions avec l'oxygène et espèces oxygénées.

Le PS est initialement dans son état électronique fondamental, qui est généralement un état singulet noté S_0 . Un état singulet est un état où la molécule possède deux électrons non appariés avec des spins antiparallèles. A cet état fondamental et à température ambiante, il peut occuper des états rotationnels et vibrationnels. L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ provenant d'un rayonnement lumineux de longueur d'onde appropriée le fait passer à un état électronique excité notés S_1 , S_2 ou S_3 . Dans tous les cas et en accord avec la loi empirique de Kasha⁷⁶, le PS revient à l'état électronique excité de plus bas niveau d'énergie S_1 , par une succession de relaxations vibrationnelles et de conversions internes, CI (les temps de relaxations vibrationnelles étant de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-15} seconde). A partir de ce niveau S_1 , le photosensibilisateur peut retourner à son niveau fondamental plus stable S_0 par plusieurs voies en compétition, par relaxation non radiative ou par relaxation radiative conduisant à l'émission d'un photon. Cette dernière voie de désexcitation est appelée fluorescence et la longueur d'onde du photon émis dépend du saut énergétique entre les niveaux S_1 et S_0 , donnée par la relation : $E=h\nu=hc/\lambda$. Le temps de cette relaxation radiative est de l'ordre de la nanoseconde qui correspond à un temps beaucoup plus long que les temps d'absorption d'un photon ou des relaxations non-radiatives. La fluorescence correspondant uniquement à la transition $S_1 \rightarrow S_0$, l'énergie du photon émis est donc forcément inférieure voire égale à l'énergie des photons absorbés ($S_0 \rightarrow S_2$, S_3 , etc.), les longueurs d'onde correspondantes étant rangées dans l'ordre inverse. C'est ce qu'on appelle le déplacement de Stokes, écart entre la longueur d'onde maximale d'absorption et la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence.

Les photosensibilisateurs ont pour la plupart cette capacité de fluorescer avec des rendements quantiques compris entre 0,1 et 0,3, ce qui leur donne la possibilité d'être aussi utilisés en imagerie.

Une autre voie pour quitter le niveau S_1 est le croisement intersystème (CIS) qui amène l'électron promu à un autre niveau excité mais triplet T_1 . Il convient de noter que le CIS se fait de façon homoénergétique sur un niveau vibrationnel de T_1 supérieur et que l'électron « retombe » au premier niveau vibrationnel T_1 par relaxation vibrationnelle.

Un état triplet est un état où la molécule possède deux électrons non appariés ayant des spins parallèles ($\uparrow \uparrow$ ou $\downarrow \downarrow$). Le mot triplet vient du fait que la multiplicité de spin est de trois : $2 \times |1/2 + 1/2| + 1 = 3$. Cela est possible, au vu de la règle de Hund, car le niveau T_1 est d'une énergie plus basse que le niveau S_1 . Le passage d'un niveau singulet à triplet se fait par retournement de spin. Les spins antiparallèles du S_1 se retrouvent alors parallèles au niveau T_1 . A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité (T_1) et l'état singulet fondamental (S_0), transition dite interdite. Cette transition de T_1 à S_0 peut se faire de façon radiative et le photon émis est appelé photon de phosphorescence. La particularité de cette émission est que la longueur d'onde va être plus élevée que celle de fluorescence car elle résulte de la désexcitation d'un niveau de plus basse énergie que le niveau S_1 ; le phénomène de phosphorescence a une durée de vie plus longue, de l'ordre de la microseconde. Ceci est dû au fait que la transition triplet-singulet est interdite et donc que le temps de vie de l'état T_1 est plus long. C'est à partir de cet état triplet caractéristique des PS que vont se former les espèces réactives de l'oxygène (EROs) responsables de l'effet photodynamique. Il est à noter que les réactions de type II se font à partir de cet état triplet.

II.2.2. Production des espèces réactives de l'oxygène (EROs)

La longue durée de vie des états triplet des photosensibilisateurs leur permet de transférer leur énergie à l'oxygène moléculaire. Ce transfert est possible car l'oxygène

moléculaire est l'une des rares molécules naturelles se trouvant dans un état triplet à l'état fondamental. Ainsi est alors formé l'oxygène singulet, noté $^1\text{O}_2$.

Cependant l'oxygène singulet n'est pas la seule espèce cytotoxique à être produite lors du mécanisme de photosensibilisation. En effet, on distingue deux types de mécanismes photochimiques de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Ce postulat est cependant sujet à débats dans la communauté PDT mondiale :

- ★ Certains distinguent les deux types de mécanismes selon **la molécule qui absorbe l'énergie de l'état triplet du PS**. Ainsi, les mécanismes de type I regroupent les transferts d'énergie entre le PS à l'état triplet et toute autre molécule pouvant engendrer la formation d'espèces radicalaires ($\text{HO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$, etc.). Les réactions de type II regroupent les transferts d'énergie entre le PS à l'état triplet et l'oxygène. Ces réactions aboutissent à la formation de l'oxygène singulet mais aussi à l'oxygène radicalaire comme $\text{O}_2^\bullet$, ou $\text{O}_2^{\bullet-}$.
- ★ D'autres distinguent les deux types de réactions selon **le mécanisme mis en jeu**. Les réactions de type I correspondent à la formation des EROs par transfert d'un électron ou d'un hydrogène, et les réactions de type II correspondent à la formation de l'oxygène singulet par transfert d'énergie⁷⁷.

Pour notre part, nous nous baserons sur la seconde hypothèse qui est la plus acceptée dans la communauté PDT.

II.2.3. Réactions de type I

Ces réactions concernent toute interaction entre le PS à l'état triplet et les molécules environnantes⁷⁸⁻⁸². Dans ce type de réaction, le PS lui-même participe à la

production de radicaux libres ou ioniques par réaction avec le substrat cellulaire, soit par transfert d'électron, soit par transfert d'un atome d'hydrogène (Figure 12).

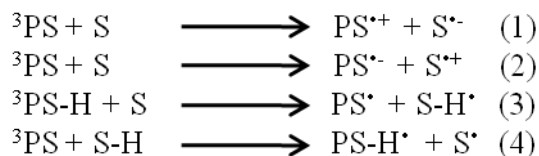


Figure 12 : Réactions entre le PS à l'état triplet et un substrat ; équations (1) et (2) : transfert d'un électron ; équations (3) et (4) : transfert d'un hydrogène.

Les espèces radicalaires générées peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire présent pour former des radicaux peroxydes, amorçant ainsi une chaîne d'auto-oxydation (équations 5 à 8, Figure 13).

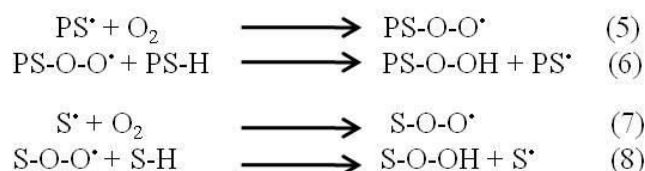


Figure 13 : Réactions radicalaires.

Les anions radicaux du PS ou du substrat peuvent également interagir de manière efficace avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ (équations 9 et 10, Figure 14).

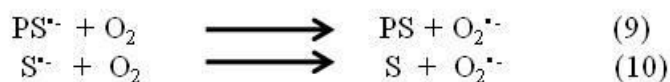


Figure 14 : Réactions conduisant à la formation de l'anion superoxyde.

L'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène (équations 11, 12 et 13, Figure 15). Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle ($\text{HO}^{\bullet}$). En conditions

physiologiques, H_2O_2 est produit par la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$, dont le principe repose sur la protonation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former son acide conjugué $\text{HO}_2^{\bullet}$, suivie par la réaction de $\text{HO}_2^{\bullet}$ avec $\text{O}_2^{\bullet-}$. Le radical hydroxyle peut alors être produit au cours de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$.

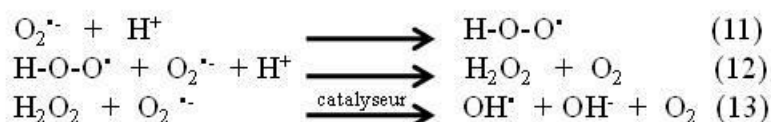


Figure 15 : Réaction conduisant à la formation du peroxyde d'hydrogène.

Les différentes espèces réactives de l'oxygène formées au cours des réactions photochimiques de type I (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$) représentent de puissants oxydants pour une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine)⁸³.

II.2.4. Réactions de type II, production d'oxygène singulet

La production d'oxygène singulet et son mécanisme photophysique seront exposés en détail dans le Chapitre 4.

II.2.5. Facteurs influençant la balance entre réactions de type I ou II

Les deux types de mécanismes présentés ci-dessus sont responsables de l'effet photodynamique. Cependant, certaines conditions physiologiques ou autres paramètres favorisent un type de réactions par rapport à l'autre.

Les réactions de type II et l'oxygène singulet sont souvent présentés comme dominant le processus photodynamique⁸⁴. Mais en conditions d'hypoxie du milieu ou en cas de forte concentration du photosensibilisateur, c'est le mécanisme de type I qui prédomine^{80, 85}. Par exemple, en milieu anoxique, le PS dans son état triplet va pouvoir réagir avec un substrat organique par échange d'électrons et induire les

cascades de réactions entraînant la formation d'espèces comme l'anion superoxyde O_2^- ou le radical hydroxyle $OH^\bullet$. De plus, la localisation intracellulaire et la lignée cellulaire ciblée vont favoriser un type de réaction par rapport à un autre⁸⁶. Il est donc très important de considérer ce phénomène lors du traitement PDT. En effet, au cours du traitement, l'oxygène est consommé pour former l'oxygène singulet et la pression d' O_2 diminue, ce qui induit une diminution de l'activité photodynamique, alors que la tumeur est en général un milieu hypoxique. Notre équipe a étudié le suivi de la pression en O_2 dans la tumeur lors du traitement PDT et publié les résultats en 2010⁸⁷.

Nous allons maintenant introduire et expliciter les différents effets sur la cellule observés après un traitement PDT. En fait, on peut diviser ces effets en deux catégories : les effets directs sur la cellule qui a internalisé le PS et les effets indirects qui sont induits par le traitement PDT.

II.3. Les effets physiologiques de la PDT

II.3.1. Les effets directs

Après incorporation du PS dans cellule et irradiation, plusieurs types de mort cellulaires peuvent avoir lieu. Cela dépend de la concentration, des propriétés physico-chimiques, de la localisation subcellulaire du PS, de la concentration en oxygène, de la fluence de la lumière appliquée et du type cellulaire⁸⁸⁻⁹⁰.

La **nécrose** est une voie de mort cellulaire due à un arrêt pathologique du fonctionnement cellulaire. La nécrose peut toucher un ensemble de cellules ou un tissu. La nécrose se définit par des modifications morphologiques survenant lorsqu'une cellule subit un traumatisme important comme un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine au niveau d'un organe, de l'hyperthermie, une intoxication par un produit chimique, etc. Les principaux effets physiologiques

observés sont le gonflement du cytoplasme, la destruction des organites et la peroxydation lipidique provoquant la désorganisation de la membrane plasmique. Les enzymes cytoplasmiques et lysosomales ainsi libérées sont à l'origine de réactions inflammatoires⁹¹. La nécrose est une mort accidentelle et violente de la cellule qui a subi un traumatisme important. En PDT, la voie de mort cellulaire par nécrose est favorisée lors de l'utilisation d'une fluence massive^{88, 92}. L'inactivation des procaspases -9 et -3 associée à une relocalisation du PS dans la membrane plasmique vers le cytosol favorisent la nécrose⁹³. Enfin, une localisation membranaire du PS favorise la mort par voie nécrotique^{71, 94-97}.

L'**apoptose** est une mort cellulaire **programmée** génétiquement. En effet, chaque cellule est programmée pour mourir au bout d'un certain nombre de divisions. Ce processus répond à des stimuli internes ou externes à la cellule conduisant à des modifications biochimiques et morphologiques. La mitochondrie est considérée comme l'organite central de ce mécanisme. L'apoptose intervient dans de nombreux cas de traitements PDT sur différentes lignées cellulaires avec des PS variés^{98, 99}.

Enfin, un dernier type de mort cellulaire a été mis en évidence récemment, il s'agit de l'**autophagie**¹⁰⁰⁻¹⁰². L'autophagie est un processus physiologique assurant le renouvellement des protéines et des organelles cellulaires. Elle consiste à piéger le matériel cytoplasmique empêchant son adressage au lysosome. Elle se distingue de l'apoptose par des critères morphologiques et moléculaires et est indépendant des caspases. L'**autophagie** débute par la formation de **vésicules autophagiques** appelées **autophagosomes**. Ces vésicules, formées en partie par des constituants de la membrane du réticulum endoplasmique, renferment des fragments de matériel cellulaire (appareil de Golgi, mitochondrie, etc.). Ceux-ci fusionnent avec des lysosomes contenant de nombreuses enzymes, et deviennent des autolysosomes dont le contenu est ensuite dégradé. Il a été montré récemment que le traitement PDT induisait ce processus¹⁰³⁻¹⁰⁵.

En résumé, de faibles doses (lumière et PS) vont orienter la cellule vers un processus d'autophagie afin de recycler les organelles détériorées et essayer de maintenir son intégrité. Pour des doses croissantes, la voie apoptotique va être induite pour éliminer les cellules endommagées. Enfin, pour des doses très fortes, les dommages cellulaires vont engendrer la nécrose. Ces trois voies cohabitent donc lors du traitement PDT avec des prédominances variées selon la distance par rapport à la source lumineuse, selon la concentration en PS dans la zone étudiée, selon la profondeur du tissu ou la pression en O₂ dans le tissu¹⁰⁶.

La voie de mort par apoptose semble prédominer lors du traitement PDT¹⁰⁷ même si certaines combinaisons de PS et de lignées cellulaires présentent une voie de mort par nécrose plus prononcée^{108, 109}. La voie de mort cellulaire va être en partie dépendante de la localisation subcellulaire du PS. Le groupe de Kessel a montré que deux PS (SnEt2 et un dimère porphycène) ayant une localisation lysosomale induisaient majoritairement et rapidement une mort cellulaire par apoptose, alors que deux PS cationiques localisés dans la membrane cellulaire n'induisaient pas les marqueurs de l'apoptose¹¹⁰.

Outre ces trois mécanismes dits « directs », il y a également l'apparition d'effets indirects.

II.3.2. Les effets indirects

Ces effets sont impliqués par le traitement PDT comprenant une réponse immunitaire ou la destruction de la néovascularisation^{111, 112}.

Les **dommages vasculaires** sont des effets facilement et rapidement discernables *in vivo*¹¹³. L'effet antivasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après le traitement PDT et contribuant à long terme à l'éradication tumorale¹¹⁴. Le degré de réponse vasculaire est fortement dépendant des

conditions de PDT utilisées, en termes de quantité de PS administrée, d'intervalle drogue-lumière (IDL) et de dose de lumière¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Le collapsus vasculaire peut être rapidement observé après PDT et peut provoquer une hypoxie tumorale post-PDT persistante et sévère¹¹⁹. La PDT peut aussi provoquer une vasoconstriction par inhibition ou relargage d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium¹²⁰, une fuite des macromolécules depuis les vaisseaux, l'adhésion de leucocytes et la formation de thrombi, ces événements étant tous liés à l'activation plaquettaire et à la libération de thromboxane¹²¹. Ces effets sont dus aux dommages directs des cellules endothéliales.

Les deux événements initiateurs potentiels de l'effet antivasculaire (dommages aux cellules endothéliales et vasoconstriction) conduisent à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin ou hémorragie¹²².

D'autres effets indirects notables sont la **réponse immunitaire et inflammatoire induites**, que nous ne développerons pas dans le cadre de cette thèse.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser l'effet antivasculaire de la PDT, soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des PS ayant un mode d'action vasculaire. Ces stratégies de *vascular targeted photodynamic therapy (VTP)* ont des applications, entre autres, pour le traitement de la dégénérescence liée à l'âge¹²³, les angiomes plans¹²⁴ et le traitement des cancers¹²⁵. La VTP pour le traitement du cancer sera décrite plus en détail dans les chapitres traitant du ciblage vasculaire passif et actif.

II.4. Les photosensibilisateurs naturels et de 1^{ère} génération

Avec le développement du Photofrin (et surtout depuis son Autorisation de Mise sur le Marché, AMM), de nombreux laboratoires s'intéressent à l'élaboration de nouveaux PS cherchant à en améliorer les caractéristiques physico-chimiques pour

une meilleure efficacité clinique. Un PS idéal devrait répondre aux exigences suivantes :

- ★ Etre non-toxique à l'obscurité.
- ★ Etre de composition parfaitement définie avec une synthèse propre et peu onéreuse.
- ★ Ne pas être toxique par photodégradation.
- ★ Posséder une absorption forte dans le proche infrarouge (600 – 800 nm : pénétration de la lumière plus profonde dans le tissu).
- ★ Posséder un fort rendement quantique de production d'oxygène singulet et/ou d'espèces réactives de l'oxygène.
- ★ Avoir une composition chimique qui favorise une biodistribution compatible avec le traitement (caractère amphiphile, affinité pour les zones tumorales).
- ★ Etre éliminé du corps sans entraîner de risques toxiques pour le patient.

Pour approcher au mieux ce « PS idéal », plusieurs générations de PS ont vu le jour.

II.4.1. Les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques

Même si la grande majorité des travaux en PDT est focalisée sur les PS tétrapyrroliques, il existe un nombre non négligeable de PS possédant des structures chimiques différentes et à caractéristiques photophysiques adaptées à la PDT.

II.4.1.a. Les Psoralènes

Les psoralènes sont extraits de l'*Ammi majus* Linneaus (Figure 16). En 1947, Fahmy *et al.* en extraient des composés cristallins dérivés du psoralène : le 8-

méthoxypsoralène (8-MOP) et le 5-méthoxypsoralène (5-MOP)¹²⁶ dont les structures chimiques sont représentées sur la Figure 16.

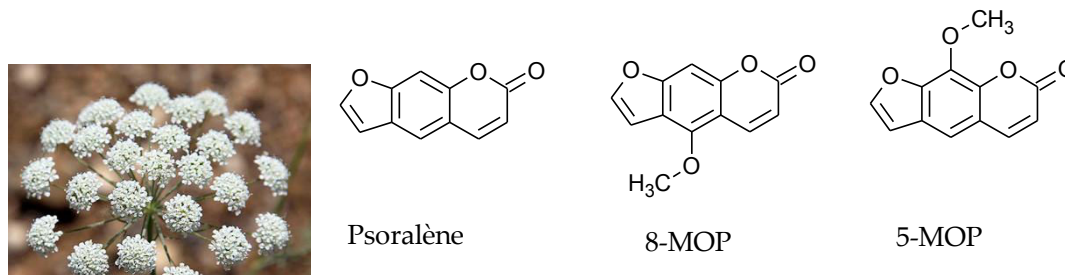


Figure 16 : L'*Ammi majus* Linneaus et structures des psoralènes.

Ces molécules sont excitées par rayons UV-A et sont utilisées pour le traitement du *psoriasis* en puvathérapie, thérapie qui consiste à administrer le médicament et à irradier la zone à traiter. Ces molécules agissent comme des agents intercalants de l'ADN, qui, après irradiation UV, induisent des pontages entre deux thymines, qui se traduit par un blocage de la réplication de l'ADN et stoppe le développement de la maladie.

II.4.1.b. Le bleu de méthylène

Le bleu de méthylène ou chlorure de méthylthioninium, dont la formule est présentée en Figure 17, est aussi un PS très utilisé en recherche ; il a été également longtemps utilisé comme marqueur de tumeurs pour aider à la chirurgie. Il est aussi utilisé *ex vivo* pour la décontamination des unités fraîches de plasma¹²⁷. Le bleu de méthylène est soluble en solution aqueuse et possède un spectre d'absorption intéressant pour une application en PDT puisqu'il absorbe assez fortement à 666 nm dans l'eau ($\epsilon = 82\,000\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)¹²⁸. Il possède aussi un bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 0,51$) mais n'est pas applicable *in vivo* car il se trouve rapidement dégradé par des enzymes avant d'atteindre le milieu tumoral¹²⁹.

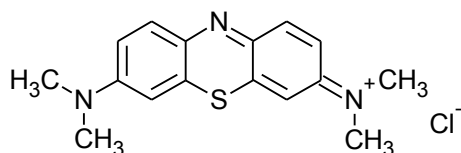


Figure 17 : Structure chimique du bleu de méthylène.

II.4.1.c. L'hypéricine

L'hypéricine est une molécule naturelle de type quinone extraite du *Millepertuis* (Figure 18). Son activité en PDT (seule ou associée à l'HpD) a été mise en évidence par Koren *et al.* en 1996¹³⁰. Elle possède aussi des propriétés spectroscopiques compatibles avec une utilisation en PDT (absorption à $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$ avec $\varepsilon = 45\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)⁷¹. L'action photodynamique est engendrée par l'action conjuguée d'un radical semi-quinone, de l'oxygène singulet et de l'anion superoxyde.

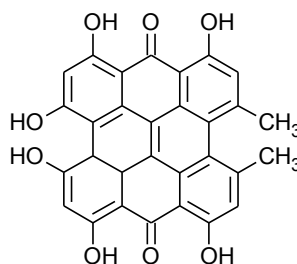


Figure 18 : Le *Millepertuis* et la structure chimique de l'hypéricine.

II.4.1.d. Le rose Bengale

Le rose Bengale, ou 4,5,6,7-tétrachloro-2',4',5',7'-tétraiodofluorescéine est extrait du rosier de Bengale rouge (Figure 19). Ce colorant est aussi une molécule photosensibilisatrice. Gollnick *et al.* déterminent en 1964 son rendement quantique de production d'oxygène singulet dans le méthanol, il est égal à 0,76¹³¹. Au-delà de toute la poésie inspirées par les roses rouges (Alfred de Musset : « Vous êtes comme les roses du Bengale, Marianne, sans épines et sans parfum » *in* Les caprices de Marianne, 1833), le rose de Bengale est souvent utilisé comme référence pour les

mesures de rendement quantique de production d'oxygène singulet en solution. Le rose Bengale est utilisé pour ses propriétés de photosensibilisateur pour le traitement ou le stockage de l'eau¹³² ou comme agent antibactérien¹³³.

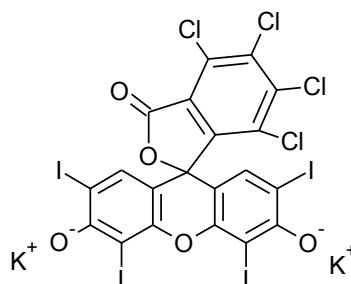


Figure 19 : La rose de Bengale et formule développée du rose de Bengale.

Outre ces molécules naturelles, d'autres photosensibilisateurs ont été synthétisés.

II.4.2. La 1^{ère} génération de photosensibilisateurs

Le Photofrin (Figure 20), dans ses formes I et II, constituent la première génération de PS. Entre 1993 et 2000, le **Photofrin** sera le seul photosensibilisateur utilisé en clinique humaine.

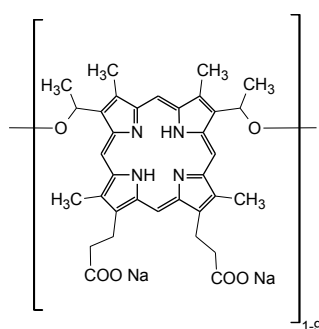


Figure 20 : Formule développée du Photofrin.

Etant le premier photosensibilisateur mis sur le marché, le Photofrin reste encore le PS le plus utilisé en clinique, malgré les inconvénients qu'il présente. Tout

d'abord, il s'agit d'un mélange hétérogène d'oligomères de porphyrines ; il souffre d'une mauvaise clairance impliquant une photosensibilité post-traitement assez longue (le patient doit rester à l'obscurité quelques semaines). Enfin, son spectre d'absorption n'est pas optimal puisqu'il n'absorbe que très peu au-delà de 600 nm ($\epsilon_{650\text{ nm}} = 3500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans l'eau).

La PDT induite par le Photofrin est basée sur une affinité meilleure pour la tumeur et pour son système de néovaisseaux que pour les tissus sains.

Policard en 1924, observe une fluorescence accrue du photosensibilisateur injecté au voisinage de la tumeur par rapport au tissu sain alentour⁷⁰. De même, en 1948, Figge *et al.*⁷¹ remarquent et quantifient la fluorescence « rouge brique » émise par les tissus néoplasiques suite à l'injection d'hématoporphyrine (HpD) et ses dérivés et démontrent, par leurs recherches, l'accumulation sélective des porphyrines dans les tissus tumoraux.

Cette affinité pour le milieu tumoral peut s'expliquer par ce que l'on appelle l'effet **EPR** (*Enhanced Permeability and Retention*) dans les néovaisseaux. L'effet EPR est l'accumulation plus importante des macromolécules dans le tissu tumoral qui est due à l'angiogenèse tumorale. Lors de cette phase biologique indispensable au développement tumoral, les vaisseaux nouvellement formés présentent des anomalies de formes et de structures ainsi qu'un manque de cellules endothéliales bordant ces vaisseaux. Il en résulte donc une perméabilité plus forte de ce milieu et donc une porte d'entrée pour les macromolécules et les lipides notamment.

Les PS de 1^{ère} génération jouissent d'une accumulation passive préférentielle pour le milieu tumoral dû en partie à l'effet **EPR**. En rapport avec cette vascularisation forte des tumeurs, l'**intervalle drogue-lumière, noté IDL**, est un paramètre très important car il permet de définir le moment idéal pour irradier la zone, c'est-à-dire au moment où le PS y est présent à concentration maximale. Un IDL assez court va donc impliquer des dommages vasculaires plus marqués et induire un affaiblissement du développement tumoral. L'IDL favorisant l'effet

antivascularia peut varier de quelques minutes à quelques heures en fonction des propriétés pharmacocinétiques du PS. En effet, les PS plutôt lipophiles diffusent rapidement dans les tissus, alors que les PS plus hydrophiles auront tendance à rester plus longtemps dans le compartiment vasculaire.

Malgré cette capacité du Photofrin à se localiser préférentiellement dans la tumeur ou dans son réseau de néovaisseaux, de nombreux inconvénients sont encore à améliorer et ont provoqué le développement d'une deuxième génération de PS. Ces vingt dernières années, la PDT a connu des développements majeurs et ce dans diverses disciplines scientifiques. D'un point de vue chimique, de nombreux PS ont vu le jour toujours dans le but de palier aux inconvénients de la molécule référence qu'est le Photofrin. Ainsi plusieurs PS ont reçu l'autorisation de mise sur le marché selon les pays.

II.5. Photosensibilisateurs de 2^{ème} génération et ciblage passif

De nombreux travaux se sont orientés vers des photosensibilisateurs de composition définie et capables d'absorber la lumière à des longueurs d'onde plus élevées afin d'obtenir un traitement efficace pour des tumeurs plus profondes. D'autres travaux ont porté sur l'amélioration des modalités de traitement avec une meilleure prise en compte de l'intervalle drogue-lumière (IDL) ou le développement de procédés d'excitation biphotonique. Des études de formulation des PS ont été très importantes dans le but de la protéger du milieu biologique. Les PS de deuxième génération sont issus de modifications chimiques. Parmi ces modifications, certaines vont aller dans le sens d'un **ciblage** dit **passif** que nous développerons dans ce paragraphe.

II.5.1. Vers des PS absorbant dans le rouge

La majorité des PS de seconde génération présentent une à des longueurs d'onde situées entre 650 et 800 nm, zone considérée comme la fenêtre thérapeutique et ce pour deux raisons (Figure 21) :

- ★ les principaux constituants de la peau absorbent peu à ces longueurs d'onde.
- ★ le proche infrarouge subit moins de diffusion que les UV-visible présentent une énergie suffisante pour exciter le PS. En effet, la loi de diffusion est, en milieu dilué, une loi en λ^{-4} . Même si le milieu biologique est un milieu fortement hétérogène et dense, la loi de diffusion doit tout de même dépendre de l'inverse de la longueur d'onde, mais en d'autres termes de proportionnalité.

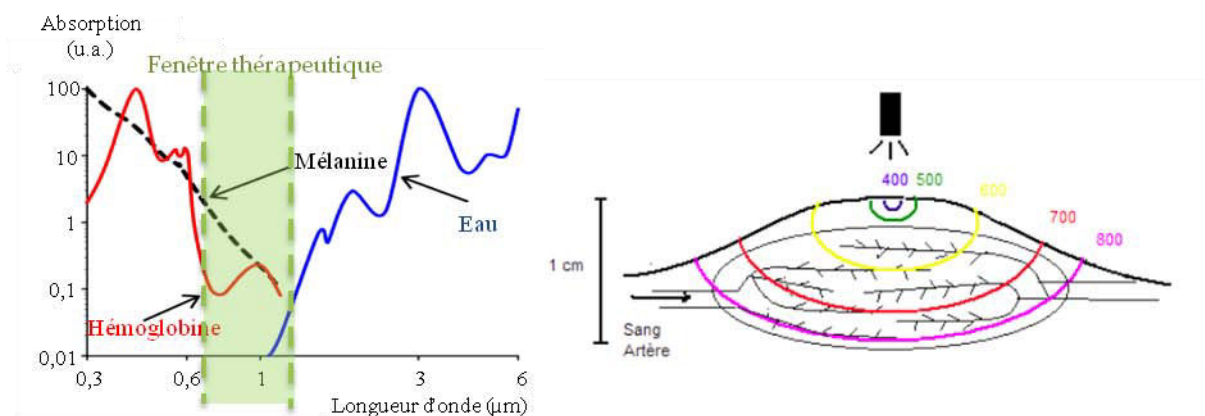


Figure 21 : Pénétration de la lumière dans les tissus. A gauche : spectres d'absorption des principales molécules endogènes. A droite : profondeur de pénétration théorique de la lumière dans un tissu selon la longueur d'onde (en nm).

Parmi ces PS de seconde génération, on trouve ainsi les chlorines, bactérochlorines ou les phtalocyanines, qui possèdent toutes une bande d'absorption plus intense à ces longueurs d'onde (fenêtre thérapeutique).

II.5.2. Les PS de deuxième génération ayant reçu l'AMM en Europe

II.5.2.a. Le Foscan® ou *m*-THPC

Le Foscan®, PS de seconde génération mis sur le marché en Europe par le laboratoire *Biolitech Pharma LTD* en 2001, est une molécule de type chlorine dont la structure est présentée en Figure 22. La molécule est aussi connue sous le nom de *m*-THPC, chlorine *mé*ta-tétra(hydroxyphényl).

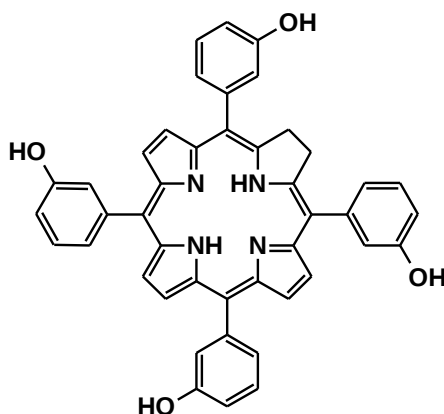


Figure 22 : Structure chimique du Foscan®.

Le Foscan est indiqué dans le traitement palliatif des carcinomes épidermoïques avancés de la tête et du cou après échec des traitements antérieurs et chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systématiques. L'illumination se fait par une lumière à 652 nm et le Foscan est injecté par voie intraveineuse à raison de 0,15 mg/kg poids du corps¹³⁴.

Le Foscan fait encore actuellement l'objet de nombreuses recherches afin d'améliorer sa biodistribution, avec son encapsulation dans des liposomes (Foslip), des formulations PEGylées (Fospeg), dans des nanoparticules de silice¹³⁵⁻¹⁴⁰.

II.5.2.b. L'acide aminolévulinique (ALA) et ses dérivés, précurseurs de la Protoporphyrine IX

Une avancée majeure en PDT est la mise au point de l'**acide aminolévulinique (ALA)** et de ses dérivés ester, en particulier en dermatologie (Figure 23).

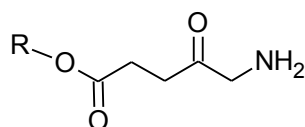


Figure 23 : Formule développée de l'ALA et de ses dérivés (R = H : ALA, R = CH₃ : méthyl-ALA, R = C₆H₁₁ : hexyl-ALA).

L'ALA (de même que ses dérivés) est un pro-médicament, c'est-à-dire qu'il va intégrer le système de biosynthèse du noyau hème pour produire la Protoporphyrine IX (PpIX) qui devient donc un photosensibilisateur biosynthétisé par la cellule elle-même (Figure 24).

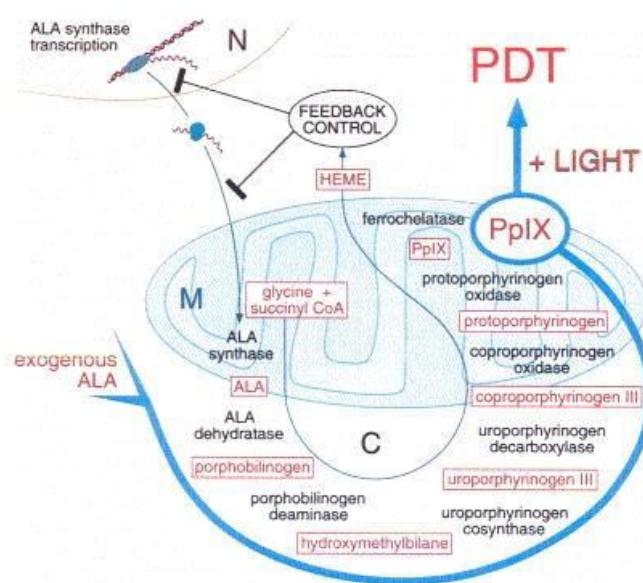


Figure 24 : Schéma de la biosynthèse de la Protoporphyrine IX (PpIX) à partir d'ALA. Les enzymes et métabolites entrant en jeu se situent dans la mitochondrie (M) et le cytosol (C). D'après Hasan *et al.*, 2000¹⁴¹.

Cette biosynthèse est un phénomène naturel mis à part qu'en absence d'excès d'ALA (conditions physiologiques normales), la PpIX est métallée par un atome de

fer à l'aide de la ferrochélatase, ce qui la rend inactive à la lumière mais qui est utilisé ensuite comme noyau hème. En présence d'excès d'ALA, la métallation ne se fait pas sur la totalité de la PpIX biosynthétisée et c'est donc la PpIX non métallée qui est ensuite activée par irradiation lumineuse.

L'ALA a d'abord été utilisée dans le traitement de cancer de la peau non-mélanome en utilisation dermique¹⁴² puis pour des pathologies non topiques comme des cancers oraux^{143, 144} ou dans le cas du traitement d'œsophage de Barrett¹⁴⁵.

L'ALA ou ses dérivés existent sous forme de crèmes applicables par voie dermique. Sous le nom de Metvix®, (commercialisé par Galderma Canada Inc.) il s'agit de chlorhydrate d'aminolévulinate de méthyle, préconisé pour le traitement des kératoses actiniques et des carcinomes basocellulaire superficiel primitif. Le Levulan® (*Dusa Pharmaceuticals*) est aussi une préparation dermique d'acide δ-aminolévulinique, utilisé notamment dans le traitement de l'acné. Une autre formulation de dérivés de l'ALA, sous forme de poudre à diluer et à injecter, est l'Hexvix® (*GE HealthCare SA*) préconisé pour la détection de tissus cancéreux dans la vessie notamment.

II.5.2.c. La Visudyne, traitement de la DMLA

La **Visudyne**¹⁴⁶ est une porphyrine qui a été développé pour traiter la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA), première cause de cécité en France. La DMLA est due à une activité angiogénique très importante au niveau de la macula qui provoque une tache floue au centre du champ visuel. Le mode d'action du médicament est le suivant : le médicament est injecté par voie intraveineuse et a tendance à s'accumuler dans les néovaisseaux et après irradiation, la destruction complète de ces vaisseaux est obtenu après plusieurs séances.

II.5.2.d. Récapitulatif des PS de 2^{ème} génération

Une liste des photosensibilisateurs ayant une AMM (ou en cours d'essais cliniques) dans différents pays et avec différentes applications¹⁴⁷ est donnée dans le Tableau 3. Tous sont des PS de deuxième génération, mis à part le Photofrin.

Tableau 3 : Récapitulatif des molécules ayant eu l'AMM ou en cours d'obtention selon le pays et leurs indications, d'après Plaetzer *et al.*, 2009¹⁴⁷.

Nom du médicament	Type de médicament	Molécule active	Pays d'AMM	Indications
Benzvix	Pro-médicament	Acide benzyl-δ-aminolévulinique	En cours	Tumeurs gastro-intestinales
Hexvix	Pro-médicament	Acide hexyl-δ-aminolévulinique	Europe	Cancer de la rate
Levulan	Pro-médicament	Acide δ-aminolévulinique	Europe Etats-Unis	Kératinoïse actinique
			En cours	Tumeurs « tête et cou » et gynécologiques
Metvix	Pro-médicament	Acide méthyl-δ-aminolévulinique	Etats-Unis Australie Canada	Carcinome basocellulaire
Lu-Tex	PS	Lutétium texaphyrine	En cours	Tumeurs « tête et cou » et gynécologiques
BOPP	PS	Protoporphyrine Borée	En cours	Tumeurs cérébrales
Pc-4	PS	Phtalocyanine 4	En cours	Lésions cutanées ou sous-cutanées
Photochlor	PS	2-(1-hexyloxyethyl)-2-divinyl pyropheophorbide-α	En cours	Carcinome basocellulaire
Photofrin, Porfimer sodium	PS	Hématoporphyrine, polyhématoporphyrine	Europe Etats-Unis Canada Japon	Dysplasie de haut grade d'un œsophage de Barrett Dysplasie cervicale Cancers endobronchiques, de l'œsophage, gastrique Cancer papillaire de la vessie
			En cours	Cholangiocarcinome Tumeurs cérébrales
Photosense	PS	Aluminium phtalocyanine	Russie	Cancers « tête et cou »
SnET2	PS	Ethylpurpurine d'étain	En cours	Cancer du sein Carcinome basocellulaire Sarcome de Kaposi Cancer de la prostate

Foscan, Temoporfin	PS	Dérivés de l'hématoporphyrine,	Europe	Soins palliatifs de cancers « tête et cou »
			En cours	Cancer de la prostate et du pancréas Cholangiocarcinome
Visudyne, Verteporfin	PS	Dérivé monoacide A de la benzoporphyrine	Europe	Carcinome basocellulaire (AMM pour la DMLA)
Tookad, WST09, WST11	PS	Dérivé de Palladium bactériochlorine	En cours	Cancer de la prostate

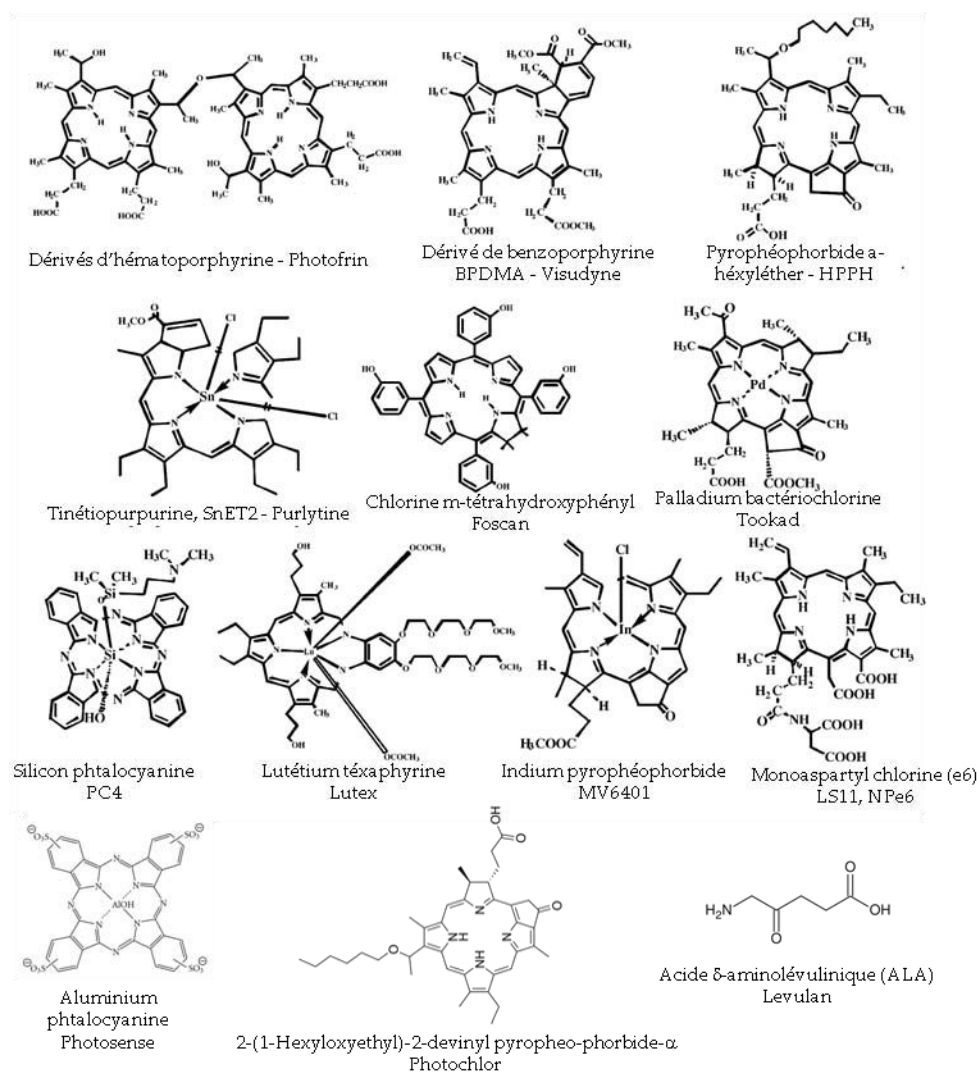


Figure 25 : Formules développées de certains PS de deuxième génération.

Nous allons exposer dans les paragraphes suivants les pistes de recherche actuelles pour améliorer les structures chimiques des PS de 2^{ème} génération déjà existants.

II.5.3. Des techniques de synthèses bien définies

Les développements d'un point de vue chimique touchent aussi au mode de synthèse des photosensibilisateurs. En effet, le macrocycle tétrapyrrolique, base des PS de type porphyrine, chlorine ou bactériochlorine, s'obtient classiquement selon deux voies de synthèse différentes : la synthèse de Lindsey¹⁴⁸ ou la synthèse de Little^{149, 150}. Ces synthèses consistent à faire réagir du pyrrole et des aldéhydes dans des proportions stœchiométriques en milieu acide anhydre. Les motifs portés par les aldéhydes vont prédéfinir les groupements portés par le macrocycle tétrapyrrolique. La méthode de Lindsey est décrite en détail dans la partie expérimentale car elle a été la méthode de choix pour synthétiser le PS que nous avons utilisé. Cette méthode est reproductible mais elle nécessite au moins 2 purifications successives du brut réactionnel afin d'éliminer les goudrons formés (polymères de pyrrole, etc.) et les porphyrines non souhaitées. La méthode de Little est basée sur le même principe et conduit aux mêmes produits et donc à des étapes de purification en fin de synthèse. La différence est que Little utilise l'acide propionique comme solvant et comme acide alors que la méthode de Lindsey fait intervenir le BF_3 étherate dans le dichlorométhane.

D'autres méthodes de synthèse des porphyrines¹⁵¹⁻¹⁵⁴ ont été développées en se basant sur des additions « 2+2 », « 3+1 » ou « 4+0 » (en termes de nombre de pyrroles que contient chaque précurseur), comme le montre la Figure 26 .

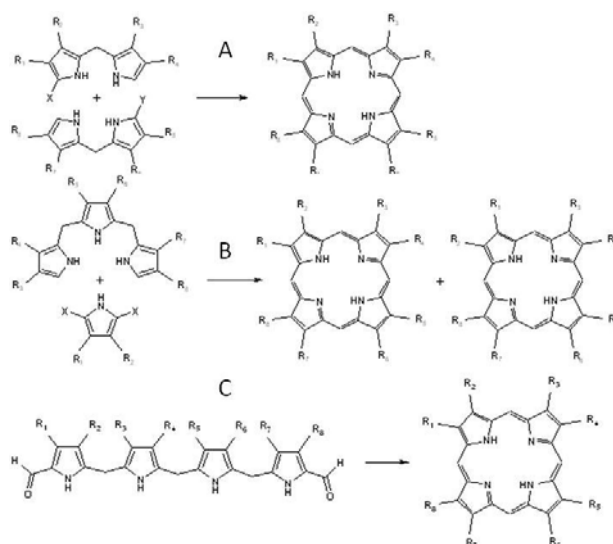


Figure 26 : Synthèses générales pour les additions de type "2+2" : A ; "3+1" : B et "4+0" : C.

Ces voies de synthèse permettent d'avancer pas à pas vers le cycle tétrapyrrolique final, avec la possibilité de mieux contrôler les étapes intermédiaires. Ces stratégies impliquent en général moins d'étapes de purification que les méthodes de Lindsey et Little.

II.5.4. Modifications chimiques des PS

L'hydrophobie des PS tétrapyrroliques est très forte et engendre des problèmes de solubilisation et d'agrégation en milieu aqueux. De nombreuses études s'orientent depuis les années 80-90 vers la dérivation de PS avec des parties hydrophiles. Un exemple intéressant concerne l'étude de porphyrines portant 1, 2 (sur 2 positions opposées ou 2 positions consécutives) ou 4 groupements sulfoniques (Figure 27).

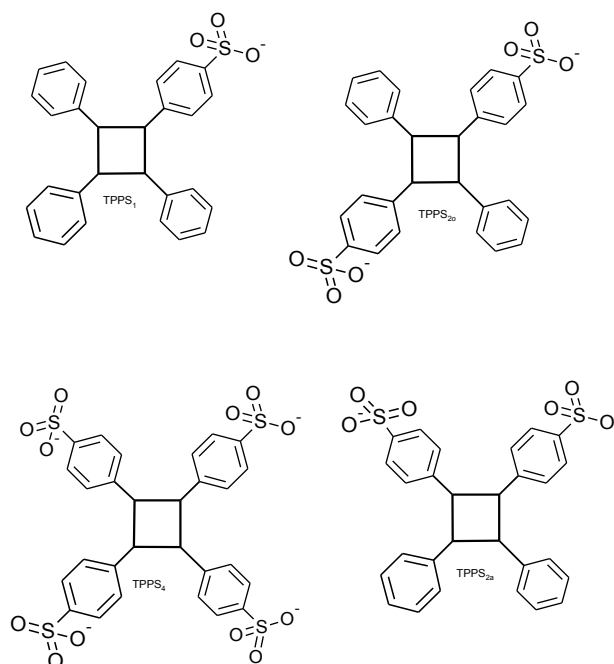


Figure 27 : Structures chimiques simplifiées des quatre porphyrines étudiées par Berg *et al.*, 1990¹⁵⁵.

Les auteurs ont étudié le lien entre l'hydrophilie de la molécule et son efficacité photodynamique¹⁵⁵. Ils montrent qu'il faut un équilibre entre hydrophobie/hydrophilie de la molécule. En effet, la plus efficace *in vitro* sur *Human Cervix Carcinoma Cells* est TPPS_{2a} alors qu'elle présente un caractère hydrophile intermédiaire entre TPPS₁ (plus hydrophobe) et TPPS₂₀ et TPPS₄ (plus hydrophiles)¹⁵⁵. Leurs conclusions indiquent donc qu'un caractère hydrophile modéré est nécessaire à une bonne efficacité *in vitro*.

L'ajout de groupements tels que les acide carboxylique, sulfate, polyéthylène glycol ou amine pour la plupart, peut modifier la biodistribution. Un groupement chargé positivement aura une tendance à induire une localisation dans le noyau de la cellule alors qu'un groupement chargé négativement entraînera une localisation dans d'autres organites de la cellule. Il est donc possible de moduler l'efficacité photodynamique en jouant sur la structure chimique des PS^{156, 157}.

II.5.5. Différentes formulations des PS

Outre ces stratégies d'optimisation chimique des PS, il existe des stratégies de formulation qui consistent à encapsuler le PS dans un assemblage pouvant favoriser son internalisation cellulaire.

II.5.5.a. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs double-couches lipidiques. Le lipide impliqué peut être un phospholipide, une molécule de cholestérol ou toute autre molécule comportant un caractère amphiphile prononcé. La méthode de synthèse va permettre d'organiser ces lipides en bicouche formant ainsi une vésicule dont l'intérieur de la bicouche va pouvoir accueillir des molécules hydrophobes et dont l'extérieur aura un caractère hydrophile (Figure 28).

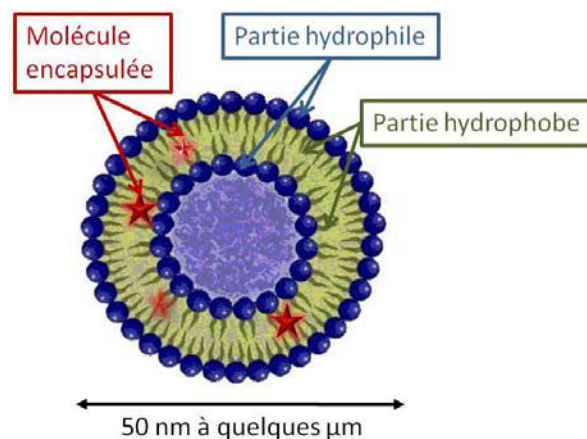


Figure 28 : Représentation schématique d'un liposome.

Une propriété fondamentale du liposome est de protéger le principe actif qu'il contient de l'hydrolyse ou de l'attaque d'enzymes. La caractéristique majeure des liposomes est de posséder la capacité de traverser les membranes des cellules et de fusionner avec celles-ci. De ce fait, ils peuvent être utilisés pour transporter des principes actifs au cœur même des cellules. Ils sont utilisés depuis des années comme

moyen de transporteur de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie pour des applications en biologie, biochimie ou en médecine¹⁵⁸.

Les liposomes étant constitués de molécules biocompatibles, ils sont rapidement dégradés et digérés par le système enzymatique ou immunitaire. Ces véhicules vont donc relarguer la molécule encapsulée et ce sans réel contrôle du lieu de relargage. Les liposomes permettent également d'augmenter l'efficacité d'un PS car ils permettent aux PS de ne pas être sous forme agrégée¹⁵⁹.

II.5.5.b. Les micelles

Les **micelles** sont aussi des macro-assemblages de molécules amphiphiles adoptant en milieu aqueux une configuration en monocouche et non en bicouche¹⁶⁰. Il en résulte alors une disposition de type cœur-coquille avec un compartiment interne hydrophobe et une surface hydrophile (Figure 29).

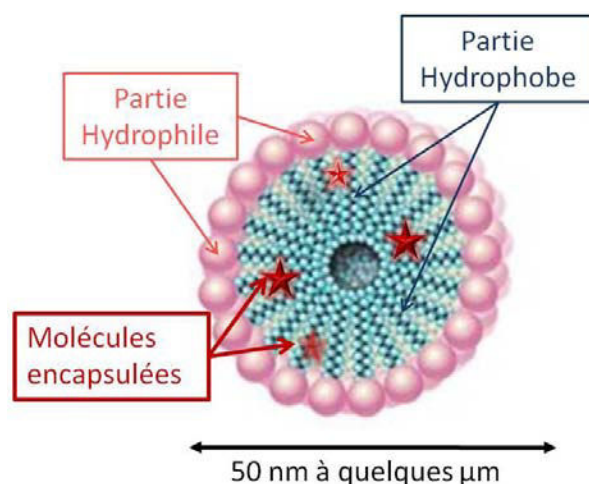


Figure 29 : Représentation schématique d'une micelle.

Plusieurs types de molécules amphiphiles sont utilisées pour établir ce genre d'assemblages, comme les phospholipides, les surfactants de type PEG ou de construction faites à partir de copolymères. De nombreuses publications relatent

l'encapsulation de PS et leur étude biologique^{161, 162}, tout comme de récentes revues abordent de manière plus large l'encapsulation de principes actifs¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Dans ce cas aussi, le PS est relargué dans le milieu biologique après dégradation par les voies métaboliques cellulaires classiques.

Une application très prometteuse en PDT des micelles est montrée par les travaux de l'équipe de Jean-Pierre Souchard. Un travail publié en 2009 (Knop *et al.*, 2009¹⁶⁶) fait état de la synthèse et de la caractérisation d'une micelle de poly (éthylèneoxyde-b- ϵ -caprolactone) encapsulant un PS, le Phéophorbide a. L'étude biologique des micelles sur la lignée cellulaire MCF-7 a notamment montré une activité photodynamique augmentée d'un facteur 2 par rapport à celle observée pour le PS seul. L'hypothèse d'une meilleure pénétration dans la cellule du PS vectorisé par la micelle peut être avancée.

Notons que les **dendrimères** se comportent sensiblement de la même manière, sauf que la construction se fait de façon covalente : en somme, le PS est fonctionnalisé par un réseau macromoléculaire hydrophile (Figure 30).

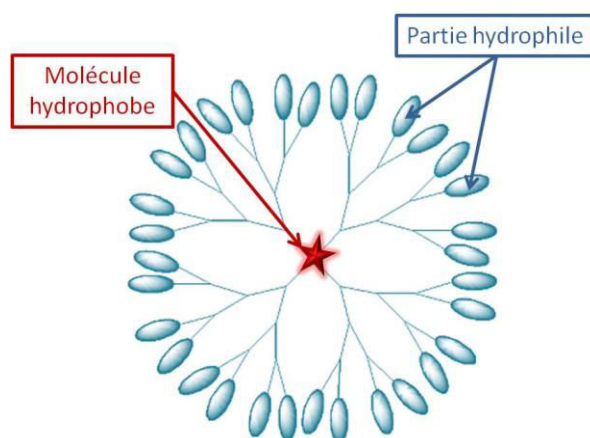


Figure 30 : Représentation schématique d'un dendrimère de PS.

La synthèse et la caractérisation de dendrimères contenant une porphyrine ont été étudiées par notre équipe de recherche. Une nouvelle voie de synthèse ainsi que la preuve de la production d'oxygène singulet par ce type de macromolécule est

reporté dans la publication de Morosini *et al.*, 2006¹⁶⁷, ouvrant des perspectives intéressantes pour l'utilisation des dendrimères en PDT.

II.5.5.c. Les nanoparticules

Les **nanoparticules** sont un autre moyen de vectoriser les PS. Les micelles, dendrimères et liposomes sont aussi *stricto sensu* des nanoparticules mais généralement, on utilise le terme **nanoparticules** pour définir des objets de tailles inférieures à 100 nm.

On distingue les nanoparticules dites « **biodégradables** » des nanoparticules « **non biodégradables** ». Les premières sont dégradées par voie enzymatique en milieu biologique pour relarguer le PS. Celles-ci présentent les mêmes avantages (biocompatibilité) et inconvénients (relargage non contrôlé) que les liposomes et micelles mais ont l'avantage d'avoir des tailles plus petites. La petite taille permet à ces nanoparticules de pouvoir être internalisées et de pouvoir donner lieu à un relargage intracellulaire du PS. Les nanoparticules « non biodégradables », quant à elles, encapsulent le photosensibilisateur, de façon covalente ou non, mais ne le relarguent pas. Les matrices sont souvent en dérivé de silice ou parfois métalliques (nanoparticules d'or, notamment). Ici, le PS n'étant pas relargué dans le milieu, l'oxygène doit cependant pouvoir diffuser dans la nanoparticule pour « réagir » avec le PS à l'état excité et former l'oxygène singulet qui va diffuser hors de la matrice et provoquer l'effet photodynamique (Figure 31).

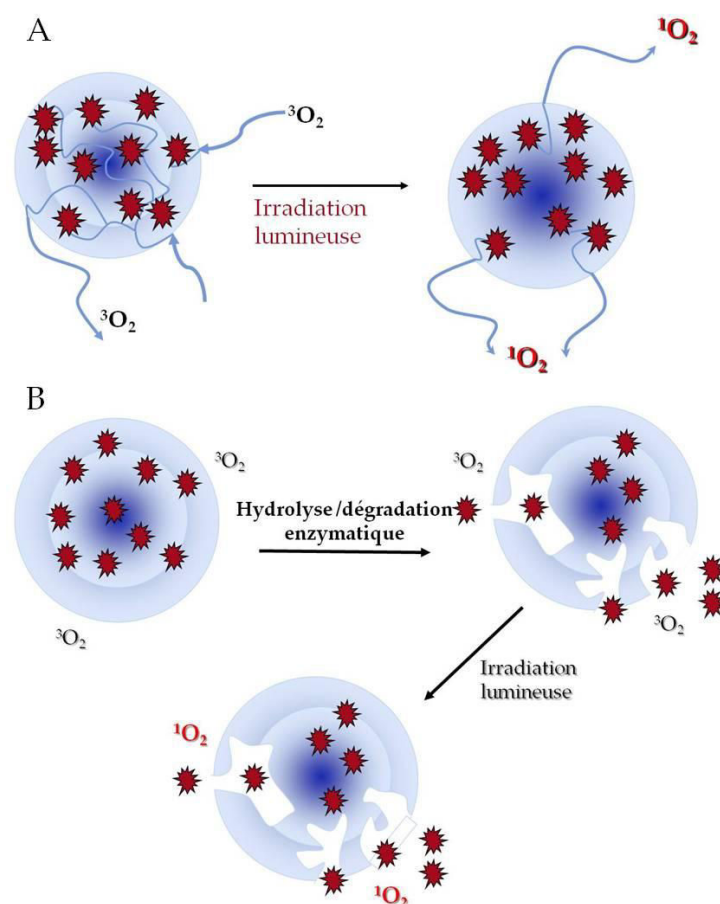


Figure 31 : Représentations schématiques de nanoparticules non-biodégradables (A) et biodégradables (B).

Mon sujet de thèse portant l'élaboration de nanoparticules pour des applications en PDT, nous avons rédigé deux revues, l'une sur l'utilisation des nanoparticules en PDT¹⁶⁸ puis une se focalisant sur les nanoparticules de silice utilisées en PDT¹⁶⁹, situées dans le fascicule adjoint à ce manuscrit.

II.5.6. Développement de la technique multiphotonique

II.5.6.a. Concept d'excitation biphotonique

Le développement de PS absorbant en biphoton est également un champ de recherche récent qui se développe. Il s'agit de molécules dont la structure particulière en général conjuguée, linéaire, peut, par exemple, posséder une partie « donneur » et une « accepteur », système appelé « *push-pull* », qui va lui conférer une bonne section

efficace d'absorption simultanée de deux photons. De telles caractéristiques vont lui permettre d'absorber 2 photons cohérents, en même temps, dont l'énergie de chaque photon sera deux fois plus faible que l'énergie d'un photon utilisé pour exciter le PS. C'est Maria Goeppert-Mayer, Prix Nobel de physique en 1931, qui décrit le principe selon lequel si un photon ne possède pas l'énergie suffisante pour produire une excitation, l'arrivée d'un second photon de même énergie, dans un intervalle spatio-temporel très court, peut amener cette excitation. La probabilité d'un tel événement est globalement très faible mais augmente dans les zones à fortes concentrations de photons, c'est-à-dire au point de focalisation (Figure 32).

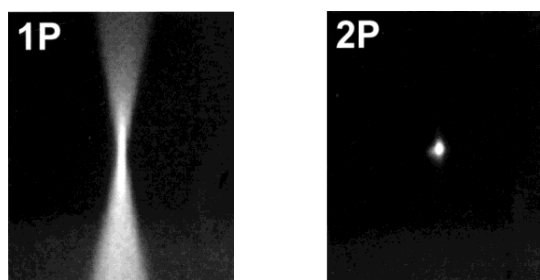


Figure 32 : Fluorescence émise avec excitation à 1 photon (1P) et à 2 photons (2P), d'après Soeller *et al.* 1999¹⁷⁰.

La meilleure résolution spatiale est aussi une des raisons du développement de la microscopie multiphotonique durant ces dernières années, qui permet d'irradier à des longueurs d'onde non absorbées ou diffusées par les tissus¹⁷¹. Cette caractéristique va trouver écho dans la communauté PDT de par la capacité de tels rayonnements à pénétrer plus profondément dans les tissus¹⁷².

Plusieurs études en PDT ont vu le jour ces dernières années, publiées par des équipes qui développent des composés dont les structures chimiques sont capables d'absorber en biphoton. Par exemple, une équipe a étudié des PS tétrapyrroliques brevetés¹⁷³ en excitation biphotonique par laser pulsé femtoseconde à 800 nm *in vitro* sur des cellules MDA-MB-231 et *in vivo* (cellules MDA-MB-231 xénogreffées sur souris SCID)¹⁷⁴. Un autre exemple vient de l'équipe de Kim *et al.* qui développe un

absorbeur à deux photons capable de transférer son énergie à un photosensibilisateur, à son tour capable de produire de l'oxygène singulet¹⁷⁵. L'encapsulation des deux molécules dans une même nanoparticule de silice permet de favoriser ce transfert d'énergie par FRET et permet d'observer la production d'oxygène singulet après une excitation biphotonique à 800 nm. Les complexes de ruthénium (II) présentent également un intérêt en thérapie photodynamique à deux photons, et font l'objet du paragraphe suivant.

II.5.6.b. Exemples des complexes de ruthénium

Les complexes à bases de ruthénium (Ru) ont des structures chimiques conjuguées et sont connus pour être des molécules avec une section efficace d'absorption à deux photons très importante. A l'état d'oxydation 2+, le cation **ruthénium** possède une structure électronique [Kr] 4d⁶ qui lui confère une coordinence de 6 lui permettant de chélater 6 atomes. Les liaisons de coordination proviennent du recouvrement des 6 orbitales vides d²sp³ du cation Ru²⁺ avec les six orbitales sp² des ligands contenant les doublets électroniques non liants. Cette liaison est ensuite stabilisée par une composante de rétrocoordination qui implique la délocalisation partielle des électrons du métal vers les orbitales π^* des ligands. Ces complexes de Ru(II) vont avoir de fortes interactions avec la lumière et notamment dans l'absorption biphotonique. On distingue 3 types de transitions électroniques entre les orbitales moléculaires induites par l'adsorption d'énergie photonique¹⁷⁶ (Figure 33) :

- ★ les transitions LC (*Ligand Centered*) : elles correspondent à une transition entre deux orbitales centrées sur les ligands ($\pi - \pi^*$). Elles présentent notamment une bande d'absorption intense dans la région UV (200-400 nm).

- ★ les transitions MC (*Metal Centered*) : elles correspondent à une transition entre deux orbitales centrées sur le métal ($d\pi - d\sigma^*$). Elles sont peu intenses et situées à la frontière entre le visible et l'UV.
- ★ les transitions MLCT (*Metal to Ligand Charge Transfer*) : elles correspondent à un transfert de charge d'une orbitale de type métal vers une orbitale de type ligand ($d\pi - \pi^*$). Elles sont relativement intenses et situées dans le domaine du visible.

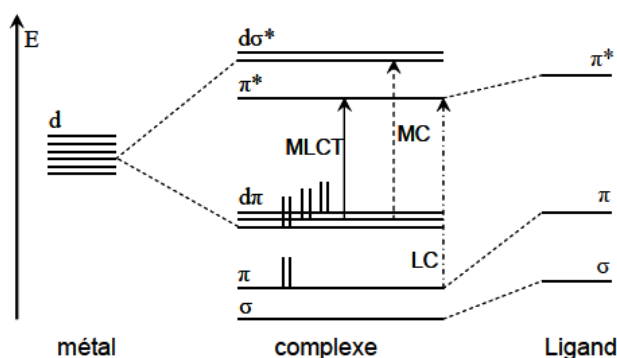


Figure 33 : Diagramme d'énergie des principales orbitales moléculaires et les transitions résultantes pour un complexe octaédrique de Ru(II)¹⁷⁷.

L'exemple des complexes de ruthénium polypyridiniques (Figure 34) est intéressant à citer ici car des applications en PDT font l'objet actuellement de nombreuses recherches.

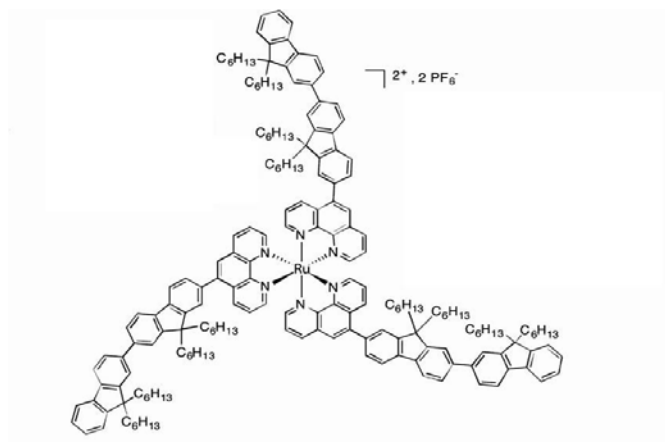


Figure 34 : Exemple de structure chimique d'un complexe de Ru(II) polypyridinique.

Ce type de structure, après absorption en biphoton, passe à un état excité MLCT singulet. Par conversion inter-systèmes, cet état se désactive rapidement (quelques centaines de femtosecondes) pour peupler l'état MLCT triplet (Figure 35). A cet état $^3\text{MLCT}$, la molécule peut, soit passer à l'état ^3ML en lui apportant de l'énergie, soit se désactiver de façons radiative ($\lambda_{\text{em.}} \sim 600 \text{ nm}$), non-radiative ou par transfert d'énergie aux molécules environnantes. Cette dernière voie des désexcitations comprend notamment la formation d'oxygène singulet¹⁷⁸.

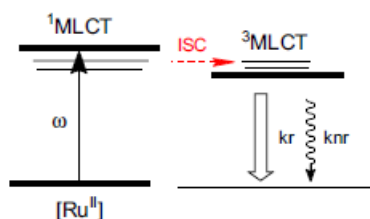


Figure 35 : Diagramme de Jablonski simplifié pour un complexe de Ru(II) ; ω : absorption à 1 ou 2 photons, ISC : croisement inter-systèmes, k_r : constante de désexcitation radiative et K_{nr} ; constante de désexcitation non-radiative, tirée de G. Lemerrier *et al.*, C. R. Chimie 11 (2008)¹⁷⁸.

L'intérêt majeur de l'utilisation de ces complexes de Ru(II) en PDT est la capacité à absorber efficacement à deux photons, ce qui induit des longueurs d'onde d'excitation de l'ordre de 800 à 900 nm. L'équipe du Pr Lemerrier, G. de l'Université

de Reims, a d'ailleurs récemment publié un travail concernant des complexes de Ru(II) comme potentiel PS à deux photons pour la PDT¹⁷⁹.

Les travaux de Schmitt *et al.* décrivent les synthèses de complexes de Ru(II) et de porphyrines pyridinium¹⁸⁰⁻¹⁸² ainsi que leur caractérisations physico-chimiques et photophysiques. Si les caractérisations spectroscopiques montrent de bonnes sections efficaces d'absorption à deux photons des molécules synthétisées, les études biologiques *in vitro*, sont effectuées avec une excitation monophotonique à 652 nm.

Une publication, de Poon *et al.*, relate aussi la synthèse d'un complexe de Ru(II) bipyridinium couplé à une porphyrine¹⁸³. Les caractérisations photophysiques ainsi que la microscopie confocale se font en excitation biphotonique à 800 nm. Cependant, les tests biologiques se font ici encore en excitation monophotonique à 652 nm.

Les complexes de Ru(II) et les molécules absorbant à deux photons font partie des derniers développements qui devraient permettre d'améliorer l'efficacité de la PDT dans les prochaines années. Cependant, un inconvénient de ces structures est la toxicité potentielle de l'atome ruthénium.

II.5.7. Conclusion sur les PS de 2^{ème} génération

Tous les photosensibilisateurs décrits dans le paragraphe précédent ne sont basés que sur un ciblage dit passif des milieux tumoraux grâce à l'effet EPR. Les recherches s'orientent depuis une dizaine d'années sur des photosensibilisateurs de 3^{ème} génération qui sont des assemblages moléculaires ou particuliers comportant une partie « PS » et une partie **de ciblage actif**. La compréhension et les études de plus en plus fines d'un point de vue biologique et anatomique des tumeurs permettent de trouver des cibles spécifiques des tumeurs et ainsi diminuer fortement les effets secondaires des thérapies et la PDT en a fait son nouveau *challenge*. Il s'agit de modifier chimiquement le PS pour l'amener directement aux cellules cancéreuses ou au niveau du réseau sanguin tumoral, en ciblant un récepteur surexprimé à la

surface de la cible. La reconnaissance spécifique du ligand greffé sur le PS permet d'accroître fortement l'affinité pour la cible par rapport aux tissus sains.

II.6. Photosensibilisateurs de 3^{ème} génération et ciblage actif

Cette classe de PS est constituée des mêmes molécules que la seconde génération, sur lesquels sont fixés différents ligands, qui sont reconnus spécifiquement par des récepteurs spécifiques. Le ciblage actif se découpe en deux grandes catégories qui correspondent à deux stratégies aboutissant à la destruction de la tumeur. On distingue les adressages direct et indirect :

- ★ L'adressage direct consiste à cibler les récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses.
- ★ L'adressage indirect consiste, quant à lui, à cibler le réseau de néovaisseaux tumoral.

Un état des lieux de ces leviers est donné dans une revue écrite par une partie de la communauté française travaillant sur la PDT¹⁸⁴.

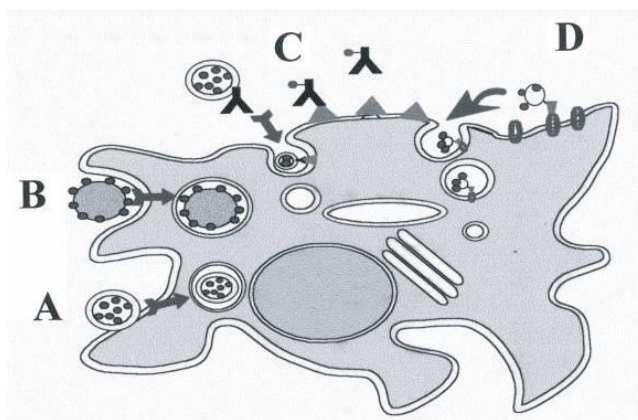


Figure 36: Stratégies de ciblage des PS vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ciblage passif : véhiculés par des liposomes (A), ou transportés par des nanoparticules (B). Ciblage actif : PS conjugués à une molécule de ciblage (anticorps, peptide, ligand spécifique, nanoparticule adressée, etc.) (C et D), d'après Barberi-Heyob *et al.*, 2007¹⁸⁴.

II.6.1. Ciblage actif direct

Cette stratégie anticancéreuse consiste à cibler les cellules cancéreuses *via* des récepteurs que celles-ci surexpriment. Les stratégies les plus développées sont décrites dans les paragraphes suivants.

II.6.1.a. Récepteurs à œstrogène

Une cible potentielle en PDT est les récepteurs à œstrogène qui sont surexprimés dans les cancers du cerveau, des ovaires et du sein^{185, 186}. Une équipe a montré qu'une porphyrine couplée *via* un bras espaceur à l'œstradiol (Figure 37) était plus internalisée dans des cellules surexprimant les récepteurs à œstrogène (MCF-7) que des cellules ne les exprimant pas (MDA-MB-231), sans toutefois induire une très bonne activité photodynamique du PS¹⁸⁷.

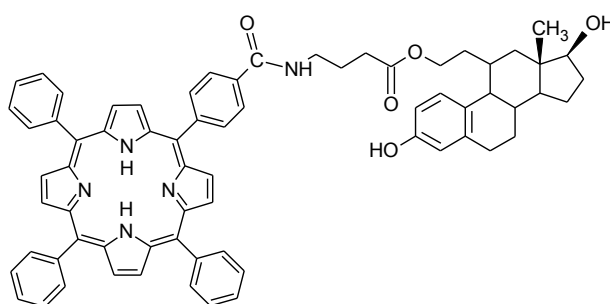


Figure 37 : Formule développée du conjugué porphyrine-œstradiol.

Une autre étude plus récente de ciblage des récepteurs nucléaires à l'œstradiol fait intervenir le Phéophorbide a couplé à un motif œstrogénique¹⁸⁸. El Akra *et al.* prouvent notamment, par microscopie confocale sur la lignée cellulaire MCF-7, que le PS conjugué à l'œstradiol se localise préférentiellement dans le noyau. De plus, ils constatent une efficacité photodynamique 7 fois supérieure à celle observée pour le PS seul¹⁸⁸.

II.6.1.b. Récepteur de l'acide folique

Un autre récepteur qui a apporté des résultats très intéressants, notamment dans notre équipe de recherche, est le récepteur à l'acide folique. Les récepteurs à l'acide folique sont surexprimés dans de nombreux cancers notamment pour l'ovaire, l'utérus et le cerveau (Figure 38).

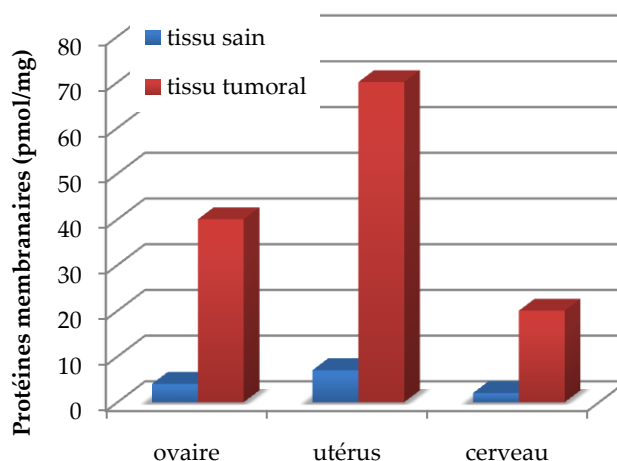


Figure 38 : Expression du récepteur à l'acide folique dans différents tissus

L'équipe PDT a publié de nombreux résultats lors de la thèse de Julien Gravier (2004-2008)¹⁸⁹ qui consistait en la synthèse, l'étude photophysique et l'étude biologique sur cellules surexprimant les récepteurs à l'acide folique (cellules KB), d'une molécule comportant une chlorure couplée à l'acide folique par deux bras espaceurs différents (Figure 39).

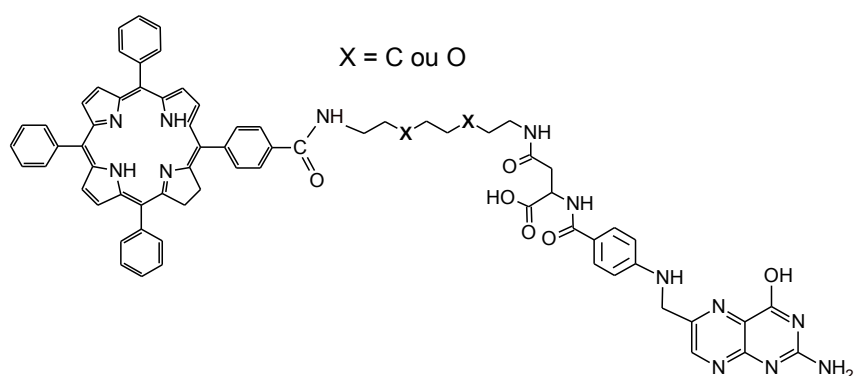


Figure 39 : Formule développée des molécules étudiées par Julien Gravier¹⁹⁰.

Par spectrofluorimétrie fibrée chez la souris xénogreffée, il a été démontré que l'accumulation de la molécule synthétisée dans les tumeurs exprimant les récepteurs à l'acide folique, 4 h après injection, était deux fois supérieure à celle de la chlorine seule mais surtout que la sélectivité par comparaison au tissu sain était améliorée d'un facteur 5. Il a aussi été montré que l'incorporation se faisait effectivement par le récepteur car en ajoutant de l'acide folique libre lors de l'expérience, une diminution de l'incorporation cellulaire du PS était observée^{190, 191}. Cette étude a notamment été poursuivie en étudiant la vectorisation de *quantum dots* par l'acide folique pour une application en PDT avec les travaux de thèse de Vincent Morosini (2006-2010)¹⁹².

II.6.1.c. Récepteurs des sucres : les lectines

Une autre voie de ciblage actif est de coupler un photosensibilisateur avec des sucres, qui sont appelés des PS glycoconjugués. En effet, il a été prouvé que certains récepteurs aux sucres sont aussi surexprimés sur des cellules cancéreuses.

Notre équipe de recherche a publié des études sur ce type de ciblage, notamment lors de la thèse de Benoît Di Stasio (2003-2007)¹⁹³ qui a montré une incorporation préférentielle d'une molécule composée d'une porphyrine et de dérivés glucosamine dans les cellules HT29 surexprimant ces récepteurs par rapport à la porphyrine seule^{194, 195}. D'autres équipes en France travaillent à l'amélioration de cette voie de ciblage en utilisant différents types de sucres (mannose, galactose)¹⁹⁶⁻¹⁹⁹.

II.6.1.d. Utilisation du métabolisme des cellules cancéreuses

Les PS conjugués à des motifs polyamines possèdent une meilleure hydrophilie et une bonne internalisation dans les cellules cancéreuses. En effet, la cellule cancéreuse étant dans une phase de développement intense, son métabolisme va attirer fortement les polyamines de type spermine et spermidine (Figure 40). Des études relatant la synthèse et l'étude biologiques de tels composés en PDT sont développées^{200, 201}.

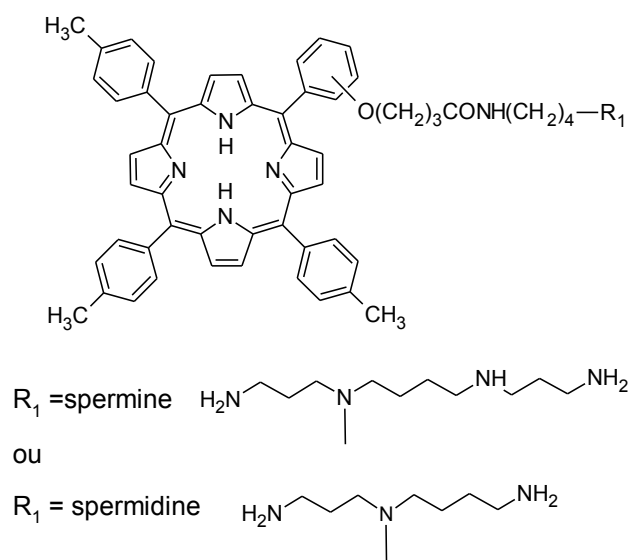


Figure 40 : Formule développée de conjugués porphyrine-polyamines, d'après Sol *et al.*, 2006²⁰¹.

II.6.2. Ciblage actif indirect

Cette stratégie de ciblage consiste à cibler non pas la cellule cancéreuse, mais à cibler le réseau de néovaisseaux tumoraux.

Nous avons vu que l'angiogenèse tumorale était un processus très important dans le développement de la tumeur et dans la dissémination des métastases, qui conduisait à la formation d'un réseau de vaisseaux sanguins pour irriguer la tumeur en oxygène et nutriments. Les acteurs biologiques responsables de ce processus vont pouvoir ainsi être des cibles potentielles car ils seront soit surexprimés, soit activés, et donc auront un caractère propre à l'environnement tumoral.

L'ANET (*anti-neovascular therapy*) a pour but d'éradiquer les cellules endothéliales proliférantes de phénotype angiogénique, et par là-même d'éradiquer les cellules tumorales en bloquant tout apport sanguin en nutriments et en oxygène. On distingue trois grandes stratégies : le ciblage vasculaire, la thérapie métronomique et la PDT. De nombreuses études tendent à montrer le rôle

prépondérant joué par l'effet vasculaire dans l'éradication tumorale par PDT. Une accumulation accrue et plus sélective des photosensibilisateurs au voisinage des néovaisseaux tumoraux peut favoriser cet effet, et donc l'efficacité du traitement. La VTP apparaît comme une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer par comparaison à des approches plus conventionnelles visant les cellules tumorales^{202, 203}. Les cellules endothéliales associées aux tumeurs se divisent de 20 à 2000 fois plus rapidement que les cellules endothéliales normales (sauf dans certains processus d'angiogenèse physiologique). Elles expriment des marqueurs que les cellules endothéliales quiescentes n'expriment pas ou faiblement (antigènes, récepteurs aux facteurs de croissance etc.), parmi lesquels : les intégrines $\alpha_v\beta_3$, les récepteurs Tie, les récepteurs des éphrines et ceux du VEGF, auxquels nous nous intéressons ici. **La stratégie d'adressage des photosensibilisateurs vis-à-vis des cellules endothéliales angiogéniques, initiée en 2005 par l'équipe PDT, s'inscrit dans ce nouveau mode de traitement.**

II.6.2.a. Ciblage des intégrines

Le peptide RGD est reconnu par les intégrines dont nous avons parlé dans la partie sur l'angiogenèse. Le tripeptide RGD possédant une forte affinité et spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ²⁰⁴, plusieurs équipes ont étudié la conjugaison d'un PS avec le motif RGD²⁰⁵⁻²⁰⁸. De plus récentes études montrent une affinité accrue d'un motif appelé RAFT-RGD pour les intégrines. Ce travail consiste à coupler quatre motifs RGD cycliques sur une molécule qui sert d'attache sur un liposome fluorescent. Seules des applications en imagerie de fluorescence sont décrites dans la littérature²⁰⁹ mais la communauté PDT s'intéresse à ce ciblage par le RAFT-RGD.

Notre « équipe PDT » a montré que le couplage entre une tétraphénylporphyrine et deux séquences RGD, l'une cyclique et l'autre linéaire, améliorait fortement, *in vitro*, l'activité photodynamique du PS sur des cellules

HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*). Les doses létales à 50 % (DL₅₀) sont de l'ordre de 3 à 4 J/cm² alors que le PS non conjugué, malgré un meilleur rendement quantique d'oxygène singulet, n'a eu aucun effet photodynamique²¹⁰.

II.6.2.b. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des enzymes qui sont sécrétées lors de l'angiogenèse tumorale afin, entre autres, de détruire la matrice extracellulaire pour favoriser le développement des néovaisseaux tumoraux.

Une stratégie a été développée en utilisant l'activité enzymatique de ces MMPs. Il s'agit de molécules comportant 3 entités, appelées *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB), développées par l'équipe de Gang Zheng à Toronto à partir de 2004²¹¹. Un PMB comporte un photosensibilisateur (qui provoquera l'effet photodynamique) couplé à un inhibiteur, ou *quencher*, d'oxygène singulet *via* un peptide choisi pour être reconnu par les MMPs. Le principe d'action est le suivant : lorsque le conjugué ne se trouve pas en présence de protéinases, un transfert d'énergie entre photosensibilisateur à l'état triplet et l'inhibiteur se produit, empêchant ainsi la formation d'oxygène singulet. En revanche, en présence d'enzymes spécifiques du milieu tumoral, les enzymes clivent le peptide et libèrent les deux entités. Le photosensibilisateur séparé de son inhibiteur retrouve ses propriétés photodynamiques. La Figure 41 illustre cette stratégie.

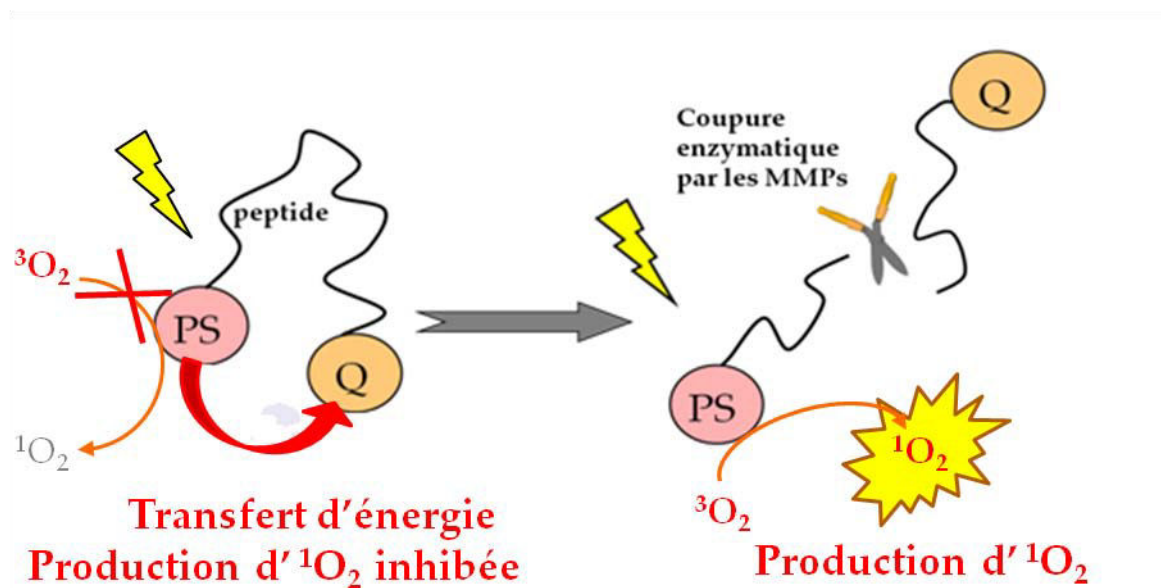


Figure 41 : Principe de la stratégie du *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB).

Des études ont donc porté sur la recherche de peptides substrats de certaines MMPs. Le peptide GPLGLARK est un peptide substrat des MMPs-7 avec une coupure enzymatique entre la glycine (G) et la leucine (L)²¹². Après avoir apporté la preuve du concept en 2004 en utilisant des caspases comme enzymes²¹¹, l'équipe de Zheng a ensuite développé un PMB comprenant un PS de type chlorine et un *quencher* de type caroténoïde relié par le peptide GPLGLARK. Ils ont montré la preuve du concept de l'inhibition de la production d'oxygène singulet et de la coupure enzymatique par les MMP-7 et non par les MMP-2. Le *quencher* utilisé est une molécule appelée *Blackberry Quencher* qui a la propriété d'inhiber la production d'oxygène singulet et la fluorescence²¹³.

Les peptides GPLGIAGQK²¹⁴ et PLGL⁶³ ont été décrits comme étant clivés par les MMPs-2 et -9 entre G et L.

En première année de thèse, j'ai travaillé sur ce sujet en synthétisant le photosensibilisateur, un inhibiteur de type caroténoïde et le peptide GPLGIAGQK. Après une première étude d'inhibition en solution entre l'inhibiteur d'une part et le

PS d'autre part, nous avons décidé, au vu du travail restant, que cette thématique ferait l'objet d'une thèse à part entière, qui est menée par Marc Verhille.

Nous avons publié une revue qui répertorie toutes les stratégies dite de PMB qui peuvent être assez vastes, allant de la séparation des entités par un peptide clivé par voie enzymatique, d'un brin d'ADN qui trouve une séquence complémentaire ou encore des répulsions/attractions électrostatiques. Nous traiterons de cela plus en détail dans le 4^{ème} Chapitre dédié au contrôle de l'oxygène singulet.

II.6.2.c. Ciblage de neuropiline-1

Un autre récepteur est le co-récepteur neuropiline-1 noté NRP-1. Cette stratégie de ciblage sera celle retenue pour mon travail de thèse. Partant de résultats très prometteurs obtenus dans les travaux de thèse de Loraine Tirand¹⁵ et de Noémie Thomas²¹⁵, nous avons cherché à améliorer ce ciblage en utilisant des nanoparticules adressées. Les principaux résultats antérieurs à ma thèse seront exposés en détail en introduction du Chapitre II.

Conclusions

La PDT est proposée comme une stratégie thérapeutique relativement récente et très prometteuse. Malgré ses aspects attractifs, le nombre de photosensibilisateurs disponibles cliniquement reste encore très limité et une conception rationnelle de photosensibilisateurs mieux adaptés aux applications thérapeutiques permettrait de donner un nouvel essor à la PDT. A partir des photosensibilisateurs de première génération, des photosensibilisateurs de deuxième génération, de composition mieux définie, de structure chimique les rendant compatibles avec une utilisation en milieu aqueux ont été élaborés. L'équipe PDT de Nancy s'intéresse aujourd'hui à la conception de photosensibilisateurs de troisième génération, possédant, en plus, un module d'adressage permettant de les fixer spécifiquement à la cible. Plus

particulièrement, des photosensibilisateurs pour des applications en VTP (*Vascular Targeted PDT*) sont développés. Il ne s'agit pas d'avoir un effet de mort directe des cellules néoplasiques, mais plutôt d'éradiquer la tumeur en visant ses vaisseaux sanguins nourriciers.

Pour réduire les phénomènes non spécifiques résultant d'une part, du caractère hydrophobe des conjugués synthétisés entraînant une agrégation nuisible aux propriétés photophysiques des molécules photo-activables et une baisse d'affinité pour la cible, et d'autre part, d'une capture importante par le système réticulo-endothélial, une solution est d'utiliser des nanoparticules. Le sujet de thèse qui m'a été confié consiste en l'élaboration de nanoplates-formes multifonctionnelles originales, permettant le couplage de photosensibilisateurs et de peptides d'adressage. Par ailleurs, la stratégie qui consiste à allier thérapie et diagnostic, encore appelée **théranostic** est rendue possible grâce à l'utilisation de nanoparticules de structure particulière permettant de les visualiser par IRM.

Le Tableau 4 rassemble les principaux avantages et inconvénients des méthodes PDT. Si la première génération actuellement utilisée en clinique ne fait plus l'objet de recherches approfondies, les travaux actuels visent l'utilisation de nouvelles molécules (PS) et de nouveaux vecteurs pour atteindre les cibles malignes.

Tableau 4 : Principaux avantages et inconvénients des différentes générations de PS.

PDT	Avantages	Inconvénients
1 ^{ère} génération	Traitement efficace et peu invasif. Localisation partielle dans le tissu malin. Traitement préférentiellement en surface (possibilité d'utiliser des fibres optiques).	Localisation partielle dans le tissu malin. Mélanges initiaux impurs. Cancers spécifiques. Photosensibilité rémanente. Faible absorption dans le rouge. Rendement quantique de production d'oxygène singulet modeste. Stabilité des produits (?) Procédés d'élimination des déchets.

2 ^{ème} génération	Cf. <i>supra</i> . Produits purs. Meilleure absorption dans le rouge. Encapsulation.	Photosensibilité rémanente. Stabilité des produits (?) Procédés d'élimination des déchets. Cibles atteintes de manière passive.
3 ^{ème} génération	Cf. <i>supra</i> . Ciblage spécifique.	Photosensibilité rémanente. Stabilité des produits (?) Procédés d'élimination des déchets.
Nanoparticules multifonctionnelles	Cf. <i>supra</i> . Couplage traitement / diagnostic. Protection du PS vis-à-vis du milieu biologique (et réciproquement). Clairance facilitée et encapsulation des métaux lourds (Gd).	Photosensibilité rémanente. Stabilité des produits (?) Procédés d'élimination des déchets.

L'objectif de la thèse est inscrit dans l'exploration de systèmes de 3^{ème} génération, utilisant des nanoparticules, devant permettre à la fois un ciblage spécifique des zones à traiter et un suivi par imagerie de leur localisation. Il s'agit de démontrer la faisabilité de **l'élaboration de nanoparticules multifonctionnelles** qui porteront un cœur d'oxyde de lanthanide pour de l'imagerie IRM, un photosensibilisateur encapsulé de façon covalente dans une matrice de polysiloxane, pour la thérapie, et des unités peptidiques à la surface des nanoparticules pour les adresser vers le réseau des néo-vaisseaux tumoraux.

Chapitre II :
Nanoparticules
multifonctionnelles
adressées pour une
thérapie photodynamique
antivasculaire. Preuve de
concept

Chapitre II : Nanoparticules multifonctionnelles adressées pour une thérapie photodynamique antivasculaire.

Preuve de concept

Le but de l'étude décrite dans ce chapitre est de montrer la faisabilité d'élaborer des nanoparticules de silice renfermant un photosensibilisateur et des unités peptidiques de ciblage, conservant à la fois les propriétés photophysiques de la molécule photo-activable et une affinité pour le récepteur neuropiline-1. L'originalité des **nano-objets** développés repose sur leur fonctionnalisation **par un peptide** ligand de NRP-1, mais également aussi par les faits qu'ils sont à la fois des **outils pour l'imagerie (IRM)** et la **thérapie (PDT)**.

La première partie de ce chapitre est consacrée au résumé des principaux résultats obtenus au cours d'études antérieures à ce travail par l'équipe PDT. Ces recherches avaient pour but l'étude du ciblage du récepteur NRP-1 par un photosensibilisateur couplé à un peptide *via* un bras espaceur. Notamment, les travaux de thèse de L. Tirand et N. Thomas ont apporté des résultats biologiques prometteurs qui sont la base du présent travail.

La deuxième partie de ce chapitre s'intéresse aux synthèses chimiques, à la description des protocoles de couplage qu'il a fallu mettre au point, aux propriétés photophysiques ainsi qu'aux premiers résultats biologiques concernant des nanoparticules de silice de taille importante (diamètre hydrodynamique $\sim 11 \pm 3$ nm). Ce travail a permis de valider le concept qui consiste à utiliser des nanoparticules en

polysiloxane fonctionnalisées par un peptide d'adressage pour une application en thérapie photodynamique antivasculaire.

Une représentation schématique de la nanoparticule qui va faire l'objet de ce chapitre est présentée en Figure 42 :

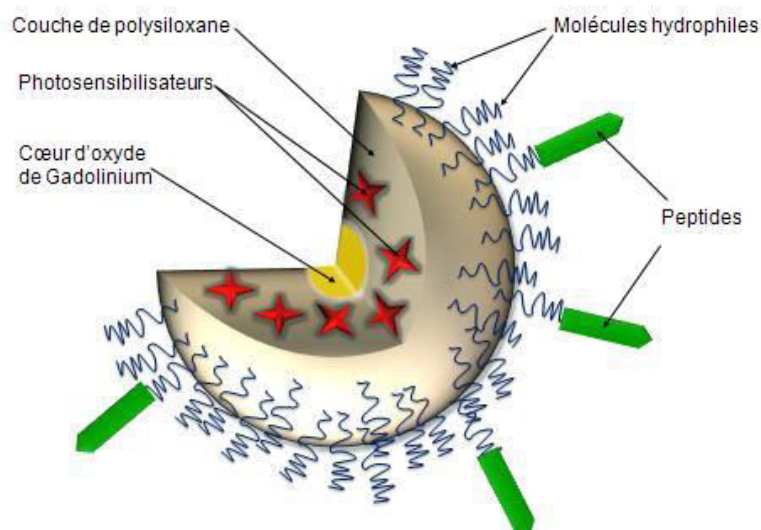


Figure 42 : Représentation schématique de la nanoparticule envisagée.

L'aspect multifonctionnel de la nanoparticule implique un travail de synthèse de chaque « composant » suivi d'un « assemblage » des « briques élémentaires ».

I. Contexte de l'étude

Nous présentons des résultats de l'équipe PDT concernant le ciblage des PS pour des applications en PDT et des résultats du LPCML concernant les nanoparticules synthétisées pour être des outils de diagnostic par imagerie de fluorescence et IRM.

I.1. Ciblage d'une chlorine par le peptide ATWLPPR

L'équipe PDT est spécialisée dans le ciblage des photosensibilisateurs. La stratégie du ciblage antivasculaire, appelée *Vascular Targeted Photodynamic Therapy (VTP)*, a été abordée avec deux peptides ciblant deux récepteurs différents. Il s'agit de RGD pour cibler les intégrines^{205, 210} et d'ATWLPPR pour cibler NRP-1. Nous nous focaliserons ici sur le ciblage de NRP-1 par ATWLPPR. Les travaux de thèse de Loraine Tirand et Noémie Thomas ont donné lieu à plusieurs publications dont nous allons décrire ici les principaux résultats qui nous servent de base pour le présent travail.

L'approche vasculaire de la thérapie photodynamique a été envisagée en couplant un photosensibilisateur à un peptide ciblant neuropiline-1 (NRP-1), co-récepteur du VEGF. La molécule est constituée d'un photosensibilisateur de type chlorine (5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine, notée TPC), conjugué à un peptide (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, noté ATWLPPR) spécifique du co-récepteur NRP-1 surexprimé par les cellules endothéliales angiogéniques, par l'intermédiaire d'un bras espaceur (acide aminohexanoïque, Ahx), permettant d'individualiser les deux parties (Figure 43). Le nouveau photosensibilisateur TPC-Ahx-ATWLPPR, qui a été synthétisé, purifié et caractérisé, présente une capacité de fixation au récepteur NRP-1. Cette propriété a pour conséquence une très nette amélioration de l'incorporation au sein des cellules endothéliales et donc, une amélioration de son activité photodynamique²¹⁶.

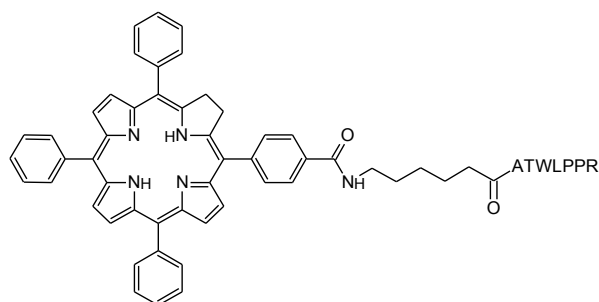


Figure 43 : Une chlorine (TPC) couplée à l'heptapeptide ATWLPPR *via* un bras espaceur Ahx.

Il a également été constaté que l'augmentation de l'incorporation de TPC-Ahx-ATWLPPR pouvait en partie être due à des phénomènes non spécifiques. Afin de pouvoir définir plus précisément la part d'incorporation intracellulaire provenant de mécanismes spécifiques par rapport à celle issue de mécanismes non spécifiques, le taux d'incorporation entre des cellules surexprimant NRP-1 (*e.g.* lignée de cancer du sein MDA-MB-231) et ces mêmes cellules traitées par ARN interférence a été comparé. Après avoir confirmé le *knock down* de NRP-1 par *western blot* et RT-PCR, il a été mis en évidence une diminution significative de l'incorporation cellulaire de TPC-Ahx-ATWLPPR pour la lignée MDA-MB-231 *knock down* comparée à la lignée *wild type*²¹⁷. Néanmoins, l'affinité du peptide pour NRP-1 est diminuée suite au couplage avec le photosensibilisateur. Cette diminution peut résulter, soit des interactions intramoléculaires entre l'entité peptidique et le groupement photoactivable, soit de l'encombrement stérique de la structure tétrapyrrolique du groupement photoactivable, limitant la reconnaissance par le récepteur. Cette affinité pourrait être améliorée en augmentant le *ratio* peptide/photosensibilisateur²¹⁸, en utilisant par exemple, un système vecteur type nanoparticule fonctionnalisée greffée en sa périphérie par le peptide d'adressage. C'est cette approche qui a été retenue pour mon projet de thèse.

L'étude *in vivo* de TPC-Ahx-ATWLPPR, sur un modèle de gliome malin humain (lignée U87), xénotransplanté en ectopique chez la souris *nude* a été réalisée. Sur ce modèle, il a été préalablement mis en évidence une angiogenèse tumorale consécutive, par le suivi de la densité vasculaire, du taux de VEGF diffusible et de la pression partielle en oxygène^{219, 220}. L'étude de la pharmacocinétique plasmatique et de la biodistribution constituait un préalable indispensable à toute étude d'efficacité *in vivo* du nouveau photosensibilisateur, en fournissant notamment des informations essentielles quant au choix des conditions de PDT, en particulier l'intervalle drogue-lumière (IDL). Les résultats de pharmacocinétique plasmatique et tumorale, après injection de TPC-Ahx-ATWLPPR par voie intraveineuse (*i.v.*), ont démontré que le

photosensibilisateur conjugué se concentrait dans la tumeur à des taux bien supérieurs à ceux retrouvés dans la peau et permettait une accumulation sélective dans les cellules endothéliales de la tumeur *in vivo* comparé au photosensibilisateur seul²²¹. L'affinité a été validée en microscopie de fluorescence par une technique de marquage immunohistochimique de l'endothélium des vaisseaux sanguins en colocalisation avec le photosensibilisateur maximale 4 h post-injection i.v.

L'utilisation de petits peptides couplés à des photosensibilisateurs afin d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des tissus cancéreux présente de nombreux avantages : petite taille permettant une meilleure pénétration tissulaire, facilité de synthèse, affinité pour leur récepteur, capacité d'internalisation etc., comme énumérés dans la revue que nous avons rédigée²²². Cependant, leur principal défaut réside dans un manque de stabilité potentiel, du fait de la présence d'exo- et d'endopeptidases *in vitro* et *in vivo* susceptibles de les dégrader. Le conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR s'est révélé stable dans le plasma humain et le plasma de souris *in vitro* mais *in vivo* la séquence peptidique se dégrade progressivement, aboutissant à la formation du composé TPC-Ahx-A. La dégradation est très rapide dans les organes du système réticulo-endothélial (foie et rate)²²³. Comme il a été également mis en évidence *in vitro*, cette dégradation enzymatique résulte majoritairement des peptidases lysosomales. L'identification du site de dégradation au niveau du peptide, a permis d'améliorer la stratégie par l'élaboration de pseudopeptides affins et plus stables²²⁴ (Thèse d'E. Kamarulzaman en cours).

L'efficacité photodynamique *in vivo* a été réalisée après optimisation des conditions de traitement d'irradiation appréhendée par une approche de méthodologie de plans d'expériences. *In vivo*, l'efficacité photodynamique avec le photosensibilisateur conjugué a induit un retard de croissance tumorale statistiquement significatif comparé au photosensibilisateur non couplé²²⁵. L'effet vasculaire a été caractérisé par une diminution du flux sanguin tumoral de 50% environ durant le traitement. *In fine*, dès 4 h post-traitement, des microhémorragies,

des stases vasculaires et des thromboses lumenales ont été observées, avec pour confirmation une nette baisse de la perméabilité vasculaire au fibrinogène. Consécutivement au traitement photodynamique avec le conjugué, les cellules endothéliales s'arrondissent mais sans atteinte des caractéristiques morphologiques des ultrastructures. Nous avons démontré que l'effet vasculaire résultait d'une modification de l'état thrombogénique des cellules endothéliales caractérisée par l'induction de l'expression du facteur tissulaire²²⁶.

Ainsi, grâce à ces résultats d'efficacité, il a été possible d'affirmer le potentiel de la VTP *via* cette stratégie de ciblage de NRP-1.

Le but de ce travail de thèse est de compléter ces résultats encourageants par l'utilisation des nanoparticules, dont les intérêts majeurs sont discutés dans les paragraphes suivants.

I.2. Intérêt des nanoparticules étudiées

Une des bases de notre recherche de thèse repose sur les travaux antérieurs menés au LPCML à Lyon (Thèse d'Anne-Charlotte Faure sous la direction d'Olivier Tillement).

L'intérêt, outre leur taille (diamètre hydrodynamique $\sim 11 \pm 3$ nm), des nanoparticules développées par cette équipe est qu'elles permettent :

- ★ La détection par IRM grâce à un cœur d'oxyde de gadolinium Gd_2O_3 ²²⁷.
- ★ Le greffage covalent de molécules organiques dans une couche de polysiloxane.
- ★ La fonctionnalisation de surface par un surfactant hydrophile.

En effet, il a été montré que l'oxyde de gadolinium, sous forme agrégée avec une concentration importante en atomes de Gd pour une taille nanométrique, possédait des propriétés de contraste très intéressantes²²⁸⁻²³¹. Gd_2O_3 augmente les vitesses T1 et T2 de relaxation des protons après stimulation par un champ magnétique. Cela a pour effet, *in vivo*, de rehausser le contraste des protons des molécules d'eau notamment. L'équipe lyonnaise a étudié cette propriété des cœurs d'oxyde de gadolinium en comparant l'effet de contraste IRM avec un produit utilisé en clinique, le DOTAREM qui est constitué de cations Gd^{3+} chélatés par l'acide gadotérique, présenté Figure 44.

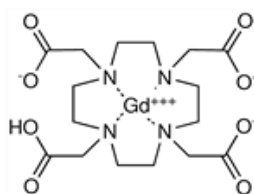


Figure 44 : Formule chimique du DOTAREM.

Les résultats sont très encourageants, car des effets de contraste équivalents ou supérieurs pour une même quantité d'atomes de Gd pour différentes tailles de cœurs sont observés²³².

Les travaux de thèse d'Anne-Charlotte Faure ont porté sur la mise en place d'un protocole **d'incorporation covalente** de plusieurs fluorophores organiques, tels la fluorescéine (FITC), la rhodamine B (RBITC) ou la cyanine 5 (Cy5), dans une matrice de polysiloxane et sur le contrôle de la croissance de cette couche pour maîtriser la taille des objets²³²⁻²³⁶.

Une autre étude a porté sur l'influence du **surfactant hydrophile** sur la biodistribution des nanoparticules. Différents polyéthylène glycols (PEG) ont été testés. Le PEG est utilisé ici car il est connu pour être hydrophile, biocompatible, non-immunogénique et non-antigénique²³⁷⁻²⁴⁰. Les PEG, comme d'autres polymères hydrophiles, induisent une furtivité des nanoparticules qu'ils recouvrent notamment

en évitant l'adsorption de protéines à leur surface ou opsonisation²⁴¹⁻²⁴⁸. La furtivité peut être définie comme la capacité d'une substance à avoir un temps de résidence élevé dans le sang, elle va donc s'affranchir de l'adsorption en surface de protéines d'opsonisation ou de la captation par le système réticulo-endothélial. La taille de ces nano-objets est aussi un facteur important quant à la furtivité *in vivo*^{243, 249}. De plus, de nombreuses études ont montré l'intérêt de combiner l'aspect furtif de par la taille des nanoparticules et un surfactant hydrophile comme le PEG^{240, 249-256}.

L'équipe lyonnaise a étudié la biodistribution de différentes nanoparticules portant les surfactants hydrophiles suivants, PEG-OMe (2000 g/mol), PEG-NH₂ (2000 g/mol), PEG-COOH (2000 g/mol) et PEG-COOH (250 g/mol), injectées dans une souris *swiss nude* implantées de cellules HEK293(β3) et HEK(β1) par injection sous-cutanée sous la patte.

A partir de cette étude, le comportement « idéal » suivant a été défini :

- ★ Temps de résidence dans le compartiment vasculaire faible (< 48 h).
- ★ Elimination par excrétion rénale.
- ★ Affinité passive pour le milieu tumoral ; cette affinité est due à l'effet

EPR, *Enhanced Permeability and Retention*.

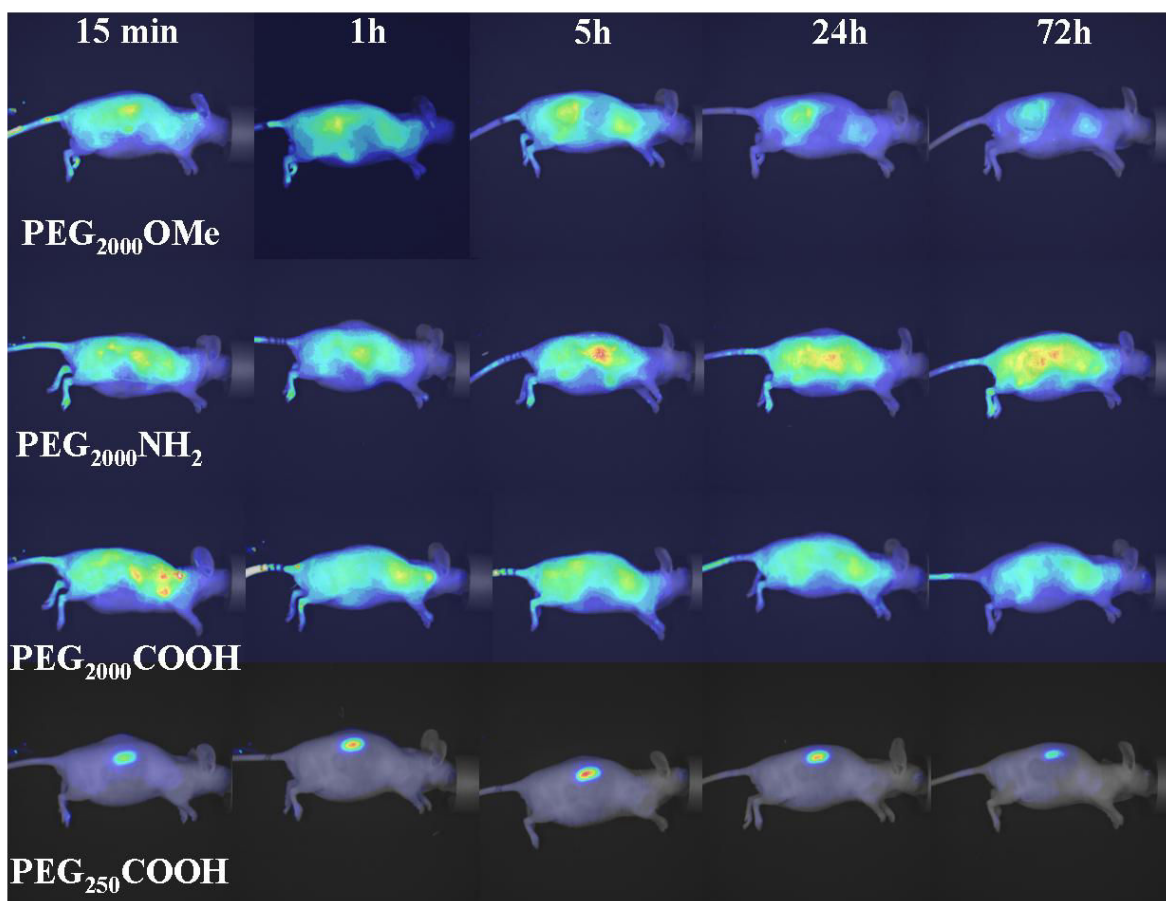


Figure 45 : Suivi temporel de la biodistribution de différentes nanoparticules. Vue du côté où la tumeur a été greffée²³⁴.

Les PEG les plus longs induisent une faible clairance des nanoparticules alors que le PEG à 250 g/mol induit un temps de résidence plus court avec une localisation dans le milieu tumoral significative (Figure 45)²³⁴.

II. Elaboration, études photophysique et biologique d'une nanoparticule multifonctionnelle

Les nanoparticules que nous avons utilisées ont un diamètre hydrodynamique d'environ 11 ± 3 nm et les caractéristiques sont décrites dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Principales caractéristiques de composition des nanoparticules étudiées.

Cœur de Gd_2O_3	Couche de polysiloxane	Photosensibilisateur
~ 2000 Gd/NPs	~ 47 Si / Gd	~ 0,003 à 0,005 PS/Gd ~ 6 à 10 PS/NPs

Ce travail a donné lieu à une publication, Couleaud *et al.* 2011 présentée en annexe²⁵⁷.

Les synthèses exposées ci-après, ainsi que les appareils utilisés pour la caractérisation photophysique sont détaillés dans la partie expérimentale en fin de manuscrit.

II.1. Le photosensibilisateur (PS)

II.1.1. Généralités sur le PS choisi

La chlorine monocarboxylée, 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine, notée TPC, possède les propriétés photophysiques adéquates pour le traitement PDT. Du fait de sa structure asymétrique, la TPC se trouve sous forme de deux isomères, selon la position de la liaison réduite du macrocycle tétrapyrrolique (Figure 46). Ces deux isomères sont séparables par HPLC mais ils présentent les mêmes

caractéristiques photophysiques²¹⁰. Pour la suite du travail, nous avons toujours travaillé avec le mélange d'isomères.

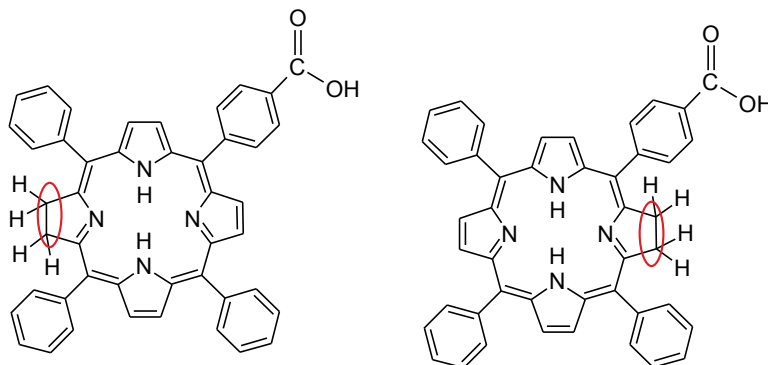


Figure 46 : Les deux isomères de la TPC.

II.1.2. Synthèse du photosensibilisateur

La synthèse de la TPC se fait en deux grandes étapes dont la première consiste à synthétiser la porphyrine équivalente à la chlorine. Il s'agit d'une porphyrine monocarboxylée : la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphenylporphyrine, notée P1COOH.

II.1.2.a. Synthèse de la porphyrine

La synthèse de la porphyrine asymétrique se réalise selon le protocole décrit par Lindsey¹⁴⁸ (Figure 47). Il s'agit de faire réagir dans le dichlorométhane et en présence de BF_3 étherate, 4 équivalents de pyrrole, 3 équivalents de benzaldéhyde et 1 équivalent de carboxybenzaldéhyde. Cette première étape conduit à la formation du squelette porphyrinogène, c'est-à-dire la structure finale non conjuguée. Une deuxième étape consiste à faire réagir un agent oxydant, une quinone. Nous utilisons, comme le stipule le protocole de Lindsey, le *p*-chloranil ou tétrachloro-1,4-benzoquinone dans le dichlorométhane. Cependant, d'autres composés sont formés (di, tri et tétra substitution, molécules à plus de 4 unités pyrroliques...), éliminés par chromatographie liquide. Nous obtenons un rendement moyen de 20 % en accord avec les données de la littérature.

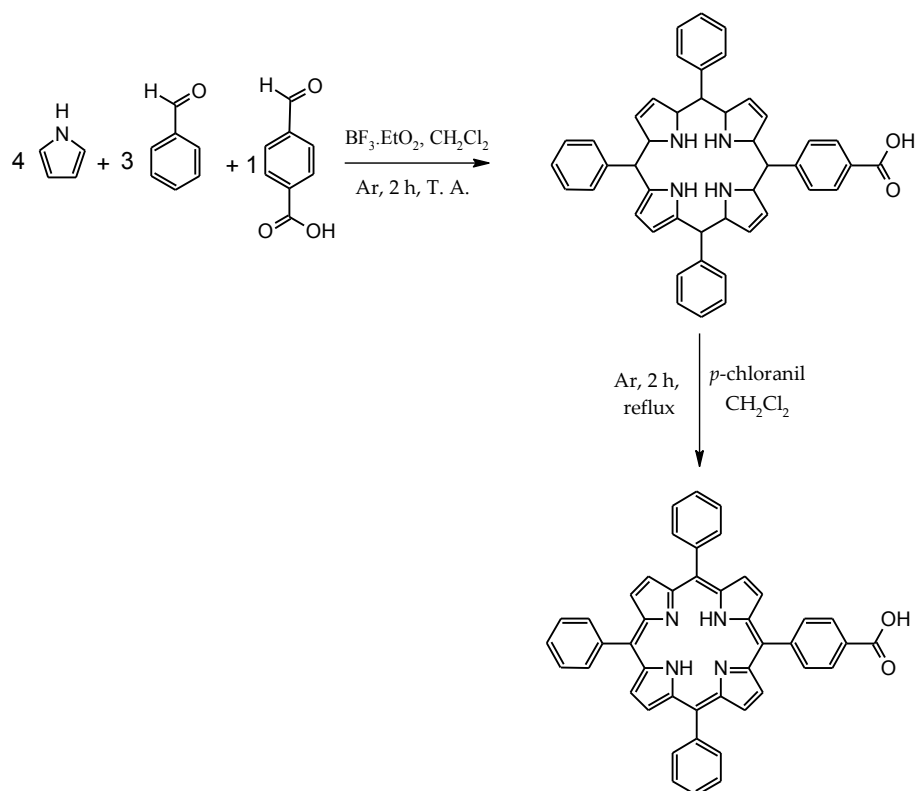


Figure 47 : Schéma de synthèse de la P1COOH.

II.1.2.b. Synthèse de la chlorine

La chlorine correspondant à la P1COOH, la TPC, est obtenue par réduction d'une double liaison C=C du macrocycle tétrapyrrolique (Figure 48). L'étape est assez délicate et est réalisée sous gaz inerte et avec des solvants secs fraîchement, distillés. Il s'agit de réduire la porphyrine en bactériochlorine (qui comporte deux liaisons saturées) et chlorine puis, après une étape de ré-oxydation de la bactériochlorine, d'obtenir la chlorine. La synthèse décrite par Whitlock²⁵⁸ donne des résultats peu reproductibles. Aussi, nous avons apporté quelques modifications au protocole en jouant sur le temps de réaction et sur la quantité de réducteur ajouté. Un long travail d'optimisation a été réalisé avec le concours des autres chercheurs de l'équipe. Les deux isomères de la chlorine sont obtenus avec un rendement de l'ordre de 20 %.

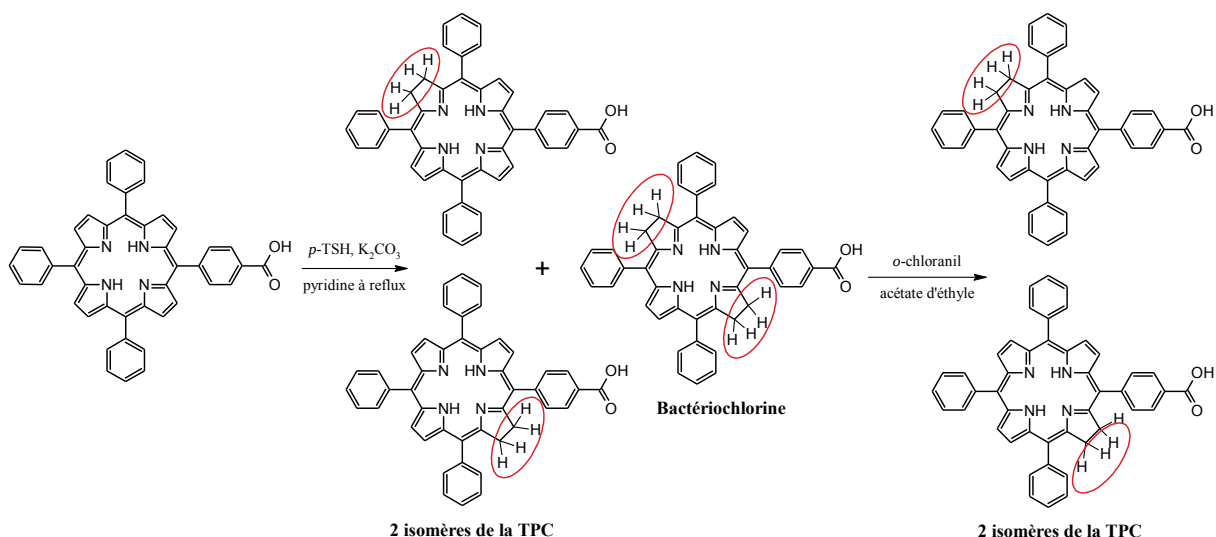


Figure 48 : Schéma de synthèse de la TPC.

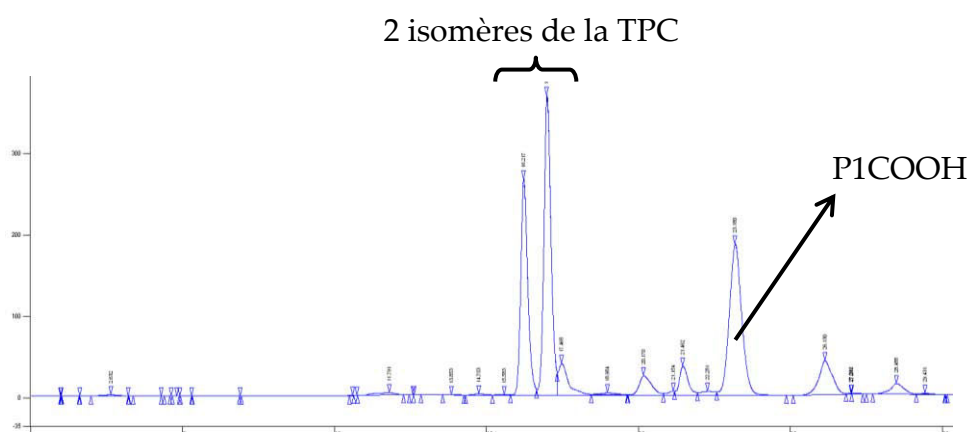


Figure 49 : Profil HPLC du brut réactionnel obtenu (colonne C_{18} , détection par fluorescence, $\lambda_{exc.} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 650 \text{ nm}$, gradient : de MeOH/eau, 75/25 à 100 % de MeOH en 15 min puis 15 min à 100 % de MeOH).

Le chromatogramme HPLC du brut réactionnel (Figure 49) montre la présence de deux pics à 15 et 17 minutes qui correspondent aux deux isomères de la chlorine et d'un autre pic remarquable à environ 23 min qui correspond à la porphyrine de départ. La présence plus ou moins importante de la porphyrine selon la réaction n'est pas forcément due au mauvais rendement. En effet, immédiatement après les derniers lavages et séchages, le profil HPLC et le spectre UV démontrent la présence

quasi exclusive de la chlorine. La chlorine peut alors se ré-oxyder en porphyrine, vraisemblablement au contact combiné de l'air et de la lumière, ou éventuellement de traces de solvant.

II.2. Propriétés photophysiques

II.2.1. Propriétés photophysiques de la P1COOH

Toutes les mesures photophysiques d'une même molécule ont été effectuées avec le même échantillon et dans les mêmes conditions de température (25 °C).

II.2.1.a. Propriétés d'absorption

Le spectre d'absorption (Figure 50) est caractéristique d'une porphyrine avec une bande de Soret à 415 nm et quatre bandes Q entre 512 et 650 nm.

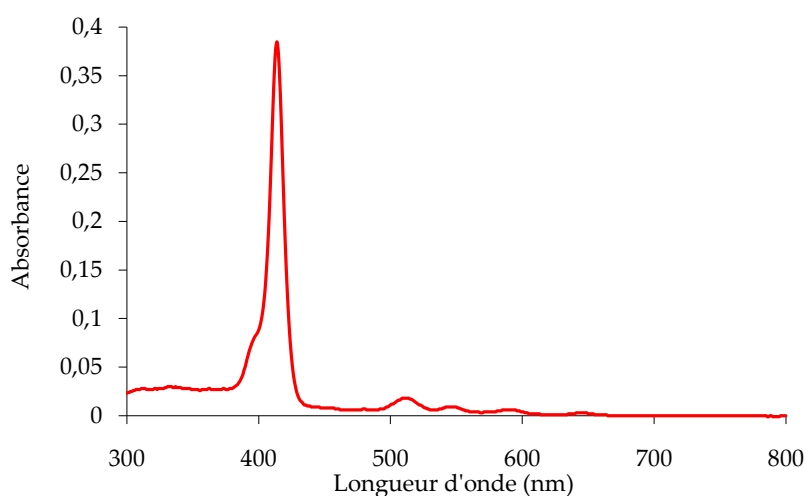


Figure 50 : Spectre UV de la P1COOH dans l'éthanol, [P1COOH] = 2,0 $\mu\text{mol/L}$.

Chaque PS peut être caractérisé par le ou les coefficients d'extinction molaire, ϵ , à des longueurs d'onde d'intérêt. Cette donnée photophysique est exprimée en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et répond à la célèbre et néanmoins empirique loi de Beer-Lambert-Bouguer qui stipule que, dans un solvant donné, dans des conditions de température

et de pression données et à une longueur d'onde donnée, la densité optique, DO, est proportionnelle au coefficient d'extinction molaire ε en L.mol⁻¹.cm⁻¹, à la longueur du trajet optique l en cm et à la concentration de la molécule en mol.L⁻¹ :

$$DO_{\lambda} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer.

Les coefficients d'extinction molaires de la P1COOH ont été calculés et sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Coefficients d'extinction molaire des différentes bandes d'absorption de la P1COOH dans l'éthanol.

Bande d'absorption	Longueur d'onde en nm	Coefficient d'extinction molaire, ε en L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
Bande de Soret	415	187 000
QIV	512	9 000
QIII	545	4 500
QII	588	3 000
QI	650	1 500

II.2.1.b. Propriétés d'émission de fluorescence

★ Fluorescence non résolue en temps

Le spectre d'émission de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol est présenté dans la Figure 51.

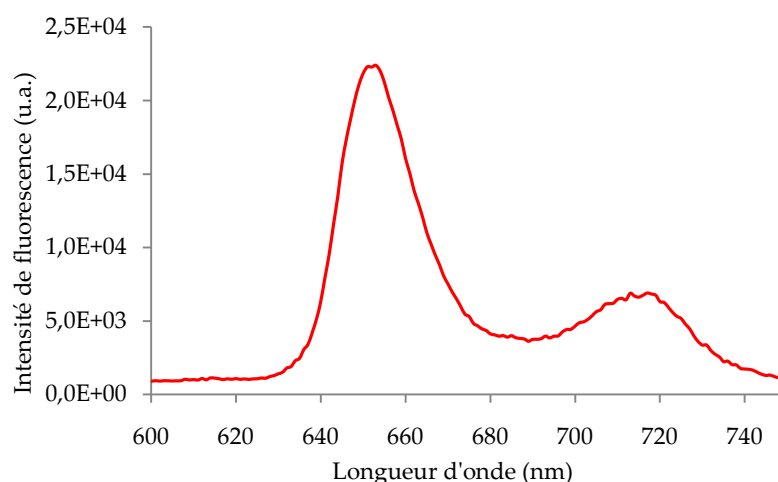


Figure 51 : Spectre d'émission de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol.

Le spectre de fluorescence de la P1COOH est formé de deux bandes dont la première a son maximum d'intensité à 650 nm et la deuxième à environ 710 nm.

Le spectre de fluorescence permet de calculer le **rendement quantique de fluorescence**. Il correspond au rapport entre le nombre de photons émis par fluorescence et le nombre de photons total absorbés par la molécule. En pratique, pendant le même temps, ce rendement est toujours calculé par rapport à une référence dont le rendement quantique est connu et déterminé par ailleurs et est donné par la formule suivante :

$$\phi_f = \phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2$$

Équation 2 : Rendement quantique de fluorescence ; où ϕ_f et ϕ_{f_0} sont les rendements quantiques du produit analysé et de la référence choisie, I_f et I_{f_0} leurs intensités de fluorescence mesurées et DO et DO_0 leurs densités optiques mesurées, n et n_0 les indices de réfraction des solvants.

La référence utilisée est la tétraphénylporphyrine (TPP) dans le toluène ; son rendement quantique étant de 0,11. Cette référence peut être utilisée sans tenir compte de facteurs de corrections de la fonction d'appareil de spectromètre utilisé car les spectres d'émission de la référence et des molécules étudiées sont situés sur la

même plage de longueurs d'onde (de 600 à 750 nm). Nous utilisons les indices de réfraction suivants : $n_{\text{EtOH}} = 1,360$ et $n_{\text{Toluène}} = 1,496$.

Nous obtenons dans l'éthanol : $\Phi_f = 0,14 \pm 0,02$.

★ Fluorescence résolue dans le temps

La courbe de déclin de fluorescence est représentée dans la Figure 52.

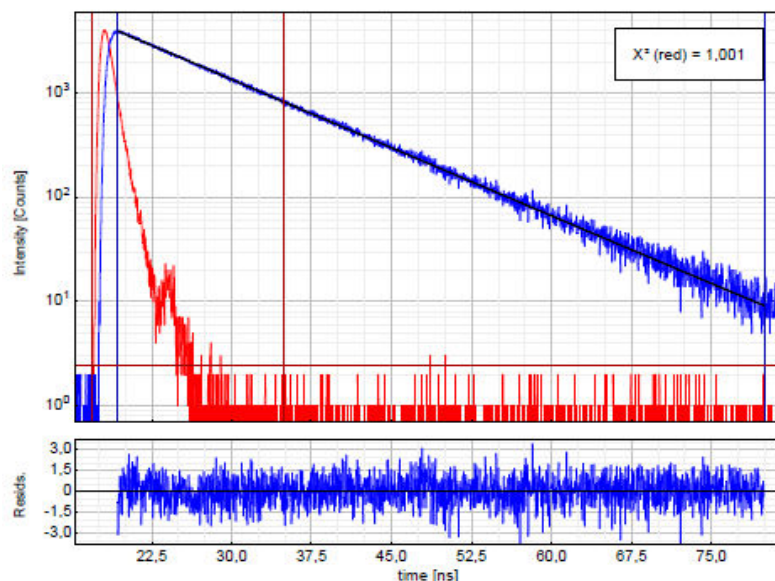


Figure 52 : Déclins de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol (bleue) et de l'excitation (rouge) ; Fonction d'autocorrélation (courbe du bas).

Le temps de vie de fluorescence de la P1COOH dans l'éthanol est de $9,96 \pm 0,5$ ns. La fonction d'autocorrélation ainsi que le $\chi^2 = 1,001$ montrent la bonne concordance avec une relaxation monoexponentielle (Équation 3).

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt$$

Équation 3 : Formule utilisée pour la déconvolution.

II.2.1.c. Production d'oxygène singulet

Le spectre d'émission de l'oxygène singulet après excitation de la P1COOH est représenté dans la Figure 53.

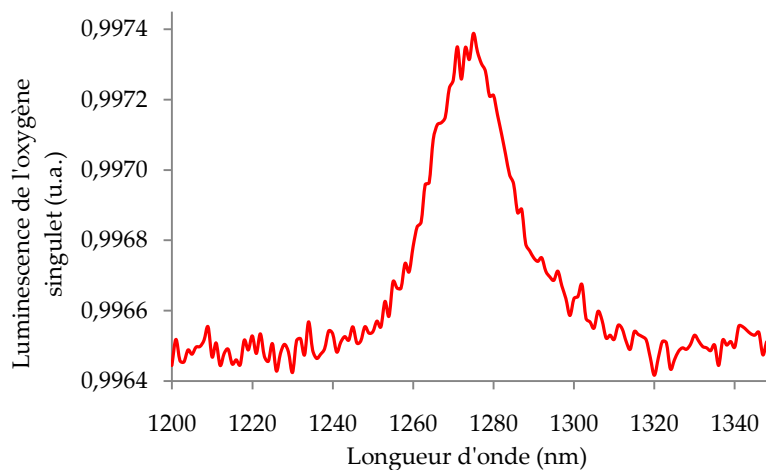


Figure 53 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet produit par la P1COOH (EtOH, $\lambda_{exc.} = 415$ nm).

Le rendement quantique est calculé selon la formule de l'Équation 4.

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO}$$

Équation 4 : Rendement quantique de production d'oxygène singulet ; où ϕ_{Δ} et ϕ_{Δ_0} sont les rendements quantiques du produit analysé et de la référence choisie, I et I_0 leurs intensités de luminescence mesurées et DO et DO_0 leurs densités optiques mesurées

Le rendement quantique de formation d'oxygène par la porphyrine P1COOH dans l'éthanol en utilisant le rose de Bengale comme référence (0,69 dans l'éthanol) est : $\Phi_{\Delta} = 0,54 \pm 0,05$.

II.2.2. Propriétés photophysiques de la TPC

II.2.2.a. Propriétés d'absorption

Le spectre d'absorption est caractéristique d'une chlorine avec une bande d'absorption plus forte à 650 nm de la TPC par rapport à la P1-COOH, et un élargissement de la bande de Soret Figure 54.

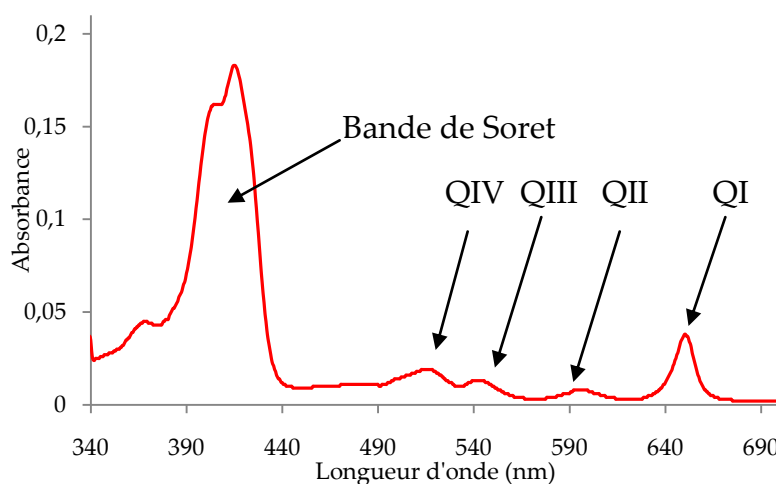


Figure 54 : Spectre d'absorption de la TPC dans l'éthanol, [TPC] = 1,11 $\mu\text{mol/L}$.

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire sont rassemblées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Coefficients d'extinction molaire des différentes bandes d'absorption de la TPC dans l'éthanol.

Bande d'absorption	Longueur d'onde en nm	Coefficient d'extinction molaire, ϵ en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
Bande de Soret	419	153 500
QIV	512	13 150
QIII	545	9 150
QII	588	4 400
QI	650	36 000

II.2.2.b. Propriétés d'émission de fluorescence

★ Fluorescence non résolue en temps

Le spectre d'émission de fluorescence de la TPC dans l'éthanol, après excitation à 420 nm, est présenté dans la Figure 55.

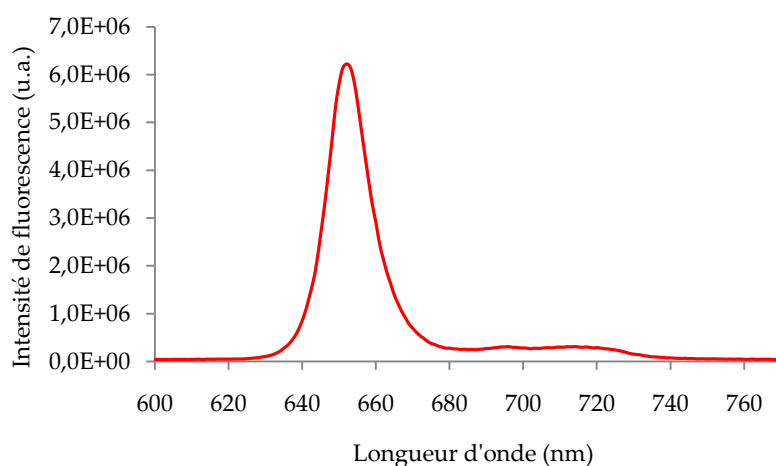


Figure 55 : Spectre d'émission de fluorescence de la TPC (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

La TPC a un rendement quantique de fluorescence de $0,21 \pm 0,02$ dans l'éthanol.

★ Fluorescence résolue en temps

Le temps de vie de fluorescence a été déterminé dans l'éthanol (Figure 56).

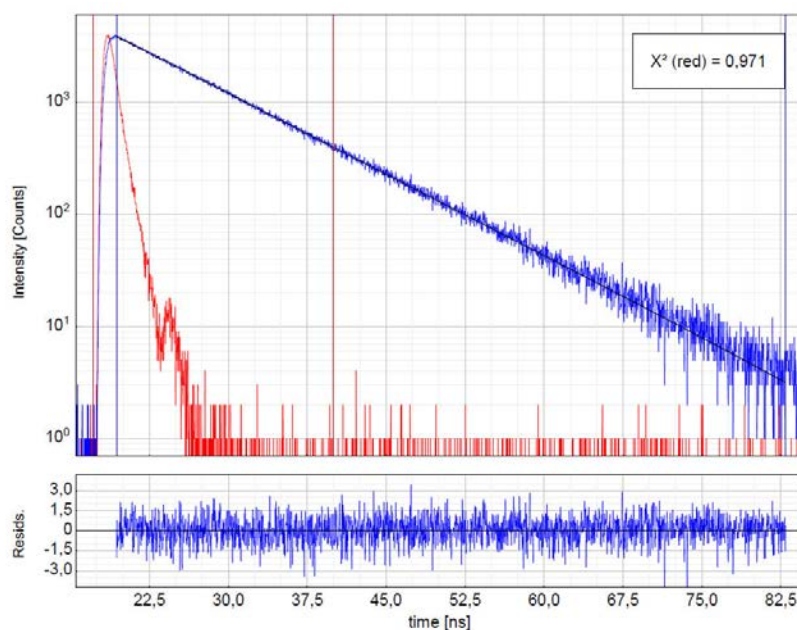


Figure 56 : Déclins de fluorescence de la TPC dans l'EtOH (bleue) et de l'excitation (rouge) ; Fonction d'autocorrélation (courbe du bas).

Un temps de vie de $9,01 \pm 0,5$ ns est calculé. La fonction d'autocorrélation ($\chi^2 = 0,97$) montre bien une concordance avec un modèle de déclin monoexponentiel de fluorescence qui montre la présence d'une seule espèce fluorescente dans l'échantillon.

II.2.2.c. Production d'oxygène singulet

Le spectre d'émission de l'oxygène singulet produit après excitation de la TPC à 420 nm est présenté dans la Figure 57.

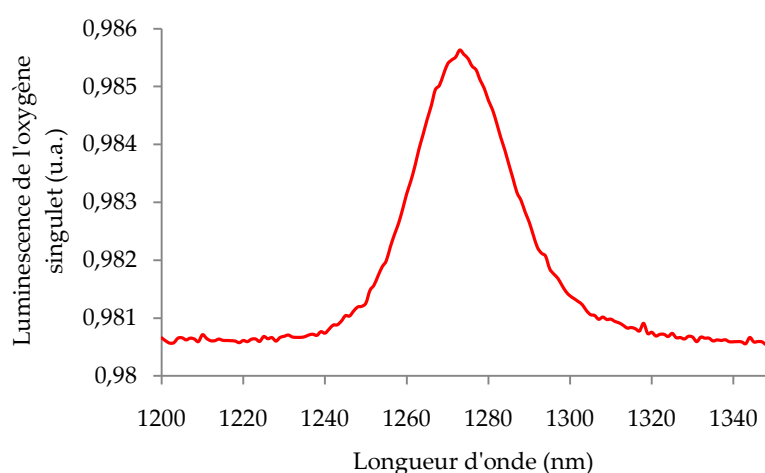


Figure 57 : Spectre d'émission de l'oxygène singulet produit par la TPC (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

La TPC possède un rendement quantique de production d'oxygène singulet légèrement supérieur à celui de la P1COOH, on trouve $\Phi_{\Delta} = 0,69 \pm 0,05$ dans l'EtOH.

II.2.3. Résumé des propriétés spectroscopiques des PS synthétisés – Critères de choix du PS

Le Tableau 8 résume les différentes propriétés photophysiques des deux composés synthétisés.

Tableau 8 : Récapitulatif des principales caractéristiques de deux PS synthétisés

	ε bande QI (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϕ_f $\pm 0,02$	ϕ_Δ $\pm 0,05$
TPC	36 000	0,21	0,69
P1COOH	1 500	0,14	0,54

En raison de la meilleure absorbance à 650 nm et du rendement quantique de production d'oxygène singulet supérieur, notre choix s'est porté sur la TPC plutôt que la P1COOH.

II.2.4. Activation et dérivation de la TPC

Afin de coupler de façon covalente la TPC à la nanoparticule, il nous fallu la dériver la TPC par une fonction silane. Pour ce faire, la TPC a été préalablement activée par le N-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure 58). Le produit final, noté TPC-NHS, a été obtenu pur avec un rendement de l'ordre de 90 %.

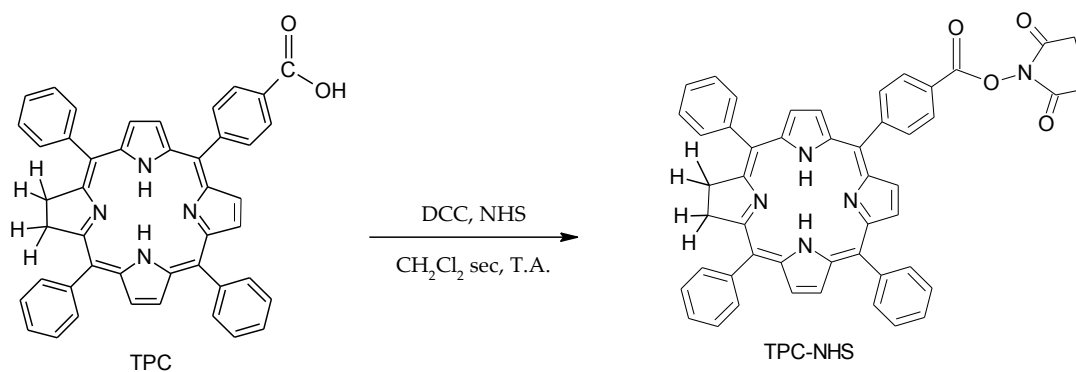


Figure 58 : Schéma de synthèse de la TPC-NHS (représentation pour un seul isomère).

Une fois activée par la fonction NHS, la TPC va pouvoir réagir de façon quasi quantitative avec un dérivé aminé.

La TPC devant être dérivée par une fonction silane portant une fonction amine afin d'être intégrée dans la couche de polysiloxane, le groupement

aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est fixé sur la TPC *via* une fonction amide (Figure 59).

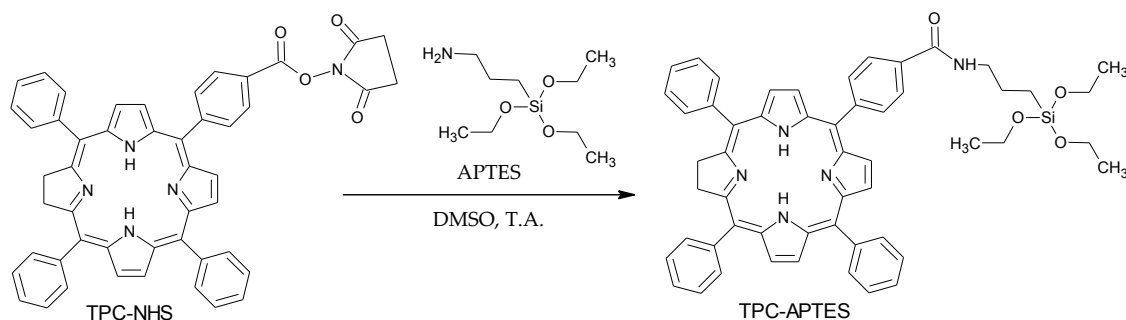


Figure 59 : Schéma de synthèse de la TPC-APTES

Les rendements de fonctionnalisation de la TPC-NHS par l'APTES sont supérieurs à 90 %. Cependant, à ce stade, aucune purification n'est effectuée et le produit de réaction est utilisé tel quel pour la prochaine étape d'intégration dans la couche de polysiloxane.

II.3. Les nanoparticules

Cette partie des synthèses a été effectuée au LPCML. La synthèse de ces nanoparticules et l'encapsulation covalente d'une molécule organique ont été décrites dans une publication de l'équipe lyonnaise (Figure 60)²³².

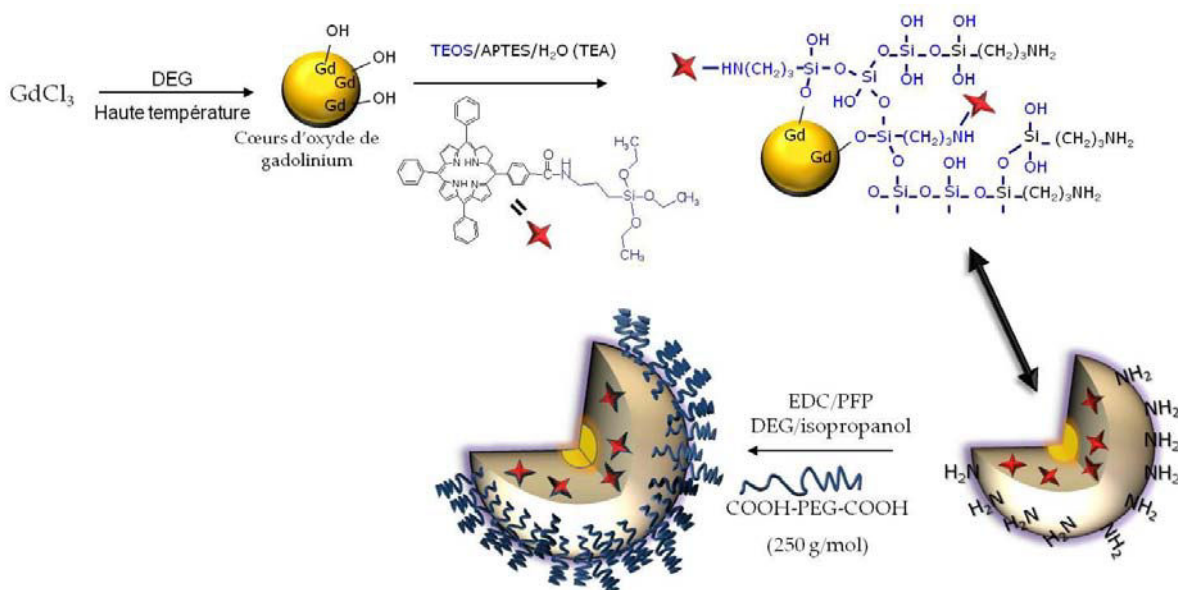


Figure 60 : Schéma général de synthèse des nanoparticules citées.

II.3.1. Formation du cœur d'oxyde de gadolinium : Gd₂O₃

Le cœur d'oxyde de gadolinium Gd₂O₃ est synthétisé, selon le protocole « polyol »²²⁷ qui consiste à former l'oxyde de gadolinium à partir de chlorure de gadolinium à haute température dans un solvant protique à haut point d'ébullition, comme le diéthylène glycol, DEG. Ces nanoparticules, selon le précurseur et les conditions acido-basiques vont, soit précipiter, soit rester en suspensions colloïdales dispersées dans le DEG. La formation de colloïdes d'oxyde de gadolinium se faisant par précipitation dans le DEG, la taille de ces nanoparticules peut être modifiée par hydrolyse basique en se plaçant dans des conditions de sous-stœchiométrie en soude. La solution colloïdale transparente obtenue peut être gardée à température ambiante pendant plusieurs semaines sans dégradation. On obtient ainsi des cœurs d'environ 2 à 5 nm de diamètre hydrodynamique mesurés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) dans le DEG.

Sur le cliché HRTEM, le cœur de Gd₂O₃ présente une forme cristalline avec des plans réticulaires. (Figure 62).

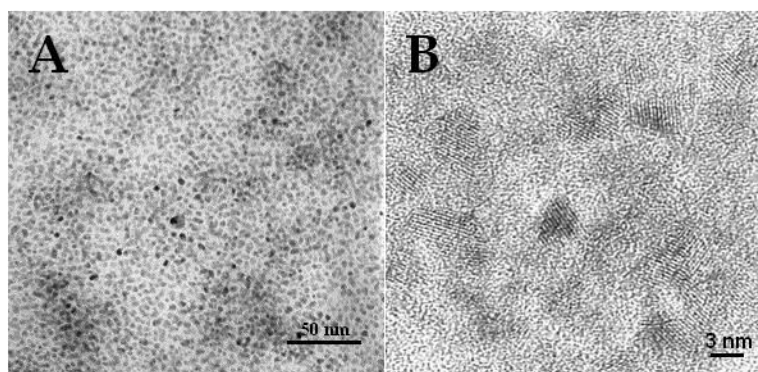


Figure 62 : Clichés (A) TEM et (B) HRTEM des cœurs de Gd_2O_3 .

Leur taille peut être évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Pour les cœurs d'oxyde de gadolinium « nus » la taille moyenne mesurée est de 4 ± 1 nm (Figure 63).

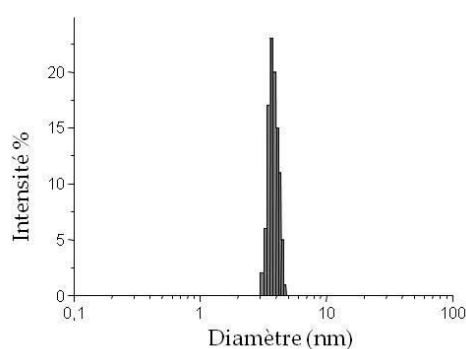


Figure 63 : Mesure de tailles des cœurs de Gd_2O_3 par DLS.

Ces cœurs sont ensuite enrobés dans une matrice de polysiloxane dans laquelle est inséré le photosensibilisateur lors de la croissance de la coque de silice.

II.3.2. Encapsulation des cœurs de Gd_2O_3 dans une couche de polysiloxane contenant la TPC

Cette étape est double, car elle consiste à recouvrir les cœurs d'oxyde de gadolinium par une couche de polysiloxane et en même temps à intégrer la TPC-APTES dans cette même couche.

La TPC-APTES est ensuite ajoutée à un mélange APTES/tétraéthylorthosilicate (TEOS), 40/60, selon la méthode de Stöber²⁵⁹. Ce mélange réagit ensuite avec les nanoparticules de Gd_2O_3 dans une solution de DEG contenant de la triéthylamine. Le réseau de polysiloxane se forme par hydrolyse-condensation de TEOS et de l'APTES (Figure 60). Ce dernier possède des fonctions amines libres qui seront utiles par la suite pour fixer des molécules hydrophiles pour rendre biocompatible ces nanoparticules. La taille de la couche est contrôlable selon le nombre d'ajout des constituants précurseurs de la couche de polysiloxane. L'épaisseur de la couche de polysiloxane finale contenant la TPC est estimée entre 5 et 10 nm par différence entre la taille des cœurs de Gd_2O_3 et la taille finale des nanoparticules. La stœchiométrie est d'environ 47 Si pour 1 Gd.

La nanoparticule obtenue est notée par la suite NP-TPC-PEG lorsqu'elle renferme de la TPC.

La dernière étape dans la préparation des nanoparticules est la fonctionnalisation par un surfactant hydrophile.

II.3.3. Greffage de polymères hydrophiles en surface des nanoparticules

Un PEG comportant deux extrémités acides carboxyliques (250 g/mol) est pré-activé par un mélange EDC/PFP (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide)/pentafluorophénol), 1/1, et est condensé sur les nanoparticules hybrides dans un mélange DEG/isopropanol (Figure 64).

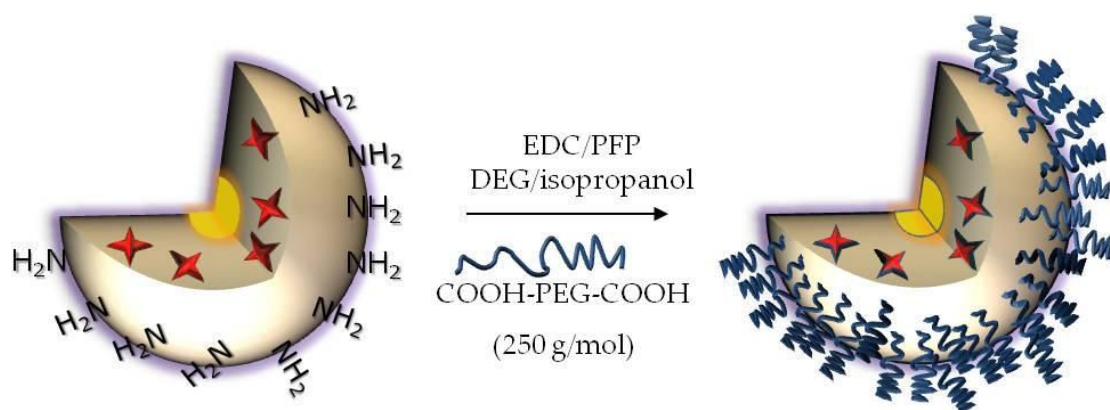


Figure 64 : Représentation schématique des étapes de synthèse de NP-TPC-PEG

II.4. Le peptide ATWLPPR – Synthèses et couplages

Nous traitons, dans une même partie, la synthèse du peptide et le couplage aux nanoparticules car, même si ce sont deux voies expérimentales différentes, la stratégie de synthèse du peptide va de paire avec la stratégie de couplage qui sera entreprise. Les détails des synthèses sont donnés dans la publication Couleaud *et al.* 2011²⁵⁷ et dans la partie expérimentale.

II.4.1. Généralités sur les peptides et leur synthèse sur support solide

II.4.1.a. Les peptides

Un peptide est un assemblage d'**acides aminés** reliés entre eux par des liaisons amides ou peptidiques. Les peptides diffèrent des protéines par leur nombre d'acides aminés (inférieur à 50) et contrairement aux protéines, les peptides ne possèdent généralement pas de structure tertiaire²⁶⁰.

La Figure 65 représente la structure d'un acide aminé. Le **carbone alpha** (carbone α ou C_α) tétraédrique est lié de façon covalente à un groupe aminé et à un groupe carboxylique. Etant lié à quatre groupes différents, le carbone α est dit asymétrique. Les deux configurations possibles du C_α constituent deux isomères non

identiques, ce sont des énantiomères. Chaque isomère dévie la lumière plane polarisée et est **dextrogyre (+)** ou **lévogyre (-)** suivant que la rotation du plan de polarisation de la lumière suit un sens horaire, ou antihoraire. Il n'y a pas de corrélation entre le sens de rotation du plan de polarisation (ou pouvoir rotatoire) et la configuration de l'acide aminé : ainsi la *L*-alanine est dextrogyre et se note *L*(+)-alanine. Par convention, il y a correspondance entre la représentation des oses et celle des acides aminés.

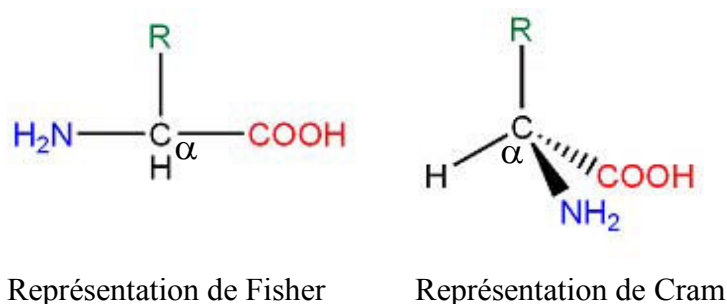


Figure 65 : Structures générales des acides aminés. Le groupement amine est représenté en bleu, le groupement carboxylique en rouge et la chaîne latérale en vert.

Les **acides aminés de la série *L*** représentent la grande majorité des résidus naturels qui se trouvent dans les protéines. Les acides aminés *D* se rencontrent dans certaines protéines produites par des organismes primaires du fond des océans, comme certains mollusques. Ce sont également des composants abondants des parois cellulaires des bactéries²⁶¹.

Une **liaison peptidique** est une liaison amide créée entre la fonction carboxylique d'un acide aminé et la fonction amine d'un second acide aminé. Les fonctions acide et amine ne réagissent pas spontanément pour former cette liaison amide et il est nécessaire d'activer la fonction carboxylique pour obtenir le lien voulu. Dans notre cas nous avons utilisé l'hexafluorophosphate de *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HBTU) comme agent activant (Figure 66).

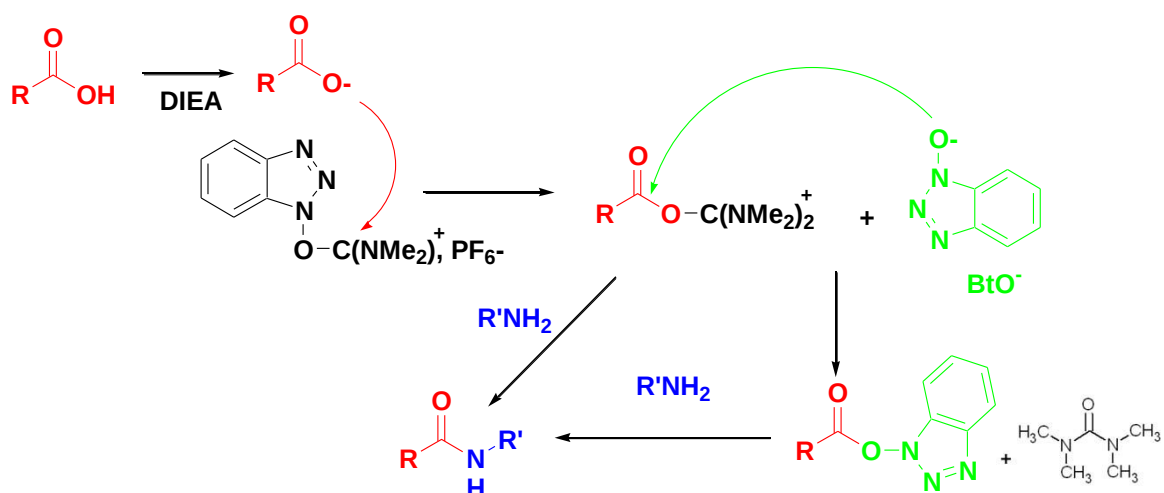


Figure 66 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés notés $R-COOH$ et $R'-NH_2$.

De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation peptidique. Dans les tissus biologiques ou compartiments cellulaires, l'inactivation implique des endopeptidases spécifiques, tandis que dans la circulation systémique et dans les organes périphériques, ce sont des exopeptidases moins spécifiques qui agissent²⁶².

La dégradation peptidique par les peptidases est importante pour produire des molécules bioactives et les inactiver après qu'elles aient joué leur rôle. Cependant, ce processus métabolique représente un *challenge* majeur pour l'utilisation de ces peptides comme médicament.

II.4.1.b. La synthèse peptidique sur support solide (SPPS)

La SPPS peut se faire de façon automatique sur un synthétiseur qu'il est possible de programmer pour définir le nombre de couplages de chaque acide aminé, le nombre d'équivalents d'agents de couplage, les temps de réactions de chaque couplage, etc. Les synthèses des peptides (protégés ou non) ont été réalisées au LCPM sur un appareil MultiPrep INTAVIS et le couplage aux nanoparticules sur un agitateur « *Synthesis 1 Heildoph* ».

Ce type de synthèse consiste à faire croître le peptide à partir d'une résine portant l'acide aminé N-terminal en couplant successivement chaque acide aminé (Figure 67). La principale différence avec une synthèse en solution est que les phases de purification entre chaque étape sont remplacées par des lavages intensifs et des filtrations rendus possibles par le fait que le peptide en croissance reste accroché aux billes de résine (souvent du polystyrène réticulé par du divinylbenzène). Ce mode de synthèse présente l'énorme avantage d'être beaucoup plus rapide qu'en solution. Il convient toutefois de noter que, sans purification des intermédiaires, la SPPS peut conduire à des mélanges de produits finaux dus notamment aux déprotections et aux couplages non quantitatifs (délétions). Ceci peut compliquer la purification finale du peptide. Il est tout de même possible de limiter les délétions par l'utilisation d'un large excès de réactifs et catalyseurs qui sera facilement éliminé par lavages et filtrations.

Le greffage du premier acide sur la résine est une étape cruciale de la synthèse. Le couplage de l'acide aminé peut être vérifié grâce au test de Kaiser, qui révèle la présence de fonctions amines libres. Dans la plupart des cas, nous avons utilisé des résines commerciales portant une quantité définie du premier acide aminé.

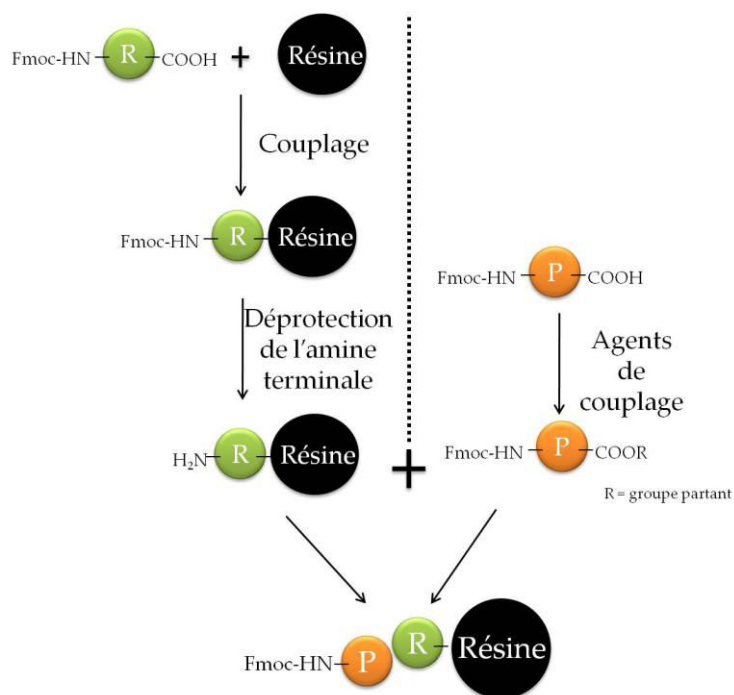


Figure 67 : Représentation schématique des étapes de déprotection et de couplage d'acides aminés sur support solide.

La fixation de l'acide aminé sur la résine se fait par sa fonction acide terminale et l'on ajoute l'acide aminé suivant en activant sa fonction acide qui réagit sur la fonction amine de l'acide aminé préalablement fixé sur la résine. Notons que la stratégie Fmoc/tBu a été utilisée ici. Les acides aminés utilisés lors d'un couplage portent tous un groupement protecteur fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc) sur leur fonction amine terminale, assurant ainsi la réaction entre deux acides aminés consécutifs et non de l'acide aminé sur lui-même. La déprotection du Fmoc est réalisée juste avant le couplage suivant en milieu basique dilué (pipéridine/DMF, 1/5, v/v) (Figure 68).

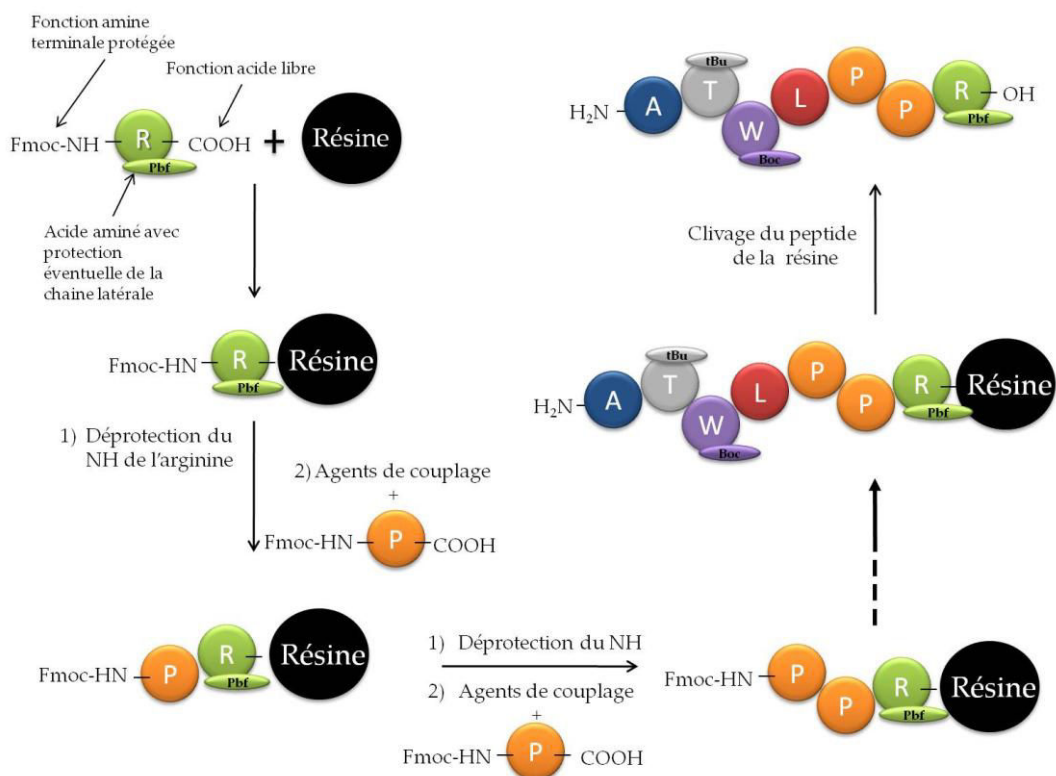


Figure 68 : Représentation schématique de la synthèse sur support solide.

Toujours pour s'assurer que le couplage ne se fasse qu'entre les fonctions NH_2 et COOH du carbone α de chaque acide aminé, il convient d'utiliser des acides aminés commerciaux portant les chaînes latérales fonctionnelles préalablement protégées. Concernant notre peptide, nous avons donc utilisé les résidus acides aminés suivants : Arg(Pbf), Pro, Leu, Trp(Boc), Thr(tBu) et Ala.

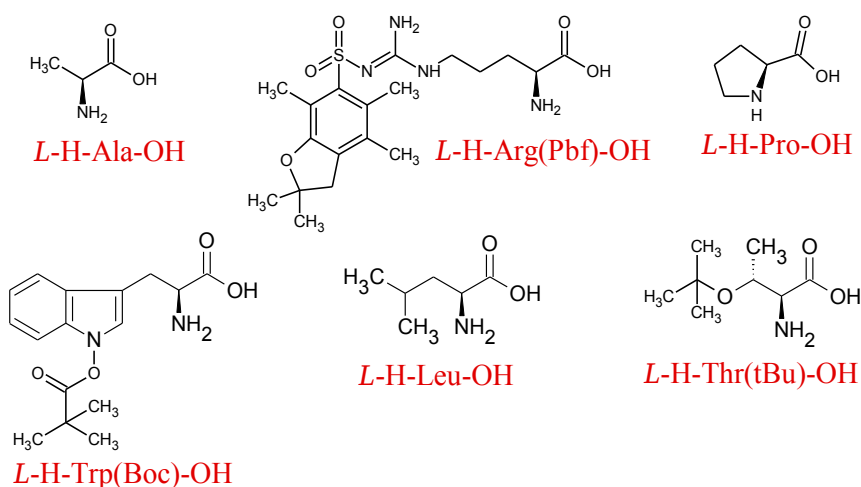


Figure 69 : Acides aminés utilisés pour notre synthèse sur support solide.

La fonction guanidinium de l'arginine est protégée par un groupement Pbf (2,2,4,6,7-pentméthyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl), la fonction amine indolique du tryptophane est protégée par un Boc (*tert*-butyloxycarbonyl) et la fonction alcool de la thréonine est protégée par un tBu (tertiobutyle). Ces protections semi-permanentes (ou orthogonales) sont choisies de telle manière qu'elles supportent les cycles répétitifs de la synthèse (déprotection du Fmoc/activation/couplage) mais aussi qu'elles puissent être éliminées lors de l'ultime étape de libération du peptide de la résine (clivage).

Une précaution supplémentaire pour obtenir un brut réactionnel de bonne qualité est de pratiquer le *capping* après chaque couplage. Cette étape consiste à faire réagir l'anhydride acétique sur les fonctions NH₂ qui n'auraient pas réagi lors du couplage. Cette action stoppe définitivement la croissance ultérieure du peptide auquel il aurait manqué un acide aminé (délétion).

II.4.2. Synthèse du peptide ATWLPPR pour notre étude

Le greffage de biomolécules sur la surface de nanoparticules ne fait l'objet que de peu d'exemples dans la littérature. On peut citer des couplages par liaison amide *via* le mélange classique entre un acide carboxylique, une amine en présence d'un carbodiimide et un succinimide²⁶³⁻²⁶⁵. On peut également citer les couplages par liaison thioéther classiquement obtenue par réaction entre un thiol et un maléimide^{266, 267}. Il nous a donc fallu mettre au point une méthode de couplage.

La synthèse du peptide est conditionnée par le type de couplage entre nanoparticules et peptide. Nous avons deux options (voie A et voie B) représentées dans la Figure 70.

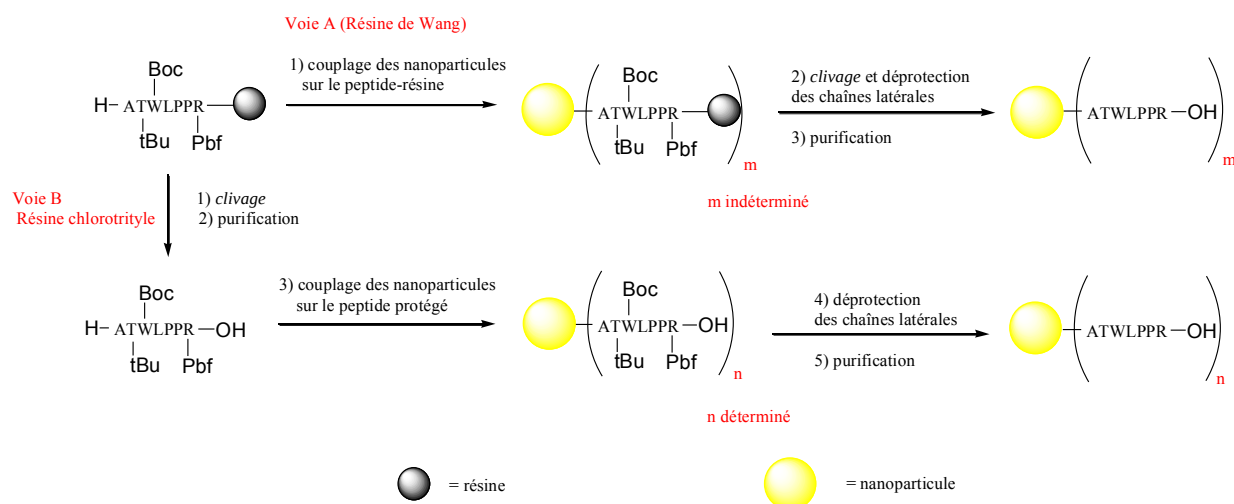


Figure 70 : Schéma des deux voies de synthèse du peptide et de couplage aux nanoparticules.

- ★ **Voie A : Couplage de la nanoparticule sur phase solide** : synthèse du peptide sur support solide suivie du couplage des nanoparticules sur le même support solide
- ★ **Voie B : Couplage de la nanoparticule en phase liquide** : synthèse du peptide sur support solide, clivage, purification et condensation sur des nanoparticules peptide en phase liquide

En début de thèse, l'idée du couplage des nanoparticules sur phase solide (voie A) paraissait plus attractive qu'un couplage en phase liquide. En effet, la SPPS permet de diminuer le nombre de purifications et de gagner beaucoup de temps. Cependant, nous avons constaté que cette approche ne permettait pas de maîtriser le ratio peptide/nanoparticule et cette restriction nous a incités à utiliser la seconde méthode (voie B). Celle-ci est plus longue mais moins aléatoire car le couplage entre le peptide purifié et les nanoparticules est réalisé dans des conditions stœchiométriques bien définies.

II.4.3. Synthèse et couplage sur support solide

Cette stratégie est la première à avoir été essayée car elle nous paraissait plus simple et plus attrayante. Il s'agit de synthétiser le peptide comme décrit dans la Figure 68 en utilisant une résine de type Wang. Cette résine permet de déprotéger le peptide lors du clivage en utilisant de l'acide trifluoroacétique (TFA) pur.

Nous faisons tout d'abord croître le peptide sur la résine Wang pré-chargée avec l'arginine. Une fois le peptide synthétisé, la fonction NH_2 terminale de l'alanine est déprotégée. Après dispersion des nanoparticules dans le DMF, les fonctions COOH de surface sont activées à l'aide d'agents de couplage, mélange équimolaire de 1-hydroxybenzotriazole, BtOH et de hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, HBTU, en présence d'une base, la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA). Il s'agit d'une double activation *in situ*. HBTU pré-activer l'acide pour permettre au BtOH de former l'ester activé sur la fonction acide.

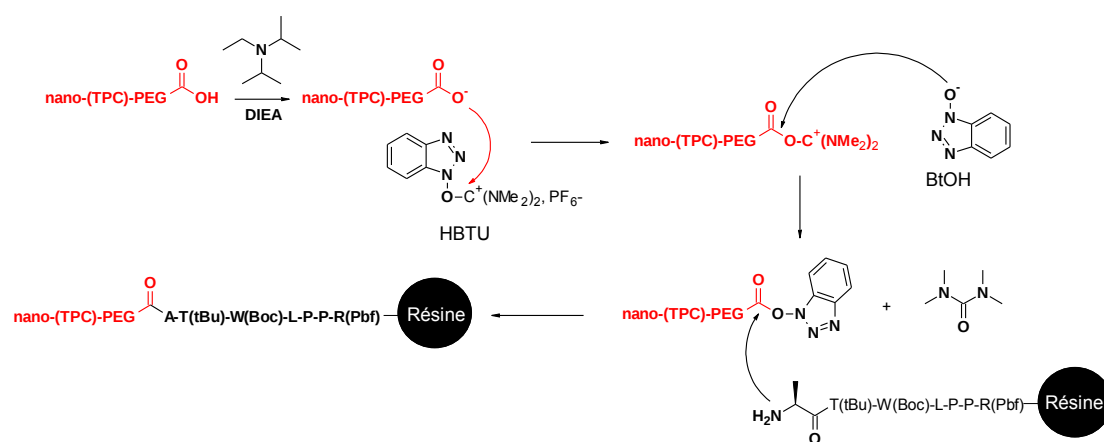


Figure 71 : Mécanisme réactionnel de l'activation par HBTU/BtOH et couplage.

Enfin, après lavages de la résine pour éliminer les excès d'agents de couplage et réactifs, le produit final est décroché de la résine en ajoutant du TFA pur. Comme nous le verrons ultérieurement, ces essais n'ont pu conduire à des lots de nanoparticules fonctionnalisées utilisables pour la suite de notre étude en raison de problèmes de redispersion en milieu aqueux.

II.4.4. Synthèse sur support solide du peptide protégé pour couplage aux nanoparticules en phase liquide

Ce couplage consiste à synthétiser le peptide, le cliver de la résine et le coupler aux nanoparticules en phase liquide. La grande différence avec le couplage précédent est qu'il faut synthétiser le peptide sous forme protégée (fonctions latérales bloquées) comme précédemment, mais en le clivant de la résine sans déprotéger ses fonctions latérales.

Une résine de type chlorotrityle a été utilisée (Figure 72) ; elle permet de cliver le peptide en milieu acide dilué avec un mélange en volume AcOH/TFE/DCM, 2/2/6 (AcOH : acide acétique, TFE : trifluoroéthanol, DCM : dichlorométhane).

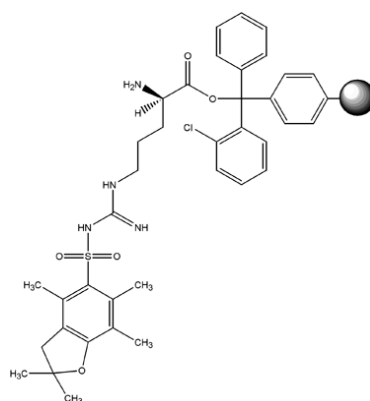


Figure 72 : Résine chlorotrityl-Arg(Pbf).

Nous nous sommes tournés vers des résines commerciales pré-chargées en Arg(Pbf). Après plusieurs synthèses en optimisant les paramètres du synthétiseur, nous obtenions des profils en chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) présentés dans la Figure 73.

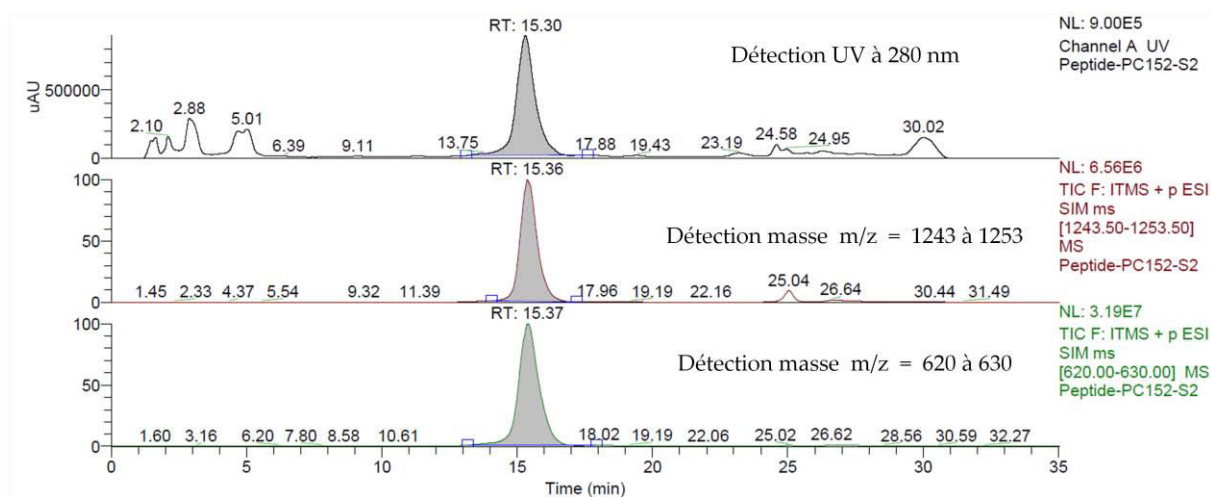


Figure 73 : Profil LC-MS d'un brut réactionnel de ATWLPPR protégé (M = 1248 g/mol) sur colonne C₁₈, avec le gradient de l'élution présentée en Figure 75 avec trois modes de détection : en haut, détection UV à 280 nm, au milieu, détection de m/z entre 1243 et 1253, en bas, détection de m/z entre 620 et 630.

Les spectres de masse correspondant au pic majoritaire sont reportés dans la Figure 74).

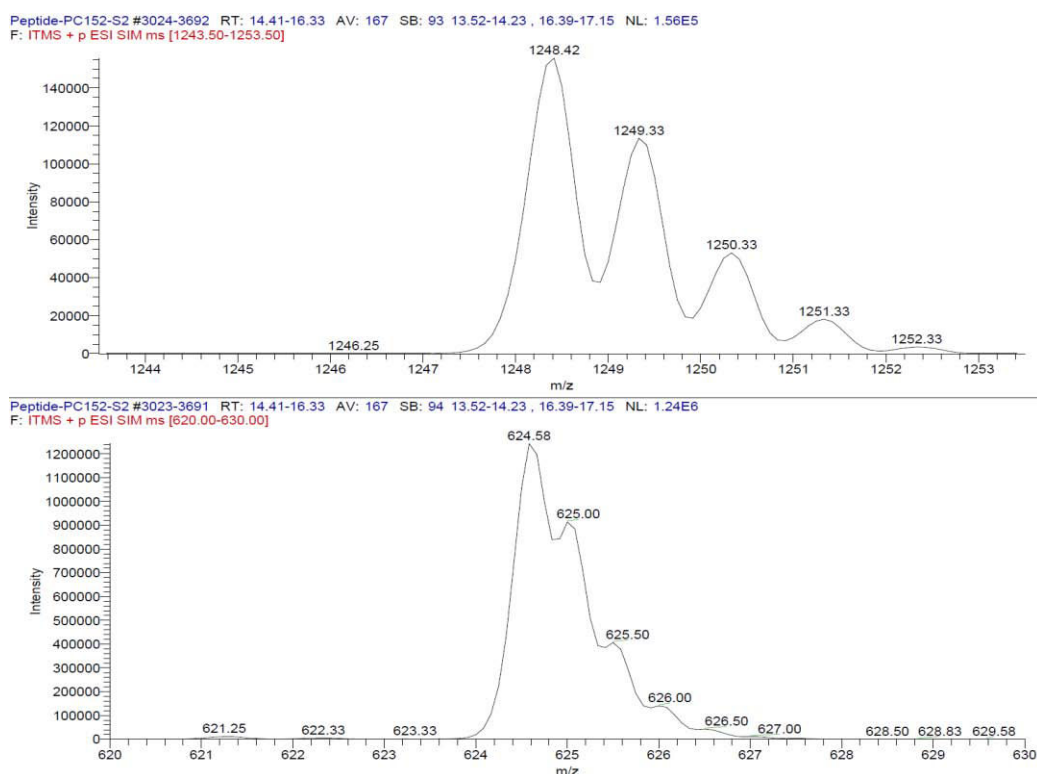


Figure 74 : Spectres de masse du pic majoritaire (t_R ~ 15 min).

Haut : ion moléculaire [M-H]⁺, m/z = 1248 ; Bas : [M-2H]²⁺ / 2, m/z = 625.

Le peptide brut est ensuite purifié par HPLC préparative sur colonne C₁₈ (150 x 10 mm). Les solvants d'élution utilisés sont l'acétonitrile (ACN) et un mélange [H₂O, 0,1 % TFA, v, v]. Le gradient utilisé est décrit dans la Figure 75.

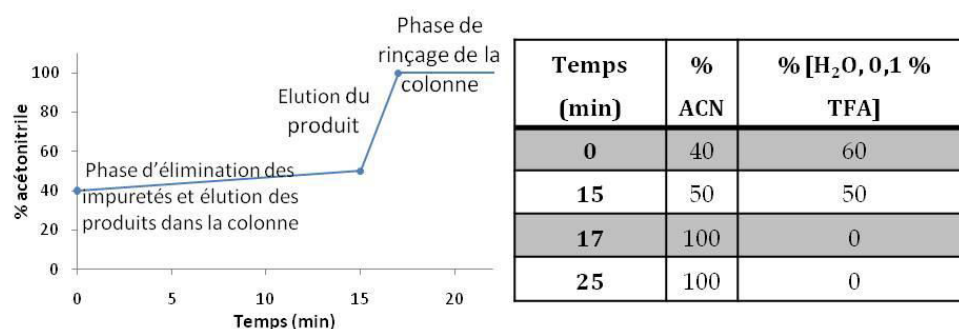


Figure 75 : Stratégie d'élution optimisée.

Le choix d'un gradient optimal pour la purification d'ATWLPPR protégé a demandé une mise au point soignée. En utilisant une colonne C₁₈, ATWLPPR protégé a un temps de rétention ($t_R = 15$ min) plus important que le peptide non-protégé ($t_R = 6$ min). Il est élué entre 60 et 65 % d'acétonitrile, en volume. Après purification sur HPLC, nous obtenons le peptide pur à 99 % en récoltant le haut du pic en HPLC. L'analyse RMN ¹H à une dimension 1D ainsi que les modes d'analyse à deux dimensions COrrélation SpectroscopY (COSY) et TOtal Correlation SpectroscopY (TOCSY) nous permettent de confirmer que le pic majoritaire est le bon peptide (Cf. Partie expérimentale).

Après purification le peptide est ensuite stocké au congélateur et peut être gardé plusieurs semaines sans dégradation.

Nous allons maintenant détailler les différents essais de couplage aux nanoparticules qui ont mené à un protocole de couplage reproductible.

II.5. Couplage du peptide sur les nanoparticules en phase liquide

L'étape finale est l'étape de couplage proprement dite, qui consiste à faire réagir les fonctions acides en surface des nanoparticules avec la fonction amine libre de l'alanine du peptide. Le couplage s'effectue en activant les fonctions acides carboxyliques de la nanoparticule avec un mélange DCC/BtOH en milieu basique. Le peptide sous forme protégée n'étant pas soluble dans l'eau, nous avons dû faire les premiers couplages dans la DMF. Pour ce faire, il a fallu disperser la quantité souhaitée de nanoparticules dans l'eau, puis ajouter un volume connu de DMF et enfin évaporer l'eau. L'activation se fait ensuite *in situ* en deux temps. Une préactivation des fonctions acides des nanoparticules est faite à l'aide du dicyclohexylcarbodiimide, DCC, puis l'activation est assurée par l'hydroxybenzotriazole, BtOH. En fin de réaction, les chaînes latérales du peptide couplé aux nanoparticules sont déprotégées par du TFA pur et les nanoparticules adressées sont purifiées.

II.5.1. Etapes de purification par dialyse

La dialyse est une technique de séparation passive basée sur la différence de tailles des différentes molécules. Le choix de la porosité de la membrane est donc essentielle pour s'assurer de retrouver dans le bon compartiment (intérieur du boudin de dialyse ou dialysat) le produit que l'on souhaite récupérer. Dans notre cas, il s'agit de séparer les nanoparticules des molécules qui n'ont pas réagi durant le couplage (agents de couplage, peptide). Des membranes à porosité 3000 ou 5000 Da ont été choisies. Ces chiffres correspondent à la masse molaire moyenne (en g/mol ou Dalton, Da) de coupure de la membrane.

La dialyse est une méthode basée sur l'équilibre de concentration qu'il se fait entre deux compartiments physiques. Elle est donc assez longue et demande un volume assez important (de 10 à 100 mL) de dispersion des nanoparticules et un

volume très important (de 500 mL à 2 L) contre lequel faire la dialyse. Cette technique, efficace, mais longue a ensuite été utilisée avec plus de précaution car de trop gros volumes de dispersion pendant des temps longs déstabilisent les nanoparticules et tendent à modifier l'équilibre vers la dissolution des composants des nanoparticules. Les premières dialyses sont faites contre un mélange eau/TFA, 20/1, v/v, afin de favoriser le passage des espèces les moins hydrophiles de l'intérieur du boudin de dialyse vers le dialysat éliminé. Ce premier type de dialyse est effectué 2 fois durant environ 12 heures chacune. Les dialyses suivantes sont effectuées contre l'eau ultra-pure pour des durées plus courtes (2 à 6 h). Ce dernier type de dialyse sert à éliminer toutes les traces de solvants organiques restant (TFA, DMF) ou des résidus de la réaction de couplage et nous en effectuons environ 10. Le nombre de ces dialyses est en grande partie guidé par le retour à un pH d'environ 7 qui prouve que tout le TFA a été éliminé.

II.5.2. Etapes de purification par ultrafiltration

L'ultrafiltration est basée sur le même principe que la dialyse avec, en supplément, une composante dynamique. Les tubes de centrifugation comportent 2 compartiments séparés par une membrane. En disposant l'échantillon dans le compartiment supérieur et en soumettant le tube à une centrifugation, le passage des espèces de masse molaire inférieure au seuil de coupure de la membrane s'effectue dans le compartiment inférieur.

Cette technique a dû être optimisée pour nos nanoparticules. En effet, une vitesse de rotation trop importante (4000 rpm) pendant une durée trop longue (plus de 20 min), favorisent la sédimentation des nanoparticules sur les membranes et diminuent la possibilité de redispersion. Les conditions optimales sont les suivantes :

- ★ Vitesse : 3000 rpm
- ★ Temps de centrifugation : 10 à 15 min

Le processus est répété jusqu'à élimination de tous les résidus (analyse spectroscopique du filtrat) et entre chaque session, le contenu de la partie inférieure du tube est évacué.

II.5.3. 1^{ers} essais : excès de peptide introduit

Les premiers essais de couplage selon le protocole précédemment décrit ont consisté à greffer un maximum de peptide en surface. Nous nous sommes donc placés en excès d'agents de couplage et de peptide. Les détails de ces synthèses en excès de peptide ne sont pas détaillés ici car elles n'ont pas abouti à des résultats exploitables. Seules leurs caractérisations photophysiques sont montrées.

II.5.3.a. Essai de 3 équivalents de peptide par fonction COOH

Suite au couplage et à la déprotection des chaînes latérales du peptide par le TFA pur, les étapes de purification par dialyse ont été effectuées.

Il est possible de suivre au fur et à mesure des dialyses, la séparation du peptide libre en contrôlant la baisse de l'absorption du tryptophane à 280-295 nm par spectroscopie UV-visible dans le dialysat (Figure 76).

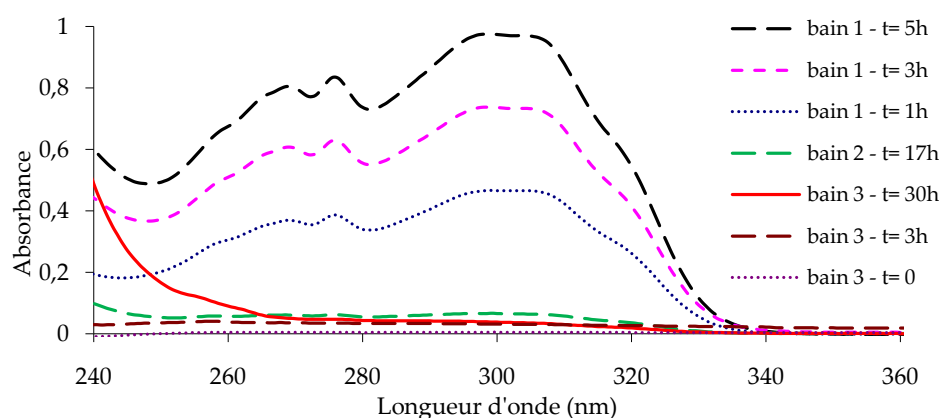


Figure 76 : Suivi de trois dialyses successives par spectroscopie UV-visible (volume prélevé équivalent, pour un volume de bain de dialyse équivalent).

La Figure 76 montre que pour le 1^{er} bain, la concentration en tryptophane croît au cours du temps dans le dialysat, ce qui montre que du peptide libre est éliminé. Dès la seconde dialyse, même après 17 h, peu de peptide diffuse hors du boudin de dialyse. Quant au bain n°3, il montre que tout le peptide libre a été éliminé.

Une étape de reconcentration sous vide de l'échantillon permet de se replacer dans des conditions de concentration compatibles avec les conditions des tests *in vitro*. Enfin, l'échantillon est lyophilisé afin de pouvoir redisperser le lot dans un volume d'eau ultra-pure connu et précis pour être ensuite utilisé pour les essais biologiques. Cependant, après les lyophilisations effectuées sur plusieurs lots de synthèse, il nous a été impossible de redisperser les nanoparticules dans l'eau. La quantité trop importante de peptide ne permettant pas de redisperser les nanoparticules dans l'eau, nous avons diminué le nombre d'équivalents de peptide.

II.5.3.b. Essai à 1,5 et 0,75 équivalents de peptide par fonction COOH

D'autres essais ont été réalisés en divisant par deux, puis par quatre, les quantités introduites en peptide et agents de couplage. Dans tous les cas, les nanoparticules n'ont pas pu être redispersées dans l'eau après lyophilisation, démontrant que la quantité de peptide ajoutée était encore beaucoup trop importante par nanoparticules. Nous avons décidé de diminuer encore le nombre de peptides greffés sur les nanoparticules.

II.5.4. Essais à 5 peptides par nanoparticule

En utilisant le même procédé pour les étapes de couplages et de séparations mais en introduisant une quantité moindre par rapport aux essais précédents, (5 peptides par nanoparticule), nous avons pu obtenir le premier lot redispersable dans l'eau. Après optimisation du procédé de couplage les paramètres de couplage

suivants ont été choisis : pour 1 éq. de nanoparticules, nous introduisons 6 éq. de peptide et 7,2 éq. d'agents de couplage (1,2 éq. par rapport au peptide ajouté).

Ces premiers essais concluants ont fait l'objet des premières études photophysiques et biologiques, décrites ci-après.

II.5.5. Analyse en chromatographie liquide haute performance des nanoparticules après couplage

La technique de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) que nous utilisons par ailleurs pour la purification des différentes molécules organiques synthétisées a été testée afin de contrôler la présence de peptide libre en solution dans les échantillons de nanoparticules après greffage du peptide en surface. L'idée d'utiliser cette technique est venue au regard de l'utilisation courante que l'on en fait pour purifier les autres produits de synthèse. Cependant, aucune publication ne présentait son utilisation pour séparer des molécules organiques de nanoparticules de silice fonctionnalisées. Un seul travail présentait l'utilisation de la Chromatographie Liquide Haute Performance pour séparer des nanoparticules d'or de 3 nm de protéines grâce à une colonne de type C₅ grâce à un gradient eau/acétonitrile²⁶⁸. Nous avons testé deux types de colonne comportant des pores (5 µm) et une longueur (25 cm) identiques. La colonne en C₄ n'a pas donné de résultats exploitables car les temps de rétention n'étaient pas reproductibles et un colmatage de la colonne apparaissait très rapidement. En revanche, l'utilisation d'une colonne C₁₈ et d'un gradient eau/méthanol a donné de bons résultats après un long travail de mise au point.

Cette technique nous a permis de confirmer la pertinence des cycles de purification pour assurer une bonne séparation des nanoparticules couplées au peptide et du peptide libre qui n'aurait pas réagi, comme le montre le

chromatogramme en Figure 77, en détectant la fluorescence du tryptophane du peptide.

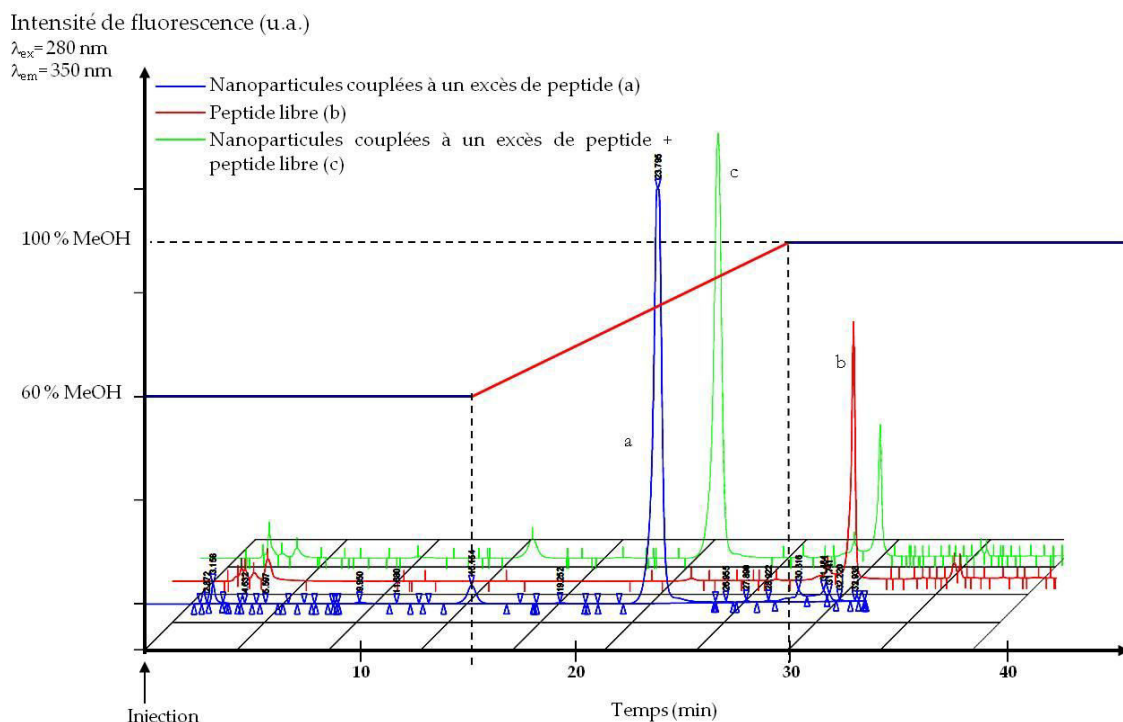


Figure 77 : Chromatogramme de nanoparticules couplées à un excès de peptide après purification (bleu), de peptide libre (rouge) et un mélange des deux solutions (vert) (colonne C_{18} , 250x10 mm, élution : MeOH/eau, détection par fluorescence : $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$).

D'après le chromatogramme de la Figure 77, le peptide libre possède un temps de rétention de 30 minutes (courbe rouge). Le lot de nanoparticules couplées à un excès de peptide montre un seul pic à environ 22 min (courbe bleue) montrant l'absence de peptide libre résiduel.

Cette technique d'analyse originale pour l'étude de nanoparticules, a permis de montrer que les étapes de purification (dialyses et ultrafiltrations) sont efficaces car aucune trace de peptide libre n'est détectée. Malheureusement, cette technique n'a pu être utilisée qu'en mode analytique, car le colmatage progressif de la colonne ne permet pas de passer à une échelle de purification par chromatographie préparative.

III. Etude photophysique des nanoparticules avant et après couplage du peptide

Les premières interrogations concernant cette étude étaient de savoir si l'encapsulation de façon covalente d'un photosensibilisateur dans une matrice de silice de taille nanométrique allait modifier, annihiler ou exalter ses propriétés photophysiques en termes d'absorption, de fluorescence et de production d'oxygène singulet.

Les études présentées dans les paragraphes suivants concernent les nanoparticules refermant de la TPC non fonctionnalisées (NP-TPC-PEG) ou fonctionnalisées par ATWLPPR avec le protocole de 5 éq. de peptide par nanoparticule (NP-TPC-PEG-ATWLPPR).

III.1. Propriétés photophysiques des nanoparticules avant couplage du peptide

Les spectres d'absorption sont effectués avec des échantillons ayant une densité optique de l'ordre de 0,2 au maximum d'absorption dans l'éthanol (~420 nm) et les spectres d'émission superposés sont normalisés par l'absorbance de l'échantillon, à la longueur d'onde d'excitation.

III.1.1. Spectre d'absorption

La Figure 78 présente les spectres d'absorption de la TPC seule et de la TPC greffée dans la nanoparticule décrite plus haut.

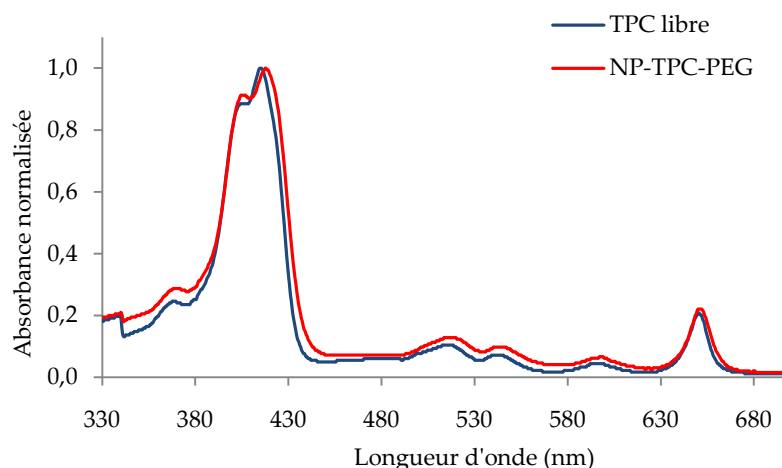


Figure 78 : Spectres d'absorption normalisés de NP-TPC-PEG (rouge) et TPC libre (bleu) dans l'EtOH.

Le spectre de NP-TPC-PEG, représentatif des lots synthétisés, montre les bandes d'absorption caractéristiques de la chlorine, à savoir une bande de Soret élargie, trois bandes QII, III, IV d'intensités décroissantes et la bande QI à 651 nm plus intense que les autres.

Afin d'estimer la quantité de TPC introduite dans les nanoparticules à partir du spectre d'absorption, nous utilisons le coefficient d'extinction molaire à 651 nm, caractéristique de la chlorine et qui subit peu l'influence de la diffusion due aux nanoparticules. En effet, certaines conditions particulières de dispersion (concentration élevée ou dispersion critique) provoquent une dérive de la ligne de base pour des longueurs d'onde inférieures à environ 500 nm. Un coefficient d'extinction molaire apparent se référant à la concentration en nanoparticules et non à la concentration en molécules absorbantes peut être défini. Pour le lot étudié au cours de ce chapitre, il est de $\epsilon' (651 \text{ nm}) = 5,4 \cdot 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le coefficient dit apparent tient compte de la concentration en nanoparticules et non la concentration en PS.

Nous avons pu ainsi estimer le nombre moyen de TPC greffée dans les nanoparticules, environ 6 molécules de TPC par nanoparticule, et en déduire un rendement pour l'étape de greffage d'environ 25 à 30 %.

III.1.2. Spectre d'émission de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence de la TPC libre et de NP-TPC-PEG sont présentés dans la Figure 79 et sont normalisés par l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'excitation, de l'ordre de 0,2 pour les deux échantillons.

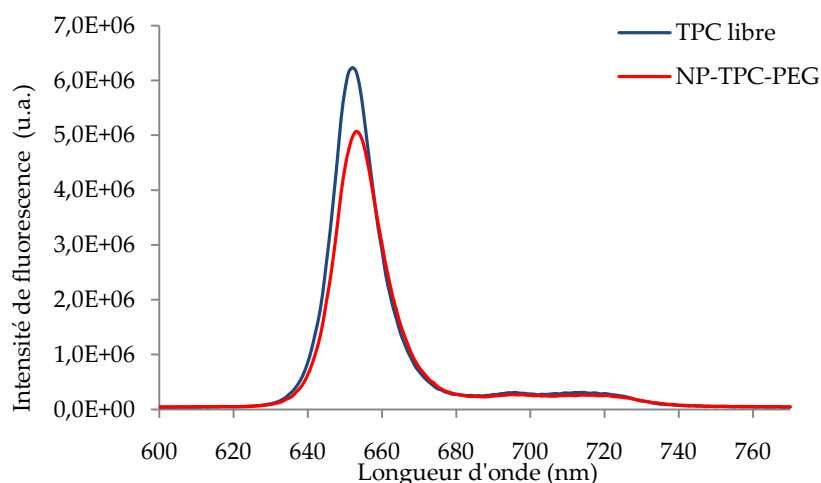


Figure 79 : Spectres d'émission de fluorescence de NP-TPC-PEG et de la TPC libre (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

Les spectres de la TPC libre et de NP-TPC-PEG sont similaires au regard du domaine de longueurs d'onde d'émission et en accord avec les données de spectroscopie UV.

A l'aide de la référence classiquement utilisée, la TPP dans le toluène ($\Phi_f = 0,11$), le rendement quantique de fluorescence NP-TPC-PEG a été estimé à $\Phi_f = 0,18 \pm 0,02$ dans l'éthanol. Rappelons que la TPC libre, dans l'EtOH, possède un $\Phi_f = 0,21 \pm 0,02$. Les propriétés d'émission de fluorescence sont donc conservées après greffage de la TPC.

La Figure 80 présente le déclin de fluorescence de la TPC dans la nanoparticule dans l'éthanol.

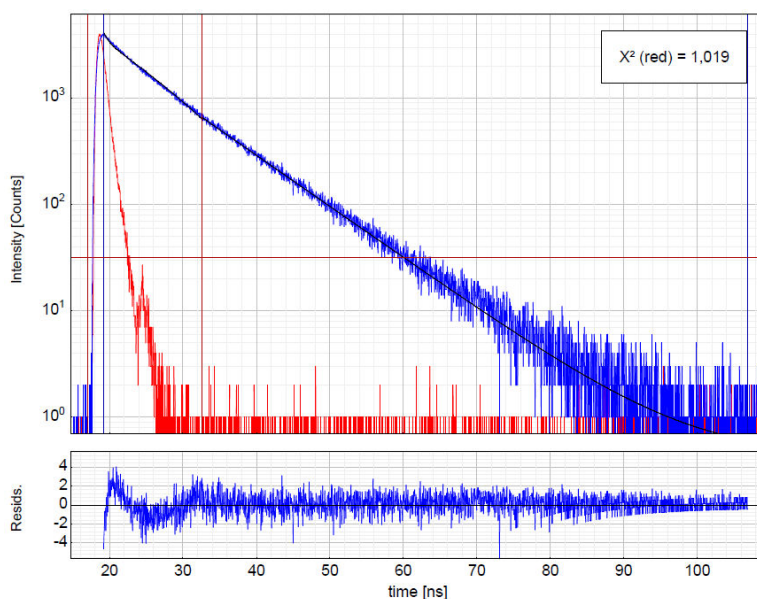


Figure 80 : Haut : Déclins de fluorescence de NP-TPC-PEG dans l'EtOH (bleu) et de l'excitation (rouge); Bas : fonction d'autocorrélation.

La correspondance entre la courbe du déclin mesuré et la fonction appropriée monoexponentielle est très bonne et le temps de vie de fluorescence pour une seule espèce est le suivant : $\tau_f = 9,02 \pm 0,5 \text{ ns}$ avec $\chi^2 = 1,02$. Pour rappel les valeurs pour la TPC libre sont $\tau_f = 9,01 \text{ ns}$ avec $\chi^2 = 0,97$. Notons que la fonction d'autocorrélation montre une légère dérive au niveau de l'excitation (entre 20 et 30 ns) non expliquée ici.

III.1.3. Production d'oxygène singulet

La Figure 81 correspond à la luminescence de l'oxygène singulet après excitation à 420 nm de NP-TPC-PEG dans l'éthanol.

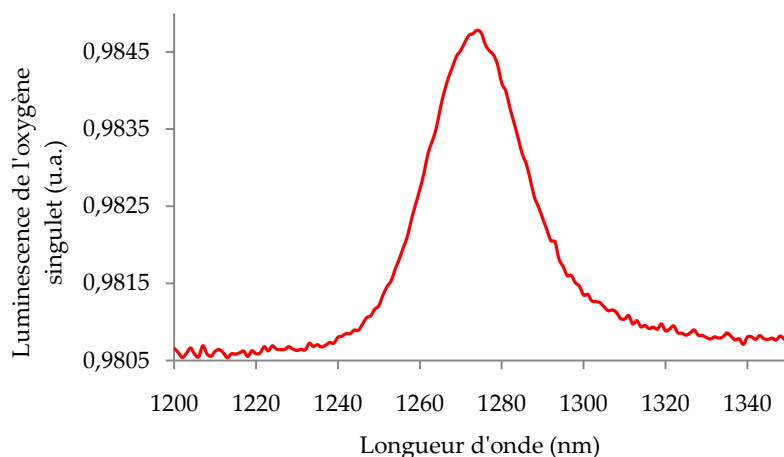


Figure 81 : Spectre d'émission de l'oxygène singulet produit par NP-TPC-PEG (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

Le rendement quantique de formation d'oxygène singulet est $\Phi_{\Delta} = 0,65 \pm 0,05$ dans l'éthanol, valeur comparable à celle obtenue pour la TPC libre ($\Phi_{\Delta} = 0,69 \pm 0,05$).

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'oxygène singulet, effectivement produit, avait la capacité de diffuser hors de la matrice de polysiloxane et ainsi être disponible pour des réactions d'oxydation. Pour ce faire, il faut recourir à l'utilisation d'une sonde chimique spécifique de l'oxygène singulet. Il s'agit de molécules qui, par action de l'oxygène singulet, vont être oxydées et une analyse spectroscopique (de fluorescence ou d'absorbance) va permettre de suivre l'évolution de cette oxydation.

La sonde qui nous paraissait la plus appropriée est vendue par *Invitrogen* et est appelée *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG). Son principe d'utilisation est le suivant : avant réaction avec l'oxygène singulet, la molécule SOSG ne fluoresce pas dans le bleu ($\lambda_{exc.} = 372$ et 393 nm et $\lambda_{em.} = 395$ et 416 nm). Après réaction avec l'oxygène singulet, la molécule formée est détectable dans le vert à 525 nm en excitant à 504 nm. Il est à noter que cette sonde ne réagit pas avec $HO\bullet$ et $O_2\bullet^{-269}$.

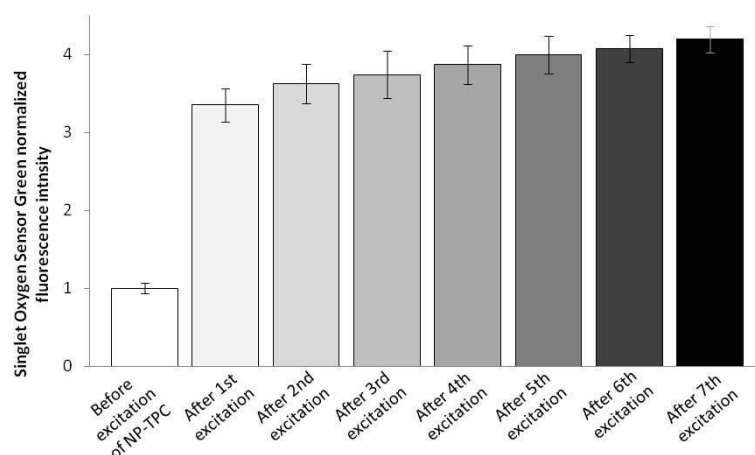


Figure 82 : Mesures de fluorescence du produit de dégradation de SOSG par action de l'oxygène singulet formé par photosensibilisation de NP-TPC-DTPA excitée à 420 nm (MeOH , $\lambda_{\text{exc}} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$).

Nous pouvons donc confirmer la formation d'oxygène singulet ainsi que sa capacité à diffuser dans la matrice de polysiloxane pour être disponible pour oxyder une molécule.

III.1.4. Paramètres pertinents pour la quantification des nanoparticules par spectrophotométrie

Dès réception des nanoparticules, les données dont nous disposons sont la quantité de Gd dans les cœurs et la quantité de nanoparticules, mesurées par l'équipe lyonnaise à l'aide d'un relaxomètre. Ne disposant pas de ce type d'appareillage, nous avons décidé d'utiliser les propriétés spectroscopiques de la TPC comme marqueur de concentration en nanoparticules. Les données obtenues sont résumées dans la Figure 83.

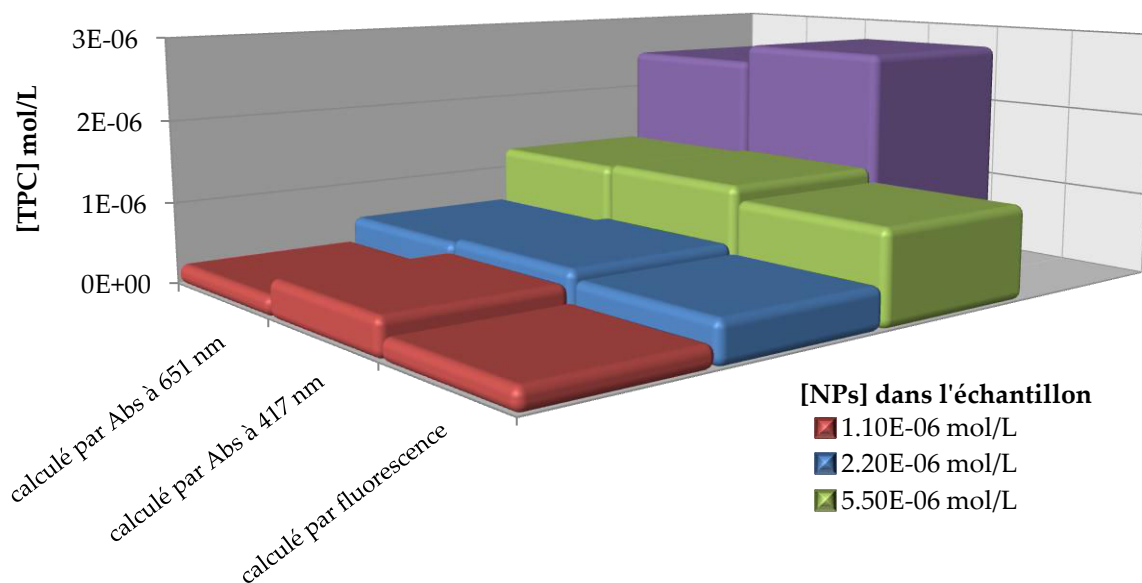


Figure 83 : Mesures de la concentration en TPC dans quatre échantillons de NPs selon trois méthodes différentes.

Ce qu'il ressort de cette étude est que les mesures de la concentration en TPC dans les nanoparticules sont **plus exactes** (non surestimées) par les mesures d'**absorbance à 651 nm** et d'**émission de fluorescence**. La mesure d'absorbance étant la plus simple mettre en œuvre, c'est celle-ci qui sera utilisée en routine et complétée par une mesure de fluorescence en fin de synthèse.

III.2. Etude photophysique après couplage du peptide

III.2.1. Spectre d'absorption

La Figure 84 présente les spectres UV-visible de la TPC libre en solution, de NP-TPC-PEG et de NP-TPC-PEG-ATWLPPR. Afin de comparer au mieux les trois échantillons, les absorbances ont été normalisées au maximum d'absorption (420 nm).

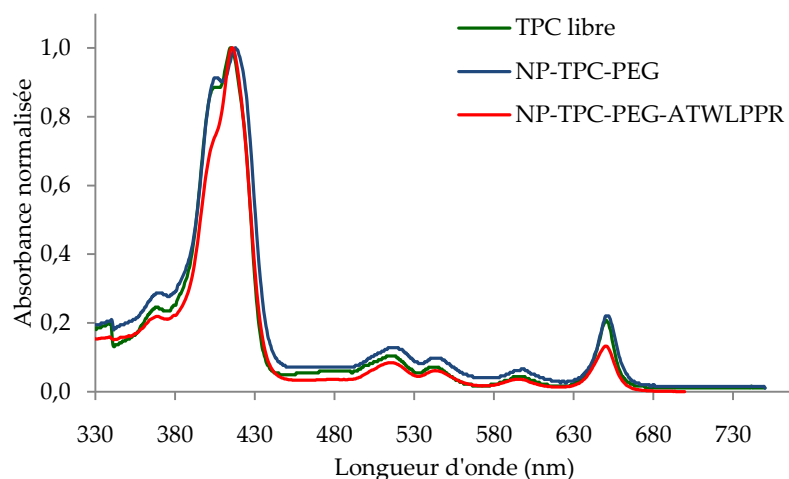


Figure 84 : Comparaison des spectres UV dans l'EtOH.

Aucune différence majeure n'apparaît après l'étape de couplage du peptide et les purifications qu'il engendre.

III.2.2. Spectre d'émission de fluorescence et production d'oxygène singulet

Les spectres d'émission de fluorescence et production d'oxygène sont présentés dans les Figure 85 et Figure 86.

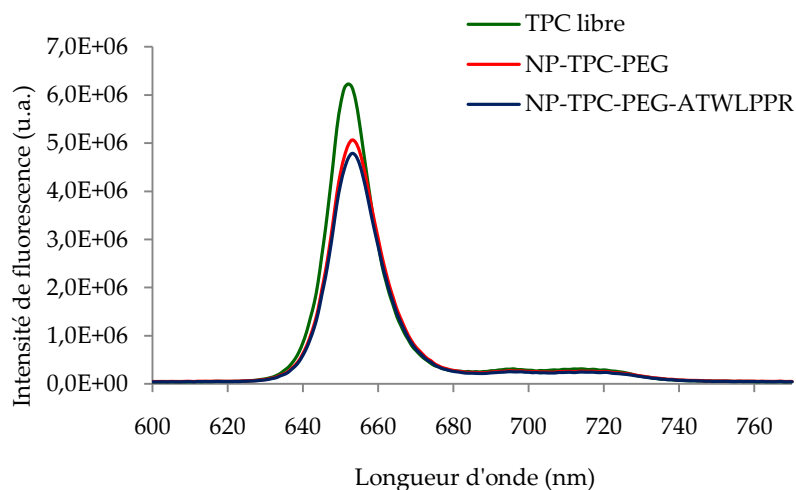


Figure 85 : Comparaison des spectres d'émission de fluorescence (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

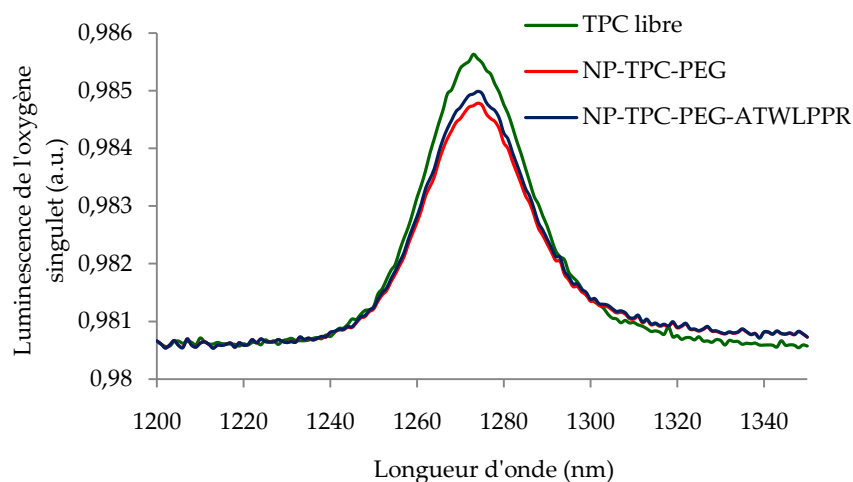


Figure 86 : Comparaison des spectres de luminescence de l'oxygène singulet (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

Le spectre d'émission de l'oxygène singulet produit par NP-TPC-PEG-ATWLPPR est similaire à ceux de la TPC libre et de NP-TPC-PEG. Une légère baisse d'intensité est à noter pour NP-TPC-PEG et NP-TPC-PEG-ATWLPPR par rapport à la TPC libre. Le rendement quantique de production d'oxygène singulet pour NP-TPC-PEG-ATWLPPR est de $0,66 \pm 0,05$.

Nous résumons dans le Tableau 9 les valeurs des rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet ainsi que les temps de vie de fluorescence pour les trois échantillons.

Tableau 9 : Récapitulatif des données spectroscopiques mesurées.

	τ_f (ns $\pm$ 0,5 ns)	ϕ_f ($\pm$ 0,02)	ϕ_{Δ} ($\pm$ 0,05)
TPC libre	9,0	0,21	0,69
NP-TPC-PEG	8,9	0,18	0,65
NP-TPC-PEG-ATWLPPR	9,0	0,17	0,66

Après encapsulation covalente dans les nanoparticules et greffage de peptides en surface, la TPC conserve ses propriétés photophysiques.

III.2.3. Mesure et quantification du peptide greffé en surface

La quantité de peptide greffé sur les nanoparticules a été mesurée par la fluorescence du tryptophane ($\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 350 \text{ nm}$). Une courbe d'étalonnage a été préalablement en portant l'intensité de fluorescence du peptide en solution dans l'eau en fonction de sa concentration. Pour ce calcul, nous avons estimé que l'émission de fluorescence du peptide après couplage n'était pas modifiée.

Les spectres d'émission sont présentés dans la Figure 87.

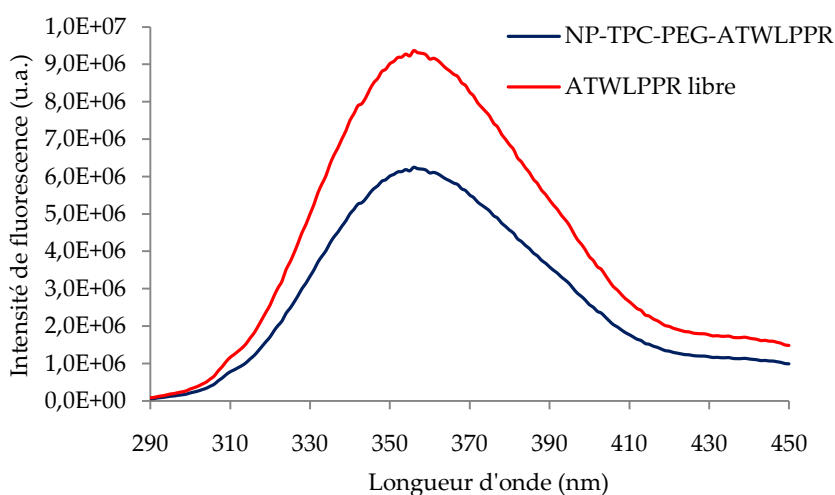


Figure 87 : Comparaison des spectres d'émission du tryptophane dans ATWLPPR libre et NP-TPC-PEG-ATWLPPR (H_2O , $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$).

Pour les essais de couplage concluants, en introduisant entre 5 équivalents de peptide par nanoparticule, nous obtenions des taux de greffage variables entre 3,5 et 4,2 peptides par nanoparticule.

III.3. Principaux résultats biologiques *in vitro*

Les nanoparticules que nous avons synthétisées au cours de cette thèse ont été étudiées afin de montrer leur efficacité photodynamique et leur affinité pour le récepteur NRP-1.

Les cellules MDA-MB-231, lignée de cellules cancéreuses du sein humain, ont été utilisées car elles surexpriment le récepteur NRP-1, dont le peptide ATWLPPR est ligand. La survie cellulaire est estimée par comptage des cellules utilisée par le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Cette molécule est réduite par une biomolécule produite lors de l'activité mitochondriale (succinate déshydrogénase mitochondriale) pour former le dérivé formazan correspondant au triazole, détectable par spectroscopie UV-visible à 550 nm.

Nous résumerons ci-dessous les résultats biologiques obtenus qui ont fait l'objet de la publication, Couleaud, Bechet *et al.*, 2011²⁵⁷, qui inclut les détails techniques.

III.3.1. Cytotoxicité à l'obscurité

Le premier paramètre qui a été étudié est la toxicité des nanoparticules en l'absence de lumière. Ce résultat nous indique la concentration maximum de nanoparticules à injecter sans risquer de dommages cellulaires non liés à un effet PDT. La Figure 88 montre la survie cellulaire en fonction de la concentration de nanoparticules introduite de NP-TPC-PEG et de NP sans TPC.

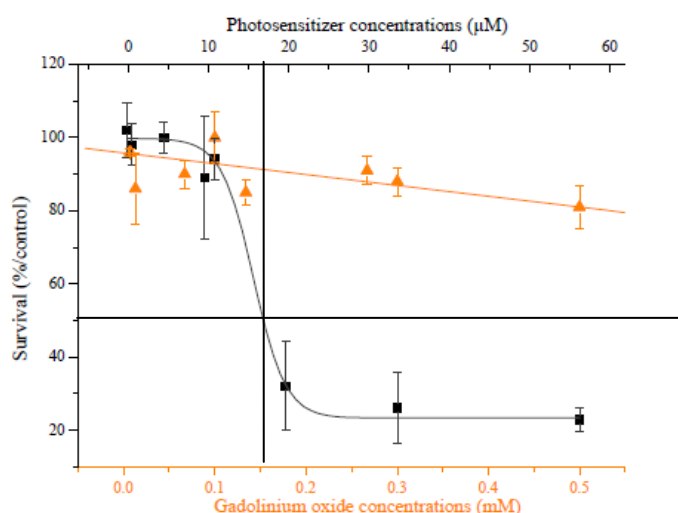


Figure 88 : Courbes de survie cellulaire de MDA-MB-231 à l'obscurité en fonction de la concentration en TPC et de la concentration en Gd ; noir : NP-TPC-PEG, orange : NP sans TPC.

Les données de la Figure 88 montrent une viabilité cellulaire supérieure à 80 % pour une concentration de TPC inférieure à 16 µmol/L. Pour la suite des expériences, nous n'avons pas dépassé la concentration de 16 µmol/L. De plus, il est à noter que les nanoparticules sans TPC présentent peu de toxicité en dessous de 0,5 mmol/L.

Enfin, la cytotoxicité n'a pas été étudiée ici pour des temps de contact supérieurs à 24h.

III.3.2. Phototoxicité

Ces tests vont permettre de mettre en évidence l'effet photodynamique sur les cellules MDA-MB-231. La Figure 89 correspond à la survie cellulaire de la lignée MDA-MB-231 en faisant varier deux paramètres : la concentration en TPC (et donc la concentration en nanoparticules) et la fluence du laser utilisé après un temps d'incubation de 24 heures.

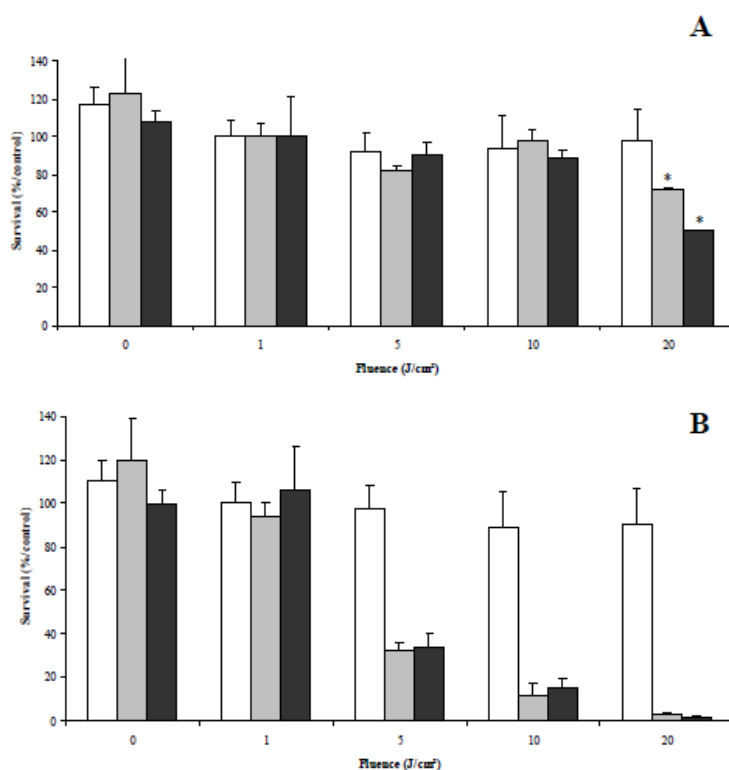


Figure 89 : Survie cellulaire de MDA-MB-231 à 24 h d'incubation (A : [TPC]= 0,1 µmol/L, B : [TPC] = 1 µmol/L ; blanc : NP sans PS, gris : NP-TPC-PEG, noir : NP-TPC-PEG-ATWLPPR ; barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n = 6).

Les mesures de phototoxicité ont été effectuées avec des nanoparticules sans TPC (en blanc, comme témoin négatif), des nanoparticules avec de la TPC fonctionnalisées ou non par le peptide ATWLPPR, respectivement représentées en noir et en gris, sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. Au vu de l'étude de cytotoxicité à l'obscurité, nous avons choisi des concentrations en TPC largement inférieures aux concentrations montrant une toxicité. Pour cette étude, les concentrations 0,1 et 1,0 µmol/L en TPC ont été testées avec un temps d'incubation de 24 heures. Les histogrammes de la Figure 89 sont exprimés en fonction de la fluence appliquée, avec 5 valeurs qui sont 0, 1, 5, 10 et 20 J/cm².

L'analyse de ces histogrammes met en évidence le caractère **concentration dépendant** et **fluence dépendant** de l'action photodynamique des nanoparticules. Comme témoin, des nanoparticules identiques mais sans TPC montrent que

l'exposition de nanoparticules n'a aucun effet sur la survie cellulaire pour les concentrations en nanoparticules injectées et un temps de contact de 24 h.

Pour la concentration la plus faible ($[TPC] = 0,1 \mu\text{mol/L}$), l'effet photodynamique n'est constaté que pour la fluence maximale, soit 20 J/cm^2 . De plus, une différence significative est observée entre les nanoparticules fonctionnalisées et celles non fonctionnalisées par ATWLPPR pour cette valeur de fluence (Figure 89 A).

Pour la concentration plus élevée ($[TPC] = 1,0 \mu\text{mol/L}$), l'apparition de l'effet photodynamique est observée pour des fluences plus faibles situées entre 1 et 5 J/cm^2 . Cependant, aucune différence notable n'est observée entre les nanoparticules fonctionnalisées et non fonctionnalisées par ATWLPPR (Figure 89 B). Pour les nanoparticules fonctionnalisées ou non, la DL_{50} , à $1 \mu\text{mol/L}$ en TPC, est située entre 3 et 5 J/cm^2 .

Au vu de ces résultats, l'hypothèse suivante peut être avancée : à faible concentration, la différence observée selon que la nanoparticule est fonctionnalisée par ATWLPPR ou pas, indique que l'incorporation cellulaire se fait majoritairement par voie spécifique *via* le récepteur NRP-1. En revanche, à plus forte concentration, l'analogie de comportement entre les deux types de nanoparticules, montrent un comportement non spécifique de l'incorporation cellulaire.

III.3.3. Affinité moléculaire pour le récepteur NRP-1

Ce type de test, aussi appelé test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), permet de quantifier l'affinité d'une molécule (protéine, peptide, etc.) pour un récepteur fixé, à une concentration donnée, sur une plaque multi-puits. Ce test d'affinité se fait en compétition avec le ligand naturel de NRP-1, le VEGF₁₆₅.

Les tests sont effectués en comparant les nanoparticules avec et sans peptide en surface et le peptide libre.

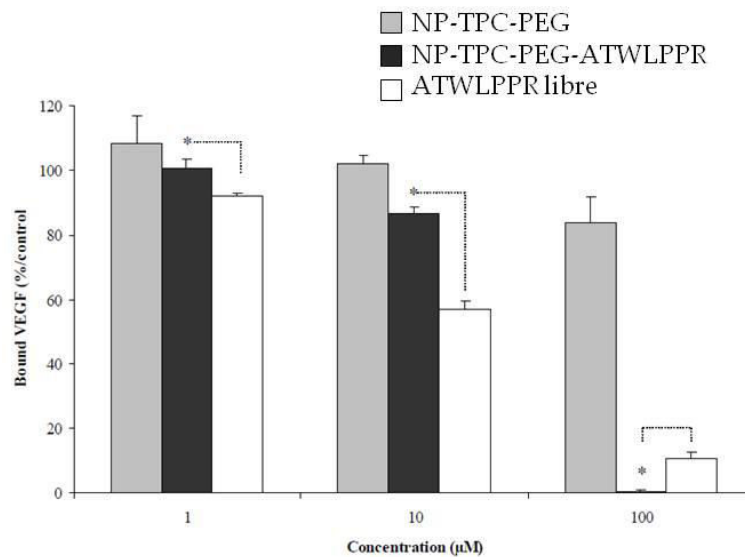


Figure 90 : Affinité pour le récepteur NRP-1 par test ELISA en fonction de la concentration en peptide (barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, $n = 3$)

Les résultats montrent une très bonne affinité des nanoparticules portant le peptide qui semble même meilleure que l'affinité du peptide libre pour la plus forte concentration en peptide (100 $\mu\text{mol/L}$), ce qui indique l'effet bénéfique de la fixation d'environ 4 peptides par nanoparticule. La concentration de peptide nécessaire pour déplacer 50 % du VEGF fixé à NRP-1 est située entre 10 et 100 $\mu\text{mol/L}$.

Conclusions

Cette étude a permis de démontrer la faisabilité de l'objectif du travail : l'élaboration de nanoparticules multifonctionnelles pour la PDT. Il a été possible de coupler de façon covalente des chlorines dans une matrice de silice avec un rendement de l'ordre de 20 à 30 %, sans altérer notablement les propriétés photophysiques du PS. Nous avons pu vérifier que l'oxygène moléculaire peut diffuser dans et hors de la matrice grâce à l'utilisation d'une sonde chimique réagissant avec l'oxygène singulet. Un protocole fiable de couplage de peptides en surface de nanoparticules a été mis au point, avec un taux effectif d'environ 4 peptides par nanoparticule. Enfin, les premiers résultats biologiques ont montré une activité photodynamique intéressante avec une DL_{50} située entre 3 et 5 J/cm² pour l'irradiation lumineuse et pour une concentration en TPC de 1 µmol/L ($\lambda_{exc.} = 652$ nm). De plus, l'affinité pour NRP-1 des nanoparticules fonctionnalisées par ATWLPPR a été prouvée et est même améliorée relativement au peptide libre (à une concentration forte de 100 µmol/L en peptide).

Il reste cependant des verrous à lever et notamment concernant l'imagerie IRM. En effet, le type de nanoparticules testé, bien que renfermant un cœur d'oxyde de gadolinium, ne permet pas d'obtenir un signal IRM suffisamment contrasté pour être utilisé comme moyen de suivi des nanoparticules *in vivo*. Or, cette dernière caractéristique est cruciale pour toute opération de **PDT guidée par imagerie**. Le signal IRM souffre vraisemblablement de l'influence de la taille élevée de la couche de silice (⁴⁷Si/Gd). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de nous focaliser sur des nanoparticules de même composition, mais avec des tailles de couche de silice plus faibles.

Chapitre III :
Etude d'une nanoparticule
optimisée pour la thérapie
photodynamique et le
diagnostic IRM.
Vers une nanoparticule
idéale.

Chapitre III : Etude d'une nanoparticule optimisée pour la thérapie photodynamique et le diagnostic IRM.

Vers une nanoparticule idéale

Introduction

Après avoir validé le concept de greffage covalent de PS dans une matrice de polysiloxane, le greffage de peptides en surface, la conservation des principales caractéristiques photophysiques du PS et les résultats très encourageants, nous nous sommes intéressés à une nanoparticule dont certains paramètres de composition ont été modifiés dans le but de prouver *in vivo* la possibilité de combiner au sein d'un même objet la **PDT** et le **diagnostic par IRM**.

Cette nouvelle nanoparticule a fait l'objet d'optimisations préalables concernant le greffage du PS de façon covalente dans la matrice de polysiloxane et la fonctionnalisation par le peptide ATWLPPR. Nous nous sommes intéressés aux caractéristiques photophysiques puis à l'étude biologique *in vitro*. Enfin, les premiers essais concernant l'utilisation de ces nanoparticules *in vivo* pour le diagnostic par IRM sur petit animal seront présentés dans ce chapitre.

Cette étude servira de base pour la mise en place d'une méthodologie de plan d'expériences afin d'obtenir une nanoparticule dite « idéale » qui permettra de combiner les paramètres optimums concernant la thérapie, le ciblage et le diagnostic par IRM.

I. Description de la nanoparticule « Nano-Star »

Afin de combiner au sein d'un même objet des propriétés pour une **efficacité photodynamique optimale**, une **sélectivité optimale** et une **détection du signal IRM optimale**, il est possible de jouer sur différents constituants de la nanoparticule, à savoir :

- ★ Concentration en Gd dans la nanoparticule (taille du cœur de Gd_2O_3).
- ★ Epaisseur de la couche de polysiloxane.
- ★ Type de surfactant.
- ★ Concentration de TPC greffée dans la matrice de polysiloxane.
- ★ Nature et concentration de peptide en surface.

Concernant la concentration en gadolinium, l'épaisseur de la couche de polysiloxane et le type de surfactant, l'équipe lyonnaise les a fait évoluer selon des études qu'ils ont menées. Nous en donnerons les principaux tenants dans les paragraphes suivants. Quant aux deux paramètres concernant la TPC et le peptide, nous avons fait deux études afin de déterminer les paramètres optimaux que nous développerons ensuite.

D'une manière générale, les nanoparticules décrites ici ont une taille plus petite que celles étudiées dans le chapitre précédent afin de leur conférer une meilleure furtivité *in vivo* et une biodistribution optimale^{270, 271}. L'objectif final, à savoir l'utilisation de ces nano-objets multifonctionnels pour des essais *in vivo*, a été l'objectif général de toutes les études menées et décrites ci-après. Les fonctionnalités principales que nous souhaitons affiner pour les nanoparticules multifonctionnelles sont l'efficacité photodynamique, l'affinité pour la cible cellulaire et l'intensité du signal IRM.

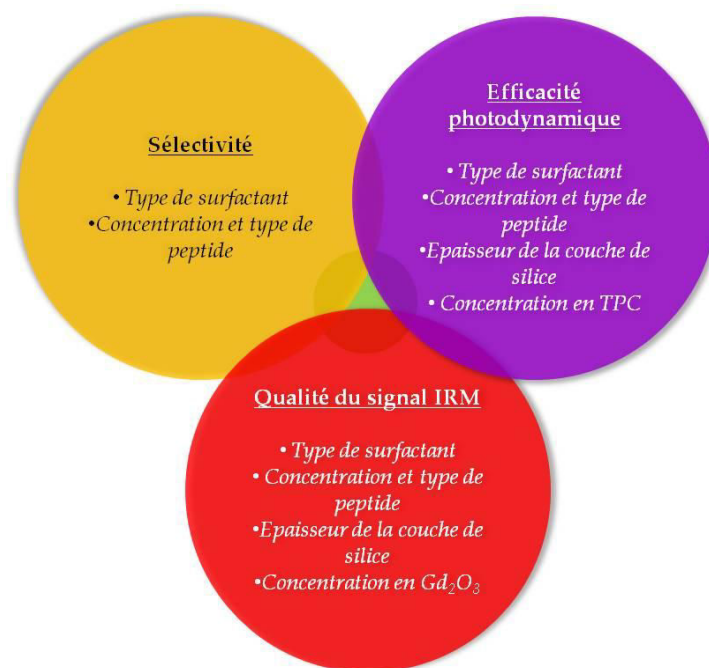


Figure 91 : Représentation schématique des différents paramètres influençant les trois fonctionnalités de la nanoparticule « idéale » pris en compte par le plan d'expériences.

La Figure 91 résume les paramètres sur lesquels nous pouvons agir lors de la synthèse des nanoparticules pour améliorer les **propriétés photophysiques** (rendement quantique en oxygène singulet) et **biologiques** (sélectivité moléculaire, efficacité PDT, rehaussement du signal IRM in vivo). Un même paramètre peut alors influencer sur plusieurs propriétés du nano-objet. Par exemple, la concentration de peptide va induire une différence dans l'affinité pour le récepteur, et modifier la concentration locale des nanoparticules au niveau de la cible et donc impacter sur le signal IRM et l'efficacité PDT localement.

I.1. Paramètres modifiés

I.1.1. Type de surfactants hydrophiles

L'ajout de surfactants hydrophiles est un paramètre important, voire incontournable afin de conférer à la nanoparticule un caractère furtif vis-à-vis de

l'adsorption de protéines ou opsonisation^{241-247, 272}. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent avec l'étude des différents types de polyéthylène glycol²³⁴, les paramètres de biodistribution vont dépendre en grande partie de la capacité qu'auront les surfactants hydrophiles à rendre la nanoparticule biocompatible et furtive.

Concernant les surfactants envisagés, deux molécules apparaissent attractives, ce sont le diéthylène triamine penta acide noté **DTPA** et le 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide, noté **DOTA** (Figure 92). En effet, ces deux molécules *via* leurs fonctions acides ont aussi la capacité de chélater le cation Gd^{3+} tout en conservant les propriétés paramagnétiques du gadolinium²⁷³⁻²⁷⁵.

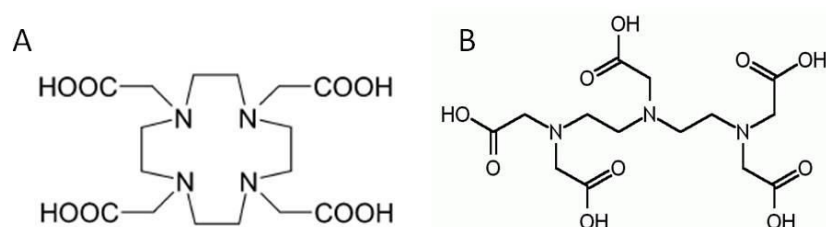


Figure 92 : Formules développées du DOTA (A) et du DTPA (B)

La biocompatibilité est aussi une caractéristique de ces deux molécules de surfactant²⁷⁶⁻²⁷⁸. Le DOTA et le DTPA, associés au cation Gd^{3+} (Figure 93), sont utilisés comme agents de contraste en IRM et possèdent une autorisation de mise sur le marché sous le nom de DOTAREM® par Guerbet et MAGNEVIST® (DTPA) par Bayer en solutions injectables. Le DOTAREM® commercial fait notamment l'objet d'un point de comparaison pour l'efficacité de contraste de nos nanoparticules.

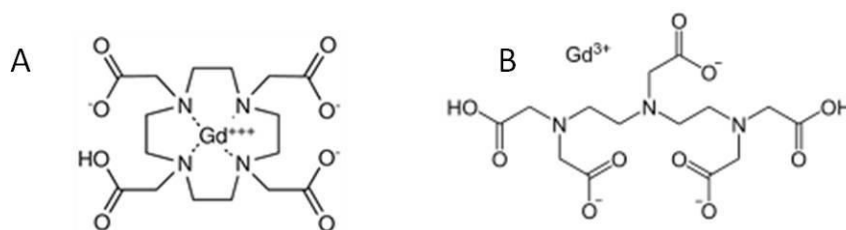


Figure 93 : Formules développées du DOTAREM® (A) et du MAGNEVIST® (B).

Le cation gadolinium, Gd^{3+} , est, comme la plupart des atomes lourds, toxique à l'état libre²⁷⁹. Certaines études sur l'animal ont montré de fortes interactions avec le système réticuloendothélial. Il peut également inhiber certaines enzymes. Une fois relargué, Gd^{3+} se loge préférentiellement dans les os, le foie et la rate²⁸⁰. C'est pourquoi les formulations cliniques le présentent sous forme de chélates de polyamines portant des fonctions acides. Ces agents chélatants doivent avoir une forte affinité pour l'ion Gd^{3+} et ne pas subir de transmétallation avec des cations métalliques endogènes comme Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc. A ce titre, les chélateurs cycliques, comme le DOTA, sont plus fiables que les linéaires comme le DTPA²⁸¹. La formule de ces agents chélatants en font aussi de très bons surfactants hydrophiles comportant des fonctions acides qui permettent de les attacher en surface des nanoparticules, de les rendre hydrosolubles et enfin de greffer un peptide comme nous l'avons effectué sur les surfactants de type polyéthylène glycol.

La Nano-Star possède des surfactants hydrophiles DTPA.

I.1.2. Epaisseur de la couche de silice

Les nanoparticules étudiées dans le Chapitre 2 (47 Si/Gd) présentaient un signal IRM insuffisant pour préconiser une utilisation *in vivo*, en raison de l'épaisseur trop élevée de la couche de silice. Suite à l'amélioration des techniques de synthèse au LPCML, il devenait possible d'obtenir des coques de silice avec une stœchiométrie de l'ordre de 1 à 4 Si pour 1 Gd, permettant un rehaussement du signal IRM plus important.

Ce paramètre nous a semblé intéressant à prendre en compte puisqu'il intervient non seulement sur l'intensité du signal IRM, mais également sur la taille de la nanoparticule (diamètre de 2 et 5 nm) donc sur sa furtivité, sa biodistribution²⁷⁰,²⁷¹ et par conséquent l'efficacité photodynamique. En diminuant l'épaisseur de la

couche de silice (entre 10 et 30 Å), on peut également s'attendre à un taux de greffage de la TPC (8 Å) plus faible.

La Nano-Star possède une coque de polysiloxane établie avec une stœchiométrie de 4 Si/Gd.

I.1.3. Taille du cœur en Gd_2O_3

L'équipe du LPCML a développé en parallèle de nos premiers travaux, une autre synthèse de cœur d'oxyde de gadolinium conduisant à des cœurs plus petits mais donnant un signal IRM de meilleure intensité. Il a donc été décidé d'utiliser ce nouveau type de cœur. Deux tailles ont été retenues et par mesure de DLS, les diamètres hydrodynamiques des différents cœurs ont été déterminés (Figure 94).

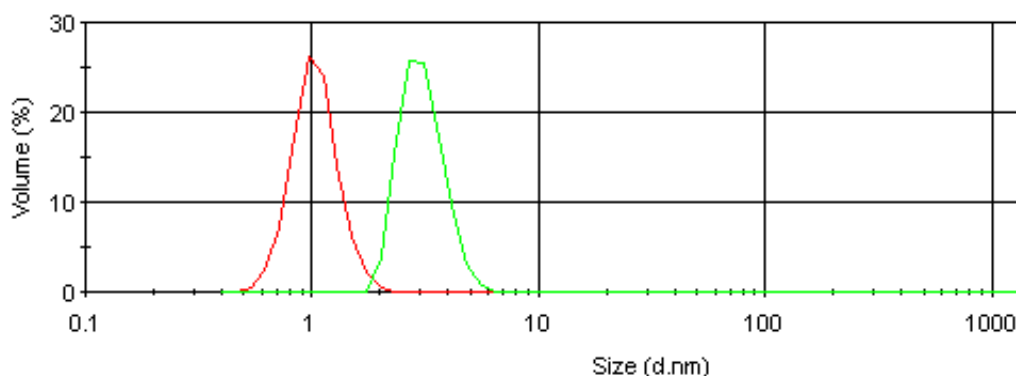


Figure 94 : Distribution de tailles en volume dans l'eau par DLS ($\lambda_{exc} = 633$ nm)

Courbe rouge : « petits cœurs nus » ; courbe verte : « gros cœurs nus » dans le DEG.

Les tailles mesurées sont monodisperses et sont de $1,0 \pm 0,2$ nm pour les « petits cœurs » et de $3,0 \pm 0,2$ nm pour les « gros cœurs ». Nous utiliserons dorénavant cette nomenclature pour distinguer les différents types de cœurs dont la seule différence est leur taille et la quantité de Gd qu'ils renferment.

La Nano-Star comporte un « petit cœur » de Gd_2O_3 .

I.1.4. Concentration en TPC

Le taux de greffage de TPC par nanoparticule est un autre paramètre à prendre en compte. Comme pour la taille de la couche de silice, le taux de greffage de TPC doit être exprimé en quantité de TPC par quantité de Gd. Le taux de greffage de TPC va influencer sur les caractéristiques photophysiques du nano-objet final et donc son efficacité photodynamique. La concentration maximale à ne pas dépasser a été préalablement définie pour ne pas observer, aux concentrations de traitement, de cytotoxicité à l'obscurité. De plus, il faut mettre en relation cette quantité maximale de TPC avec la quantité minimale de Gd nécessaire pour observer un rehaussement de contraste efficace.

Nous montrons, dans l'étude présentée au paragraphe I.2 de ce chapitre, l'importance du taux de greffage de la TPC sur les propriétés photophysiques.

I.1.5. Nature et concentration du peptide par nanoparticule

Pour cette étude, nous avons décidé de montrer les limites du greffage de peptides en surface des nanoparticules en termes de nombre de peptides que l'on pouvait effectivement greffer et d'efficacité de reconnaissance moléculaire pour la cible NRP-1. Nous avons aussi comparé le comportement de nanoparticules couplées au peptide ATWLPPR et celui de nanoparticules couplées au peptide LWRPTPA. Ce peptide a été utilisé comme témoin négatif du peptide ATWLPPR. Ce « *scrambled* » correspond au peptide ligand et contient les mêmes acides aminés (donc encombrement et charge analogues). Il présente une affinité nulle pour le récepteur NRP-1 et est utilisé comme témoin négatif d'affinité. Starzec *et al.* utilisent le peptide LWRPTPA à une concentration de 1000 $\mu\text{mol/L}$ sans observer d'affinité moléculaire pour NRP-1²⁸².

Plusieurs taux de greffage de peptide par nanoparticule seront envisagés. Une étude plus détaillée sera décrite au paragraphe I.3 concernant la synthèse et l'affinité des nanoparticules fonctionnalisées avec plusieurs taux de greffage.

I.2. Optimisation du taux de greffage de TPC dans la matrice de polysiloxane

I.2.1. Présentation des nanoparticules étudiées et des études menées

Cette étude de l'évolution des caractéristiques photophysiques en fonction du taux de greffage de TPC dans la matrice a été réalisée sur des **nanoparticules décrites plus haut (4 Si/Gd)** sauf qu'elles ne présentent **pas de surfactants hydrophiles en surface**. L'étude a porté sur 4 lots de nanoparticules correspondant à 4 taux différents, notés : Nanos 5, Nanos 10, Nanos 20 et Nanos 50 (Figure 95). Le chiffre correspond au taux de greffage théorique, au nombre d'équivalents de TPC introduit par nanoparticule.

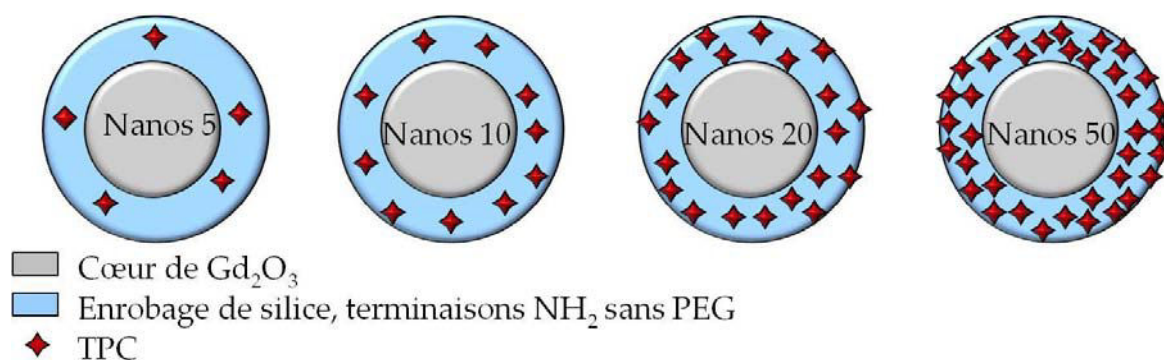


Figure 95 : Représentation schématique des quatre lots de nanoparticules testées dans cette étude.

Une première étude a consisté à quantifier le taux de TPC effectivement couplé dans la couche de polysiloxane et à étudier l'influence de la concentration en TPC sur les propriétés photophysiques des nanoparticules, elle-même fonction du nombre de nanoparticules introduit.

I.2.2. Etude spectroscopique à concentration de nanoparticules constante

Le but de cette étude est d'évaluer les propriétés photophysiques de quatre solutions de concentration en nanoparticules constante, donc de concentration en TPC différente, représenté schématiquement dans la Figure 96.

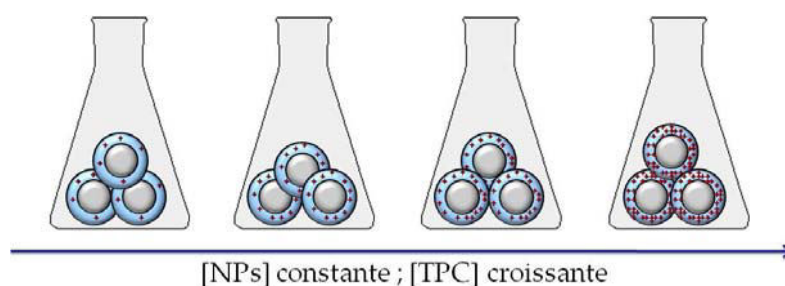


Figure 96 : Représentation schématique des quatre lots de nanoparticules à une même concentration en NPs.

I.2.2.a. Spectroscopie UV-visible

Le coefficient d'extinction molaire de la TPC libre dans l'éthanol a été calculé précédemment : $\epsilon(419 \text{ nm}) = 0,153 \cdot 10^6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. En supposant que les caractéristiques d'absorption de la TPC ne sont pas modifiées lorsque la TPC est greffée dans la nanoparticule, il est ainsi possible de déterminer la quantité réelle de TPC greffée (Tableau 10).

Tableau 10 : Principales données mesurées par spectroscopie UV dans l'éthanol.

Echantillons	Absorbance mesurée à	Rendement
	419 nm	d'encapsulation (%)
Nanos 5	0,047	29
Nanos 10	0,088	28
Nanos 20	0,165	26
Nanos 50	0,427	27

La concentration réelle de TPC greffée dans les nanoparticules diffère d'un facteur 3 par rapport à la TPC introduite pour le greffage. Le rendement d'encapsulation peut donc être considéré pour ces nanoparticules d'environ 30 %, quelque soit la quantité de TPC introduite. Les résultats présentés en Figure 97 montrent que, pour une même quantité de chaque lot de nanoparticules, l'évolution de la concentration en TPC (au vu de l'absorption à 419 nm) est linéaire, ce qui confirme que le taux d'encapsulation est identique pour chaque lot.

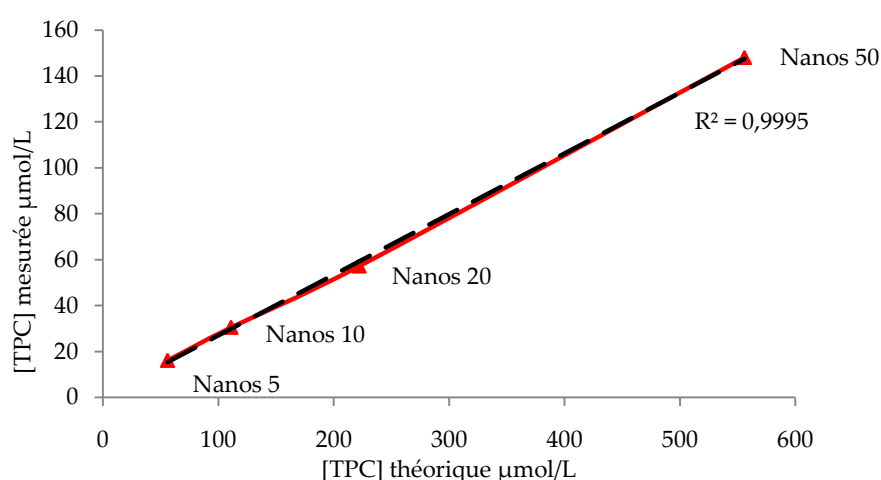


Figure 97 : Evolution de la concentration en TPC mesurée en fonction de la TPC théorique pour les quatre échantillons.

Enfin, d'après les spectres UV-visible présentés dans la Figure 98, le taux d'encapsulation ne semble pas influencer les propriétés d'absorption de la TPC.

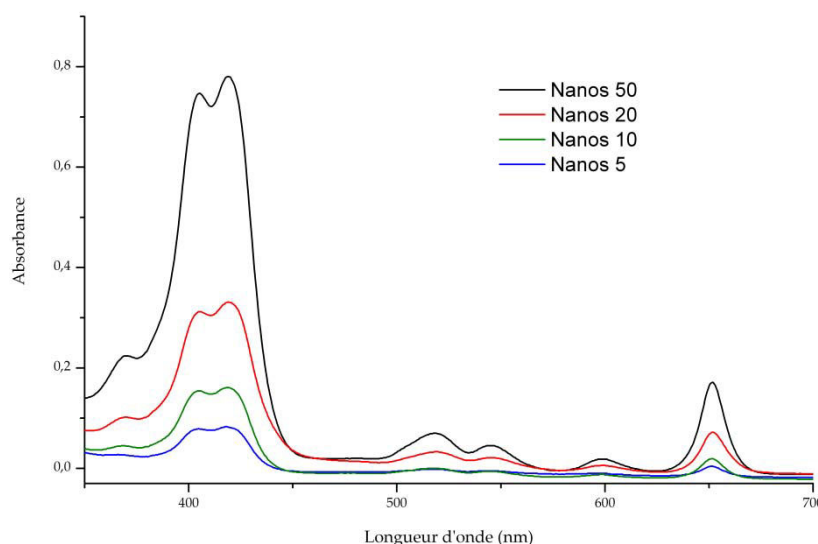


Figure 98 : Spectres UV-visible des quatre lots de nanoparticules à la même concentration en nanoparticules dans l'éthanol.

I.2.2.b. Propriétés d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet

L'émission de fluorescence ainsi que la production d'oxygène singulet ont été mesurées pour les 4 échantillons (Nanos 5, Nanos 10, Nanos 20 et Nanos 50). Les échantillons sont excités à 419 nm et le signal de fluorescence est enregistré entre 620 à 750 nm, le signal d'émission de l'oxygène singulet entre 1200 et 1350 nm. La TPC sert de référence pour calculer les rendements quantiques de fluorescence de production d'oxygène singulet, avec respectivement des rendements quantiques de fluorescence $\Phi_f = 0,21 \pm 0,02$ et de production d'oxygène singulet $\Phi_\Delta = 0,69 \pm 0,05$ dans l'éthanol.

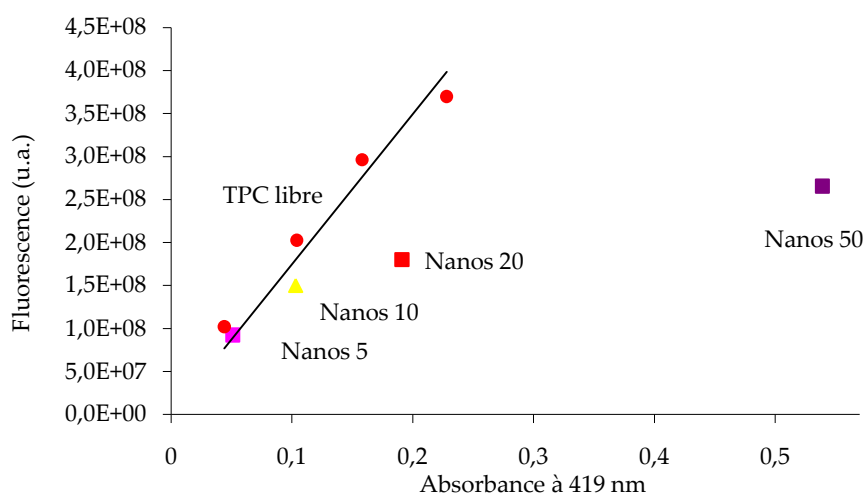


Figure 99 : Emission de fluorescence mesurée pour la TPC libre et les solutions de nanoparticules ($\lambda_{exc.} = 419$ nm) en fonction de l'absorbance à 419 nm dans l'EtOH.

D'après la Figure 99, l'intensité de fluorescence de la chlorine en solution est proportionnelle à l'absorbance pour une absorbance inférieure à 0,2. En revanche, les solutions de nanoparticules présentent des intensités de fluorescence non proportionnelles à la DO dès le 3^{ème} lot (Nanos 20). Le lot de Nanos 50 confirme cette tendance. Ces éléments font l'objet d'une modélisation, non présentée ici.

La production d'oxygène singulet en fonction du lot de nanoparticules est présenté dans la Figure 100.

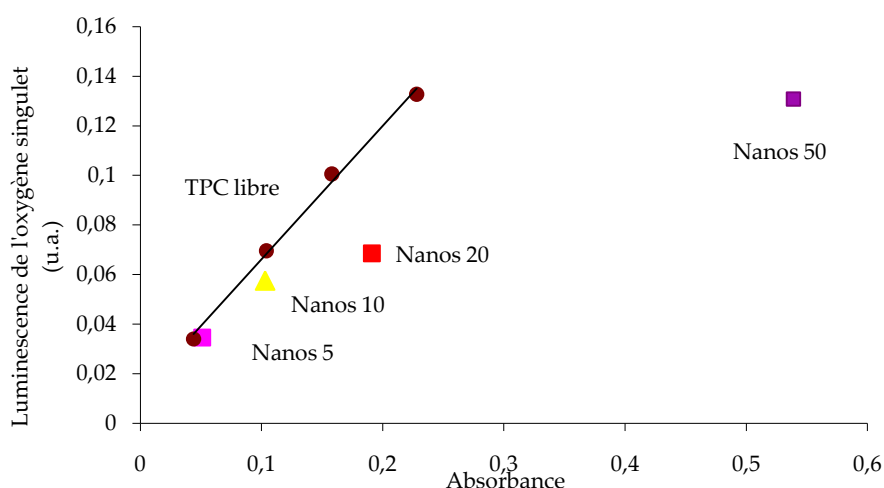


Figure 100 : Emission de l'oxygène singulet mesurée pour la TPC libre et les solutions de nanoparticules en fonction de l'absorbance dans l'EtOH.

En ce qui concerne la production d'oxygène singulet, la même tendance est observée : au-delà d'une absorbance de 0,1, le rendement quantique diminue fortement et n'est plus proportionnel à la DO de la solution. Après 3 séries de mesures et en moyennant les données, les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des rendements quantiques mesurés dans l'éthanol.

Echantillon	Rendement quantique de fluorescence	Rendement quantique de production d'oxygène singulet
	($\pm 0,01$)	($\pm 0,05$)
TPC libre	0,21	0,69
Nanos 5	0,16	0,64
Nanos 10	0,13	0,54
Nanos 20	0,08	0,34
Nanos 50	0,04	0,23

D'après les résultats du Tableau 11, on peut noter une baisse des rendements de fluorescence et d'oxygène singulet pour tous les lots de nanoparticules, quel que soit le taux de greffage de la TPC dans les nanoparticules, par rapport à une même concentration de chlorure en solution. Si cette baisse reste faible pour des taux de greffage faible (Nanos 5 et Nanos 10), elle devient importante pour les taux plus élevés. Ceci pourrait s'expliquer par des interactions intra-particulaires entre les photosensibilisateurs à l'intérieur même des nanoparticules. Pour vérifier que ces interactions sont intra-particulaires et non inter-particulaires, une autre série de mesures a été effectuée et décrite dans le paragraphe suivant.

I.2.3. Etude spectroscopique des échantillons Nanos 10 et Nanos 20

Dans cette étude, il s'agit de garder une concentration de TPC constante, en faisant varier la concentration en nanoparticules, comme le montre la Figure 101.

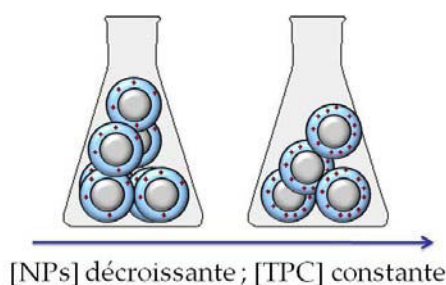


Figure 101 : Représentation schématique des deux lots de nanoparticules (Nanos 10 et Nanos 20) à une concentration équivalente en TPC.

Des échantillons de Nanos 10 et Nanos 20 à des concentrations en nanoparticules différentes ont été préparées et analysées par spectroscopie de fluorescence (Figure 102).

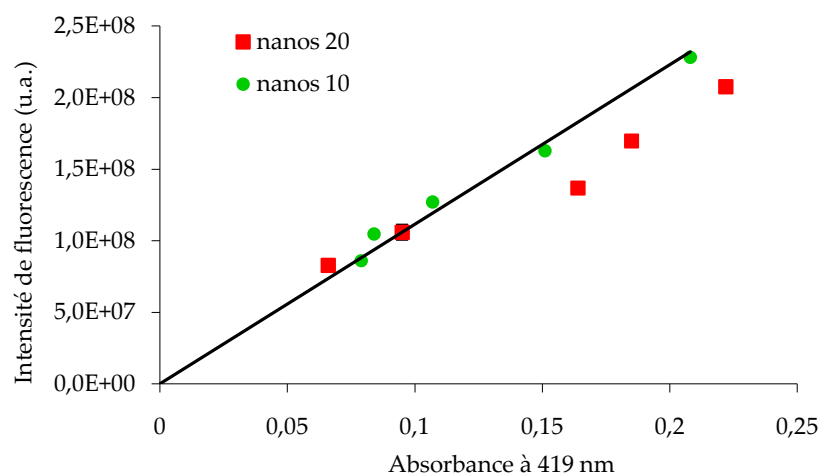


Figure 102 : Intensité de fluorescence en fonction de l'absorbance pour quatre concentrations différentes des deux lots Nanos 10 et Nanos 20 (EtOH, $\lambda_{\text{exc.}} = 419 \text{ nm}$).

La Figure 102 montre que, pour une certaine concentration en TPC dans les nanoparticules (ici Nanos 20), des interactions inter-particules provoquent une baisse du rendement quantique de fluorescence et, comme on l'a vu plus haut, du rendement quantique de formation de l'oxygène singulet (Figure 100).

I.3. Etude de plusieurs taux de greffage de peptide – Limite du greffage de peptide en surface

Nous avons voulu étudier l'influence du nombre de peptides greffés sur l'affinité de la nanoparticule fonctionnalisée pour le récepteur NRP-1. En effet, il est intéressant d'évaluer un taux optimal de fonctionnalisation des nanoparticules par ATWLPPR afin d'obtenir une affinité maximale pour NRP-1.

I.3.1. Synthèse et caractérisation photophysique des lots

Nous nous sommes fixés de coupler 5, 10 et 100 peptides par nanoparticule. En utilisant, les mêmes stœchiométries entre agents de couplage et peptide (à savoir 1,2 éq. d'agents de couplage pour 1 éq. de peptide), nous avons mené les synthèses en parallèle en utilisant le peptide décrit précédemment, ATWLPPR. La quantification réelle du nombre de peptides est effectuée par spectroscopie de fluorescence comme nous l'avons explicité dans le chapitre II, en mesurant la fluorescence du tryptophane du peptide.

Le couplage d'environ 5 peptides par nanoparticule est reproductible avec des rendements compris entre 75 et 90 %. En revanche, pour les quantités théoriques plus importantes (50 et 100 peptides théoriques par nanoparticule), le taux de greffage réel est différent du taux de greffage théorique, compris entre 15 et 60 %. Au vue de la taille des nanoparticules, de l'ordre de 2 à 3 nm de diamètre, le fait de fixer 15 peptides semble effectivement être un maximum, du fait de l'encombrement stérique, sachant que le peptide mesure environ 15 Å (sans préjuger de sa structure tertiaire). Pour la suite des études, il nous a semblé raisonnable de greffer 5 peptides par nanoparticule.

I.3.2. Etude de l'affinité moléculaire pour NRP-1 de trois lots de nanoparticules

De même que nous l'avons décrit au Chapitre II, cette étude consiste à évaluer l'impact de la concentration en nanoparticules fonctionnalisées par ATWLPPR sur le déplacement du VEGF fixé au préalable sur NRP-1. Les concentrations des trois lots de nanoparticules, au vu des taux de greffage calculés plus haut, ont été exprimées en fonction d'ATWLPPR. Les lots étudiés sont issus d'une synthèse, différente de celle présentée ci-dessus, de trois lots comportant 5, 10 et 100 peptides par nanoparticules.

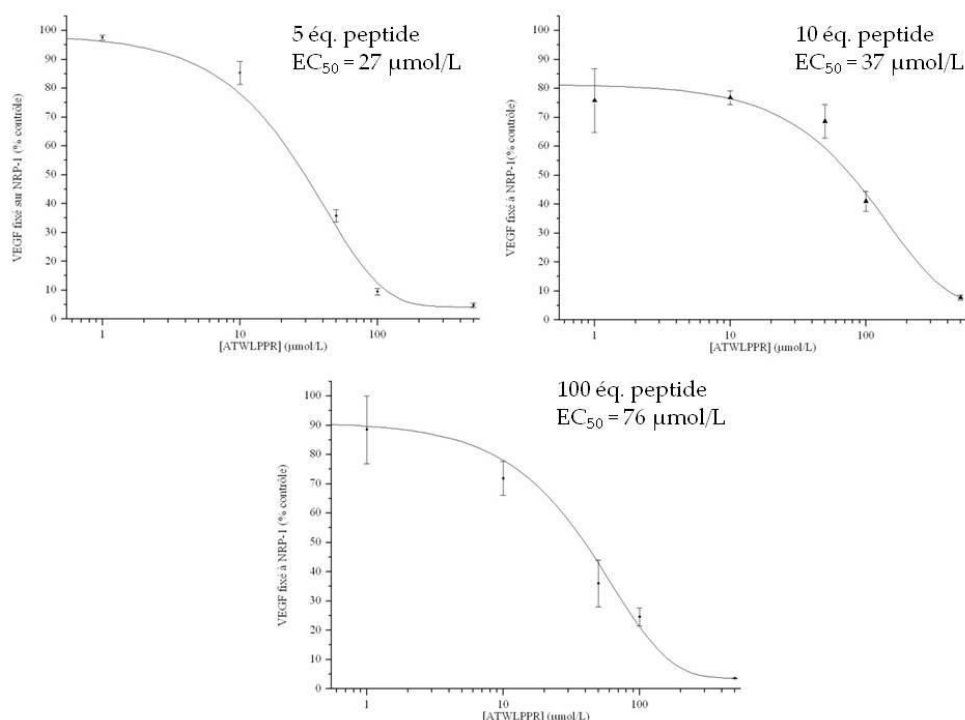


Figure 103 : Résultats des tests ELISA pour les trois échantillons synthétisés.

La meilleure affinité est pour les nanoparticules avec 5 équivalents de peptide par nanoparticule, avec une EC_{50} d'environ $27 \mu\text{mol/L}$. En se plaçant dans des conditions présentant 10 et 100 équivalents de peptide, l'affinité décroît avec le nombre de peptides. Ceci peut notamment s'expliquer par un encombrement stérique en surface des nanoparticules et ainsi limiter l'accès du peptide au récepteur NRP-1.

Cette étude nous confirme ce que nous supposions dans le chapitre II en comparant les résultats ELISA obtenus pour le conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR et les nanoparticules couplées à ~5 peptides, présentées au Chapitre II. Ici aussi, la meilleure affinité apparaît pour environ **5 peptides couplés à la nanoparticule** et nous pousse à croire à une **réelle coopération positive** de ce taux de peptide greffé en surface sur l'affinité moléculaire pour NRP-1.

I.4. Conclusions – Résumé des caractéristiques de la nanoparticule étudiée

Les différentes études photophysiques ont permis de définir plusieurs paramètres :

- ★ **Greffage du photosensibilisateur :**
 - **Limite supérieure du taux d'encapsulation de PS à ~ 0,1 PS/Gd.**
 - **Rendement d'encapsulation d'environ 30 % pour les quantités optimales (0,05 et 0,1 PS/Gd).**
- ★ **Présence de surfactants hydrophiles pour éviter les interactions interparticulaires.**
- ★ **Couplage de 5 unités peptidiques pour une bonne reproductibilité de synthèse et une affinité accrue pour NRP-1.**

A l'aide de ces études spectroscopiques et des études effectuées par l'équipe lyonnaise, nous avons défini les paramètres de la nanoparticule qui sera étudiée ci-après.

- ★ **« Petit cœur » d'oxyde de gadolinium (~1 nm de diamètre)**
- ★ **Couche de polysiloxane = 4 Si/Gd**
- ★ **Taux de greffage = 0,1 TPC/Gd**
- ★ **Surfactant = DTPA**
- ★ **Fonctionnalisation = 5 unités d'ATWLPPR par nanoparticule**

II. Etude de la nanoparticule Nano-Star

Nous détaillons dans les paragraphes suivants les synthèses effectuées pour cette étude, sans reprendre les synthèses exposées dans le chapitre précédent comme celle du peptide ATWLPPR protégé et de la TPC. En revanche, nous détaillerons les synthèses du peptide LWRPTPA qui diffèrent de celles d'ATWLPPR et nous exposerons le protocole de couplage adapté à ce type de nanoparticules.

II.1. Synthèse du peptide LWRPTPA protégé

La synthèse du peptide LWRPTPA sous forme protégée se fait sur support solide sur résine chlorotrityle et de façon automatique comme nous l'avons décrite pour le peptide ATWLPPR dans le chapitre II. Une seule différence par rapport à la synthèse préalablement décrite existe, car il nous a fallu greffer le premier acide aminé, l'alanine, sur la résine chlorotrityle nue.

II.1.1. Greffage du premier acide aminé

Le premier acide aminé à fixer sur la résine est l'alanine. Il s'agit de faire réagir la fonction acide de l'alanine sur la résine portant un chlore (Figure 104).

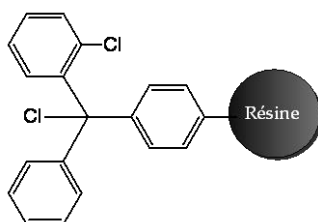


Figure 104 : Résine chlorotrityle portant un atome de chlore.

Le couplage se fait classiquement entre Fmoc-Ala-OH (1 éq.) en milieu basique (DIEA, 2,5 éq.) et la résine (1 éq. de sites actifs) dans un mélange DCM/DMF pendant 2 heures. Une étape de *capping*, qui consiste à bloquer tous les sites actifs de la résine,

est effectuée suivie de nombreux lavages successifs à la DMF, au DCM puis au MeOH. La résine est ensuite séchée sous vide. Le greffage de l'alanine peut être évalué, de façon qualitative, par le test colorimétrique à la ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) qui conduit à une coloration violette plus ou moins intense. Cette intensité de la couleur violette nous renseigne sur la présence de fonctions amines libres ce qui implique la présence de l'alanine.

II.1.2. Synthèse et caractérisation du peptide LWRPTPA

Une fois que nous nous sommes assurés que l'alanine est fixée sur la résine chlorotrityle, la synthèse du reste du peptide est réalisée sur un synthétiseur automatique, comme décrit précédemment. De même que pour ATWLPPR protégé, le peptide est décroché de la résine par mélange DCM/TFE/AcOH, 6/2/2 afin de garder les protections des chaînes latérales. Enfin, le peptide est purifié par HPLC et analysé par spectroscopie de masse couplée à une chromatographie liquide. La masse obtenue pour le pic majoritaire est de 1248,21 g/mol.

Le profil HPLC obtenu pour ce peptide (Cf. Partie expérimentale) est sensiblement le même que celui observé pour le peptide ATWLPPR protégé, ce qui nous confirme de la pertinence d'utiliser ce peptide comme témoin car ils possèdent des hydrophilies (ou polarités) analogues. LWRPTPA protégé sort pour un éluant comportant environ 65 % d'acétonitrile, en volume, et est obtenu à environ 99 % de pureté en prélevant le haut du pic.

II.2. Adaptation du protocole de couplage élaboré précédemment

Le protocole établi dans le Chapitre 2 portait sur des nanoparticules de taille supérieures (20 à 30 nm), recouvertes par des chaînes polyéthylène glycol. Le greffage

de peptides sur des nanoparticules de taille inférieure (2 à 3 nm), recouvertes de DTPA nous a amené à modifier notre protocole de couplage du peptide en surface.

Une différence majeure s'est tout de suite révélée puisque les Nano-Stars ne se redispersent pas dans la DMF. Il nous a donc fallu changer le protocole de couplage, notamment en se plaçant dans l'eau ou dans un mélange eau/solvant organique qui permet de disperser/solubiliser tous les constituants, tout en conservant la stratégie d'activation *in situ* des fonctions acides portées en surface des nanoparticules à l'aide d'agents d'activation et de couplage.

Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, noté EDC, est un agent de couplage connu pour être hydrosoluble. Le BtOH a été utilisé comme précédemment. Nous avons introduit ensuite une base de type triéthylamine ou DMAP pour favoriser le couplage entre l'acide (porté par les fonctions DTPA) et l'amine du peptide.

Les Nanos-Stars ont été préalablement dispersées dans des volumes d'eau de l'ordre de 1 à 2 mL dans lesquels nous avons ajouté l'EDC à raison de 5 à 6 éq. par rapport à la quantité de nanoparticules, du BtOH dilué dans un minimum de DMSO et 15 minutes plus tard, le peptide préalablement dilué dans le DMSO. Nous pouvons évaluer **qualitativement** les différentes étapes du couplage et de la purification en spectroscopie UV comme représenté dans la Figure 105.

Les détails expérimentaux de ce protocole de couplage sont présentés dans la partie expérimentale.

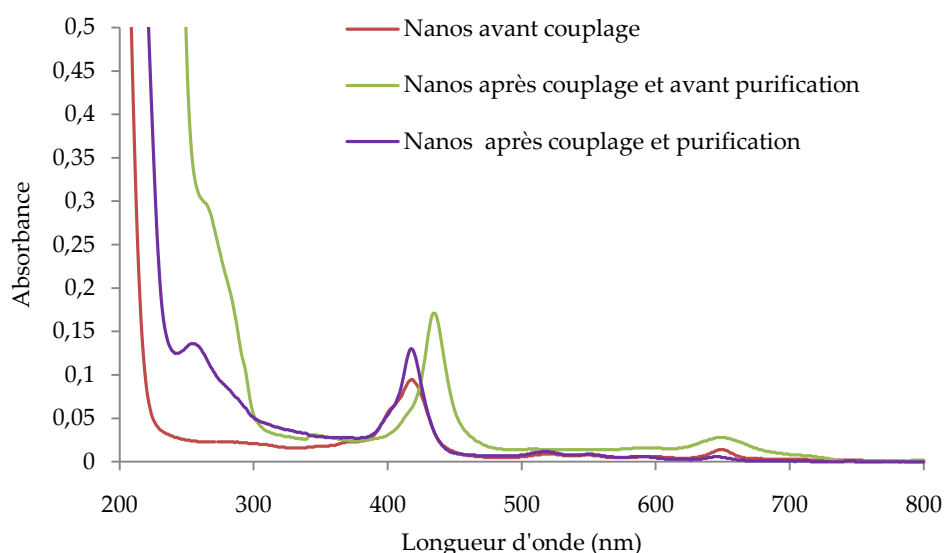


Figure 105 : Spectres UV-visible des Nano-Stars dans l'eau à trois étapes différentes du couplage : rouge : avant couplage ; vert : après couplage et avant purification ; violet : après couplage et purification.

Les trois spectres de la Figure 105 représentent les spectres UV-Visible des nanoparticules à différentes étapes du couplage. Les Nano-Stars avant couplage révèlent un spectre de TPC semblable à celui de la TPC obtenu en solution. Après couplage, en vert, un décalage de 8 nm du maximum d'absorption de la TPC peut être observé. Ceci peut s'expliquer par le pH acide de la solution résultant de la déprotection des chaînes latérales par le TFA. La forte absorption en dessous de 300 nm correspond à la présence du peptide et des agents de couplage. Enfin, après purification (dialyses et ultrafiltration), le retour à un pH neutre de la solution entraîne un recalage de la bande de Soret de la TPC encapsulée à 418 nm. L'élimination des agents de couplage qui absorbaient en dessous de 300 nm est visible, la bande d'absorption entre 250 et 300 nm persistante correspondant à l'absorption du tryptophane du peptide.

Nous avons procédé à l'étude photophysique des Nano-Stars avant et après couplage au peptide ATWLPPR. Les différents lots de nanoparticules sont notés comme suit :

- ★ **NP-TPC-DTPA** : Nano-Stars contenant de la TPC sans peptide, avec du DTPA comme surfactant.
- ★ **NP-TPC-DTPA-ATWLPPR** : Nano-Stars contenant de la TPC avec du DTPA comme surfactant fonctionnalisées par ATWLPPR.

II.3. Etude photophysique des Nano-Stars avant et après fonctionnalisation par le peptide ATWLPPR

II.3.1. Spectroscopie UV-visible

La Figure 106 présente les spectres UV-visible dans l'éthanol de la TPC libre, de NP-TPC-DTPA et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR.

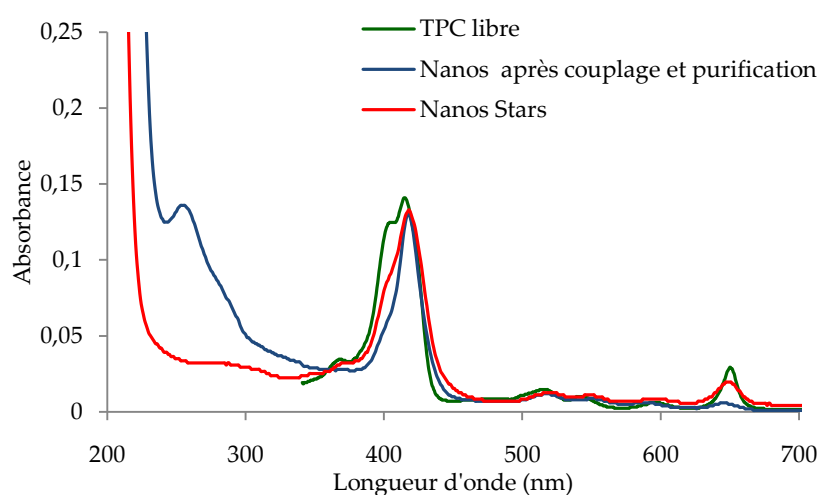


Figure 106 : Spectres UV-visible de la TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (bleu) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (rouge) dans l'éthanol.

Comme le montre la Figure 106 et en accord avec les expériences réalisées sur les nanoparticules de tailles plus importantes (Chapitre 2), le spectre de la TPC encapsulée de façon covalente dans les Nano-Stars diffère peu de celui de la TPC libre. De plus, la bande d'absorption observée entre 250 et 300 nm prouve la présence de peptide pour l'échantillon NP-TPC-DTPA-ATWLPPR.

II.3.2. Spectroscopie d'émission de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence sont normalisés par la valeur de l'absorbance de chaque échantillon (de l'ordre de 0,2) à la longueur d'excitation.

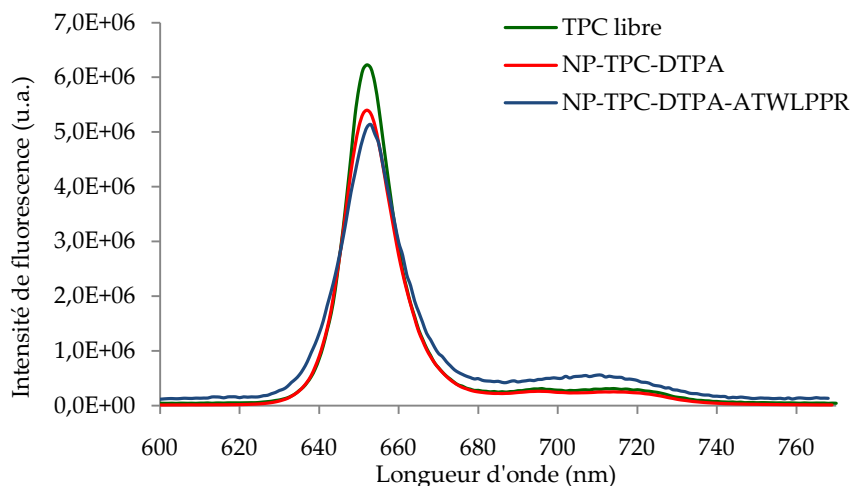


Figure 107 : Spectres d'émission de fluorescence de TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (rouge) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (bleu) (EtOH, $\lambda_{exc.} = 420$ nm).

Les spectres d'émission de fluorescence présentés dans la Figure 107 ne montrent pas de différence entre la TPC encapsulée dans les Nano-Stars avec et sans peptide et la TPC libre dans l'éthanol. Les rendements quantiques de fluorescence, analogues à celui de la TPC libre dans l'éthanol, sont de $0,19 \pm 0,02$ pour NP-TPC-DTPA et de $0,18 \pm 0,02$ pour NP-TPC-DTPA-ATWLPPR.

II.3.3. Production d'oxygène singulet

Les spectres d'émission de l'oxygène singulet sont normalisés par la valeur de l'absorbance de chaque échantillon (de l'ordre de 0,2) à la longueur d'excitation. La Figure 108 présente les spectres d'émission d'oxygène singulet produit par la TPC couplée aux Nano-Stars avec et sans peptide et par la TPC libre dans l'éthanol.

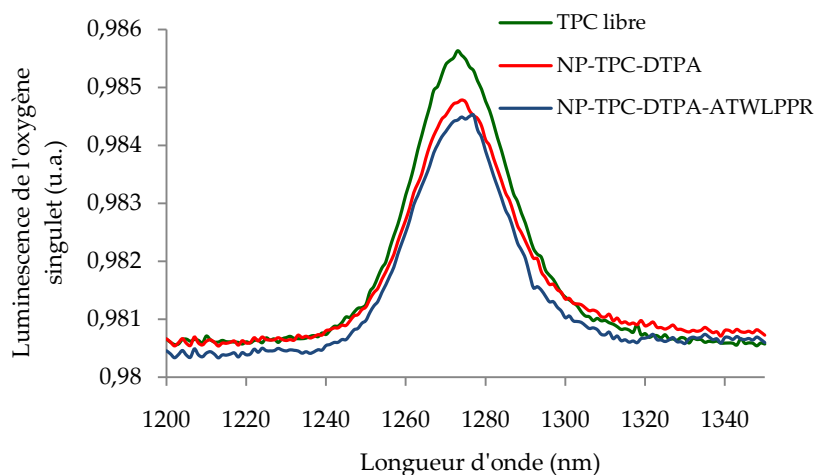


Figure 108 : Spectres d'émission de l'oxygène singulet produit par la TPC libre (vert), NP-TPC-DTPA (rouge) et NP-TPC-DTPA-ATWLPPR (bleu) (EtOH, $\lambda_{\text{exc.}} = 420 \text{ nm}$).

Les spectres illustrent la formation d'oxygène singulet pour les lots mesurés. Les rendements quantiques de production d'oxygène singulet, analogues à celui mesuré pour TPC dans l'éthanol, qui est de $0,69 \pm 0,05$, sont de $0,66 \pm 0,05$ pour les Nano-Stars avec et sans peptide.

Afin de vérifier que l'oxygène singulet produit diffuse à travers la couche de polysiloxane, nous avons utilisé une sonde chimique spécifique de l'oxygène singulet, SOSG.

La Figure 109 montre l'évolution de l'intensité de fluorescence du *Singlet Oxygen Sensor Green* après excitation de la Nano-Star sans peptide à 420 nm.

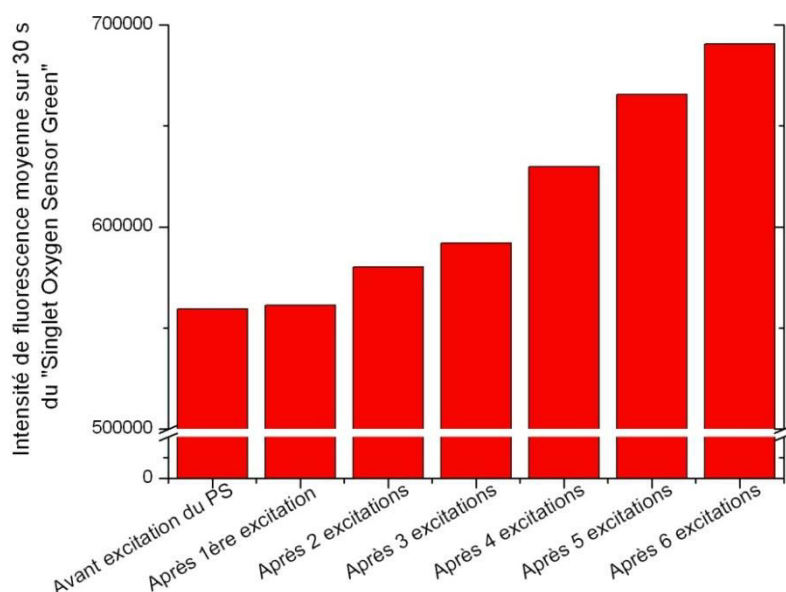


Figure 109 : Mesures de fluorescence du produit de dégradation de SOSG par action de l'oxygène singulet formé par photosensibilisation de NP-TPC-DTPA excitée à 420 nm (MeOH, $\lambda_{\text{exc.}} = 504 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 524 \text{ nm}$).

Nous pouvons constater une augmentation de la fluorescence résultant d'une réaction entre oxygène singulet et SOSG. Cela tend à montrer, en supposant que la sonde chimique (dont la formule nous est inconnue) ne peut diffuser à l'intérieur de la couche de polysiloxane, que l'oxygène singulet produit est bien capable de diffuser à l'extérieur des nanoparticules et est donc de l'oxygène singulet « efficace ».

II.3.4. Fluorescence du tryptophane et estimation du taux de peptide greffé

Après couplage du peptide et purification, la fluorescence du tryptophane du peptide nous a permis d'estimer la quantité de peptides greffés par nanoparticule en utilisant une courbe d'étalonnage d'ATWLPPR dans l'eau.

Le spectre de fluorescence du tryptophane pour le composé NP-TPC-DTPA-ATWLPPR est présenté dans la Figure 110.

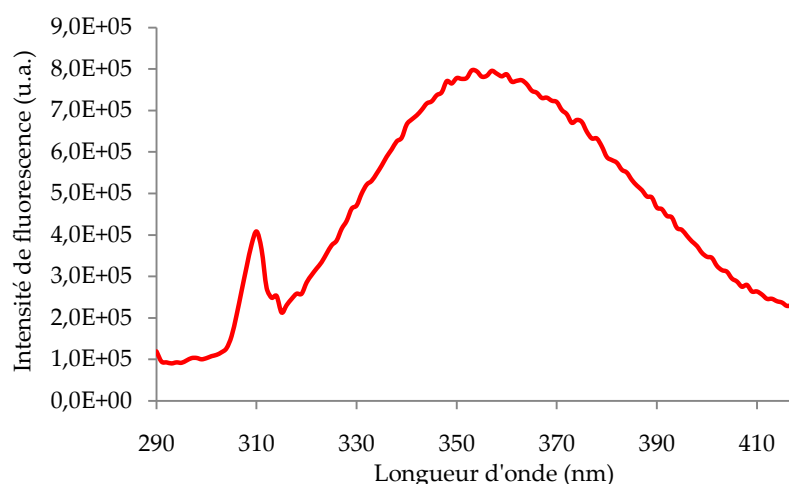


Figure 110 : Spectre de fluorescence du tryptophane du peptide greffé sur NP-TPC-DTPA-ATWLPPR
(H_2O , $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$).

Nous obtenons un taux de couplage de l'ordre de 4 ± 1 peptides par nanoparticule en introduisant 6 équivalents de peptide et 7,2 équivalents d'agents de couplage pour 1 équivalent de nanoparticule.

III. Caractérisation physico-chimique des Nano-Stars

Les techniques qui nous apparaissaient les plus intéressantes à utiliser étant celles relatives à la mesure de taille des objets étudiés et les mesures concernant la caractérisation de surface, à savoir le potentiel Zêta.

III.1. Mesures de taille par diffraction dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de DLS n'ont pu être effectuées sur les nanoparticules renfermant la TPC car la longueur d'onde du laser incident de l'appareil est fixée à 633 nm et l'absorption de la TPC perturbait fortement les mesures. L'impossibilité de pouvoir mesurer le rayon hydrodynamique a pu être contournée en synthétisant des

nanoparticules ne comportant pas de PS. Ces essais donnent les résultats présentés dans la Figure 111 avec un rayon hydrodynamique moyen de $2,70 \pm 0,69$ nm.

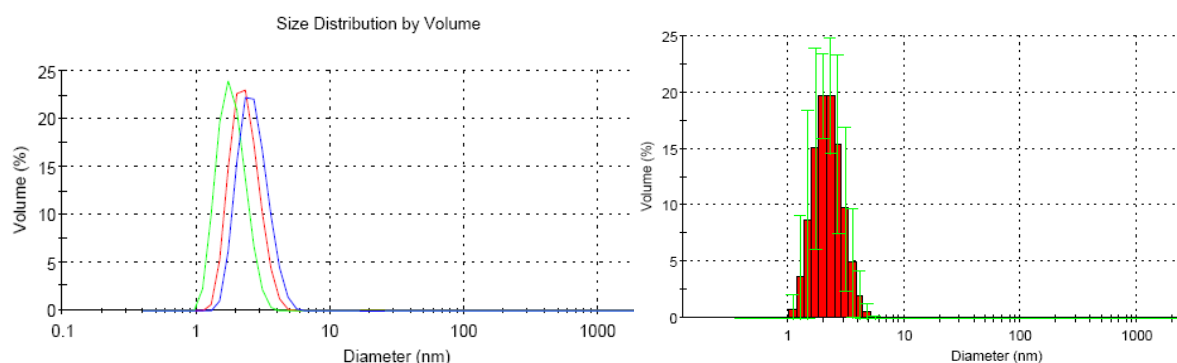


Figure 111 : Gauche : trois mesures d'une solution de nanoparticules par DLS ; droite : données statistiques de ces trois mesures.

III.2. Mesures de potentiel Zêta, ζ

Les mesures de potentiel Zêta ont été effectuées au LCPM à Nancy avec l'aide du Dr Emmanuelle Marie et avec la collaboration de Norman Wozniak, stagiaire de l'ENSCR.

Les résultats des mesures de potentiel zêta dans l'eau à différentes concentrations de NaCl sont présentés dans la Figure 112.

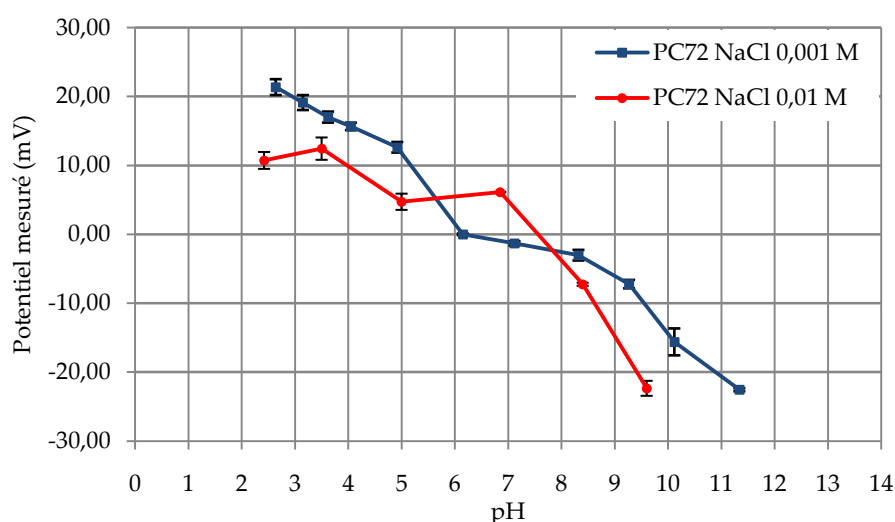


Figure 112 : Mesures de potentiel Zêta en fonction du pH de la solution pour deux concentrations en NaCl différentes (PC72 : NP-TPC-DTPA).

Ces mesures de potentiels Zêta montrent un comportement quasiment identique pour les deux concentrations salines testées. Le point isoélectrique se situe dans les deux cas autour de $\text{pH } 6,5 \pm 0,5$. De plus, le faible impact de la concentration saline pour les deux échantillons mesurés montre que l'adsorption ionique est uniquement de nature électrostatique^{283, 284}.

Une surface neutre ou chargée négativement va induire une furtivité certaine à la nanoparticule vis-à-vis des protéines ou de l'opsonisation²⁴⁵⁻²⁴⁷ et favoriser l'incorporation cellulaire²⁸⁵. Il a notamment été prouvé que la fonctionnalisation de surface par un surfactant hydrophile chargé négativement, comme la famille des PEG, permettait d'augmenter la durée de la circulation sanguine en diminuant la captation hépatique^{252, 254}. De plus, une charge négative de surface en milieu biologique permet de s'affranchir d'une reconnaissance phagocytaire importante²⁴⁰.

Nous avons également étudié l'influence de la durée des dialyses et l'évaporation de l'eau après dialyses sur le potentiel zêta, comme le montre la Figure 113.

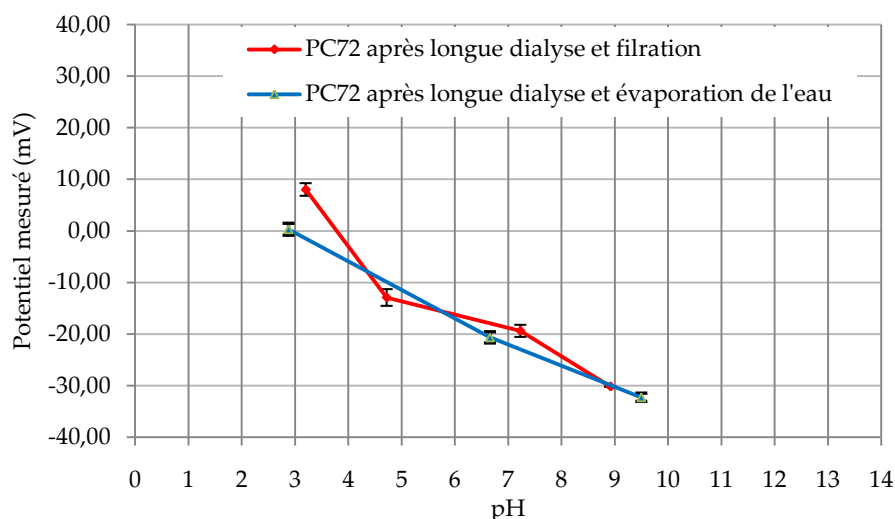


Figure 113 : Mesures de potentiel Zêta dans différentes conditions d'expériences (PC72 : NP-TPC-DTPA).

Les dialyses supérieures à 24 h entraînent des modifications de potentiel zêta importantes, même après une filtration de l'échantillon à 0,2 μm pour éliminer les agrégats. Les temps de dialyse ont ainsi été diminués à 2 ou 3 heures pour éviter toute dégradation de surface des nanoparticules.

En effet, les dialyses ont l'inconvénient de s'effectuer avec des volumes d'eau très importants. Cette quantité élevée d'eau permet d'éliminer un maximum d'espèces chimiques car il s'opère un équilibre, entre les compartiments séparés par la membrane de dialyses, pour les espèces capables de traverser cette membrane. Or, un grand volume de dispersion va faire tendre l'équilibre de stabilisation de la solution colloïdale vers la dissolution des nanoparticules. Ce phénomène peut notamment être marqué par une modification de l'état de surface des nanoparticules comme le montre la Figure 113. Au vu des différents essais effectués par nous-mêmes et par l'équipe lyonnaise, la concentration en Gd de 500 mM semble constituer une limite inférieure à ne pas dépasser pour conserver les caractéristiques de surface et de taille de ces nanoparticules.

IV. Validation biologique *in vitro* & *in vivo*

Les principaux tests biologiques réalisés concernent la cytotoxicité à l'obscurité ainsi que la phototoxicité des nanoparticules synthétisées avec et sans peptide. Les tests *in vitro* ont été effectués sur la lignée MDA-MB-231. L'affinité moléculaire pour la protéine chimérique recombinante NRP-1 (R&D System) a été réalisée sur les Nano-Stars sans peptide, les Nano-Stars fonctionnalisées par ATWLPPR ou LWRPTPA. Le détail des « matériels et méthodes » employés pour mettre en œuvre tous les tests biologiques sont les mêmes que ceux présentés au Chapitre II et sont décrits dans la publication de Couleaud *et al.* 2011²⁵⁷.

IV.1. Cytotoxicité des Nano-Stars

Les essais *in vitro* réalisés sur les nanoparticules décrites dans le chapitre précédent et dans la publication attenante ont montré qu'une concentration de 10 μM en TPC était la limite supérieure à ne pas dépasser pour s'affranchir de toute toxicité *in vitro* à l'obscurité à court terme. Nous devons également tenir compte d'une intensité du signal IRM suffisante et nécessaire, de fait, le rapport de concentration entre la TPC et le Gd_2O_3 a conditionné notre choix.

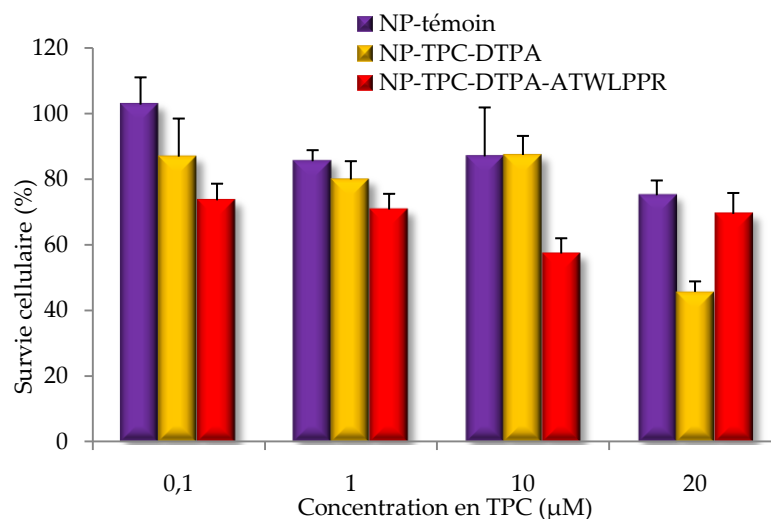


Figure 114 : Cytotoxicité à l'obscurité sur la lignée MDA-MB-231 évaluée par MTT pour différentes concentrations en TPC pour les Nano-Stars témoin (sans TPC), les Nano-Stars sans peptide et les Nano-Stars avec peptide. (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=6)

D'après la Figure 114, l'étude de la cytotoxicité à l'obscurité montre que les nanoparticules sans TPC ne présentent aucune toxicité jusqu'à 10 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent TPC, tout comme les NP-TPC-DTPA.

IV.2. Photocytotoxicité

Les tests ont été effectués sur la même lignée MDA-MB-231 surexprimant NRP-1 pour les concentrations de 10, 1 et 0,1 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent TPC et pour cinq valeurs de fluence : 0, 1, 5, 10 et 20 J/cm^2 avec une irradianance de 4,54 mW/cm^2 ($\lambda_{\text{exc.}} = 652 \text{ nm}$). Le temps de mise en contact entre les cellules et les lots est de 24 heures (Figure 115).

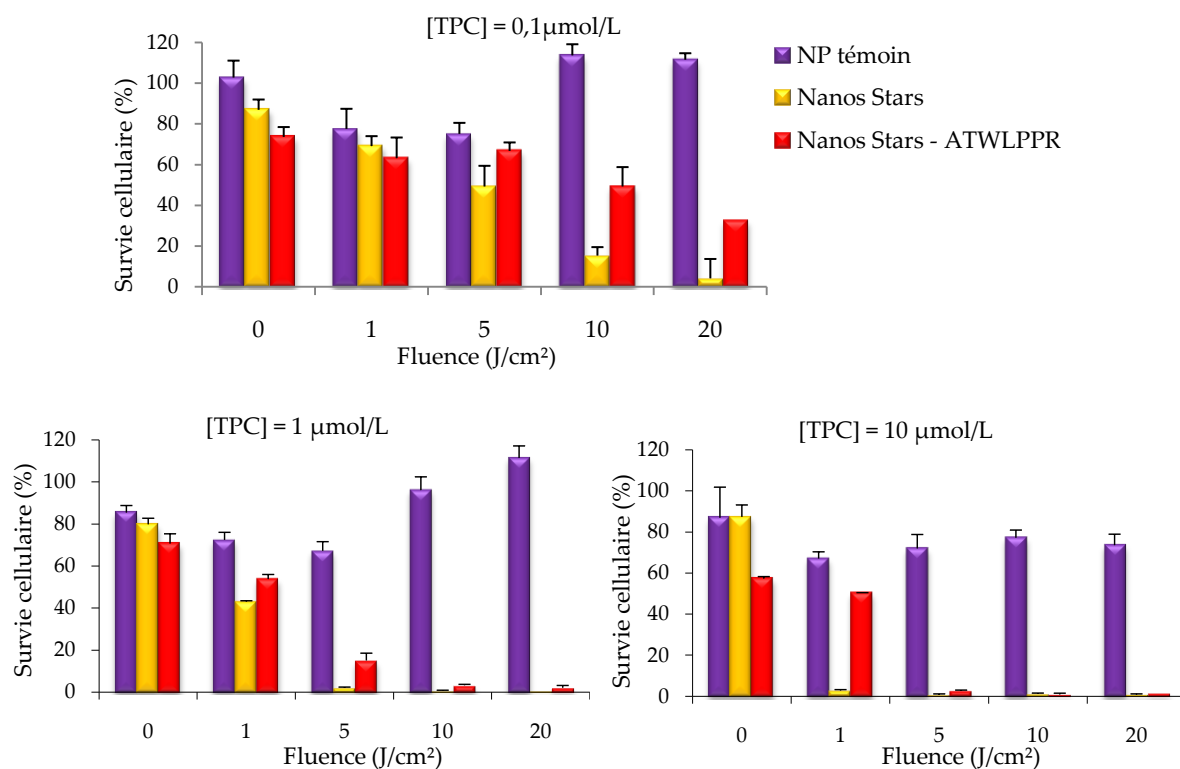


Figure 115 : Photocytotoxicité évaluée par MTT sur la lignée MDA-MB-231 pour différentes concentrations en TPC et en fonction de la fluence appliquée (laser à colorant 652 nm) à partir du même lot (PC146). (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=6)

Ces histogrammes (Figure 115) montrent que les nanoparticules ne comportant ni TPC, ni peptide ne présentent aucune photocytotoxicité aux concentrations étudiées (0,1, 1 et 10 µmol/L), quelle que soit la fluence de l'irradiation (1, 5, 10 ou 20 J/cm²). Ces résultats illustrent également que, pour une concentration faible soit 0,1 µmol/L en TPC, aucune différence significative de phototoxicité n'apparaît entre les nanoparticules avec et sans peptide pour les fluences inférieures à 10 J/cm². Pour une concentration en TPC de 1 µmol/L, la DL_{50} est d'environ 1 J/cm², qui est meilleure que celle observée pour les nanoparticules étudiées dans le Chapitre 2.

La présence du peptide sur les nano-plates formes n'influence pas l'incorporation de nanoparticules. Ceci semble cohérent avec le fait que les nano-objets testés sont rapidement incorporés et que nous n'avons pas de témoin négatif

présentant un faible niveau d'expression de NRP-1 pour mettre en exergue la part résultant de l'incorporation spécifique récepteur-dépendant. De plus, en augmentant la concentration en TPC, et donc en nanoparticules, on favorise l'incorporation non spécifique. Des conclusions similaires ont été obtenues avec les nanoparticules de $^{47}\text{Si}/\text{Gd}$ (Couleaud *et al.*, 2011)²⁵⁷. La présence de peptide ne semble donc pas influencer la concentration de nanoparticules incorporée par les cellules MDA-MB-231 surexprimant NRP-1. Pour conclure sur l'impact de cette fonctionnalisation sur la sélectivité *in vitro*, entre autres, des expérimentations par compétition en excès de peptide sont en cours.

IV.3. Affinité moléculaire pour neuropiline-1

La Figure 116 présente les deux courbes de *binding* correspondant aux essais par compétition en présence du VEGF₁₆₅ biotinylé et des Nano-Stars fonctionnalisées par ATWLPPR (ligand de NRP-1) ou par LWRPTPA (témoin négatif).

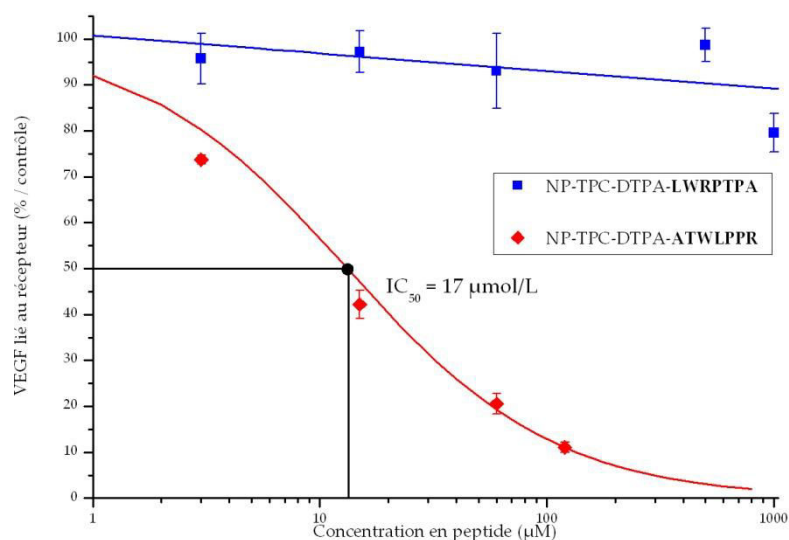


Figure 116 : Courbes de *binding* des NP-TPC-DTPA-ATWLPPR(en rouge) et NP-TPC-DTPA-LWRPTPA (en bleu). (Barres d'erreur correspondant à $\pm$ l'écart-type, n=3)

Le test de *binding* démontre que les nanoparticules portant le peptide (NP-TPC-DTPA-ATWLPPR) déplacent efficacement la fixation du VEGF₁₆₅, ce qui n'est pas le cas pour les Nano-Stars fonctionnalisées par le peptide témoin LWRPTPA. L'IC₅₀, concentration en peptide pour laquelle 50 % du VEGF est déplacé, est d'environ 17 µmol/L. Comme pour le type de nanoparticules décrit au chapitre II, l'affinité moléculaire est améliorée par comparaison au conjugué chlorure-peptide (environ 170 µM), ce qui nous confirme la pertinence de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules par environ 4 peptides par nanoparticule.

IV.4. Premiers essais d'IRM *in vivo*

L'optimisation puis la mise en place du protocole d'étude IRM céphalique *in vivo* sur rats xénogreffés ont été effectuées avec les Nano-Stars. A titre d'illustration et comme ouverture du sujet, nous présentons ici les premiers clichés IRM obtenus (Brevet en cours de dépôt). L'étude, dont proviennent ces clichés, a été réalisée à Lille (INSERM U703 – S. Mordon) sur des rats xénogreffés en orthotopique par un modèle U87 (tumeur astrocytaire de haut-grade). Les nanoparticules se localisent préférentiellement au niveau du tissu tumoral quelques minutes après l'injection intraveineuse. Les essais *in vivo* réalisés en 2010, nous ont permis de valider la faisabilité du concept qui consiste à réaliser la thérapie photodynamique en interstitielle guidée par l'IRM. En effet, après administration des nanoparticules multifonctionnelles, nous visualisons nettement le rehaussement du signal au niveau de la zone tumorale (Figure 117), ce qui permet d'optimiser l'implantation de la fibre optique (moins de 300 µm de diamètre) qui amorce la réaction photodynamique au sein de la lésion à traiter.

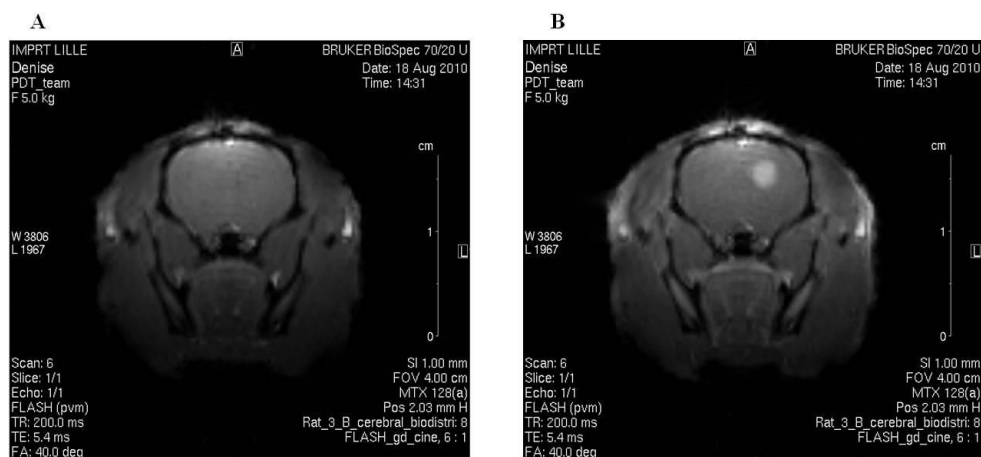


Figure 117 : IRM en T1 au niveau de la zone tumorale : (A) avant injection des Nano-Stars, (B) quelques minutes après l'injection intraveineuse de Nano-Stars multifonctionnelles, pour des rats xénogreffés en orthotopique par des cellules de glioblastome multiforme humain. Images coll. CRAN & U703.

Ces résultats de sélectivité *in vivo* très encourageants nous ont poussés à étudier l'impact des différents éléments constitutifs de la nanoparticule sur les différents facteurs d'étude déjà énumérés plus haut (efficacité photodynamique, sélectivité et rehaussement du signal IRM). La méthodologie par plan d'expériences permettra notamment de cribler un nombre important de lots de nanoparticules en ne testant qu'une partie seulement, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant (travail qui sera réalisé dans le cadre du travail de thèse d'Aymeric Seve (LRGP et LCPM) et du post-doctorat de Hamanou Benachour (CRAN)).

V. Méthodologie de plan d'expériences, définition, intérêt

Comme perspective directe de ce travail, il apparaît qu'une optimisation, non plus au niveau de la synthèse des différentes étapes de l'élaboration des nanoparticules, mais au niveau des résultats biologiques soit une prochaine étape dans le développement des nanoparticules multifonctionnelles.

En effet, la preuve de la faisabilité d'obtenir des nanoparticules multifonctionnelles a été le moteur de ce présent travail, il convient désormais de trouver les meilleures combinaisons dans les paramètres constitutifs des nanoparticules (taille du cœur d'oxyde de gadolinium, épaisseur de la couche de silice, taux de greffage de TPC et de peptide) afin de lui conférer les meilleures propriétés à la fois en terme de thérapie par PDT, de diagnostic par IRM et de ciblage par le peptide ATWLPPR.

Un tel projet ne peut se faire, au vu des nombreux paramètres à modifier et des **trois grandes fonctionnalités à tester**, que par une méthodologie par plans d'expériences. Nous détaillons cette perspective car ce plan d'expériences a débuté et j'ai participé à l'élaboration de certains échantillons.

V.1. Définition

La dénomination de *plans d'expériences* regroupe généralement des méthodes et outils statistiques de modélisation expérimentale. Ces techniques reposent sur la production et la collecte de données quantitatives utilisées ensuite pour élaborer des modèles mathématiques du type :

$$\begin{cases} Y = Z + E \\ Z = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \end{cases}$$

où Y est la variable à expliquer (ou *réponse*) et (X_1 , X_2) sont les variables explicatives (ou *facteurs*) que l'expérimentateur peut arbitrairement modifier pendant les expériences. E est une variable aléatoire suivant généralement une loi normale centrée qui est utilisée pour décrire, d'une part la partie inexpliquée et d'autre part, la variabilité de la réponse. Z désigne la réponse théorique prédite par le modèle dont les termes b_i sont les coefficients.

Ce type de modèle peut être utilisé pour répondre principalement à trois genres de problématique :

- ★ le criblage qui consiste à isoler, parmi un grand nombre de facteurs étudiés, ceux qui sont probablement les plus influents,
- ★ l'analyse des effets qui consiste à mesurer et à comparer l'influence non seulement des facteurs eux-mêmes mais également de leurs interactions (X_1, X_2) afin d'identifier des effets synergiques potentiels entre facteurs,
- ★ l'optimisation, dont l'objectif est, soit de minimiser, soit de maximiser la réponse Y .

Pour résoudre les deux premiers points, ce sont les coefficients b_i du modèle qui vont nous fournir les réponses. Leur valeur est un estimateur de l'influence du facteur associé ou de l'interaction (X_1, X_2) considérée. Pour le dernier point, on utilise la réponse prédite par le modèle Z pour chercher les valeurs des facteurs conduisant à sa minimisation ou sa maximisation. Dans tous les cas, il faut connaître les termes b_i , or ce sont les inconnues du problème de modélisation. Pour les déterminer, il est nécessaire de procéder à des expériences.

Le principe des plans d'expériences est illustré dans la Figure 118. Il consiste à chercher quelles sont les expériences à réaliser pour obtenir une précision acceptable sur les coefficients ou sur la réponse prédite. Ce type d'approche expérimentale permet donc souvent de réduire sensiblement les coûts expérimentaux tout en proposant une démarche rationnelle de l'étude. Pour plus de renseignements sur ces méthodes, on peut se référer aux ouvrages cités en référence²⁸⁶⁻²⁹⁰.

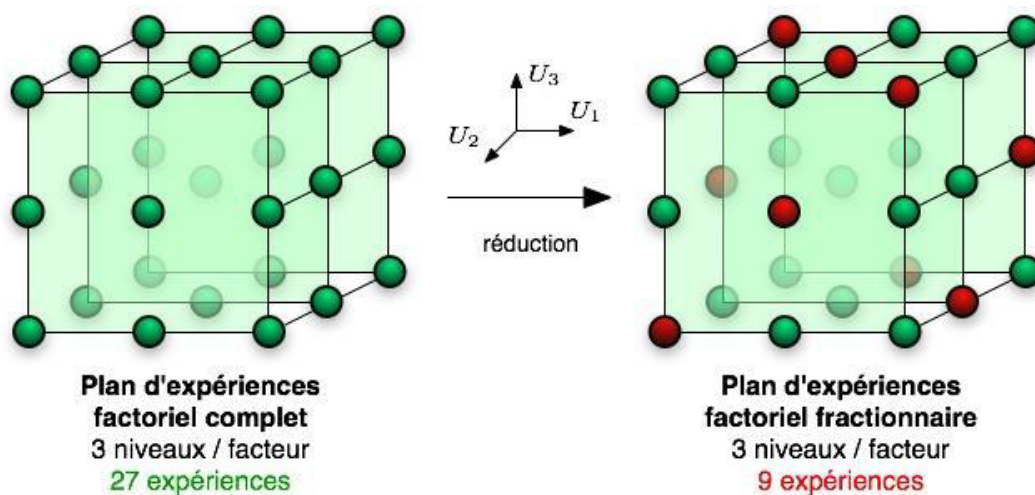


Figure 118 : Plans d'expériences factoriels complets et fractionnaires.

En résumé, la méthodologie des plans d'expériences permet de diminuer de façon drastique le nombre d'expériences à effectuer en choisissant de façon adéquate les combinaisons de paramètres à tester expérimentalement et celles qui pourront en être déduites. L'application d'un modèle théorique sur des paramètres expérimentaux implique des limites dans l'interprétation des résultats. En effet, la méthodologie de plans d'expériences permet de faire ressortir une tendance dans les différents paramètres et leur valeur, numérique ou non, plutôt qu'une combinaison exacte de ces paramètres.

V.2. Application à notre étude

Les paramètres influents qui vont entrer dans le plan d'expériences sont les mêmes que ceux discutés en introduction de ce chapitre et qui ont été représentés schématiquement dans la Figure 91.

En résumé, le plan d'expériences prend en compte 5 paramètres différents pouvant prendre plusieurs valeurs (numériques ou non numériques, Tableau 12). Ce plan d'expériences ne prend pas en compte la toxicité des nanoparticules, hormis la cytotoxicité à l'obscurité pour une durée d'incubation de 24 h. De plus, la toxicité

sera prise en compte lors des injections *in vivo* pour les essais d'IRM. La toxicité devra cependant faire l'objet d'une étude poussée.

Sans plan d'expériences, le nombre total de lots de nanoparticules à synthétiser et à tester serait de 144. La stratégie de plan d'expérience permet d'abaisser ce nombre de lots à 13, dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des 13 lots de nanoparticules. GC : gros cœur de Gd_2O_3 , PC : petit cœur de Gd_2O_3 , DTPA : diéthylène triamine penta acide, DOTA : 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide, L5 et L10 : 5 et 10 peptides Ligands (ATWLPPR) par nanoparticule, S5 : 5 peptides Scrambled (LWRPTPA) par nanoparticule.

Numéro de lot	Taille du cœur de Gd_2O_3	Type de surfactant hydrophile	Taille de la couche de polysiloxane (Si/Gd)	Taux de TPC encapsulé (TPC/Gd)	Type et nombre de peptide greffé
1	GC	DTPA	1	0.1	L10
2	GC	DOTA	2	0.01	L10
3	PC	DTPA	4	0	L10
4	PC	DTPA	4	0.1	L5
5	PC	DOTA	2	0.1	L5
6	GC	DTPA	4	0,01	L5
7	PC	DOTA	1	0	L5
8	PC	DOTA	4	0,1	S5
9	GC	DOTA	1	0.01	S5
10	GC	DTPA	2	0	S5
11	GC	DOTA	4	0,1	0
12	PC	DTPA	2	0.01	0
13	PC	DOTA	4	0	0

Pour valider le choix des différents paramètres supposés influents, nous avons défini les méthodes de mesure suivantes :

- ★ **Sélectivité** : Etude d'affinité moléculaire pour la protéine recombinante NRP-1 par test ELISA
- ★ **Efficacité photodynamique** : Etudes de la cytotoxicité à l'obscurité et de l'efficacité photodynamique *in vitro*
- ★ **Rehaussement du signal IRM** : Test *in vivo* en IRM du petit animal sur rat xénogreffés en orthotopique par un modèle de tumeur astrocytaire de haut-grade (U87). Préalablement des tests d'innocuité par injection intraveineuse sur rat sont effectués.

CONCLUSIONS

Cette seconde étude de nanoparticules a conduit à des résultats très encourageants. Nous avons pu montrer qu'il existe une reproductibilité dans le greffage des peptides ATWLPPR et LWRPTPA en surface de ces nanoparticules sur le surfactant DTPA pour une concentration de 5 ± 1 peptides par nanoparticule. Une étude photophysique sur des nanoparticules ayant des concentrations en PS différentes nous a permis d'estimer le nombre de molécules de TPC effectivement greffées dans la couche de polysiloxane de l'ordre de 30 %. De plus, nous avons montré que le couplage covalent de la TPC ne modifie pas ses propriétés photophysiques, en particulier la production d'oxygène singulet dont nous avons montré la véracité de manière directe (par sa luminescence) et de manière indirecte en utilisant une sonde chimique. L'étude du potentiel Zêta nous ont permis d'améliorer les différentes étapes de synthèse, notamment, définir les conditions optimales de purification après greffage du peptide. Les études de diffraction dynamique de la lumière nous ont permis de montrer les tailles de ces nanoparticules aux alentours de 3 nm après greffage du peptide.

Enfin, les premiers résultats biologiques illustrent l'intérêt de telles nanoplateformes multifonctionnelles. En effet, la composition définie de la nanoparticule testée ici permet d'obtenir une phototoxicité intéressante avec un DL_{50} de l'ordre de 1 J/cm^2 pour une concentration en TPC de $1 \text{ } \mu\text{mol/L}$. De plus, l'affinité moléculaire pour NRP-1 mesurée est très encourageante car l' IC_{50} mesurée est de $17 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

Enfin, un rehaussement du signal IRM *in vivo* a été observé avec une intensité suffisante pour l'implantation en stéréotaxie de la fibre d'irradiation qui délivre la lumière, pour les essais futurs de PDT guidée par IRM.

Chapitre IV :
Oxygène singulet,
production, mesures et
contrôles

Chapitre IV : Oxygène singulet, production, mesures et contrôles

I. L'oxygène singulet : historique, production, inhibition

L'oxygène singulet tient une place importante dans la thérapie photodynamique de par les réactions chimiques qu'il engendre auprès des tissus biologiques, de l'ADN ou des protéines²⁹¹. L'oxygène singulet a une réactivité très forte et un temps de vie assez court pour ne réagir que dans la cellule hôte. Il a fait et fait encore l'objet de nombreuses recherches, concernant ses mécanismes de formation, son temps de vie dans différents milieux, ses modes d'action en milieu biologique et la mesure de sa production, depuis sa découverte. Comme nous l'avons rappelé dans le Chapitre 1, il est important d'avoir à l'esprit que ce n'est pas la seule espèce photoactive lors du traitement PDT. En effet, d'autres espèces réactives de l'oxygène (EROs) peuvent être formées après excitation électronique du photosensibilisateur. Toutefois, compte tenu de l'importance de l'oxygène singulet dans la PDT, nous avons choisi d'écrire ce Chapitre 4 pour traiter de l'oxygène singulet, qui est l'espèce réactive majoritairement produite pour les PS décrits précédemment. Les mécanismes photophysiques aboutissant à la production de l'oxygène singulet seront détaillés. Nous parlerons alors de mécanisme de photosensibilisation plutôt que de thérapie photodynamique.

Les différents moyens de mesurer la production d'oxygène singulet seront exposés et les intérêts et les limites de chaque méthode de détection seront discutés.

Enfin, seront développés les moyens de contrôler cette production, i.e. les phénomènes de *quenching* qui ouvrent un champ intéressant en termes de stratégie d'adressage avec le développement des *PDT Molecular Beacons* (PMB).

I.1. Découverte et histoire

La connaissance des conséquences, bénéfiques ou non, de la combinaison de la lumière et d'une molécule sur le vivant remonte à plusieurs milliers d'années. Cependant, il faudra attendre la fin du XIX^{ème} et le début du XX^{ème} siècle pour voir émerger des hypothèses et des expériences scientifiques pour prouver l'existence de l'oxygène singulet et montrer les mécanismes de sa formation.

Le phénomène de photosensibilisation a été mis en évidence par les travaux de Raab en 1898 en montrant notamment le caractère toxique et donc réactif des espèces formées par la combinaison lumière-colorant⁶⁶.

Outre ces deux paramètres indispensables au phénomène phototoxique, que sont la lumière et la présence d'un colorant, Von Tappeiner et Jesionek mettent en évidence en 1904 l'importance de la présence d'oxygène⁶⁷⁻⁶⁹. Le mécanisme de photosensibilisation fait donc intervenir un 3^{ème} paramètre qui est l'oxygène ; le terme d'**action photodynamique** fait donc son apparition.

Suite à ces découvertes, de nombreuses études de chimistes, de physiciens et de médecins pour appliquer ce phénomène phototoxique ont conduit aux travaux pour la compréhension de la thérapie photodynamique.

En parallèle, de nombreux travaux de physique ont porté sur la mise en évidence de l'oxygène singulet, de la preuve des mécanismes photophysiques mis en jeu, ainsi que de l'étude de son comportement dans différents milieux. Les astrophysiciens se sont aussi intéressés à cette forme de l'oxygène qui est présent à la surface du soleil et qui donne notamment la couleur rouge aux aurores boréales. Les travaux de l'astrophysicien, et prix Nobel de chimie en 1971, Herzberg ont, en effet,

montré en 1934 la présence d'une émission à 12 900 Å dans le spectre solaire infrarouge²⁹².

Les travaux du français Mallet avaient montré en 1924 que la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'anion OCl^- provoquait une « très légère luminescence rouge foncée »²⁹³.

Les premiers travaux qui font état d'une espèce réactive de l'oxygène produit en présence de lumière sont ceux de Kautsky en 1931. A cette date, le phénomène de fluorescence est alors bien connu et il montre que la fluorescence de la tryptaflavine diminue lorsqu'on l'irradie en présence de dioxygène. Il en conclut que la formation d'une espèce oxydante est une voie alternative de désexcitation de la tryptaflavine. Il montre aussi que cette espèce oxydante peut être mise en évidence par sa réaction avec la malachite *green* qui devient à son tour fluorescente sous sa forme oxydée. Un transfert d'énergie s'effectue donc entre le PS excité et l'oxygène moléculaire²⁹⁴.

La structure électronique de l'oxygène a, quant à elle, été largement étudiée par Mulliken. Il montre en 1928, puis plus précisément en 1932, qu'il existe deux états métastables d'oxygène singulet d'énergie plus haute que l'oxygène triplet^{295, 296}.

Entre 1963 et 1966, des études de chimiluminescence, sur l'expérience de Mallet, par Khan et Kasha montrèrent des similitudes spectroscopiques entre ce qu'ils observaient et l'oxygène singulet observé en haute atmosphère^{297, 298}. Ils établirent ensuite que l'oxygène singulet intervenait dans de nombreuses réactions chimiques et qu'il possédait un caractère « fugace » dans les milieux aqueux ; ils écrivirent : « *La chimiluminescence qui survient au cours de réactions d'oxydation de molécules organiques est associée à l'excitation d'états métastables de l'oxygène moléculaire, en systèmes peroxydés* »²⁹⁹.

Ensuite Foote *et al.* étudient les interactions entre l'oxygène singulet et les milieux biologiques et mettent notamment en évidence que le β -carotène est un *quencher* naturel de l'oxygène singulet^{79, 300, 301}. La présence de dérivés du carotène dans les plantes est donc importante pour réguler les mécanismes de d'oxydation.

Par exemple, la chlorophylle, dont la structure est de type chlorine, en présence de lumière peut donner lieu à la formation d'oxygène singulet et les carotènes présents permettent d'inhiber la toxicité de l'oxygène singulet vis-à-vis de la plante elle-même.

I.2. Mécanismes photophysiques de la production d' $^1\text{O}_2$

I.2.1. La photosensibilisation

Comme cela vient d'être rappelé, l'oxygène singulet peut être formé par voie chimique ou par voie photonique. Nous nous attacherons dans la suite à présenter les mécanismes en jeu dans la voie photonique, *via* la **photosensibilisation**. La photosensibilisation est une cascade de réactions et de transferts d'énergie électronique aux interfaces entre une onde (la lumière) et une molécule, le photosensibilisateur. La présence d'oxygène au voisinage du photosensibilisateur vient agir sur le déroulement des réactions, l'oxygène agissant comme un accepteur d'énergie à l'état triplet. Dû au fait que l'oxygène moléculaire, qui se trouve à son état fondamental dans un état triplet (biradical), un transfert d'énergie triplet-triplet peut avoir lieu entre le PS et l'oxygène, ce dernier passant alors à un état singulet réactif. Nous détaillons ci-après les différentes étapes du mécanisme de photosensibilisation en présence d'oxygène.

I.2.2. Formation du PS à l'état triplet

La Figure 119 résume les phénomènes photophysiques donnant lieu à la formation d'oxygène singulet, comme nous l'avons détaillée dans le Chapitre 1.

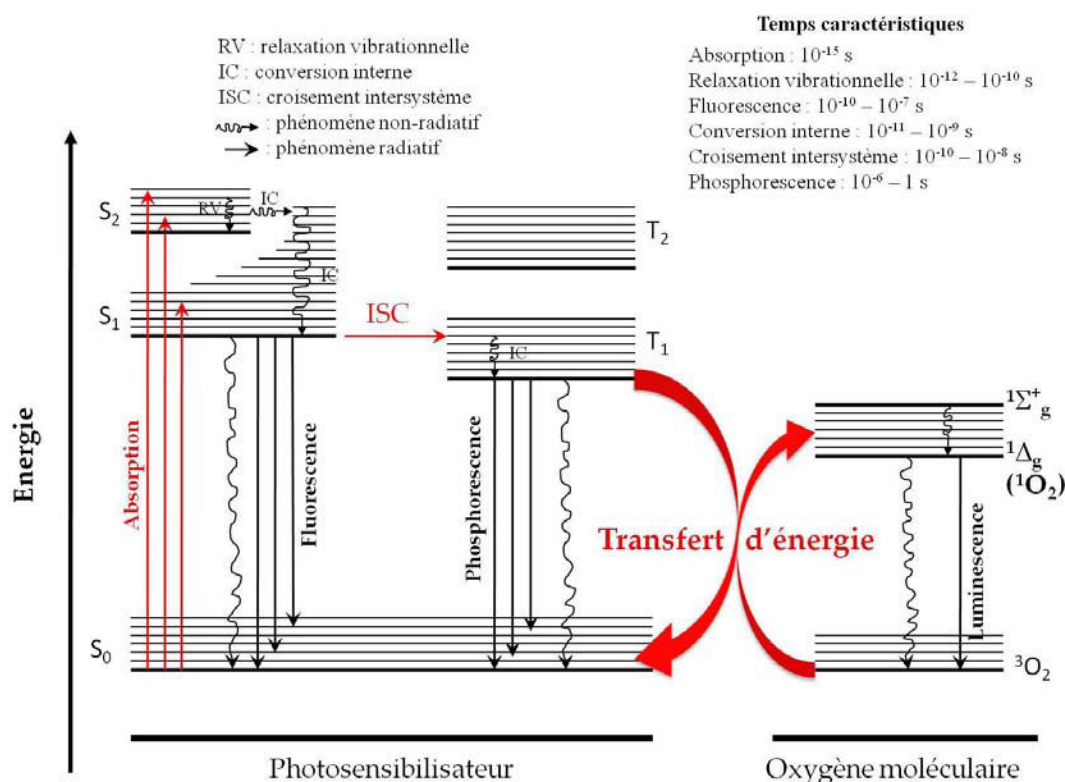


Figure 119 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

I.2.3. Formation de l'oxygène singulet

La formation de l'oxygène singulet, qui se fait grâce à une transition interdite (passage du PS de l'état triplet à singulet), n'est possible que parce qu'il se forme un complexe entre le PS et l'oxygène moléculaire. La théorie de la formation d'un complexe PS- O_2 a été étudiée par Evans durant les années 50³⁰² puis prouvée par Tsubomura et Mulliken en 1960³⁰³. Ils montrèrent que de nouveaux états sont créés lors de la formation du complexe PS- O_2 et appelés « état de transfert de charge ». Dans ces états, une densité électronique conséquente est transférée du PS à l'oxygène et ainsi le complexe peut être représenté comme suit : $PS^+ \cdot O_2^- \cdot$. Il s'agit d'un transfert d'énergie de type **Dexter**³⁰⁴. Ce type de mécanisme de transfert, dit de courte distance, nécessite que le PS et O_2 soient très proches ($\sim 15-20$ Å) pour qu'il y ait un recouvrement spatial de leurs orbitales frontières, ce qui est permis par la formation du complexe susnommé. Il faut que la fonction d'onde de l'orbitale HOMO (*Highest*

Occupied Molecular Orbital) du PS recouvre celle de l'orbitale LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) de l'O₂ (Figure 120).

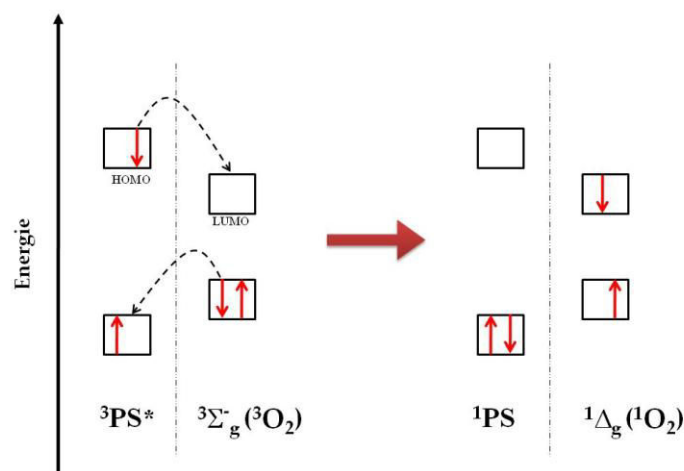


Figure 120 : Transfert d'énergie selon Dexter

Il existe en fait deux formes métastables d'oxygène à l'état singulet : $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$ ^{296, 305}. Comme le montre la Figure 122, les deux états électroniques de l'oxygène singulet ne diffèrent que par le spin d'un électron et le remplissage du niveau quantique anti-liant π^* . L'état $^1\Sigma_g^+$ a un temps de vie extrêmement court et passe dans l'autre état $^1\Delta_g$ de plus basse énergie, qui correspond à l'oxygène singulet dont nous parlerons dans le reste du manuscrit.

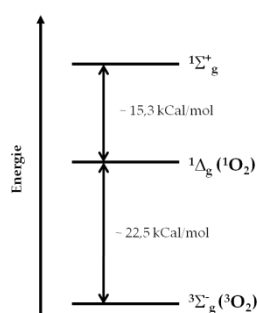


Figure 121 : Ordre énergétique des états de l'oxygène

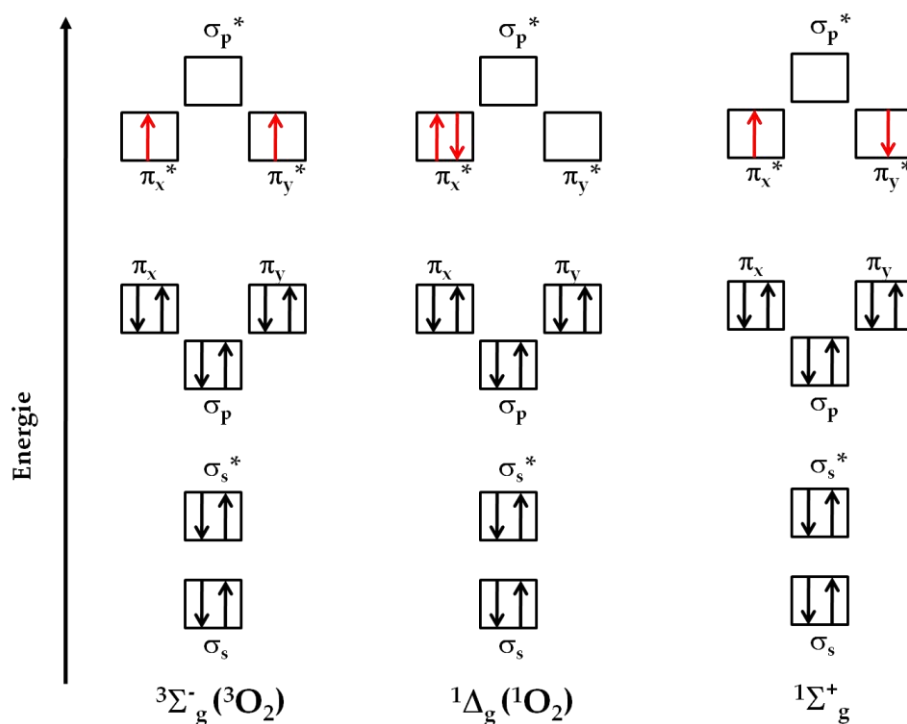


Figure 122 : Représentation des orbitales moléculaires des états de l'oxygène

Nous ne parlerons désormais uniquement de la forme $1\Delta_g$ lorsque nous parlerons d'oxygène singulet.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est une donnée de choix dans l'élaboration de nouveaux PS. Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est le rapport entre le nombre de photons absorbés par le PS et le nombre de molécules d'oxygène singulet formées.

I.3. Action de l'oxygène singulet – Mécanismes d'inhibition et de réactivité

L'oxygène singulet se caractérise par une réactivité très forte. Les paragraphes suivants relatent les différents mécanismes physiques ou chimiques où l'oxygène singulet intervient. Ces différents processus d'inhibition de l'oxygène singulet introduiront finalement l'activité biologique de l'oxygène singulet.

I.3.1. Inhibition par voie physique – Exemple des caroténoïdes

L'inhibition physique résulte d'un transfert d'énergie entre la molécule excitée (ici $^1\text{O}_2$) et un accepteur.

Pour les PS, qui peuvent se trouver dans un état excité singulet ou triplet, il existe deux types de *quenching* physiques :

- ★ **l'inhibition de l'état singulet** qui va provoquer une baisse voire une perte de l'émission de fluorescence du PS et la perte des propriétés photosensibilisatrices.
- ★ **l'inhibition de l'état triplet** qui implique une disparition de la formation de l'oxygène singulet mais ne perturbe pas l'émission de fluorescence.

L'exemple des dérivés du carotène ou caroténoïdes est l'exemple le plus ancien et le plus connu car il se base sur des constatations de botanique. En effet, un photosensibilisateur naturel très efficace est la chlorophylle³⁰⁶, qui permet aux plantes d'utiliser la lumière comme source d'énergie principale. Pour assurer leur survie, les plantes doivent donc posséder une molécule qui va empêcher le processus photodynamique d'avoir lieu à la surface des feuilles où le cocktail oxygène-lumière-photosensibilisateur est présent. Ce sont les caroténoïdes présents dans les plantes qui assurent ce rôle de protection.

Foote *et al.*, en 1968, font une étude sur l'aptitude du β -carotène à inhiber l'oxydation d'un substrat par photosensibilisation du bleu de méthylène³⁰¹. Ils montrent notamment que l'inhibition de la photo-oxydation dépend linéairement de la concentration de β -carotène ajouté et que le *quenching* en jeu est une désactivation de l'état triplet du bleu de méthylène³⁰¹.

Cependant, dans deux publications de 1970, Foote *et al.* montrent qu'il existe aussi un transfert par transfert d'énergie entre l'oxygène singulet et le β -carotène. En effet, ils montrent que le *cis*- β -carotène sous l'apport d'énergie de l'oxygène singulet passe sous forme *trans* dans une réaction exothermique^{300, 307}.

Ils résument leurs travaux sur l'isomérisation du β -carotène par ce schéma, montrant l'inhibition à la fois par l'état triplet du bleu de méthylène (MB) et par l'oxygène singulet (Figure 123) :

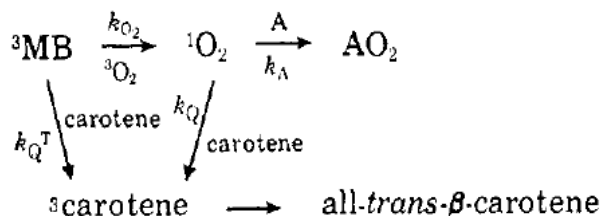


Figure 123 : Résumé des processus d'inhibition décrits par Foote *et al.*³⁰⁷.

I.3.2. Réactivité de l'oxygène singulet par voie chimique

Les principales réactions de l'oxygène singulet ont lieu au niveau des doubles liaisons C-C et préférentiellement pour des systèmes π conjugués, d'où la forte réactivité (et donc toxicité) de l'oxygène vis-à-vis des systèmes biologiques types chaînes grasses, dérivés du carotène ou encore certaines protéines. L'oxygène singulet ayant une répartition électronique voisine de celle de l'éthylène, il va pouvoir s'engager dans des réactions classiques de chimie organique mettant en jeu l'éthylène³⁰⁸, avec souvent des réactions concertées régies par les lois de Woodward et Hoffman.

Cette réactivité intervient notamment dans les méthodes de détection indirecte de l'oxygène singulet, basée sur l'oxydation d'une sonde chimique que nous verrons plus loin.

I.3.2.a. Réactions de type Alder-ène

Ce type de réaction fait intervenir une molécule avec une double liaison C-C (appelée « ène ») et un énophile qui vient attaquer cette double liaison. Dans le cas de l'oxygène singulet, c'est lui qui joue le rôle d'énophile et attaque une double liaison. La réaction est plus connue sous le nom de réaction de Schenck³⁰⁹ et est illustrée par la Figure 124.

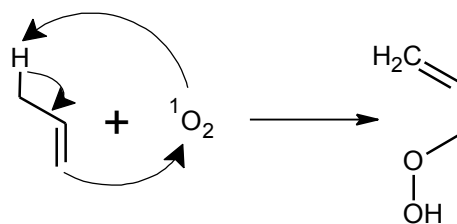


Figure 124 : Réaction de Schenck entre l'oxygène singulet et un « ène ».

La réaction de Schenck aboutit à la formation d'un peroxyde qui va à son tour pouvoir réagir sur d'autres substrats ou former des radicaux. Plusieurs formes d'intermédiaires réactionnels sont proposées comme la formation d'un intermédiaire perépoxyde³¹⁰ ou de biradicaux^{311, 312}.

I.3.2.b. Réactions de Diels-Alder

Ce type de réaction fait intervenir un diène (molécule avec deux doubles liaisons C-C conjuguée) et un diénophile. L'oxygène singulet jouant ici aussi le rôle du diénophile. La réaction est définie aussi comme une cycloaddition [4+2] (Figure 126).

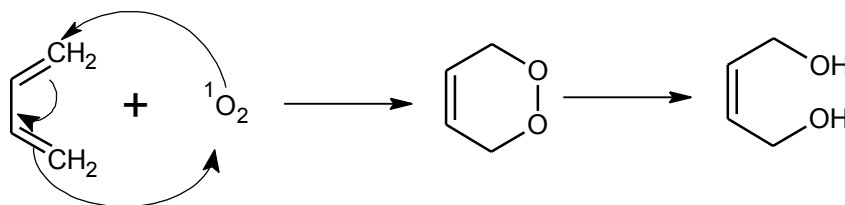


Figure 125 : Réaction de Diels-Alder entre l'oxygène singulet et un diène.

La réaction aboutit à un cycle insaturé instable qui évolue vers un diol.

I.3.2.c. Cycloaddition 1,2

Cette réaction de type 2+2 fait intervenir un ène et l'oxygène singulet comme ènophile³¹³ (Figure 126).

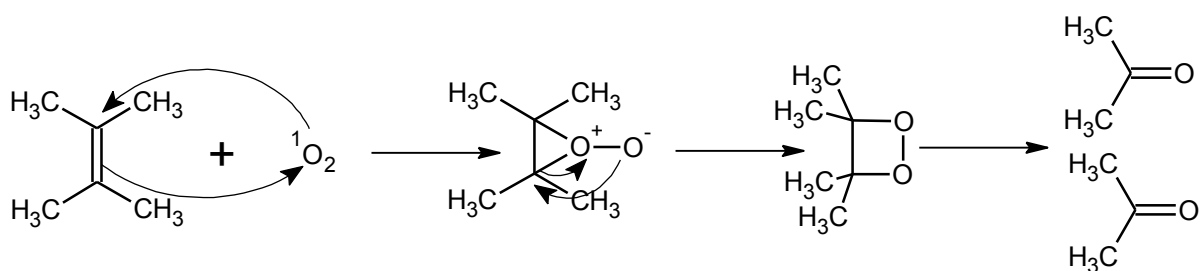


Figure 126 : Exemple de cycloaddition 1,2.

La réaction conduit à un cycle à quatre atomes appelé dioxéthane issu d'un peroxyde³¹⁰ se stabilisant finalement en formant deux cétones.

Ces principaux exemples de réactions chimiques, entre l'oxygène singulet et des molécules portant des doubles liaisons C-C conjuguées ou non, montrent l'étendue des actions chimiques qu'il peut engendrer sur les systèmes biologiques dont de nombreuses biomolécules structurantes portent ces fonctions ène ou diène.

I.3.3. Action sur les biomolécules

L'oxygène singulet possède une forte réactivité vis-à-vis des systèmes insaturés et conjugués, ce qui lui confère une toxicité accrue pour la plupart des systèmes biologiques⁸⁶. Les biomolécules qui vont être oxydées par l'oxygène singulet sont :

- ★ Les lipides insaturés
- ★ Le cholestérol
- ★ Les aminoacides (tryptophane, histidine, méthionine)
- ★ Les bases puriques (guanine)

Les acides gras insaturés ainsi que le cholestérol, étant des constituants des membranes cellulaires, l'oxygène singulet va avoir une action forte sur la destruction des membranes entraînant la lyse cellulaire.

De plus, l'action de l'oxygène singulet sur les aminoacides, va induire une destruction et donc une désactivation des protéines ainsi oxydées.

Enfin, l'ADN et l'ARN vont être des cibles de l'oxygène singulet *via* l'oxydation des bases puriques comme la guanine.

Il résulte de cette forte réactivité en milieu biologique, un temps de vie de l'oxygène singulet très court dans les cellules. Moan et Berg³¹⁴, ont estimé que cette durée de vie était de l'ordre de 0,04 μ s avec un rayon d'action de l'ordre de 0,02 μ m. L'oxygène singulet ne va donc être réactif qu'à proximité de son lieu de production, ce qui lui confère une composante spatio-temporelle réduite.

II. Détection de l'oxygène singulet

II.1. Mesure directe

Une remarque importante est la difficulté de mesure de la concentration de l'oxygène singulet dans l'eau. En effet, l'énergie de rotation ou d'élongation des liaisons O-H de l'eau est équivalente à l'énergie électronique de l'oxygène singulet. L'utilisation de D₂O, l'eau lourde, où les atomes d'hydrogène sont remplacés par son isotope le deutérium, D, est alors recommandée pour apprécier le comportement de certains PS dans un milieu aqueux. La taille du deutérium fait que l'angle D-O-D est différent de celui H-O-H et donc l'énergie de vibration est changée. Le temps de vie de l'oxygène singulet dans l'eau est d'environ 3,5 μ s^{315, 316} alors que dans D₂O il est de l'ordre de 68 μ s³¹⁷.

II.1.1. Mesure directe en solution

Il s'agit de collecter les photons émis dans une certaine plage de longueur d'onde. Nous nous plaçons généralement entre 1200 et 1350 nm afin d'observer un

maximum d'émission à 1270 nm. Nous avons déjà discuté des mesures de rendements quantiques de production d'oxygène singulet dans les Chapitres 2 et 3, et les détails techniques sont présentés dans la Partie expérimentale.

II.1.2. Mesure directe *in vitro*

L'équipe du Pr Peter R. Ogilby, du Département de Chimie de l'Université d'Århus au Danemark est spécialisée dans l'étude *in vitro* de la production d'oxygène singulet. Cette équipe développe en particulier l'instrumentation pour réaliser des mesures directes et résolues dans le temps d'oxygène singulet.

Pour les mesures de luminescence de l'oxygène singulet *in vitro* il est donc indispensable de changer l'eau du milieu intracellulaire par de l'eau lourde en provoquant un choc osmotique dont le détail de l'expérience est décrit par Hatz *et al.*, 2007³¹⁸. Leurs travaux ont mis en évidence des différences de durées de vie de l'oxygène singulet selon le système « PS/cellules » utilisé pour le produire. Ceci implique donc que, selon la localisation du PS dans le compartiment intracellulaire hôte, l'oxygène singulet produit a une durée de vie différente.

L'exemple de l'étude de deux PS, l'un cationique et l'autre non chargé, montre cette tendance. En effet, pour le PS cationique qui se localise préférentiellement dans le cytoplasme et le noyau, les durées de vie de l'oxygène singulet sont comprises entre 30 et 40 μ s, tandis que pour le PS non chargé, la durée de vie mesurée est de l'ordre de 17 μ s³¹⁹. L'étude des constantes de *quenching* par NaN₃ a été effectuée et va dans ce sens. Les expériences ont été effectuées sur la même lignée cellulaire, HeLa, et dans les mêmes conditions opératoires (D₂O à la place de H₂O, temps d'incubation de 2 h et mêmes paramètres d'irradiation).

Les auteurs en tirent la conclusion que, comme seul l'environnement intracellulaire proche change entre les deux expériences, l'oxygène singulet est un bon marqueur de l'hétérogénéité de la cellule et de ses gradients de viscosité³²⁰.

Une autre équipe, de l'Université de Toronto dirigée par le Pr Brian C. Wilson, a effectué des mesures *in vitro* d'oxygène singulet afin d'améliorer la dosimétrie en PDT³²¹. Ils ont mesuré, au cours de traitement PDT sur la lignée cellulaire AML5 *Leukemia* par la PpIX, différents paramètres comme la pression en O₂, la concentration en PS, le photoblanchiment du PS et la production d'oxygène singulet pour différents paramétrages d'irradiation. Ils ont ainsi montré que la production d'oxygène singulet était un paramètre qui corrélait à chaque fois avec la mort cellulaire. Ils confirment ainsi le rôle important de l'¹O₂ dans la lyse cellulaire par PDT. Ce qui leur permet, selon eux, d'estimer, par une mesure directe, une concentration en ¹O₂ par cellule pour atteindre un certain niveau de mort cellulaire. Enfin, ils avancent le fait que la mesure directe *in vitro* peut être un moyen intéressant pour améliorer la dosimétrie en PDT³²¹.

II.1.3. Mesure directe *in vivo*

L'équipe du Pr Brian C. Wilson, à l'Université de Toronto, a par ailleurs développé un système d'imagerie *in vivo* de luminescence de l'oxygène singulet à l'aide d'un microscope. Le détail du montage technique a été présenté en 2005³²². Ils insistent sur le fait que l'image obtenue est moyennée sur un volume tissulaire et qu'elle ne permet pas de refléter les hétérogénéités d'oxygénation des tissus par exemple. Cependant, il s'agit du premier système d'imagerie de luminescence d'oxygène singulet *in vivo* de 1 cm x 1 cm avec une résolution de 1 mm, qui représente une preuve de faisabilité de l'imagerie *in vivo* de la luminescence de l'oxygène singulet. Pour les détails de l'expérience, il faut se référer à la publication de Niedre *et al.*, 2005³²³. Brièvement, l'image en Figure 127 relate l'évolution de la production d'oxygène singulet durant le traitement PDT(B).

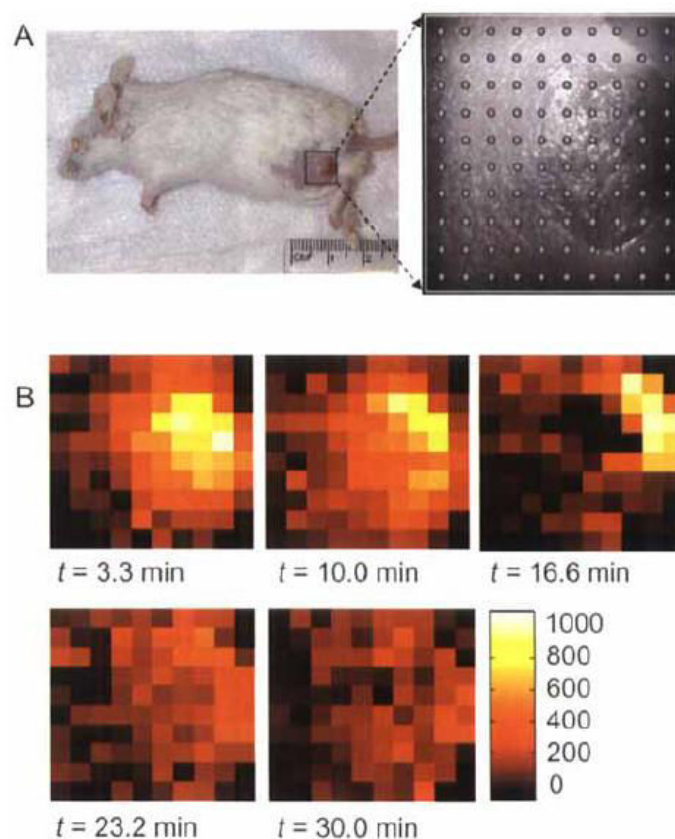


Figure 127 : A : Photographies de la souris traitée et de la zone imagée ; B : Clichés effectués pendant le traitement PDT aux temps indiqués. D'après Niedre *et al.*, 2005³²³.

Aussi, une étude préliminaire de dosimétrie *in vivo* à l'aide de la détection de l'oxygène singulet a été publiée par cette équipe³²².

II.2. Mesures indirectes

Il existe de nombreuses sondes chimiques décrites pour réagir avec l'oxygène singulet dont le spectre d'absorption ou d'émission de fluorescence va être après réaction avec l'oxygène singulet. En règle générale, la plupart des sondes sont des molécules conjuguées, dont la formation de peroxydes stables va provoquer des modifications de leurs propriétés photophysiques. Les réactions entre l'oxygène et les sondes ont été vues dans les paragraphes concernant la réactivité chimique de l'oxygène singulet (§ I.3.2).

Une liste non-exhaustive de sondes chimiques est donnée et peut être classée selon deux critères de détection.

- ★ Sondes détectables par spectroscopie d'absorption UV,
 - acide 9,10-anthracènediyl-bis-(méthylène)dimalonique, (ADMDMA)³²⁴
 - 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF)³²⁵⁻³²⁸
 - ditaurate de bilirubine (BDT)³²⁶
 - N,N-diméthyl-4-nitrosoaniline (RNO) en présence d'imidazole^{326, 329-331}
 - acide 9,10-anthracènedipropionique disodique(ADPA)³³²

- ★ Sondes détectables par spectroscopie de fluorescence
 - 9,10-diméthylanthracène (DMA)^{333, 334}
 - acide 9-anthracènepropionique(APA)³³⁴
 - acide 9,10-anthracènedipropionique disodique (ADPA)³³⁵
 - Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) en solution ²⁶⁹ et *in vivo*³³⁶
 - 3'-p-(aminophényl) fluorescéine (APF) et 3'-p-(hydroxyphényl) fluorescéine (HPH)³³⁷
 - 3,7-dihydro-6-[4-[2-[N'-(5-fluorescéinyl)thiouréido] éthoxy]phényl]-2-méthylimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (FCLA), détection possible en solution et *in vivo*³³⁸
 - luminol³³⁹
 - bis(2,2'-biphénylène) (BPE)³⁴⁰

III. Nos différents travaux sur la détection de l'oxygène singulet pour la PDT

III.1. Etudes effectuées dans le cadre de collaborations scientifiques

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des collaborations dont les travaux sont décrits ci-après.

Laboratoire	Thésards et permanents	Action	Publications
LCSN EA 1069 (Limoges)	Pierre Krausz (Pr) Vincent Sol (MdC) Cyril Ringot (Thésard)	Elaboration et étude antimicrobienne de fibres de coton couplées à des PS	Ringot <i>et al.</i> , soumise.
CMOS UMR 5253 (Montpellier)	Jean-Olivier Durand (Pr) David Brevet (Post-doctorant)	Elaboration et étude biologique de nanoparticules de silice mésoporeuse glycosylées	Revue : Couleaud <i>et al.</i> , 2010, <i>Nanoscale</i> . Publications : Brevet <i>et al.</i> , 2008, <i>Chemical Communications</i> . Hocine <i>et al.</i> , 2010, <i>International Journal of Pharmaceutics</i> .
UMR 176 Institut Curie (Paris)	Philippe Maillard (Pr) Sylvain Achelle (Thésard)	Elaboration et études biologiques de photosensibilisateurs glycosylés absorbant en biphoton	Achelle <i>et al.</i> , sous presse, <i>European Journal of Organic Chemistry</i> .

III.1.1. Etude de nanoparticules de silice mésoporeuses pour la thérapie photodynamique

Les nanoparticules de silice mésoporeuse synthétisées renferment un photosensibilisateur de type porphyrine. Les différents PS utilisés sont liés de façon covalente à la couche de silice et certains lots testés ont été fonctionnalisés par du

mannose, afin d'augmenter la sélectivité des nanoparticules pour les récepteurs au mannose, présents en surface de certaines cellules cancéreuses comme la lignée MDA-MB-231^{233, 341}.

Les photosensibilisateurs utilisés sont des porphyrines hydrosolubles dont les structures chimiques des précurseurs porphyriniques silylés sont présentées dans la Figure 128 :

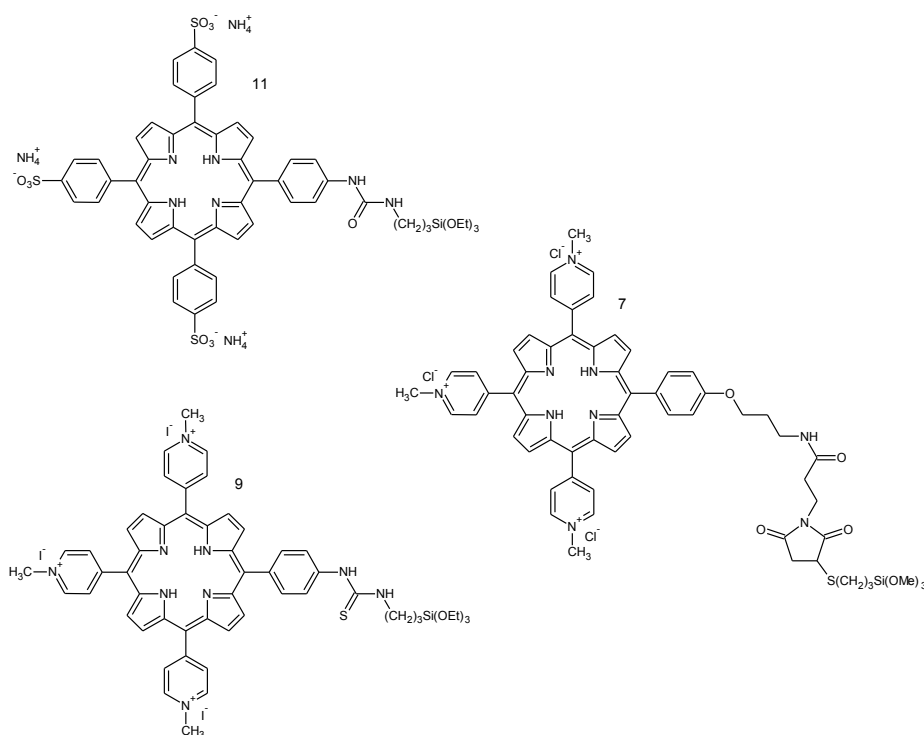


Figure 128 : Structures chimiques des trois PS (7, 9 et 11) utilisés pour la synthèse des nanoparticules.

Les trois types de nanoparticules diffèrent selon le type de synthèse utilisé :

- Croissance d'un réseau de silice autour des PS portant les fonctions $\text{Si}(\text{OEt})_3$, notées S9 et S11.
- Intégration du PS dans une matrice mésoporeuse de silice, notées *Mesoporous Silica Nanoparticles*, MSN-7, MSN-9 et MSN-11.

Le Tableau 14 présente les principaux résultats^{341, 342}.

Tableau 14 : Viabilité cellulaire sans irradiation, après irradiation ($\lambda_{exc} = 630-680$ nm, 6 mW.cm²) et rendement quantique de formation d'oxygène singulet dans les nanoparticules mésoporeuses D'après Hocine *et al.*, 2010³⁴².

Cell viabilities (% control) of MDA-MB-231 breast cancer cells.						
Nanoparticles	S9	S11	MSN7	MSN9	MSN11-3.5	MSN11-5.8
No irradiation% of living cells	98 ± 4	96 ± 5	99 ± 4	103 ± 6	97 ± 4	103 ± 9
Irradiation% of living cells	48 ± 5*	55 ± 6*	52 ± 7*	43 ± 5*	64 ± 4*	40 ± 8*
Quantum yield of ¹ O ₂ production (EtOH ± 5%)	Not calculable	31	58	60	58	46

Cells were incubated for 24 h with nanoparticles, submitted or not to irradiation, and ¹O₂ quantum yield (%) was assayed as described in experimental part.
* $p < 0.05$ statistically different from control.

Dans tous les cas, la formation d'oxygène singulet a été observée. De plus, toutes les nanoparticules ont aussi montré une phototoxicité *in vitro* en adéquation avec le rendement quantique de production d'oxygène singulet calculé en solution. Cependant, le rendement quantique de production d'oxygène singulet de la nanoparticule MSN11-3,5 est supérieur à celui des MSN11-5,8 alors que les phototoxicités sont dans l'ordre inverse. Ceci est probablement dû à un phénomène d'agrégation qui peut engendrer une production d'oxygène singulet, sans perturber la phototoxicité. Ce phénomène avait été observé par Vicente *et al.* pour une carboxy-chlorine qui présentait un rendement quantique de l'ordre de 10 % et une phototoxicité très forte³⁴³. La phototoxicité dans ce cas reposerait plus sur les mécanismes de type I (à partir de l'état triplet du PS).

Quant aux nanoparticules portant du mannose en surface, elles présentent un rendement quantique de production d'oxygène singulet équivalent de l'ordre de 57 % mais une phototoxicité différente sur les cellules MDA-MB-231. En effet, la fonctionnalisation des nanoparticules par du mannose fait passer la mort cellulaire de 45 % à 99 % sous les conditions décrites dans la publication de Brevet *et al.*³⁴¹. Cette meilleure efficacité des nanoparticules mannosylées peut s'expliquer par une incorporation cellulaire par endocytose *via* les récepteurs au mannose^{344, 345}.

III.1.2. Etude de photosensibilisateurs glycosylés pour la thérapie photodynamique

L'étude présentée fait intervenir des di et trimères de porphyrines portant un atome de zinc au centre du macrocycle tétrapyrrolique et ayant la capacité d'absorber en mode biphotonique (Figure 129 et Tableau 15) (Achelle *et al.*, 2010³⁴⁶).

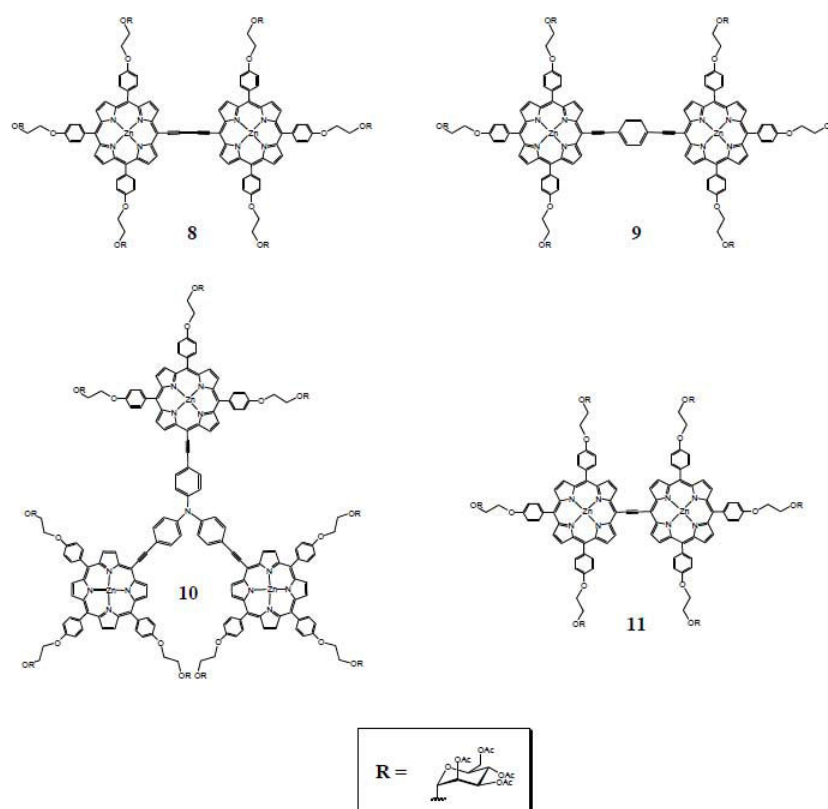


Figure 129 : Structures chimiques des di- et trimères étudiés. D'après Achelle *et al.*, 2010³⁴⁶.

Tableau 15 : Propriétés photophysiques mesurées pour les composés 8 à 11, dans le dichlorométhane (TPA : *Two-Photon Absorption*, GM : Goeppert-Mayer). D'après Achelle *et al.*, 2010³⁴⁶.

Composé	$\lambda_{\text{abs.}}$ (nm)	ϵ ($10^{-3}\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)	Φ_f	Φ_{Δ}	TPA $\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\delta_{\text{max.}}$ (GM)
8	419	215	619 712	0,07	0,75	790	8000
	450	244					
	481	157					
	656	22					
	630	35					
	677	48					
9	449	294	655	0,10	0,61	820	260
	570	19					
	640	44					
10	440	535	647 698	0,05	0,47	790	1300
	573	36					
	632	88					
11	424	242	707	0,08	0,43	790	420
	450	168					
	481	111					
	558	20					
	631	23					
	677	31					

Cette étude montre l'intérêt de ce type de composés. En effet, les di- et trimères de porphyrines zinguées présentent une absorption à deux photons très efficace pour des longueurs d'onde d'excitation (respectivement 790 et 820 nm) ce qui permet une irradiation dans la zone de la fenêtre thérapeutique ($\lambda > 650$ nm) et entraîne une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus. Enfin, ces composés présentent de très bons rendements quantiques de production d'oxygène singulet, pour une excitation monophotonique.

III.1.3. Etude de précurseurs porphyriniques pour des applications antimicrobiennes de la PDT

Le but de ce travail est de confectionner des tissus antimicrobiens par effet photodynamique. Il s'agit donc de fixer de façon covalente des photosensibilisateurs en surface d'un tissu comme du coton, *via* les fonctions de surface de la cellulose. Ces tissus, soumis à un rayonnement lumineux vont former des espèces réactives de l'oxygène, dont l'oxygène singulet, et provoquer la lyse des bactéries à son contact³⁴⁷.

La Figure 130 représente la structure chimique des photosensibilisateurs de type porphyrine qui sont respectivement neutre (1), chargé négativement (2) et chargé positivement (3).

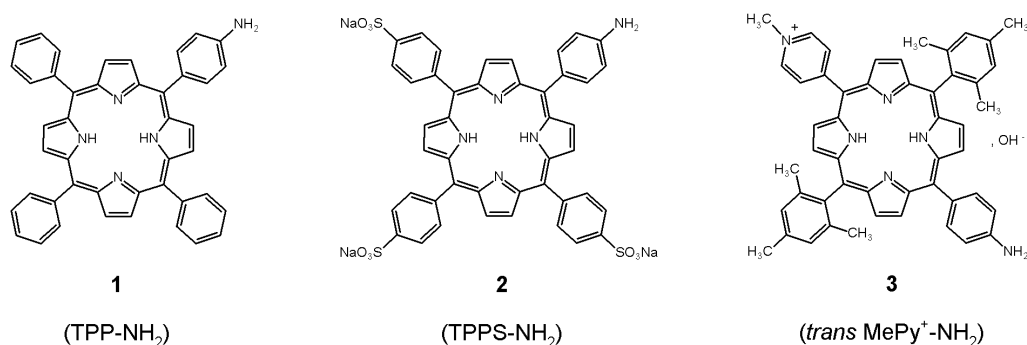


Figure 130 : Structure chimique des précurseurs de porphyrines testés³⁴⁷.

Le greffage covalent de ces précurseurs sur la cellulose est assuré par un motif triazine entre les fonctions NH₂ portées par les porphyrines et les fonctions OH de la cellulose, comme indiqué sur la Figure 131.

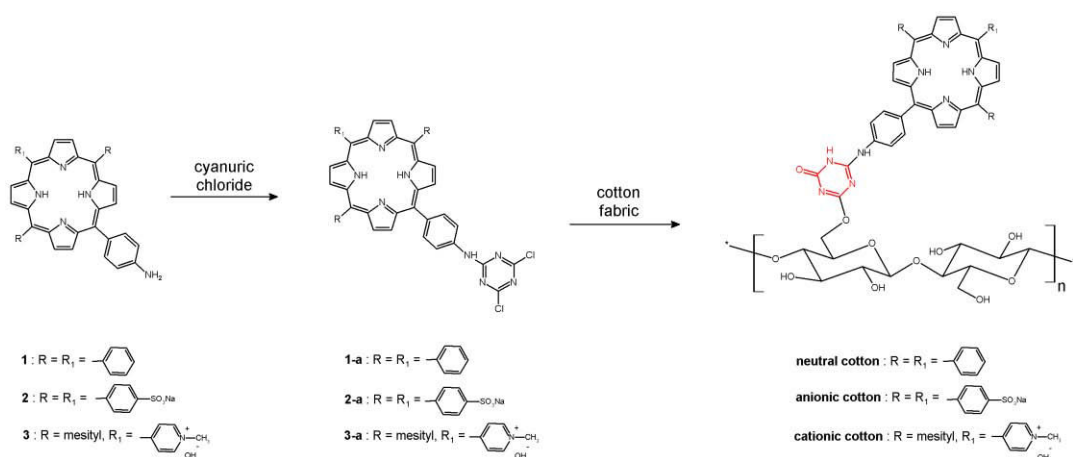


Figure 131 : Voie de synthèse du couplage covalent entre les porphyrines et la cellulose³⁴⁷.

Le Tableau 16 montre les résultats de formation d'oxygène singlet et de l'effet photobactéricide³⁴⁷.

Tableau 16 : Tableau général des résultats. D'après Ringot *et al.*, 2011³⁴⁷.

Précurseur de porphyrine	$\Phi_{\Delta} (^1\text{O}_2)$	Effet photobactéricide (%) du coton modifié par le précurseur de porphyrine	
		<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>
TPPS-NH ₂ (2)	0,59	37	0
TPP-NH ₂ (1)	0,65	93,7	0
<i>trans</i> MePy ⁺ -NH ₂ (3)	0,82	100	0

La grande différence d'activité entre les bactéries *S. Aureus* et *E. Coli* peut s'expliquer par le fait qu'elles appartiennent à deux classes différentes, respectivement Gram⁺ et Gram⁻. Pour *S. Aureus*, l'ordre d'activité photobactéricide en fonction de la charge du PS est le même que celui observé pour les porphyrines libres, à savoir : cationique > neutre > anionique, pour les bactéries à Gram négatif³⁴⁸,³⁴⁹. En revanche, la faible correspondance entre activité photobactéricide et le rendement quantique d'oxygène singlet semble montrer que l'oxygène singlet n'est pas le seul EROs à intervenir dans la lyse bactérienne. Quant aux bactéries à

Gram positif, aucune activité photobactéricide n'est observée, ce qui peut s'expliquer par la présence de peptidoglycane en surface de la couche externe de la bactérie, lui procurant une plus grande stabilité chimique³⁴⁷.

III.2. Evaluations de deux sondes chimiques pour la détection indirecte

L'étude a été réalisée par Julie Bollé, stage de fin d'études ENSIC, sous la direction de C. Frochot, R. Vanderesse et moi-même.

Différentes sondes de la littérature ont été testées dans les conditions préconisées par les publications y faisant référence, mentionnées précédemment. Un nombre important d'expériences n'ont pas donné les résultats attendus ou exposés dans les publications. Toutefois, deux sondes ont conduit aux résultats exposés ci-après.

III.2.1. Evaluation de l'APF avec la tétraphénylporphyrine

L'APF (3'-p-(aminophényl) fluorescéine) est une sonde chimique qui, en réagissant avec l'oxygène singulet (Figure 132), est oxydée en une espèce (la fluorescéine) dont le spectre d'émission de fluorescence est différent.

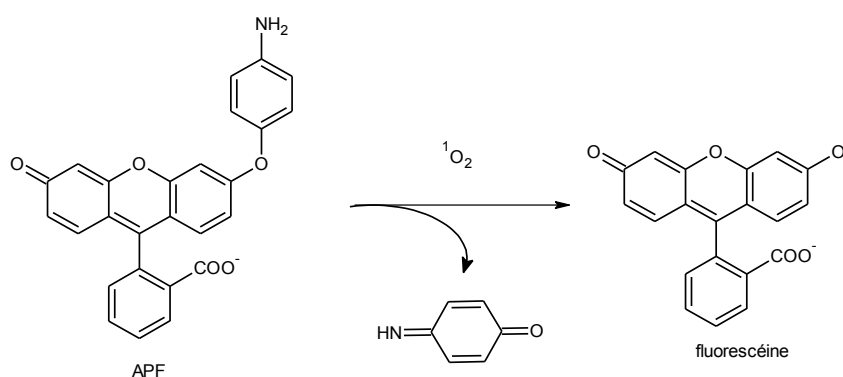


Figure 132 : Réaction entre l'APF et l'oxygène singulet.

Une augmentation de l'émission à 525 nm doit être observée en excitant la sonde à 492 nm. Les conditions opératoires invariables sont les suivantes :

- ★ Solvant : D₂O
- ★ Photosensibilisateur : Tétraphénylporphyrine, TPP
- ★ Excitation du PS : 10 s, $\lambda_{\text{exc.}} = 418 \text{ nm}$
- ★ Mesure de la fluorescence de l'APF : 10 s, $\lambda_{\text{exc.}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 525 \text{ nm}$
- ★ Fentes : 11 nm

Les paramètres modifiés sont les suivants :

- ★ Présence de PS ou non
- ★ Saturation du milieu en azote ou taux d'oxygène dissous naturel
- ★ Présence de NaN₃ ou non (NaN₃ étant un *quencher* d'oxygène singulet)

Le principe de l'expérimentation est le suivant : une première mesure est effectuée pendant 10 secondes avant toute excitation du milieu. Puis le milieu est excité à 418 nm pendant 10 secondes et une autre mesure de la fluorescence de la sonde est réalisée. Ce cycle est répété plusieurs fois.

Le rapport I/I_0 , I_0 étant l'aire sous la courbe de fluorescence de la sonde avant excitation et I la valeur de l'aire sous la courbe de fluorescence de la sonde après chaque excitation, est porté en fonction du temps, comme présenté dans la Figure 133.

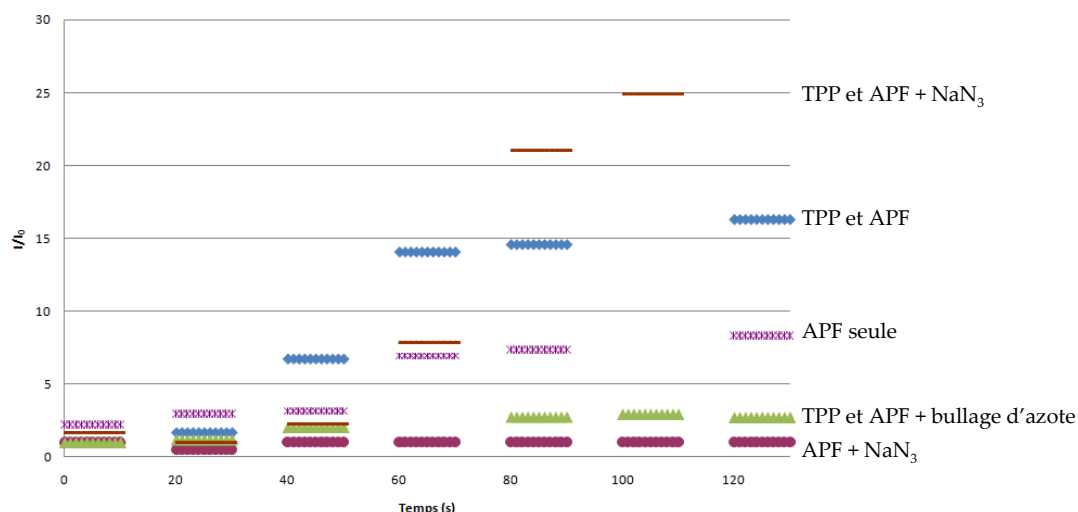


Figure 133 : Evolution du rapport de fluorescence de la sonde (APF) en fonction du temps

($\lambda_{exc.} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 525 \text{ nm}$, D_2O).

Les points de mesure bleus, correspondant à l'excitation de la solution comportant la sonde APF et la TPP, montrent une augmentation significative de la fluorescence de l'APF d'un facteur 16, ce qui prouve la formation d'oxygène singulet par sa réactivité vis-à-vis de la sonde.

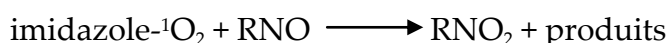
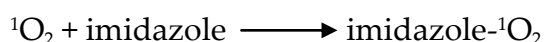
Les points marqués en mauve et vert, représentant des témoins de réaction que sont, respectivement, l'APF en présence de NaN_3 et l'APF avec la TPP et un bullage d'azote dans la cuve d'analyse, ne montrent aucune augmentation significative de la fluorescence de la sonde. Le bullage d'azote prive le milieu de dioxygène dissous dans D_2O et donc rend la production d'oxygène singulet impossible.

Concernant l'APF seule, points violet, une légère augmentation néanmoins non négligeable peut s'expliquer par une dégradation de la sonde en milieu aqueux sous irradiation lumineuse. Enfin, la forte augmentation pour le lot comportant l'APF avec la TPP et NaN_3 (points en rouge), s'explique par le fait que le NaN_3 ne parvient pas à inhiber efficacement l'oxygène singulet produit, ce qui engendre l'oxydation de la sonde.

En tenant compte des témoins de réaction, une augmentation d'un facteur 8 est due à la présence de TPP excitée dans le milieu, qui prouve la production d'oxygène singulet.

III.2.2. Evaluation du couple RNO/imidazole avec le bleu de méthylène

Le N,N-diméthyl-4-nitrosoaniline (RNO) en présence d'imidazole voit sa bande d'absorption maximale à 440 nm diminuer d'intensité, après réactions avec l'oxygène singulet. Ne pouvant utiliser la TPP comme producteur d'oxygène singulet car il absorbe près de cette longueur d'onde, le bleu de méthylène a été utilisé ici comme producteur d'oxygène singulet. Le mécanisme d'oxydation de la RNO est le suivant :



Les conditions opératoires sont les suivantes :

- ★ Solvant : D₂O
- ★ Photosensibilisateur : bleu de méthylène, MB
- ★ Excitation du PS : 10 min, $\lambda_{\text{exc.}} = 665 \text{ nm}$
- ★ Mesure d'absorbance de la RNO à 440 nm

L'excitation est faite pendant 10 min puis nous mesurons l'absorbance de la solution.

La Figure 134 montre la variation des spectres d'absorption du bleu de méthylène dans D₂O dans différentes conditions d'excitation.

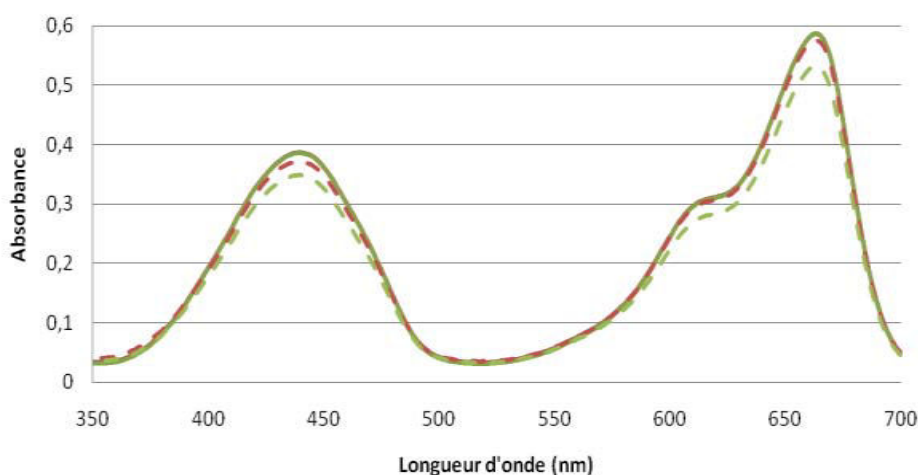


Figure 134 : Spectres d'absorption obtenus dans D₂O pour le mélange MB, RNO/imidazole dans différentes conditions : courbes continues : avant excitation ; courbes en pointillés : après excitation ; courbe verte : MB/RNO/imidazole ; courbe rouge : MB/RNO/imidazole + NaN₃.

Une baisse significative de l'absorbance de la sonde à 440 nm est observée pour le l'échantillon comportant le bleu de méthylène et le couple RNO/imidazole après irradiation. En présence de NaN₃, une diminution plus faible est aussi observable, ce phénomène pouvant être attribué ici aussi au fait que NaN₃ ne peut pas inhiber tout l'oxygène singulet produit. Comparés à ceux de la littérature, nos résultats sont ici en accord avec les travaux de Liu *et al.* qui montrent une diminution de l'ordre de 0,2 unité d'absorbance dans un tampon pH 7,4 avec une irradiation laser à 633 nm (Figure 135)³³¹.

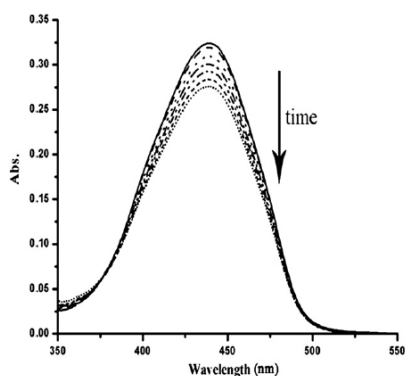


Figure 135 : Evolution de l'absorbance de la RNO observée par Liu *et al.*³³¹

IV. Développement des Photodynamic Molecular Beacons (PMB)

La thématique des *Photodynamic Molecular Beacons* (PMB) intéresse notre équipe de recherche depuis 3 ans car il s'agit d'une stratégie d'adressage originale et prometteuse que nous allons développer ci-après. Une première approche a consisté à effectuer quelques synthèses mais surtout à mener une recherche bibliographique (thèse d'exercice en Pharmacie de L. Degraeve).

Plus récemment, nous avons recensés les différents mécanismes de modulation de la production d'oxygène singulet et leur applications en PDT (Verhille *et al.* 2010³⁵⁰, mise en annexe). Outre les PMB qui y tiennent une place de choix, cette revue recense des moyens de contrôler la production d'oxygène singulet.

IV.1. Concept de la PDT utilisant un *Photodynamic Molecular Beacon*

L'équipe du Pr Gang Zheng de l'Université de Toronto est l'équipe pionnière qui a développé les PMB. Le concept de PMB se base sur des études sur les mécanismes d'inhibition de l'oxygène singulet développés dans les années 60. Le concept existant derrière les termes anglais de *Photodynamic Molecular Beacons*, traduisibles par « balises moléculaires pour la PDT », est basé sur le fait que le photosensibilisateur ne devient photoactif qu'en présence de sa cible. Ainsi, la molécule (PS-peptide-*Quencher*) telle qu'elle est décrite en Figure 136, n'est pas photoactive du fait de la proximité spatiale entre le PS et le *quencher* assurée par le peptide. Ce peptide est choisi pour être un substrat spécifique d'enzymes spécifiques de la zone tumorale à traiter, qui seront la marque du milieu que l'on souhaite cibler. Alors, en présence de ces enzymes capables de cliver la chaîne peptidique, le peptide

libère PS et le *quencher* et le PS retrouve ainsi son activité photodynamique. La publication pionnière concernant cette thématique est celle du groupe du Pr Gang Zheng en 2004 où il présente le concept avec Figure 136²¹¹.

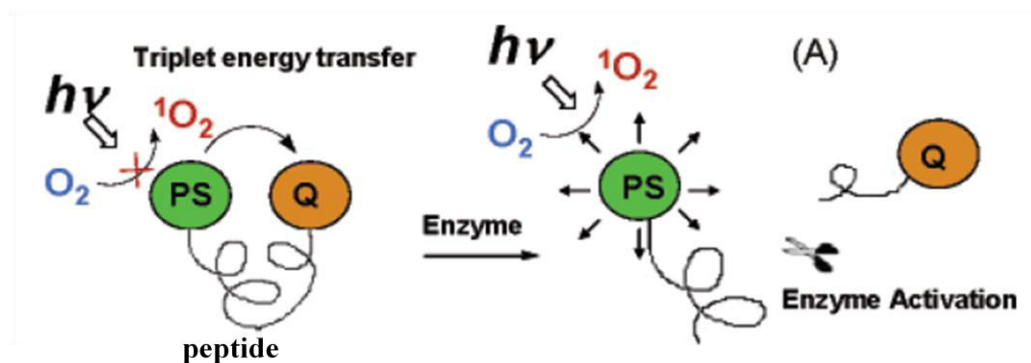


Figure 136 : Représentation schématique du concept de PDT par un PMB. D'après Chen *et al.*, 2004²¹¹.

L'étude a permis de prouver le phénomène de *quenching* de l'oxygène singulet du PMB. De plus, ils ont montré que le peptide, substrat des caspases-3, était effectivement clivé par ces mêmes enzymes et que le PS retrouvait son efficacité photodynamique. Enfin, l'intervention des enzymes a été démontrée en introduisant des inhibiteurs de caspases-3 qui bloquent ainsi le clivage du peptide pour garder le PMB non-phototoxique²¹¹.

IV.2. Synthèses et étude préliminaire du PMB choisi

Le PMB que nous avons développé, est composé comme suit (Figure 137) :

- ★ un photosensibilisateur, la TPC précédemment décrite.
- ★ un *quencher* d'oxygène singulet de type caroténoïde.
- ★ le peptide GPLGIAGQK, qui a été démontré comme substrat des métalloprotéinases 2 et 9, MMPs-2 et -9 par Mansour *et al.*, 2003²¹⁴.

Les MMPs-2 et-9 sont surexprimées au niveau des néovaisseaux dans de nombreux types de cancer (tête et cou, cerveau, œsophage, estomac, colorectal, sein, ovaires, mélanome)³⁵¹ et interviennent dans différentes phases du processus angiogénique comme la lyse de la membrane basale favorisant l'invasion vasculaire et favorisent le *switch* angiogénique³⁵². Selon le concept décrit plus haut, la TPC ne sera active que lorsqu'elle arrivera au niveau des néo-vaisseaux tumoraux et que le peptide sera clivé par les métalloprotéinases 2 et 9.

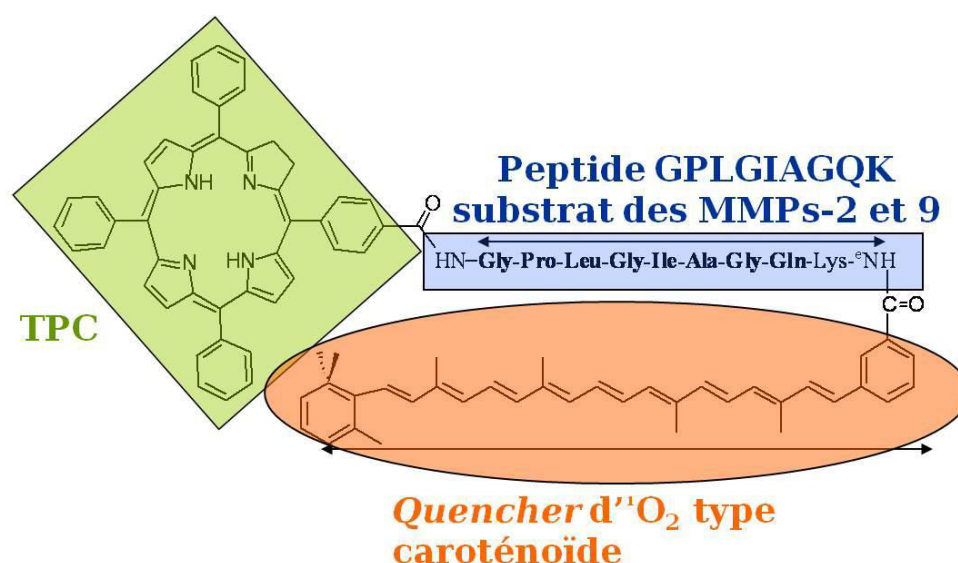


Figure 137 : Représentation du Photodynamic Molecular Beacon envisagé

Dans les paragraphes suivants, nous allons développer la synthèse du *quencher* dérivé du caroténoïde, du peptide GPLGIAGQK et le couplage entre la TPC et le peptide. Nous évoquerons les premiers essais d'inhibition en solution. Il est à noter que pour mon travail de thèse, seule une ébauche de ce projet a été réalisée sachant que ce vaste sujet a été, par la suite, assuré par Marc Verhille dans son projet de thèse.

IV.2.1. Synthèse du quencher, 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)- β -carotène

La synthèse du caroténoïde final (5) se fait en plusieurs étapes selon le schéma de synthèse présenté dans la Figure 138.

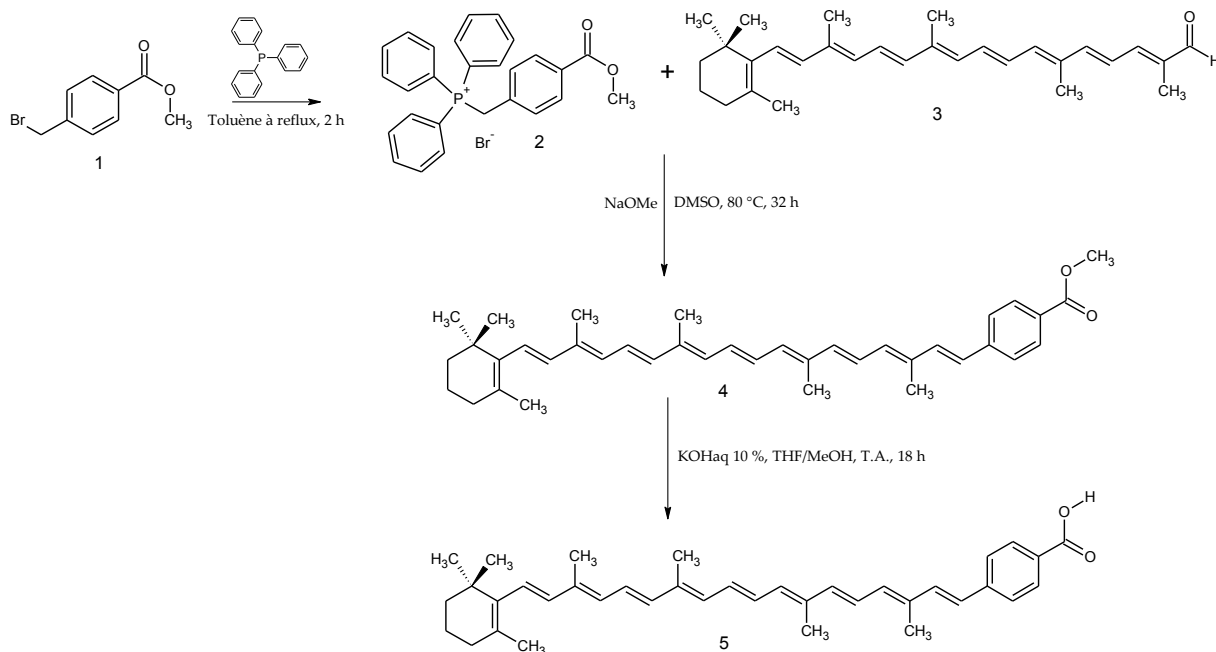


Figure 138 : Schéma de synthèse du caroténoïde acide (5).

Il s'agit de faire une réaction de Wittig³⁵³ entre le 8'-apo- β -caroténal (3) et le bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (2). Le composé obtenu (4) est ensuite saponifié pour obtenir une fonction acide (5) nécessaire au couplage final. Cette réaction est décrite par l'équipe de Devens Gust³⁵⁴.

IV.2.1.a. Synthèse du bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (2)

Ce précurseur est obtenu en effectuant une substitution nucléophile entre la triphénylphosphine et le dérivé bromé que l'on souhaite, dont la réaction est montrée dans la Figure 139.

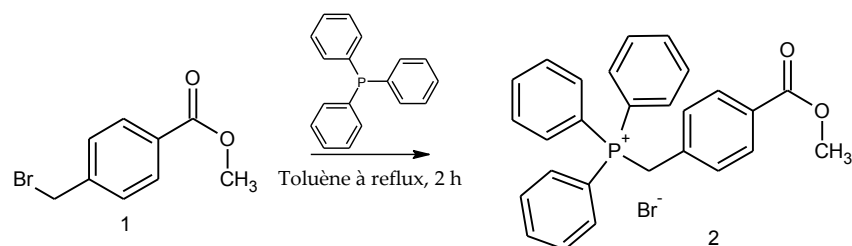


Figure 139 : Substitution nucléophile entre le dérivé bromé et la triphénylphosphine.

Le produit de réaction est obtenu avec un rendement de 81 % après une purification par filtration et lavages au toluène.

IV.2.1.b. Réaction de Wittig – synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)- β -carotène ((4), Q-COOMe)

Cette réaction se fait entre les composés notés (2) et (3) et plus précisément entre la fonction aldéhyde de (3) et la fonction triphénylphosphine de (2), dont le mécanisme est représenté sur la Figure 140.

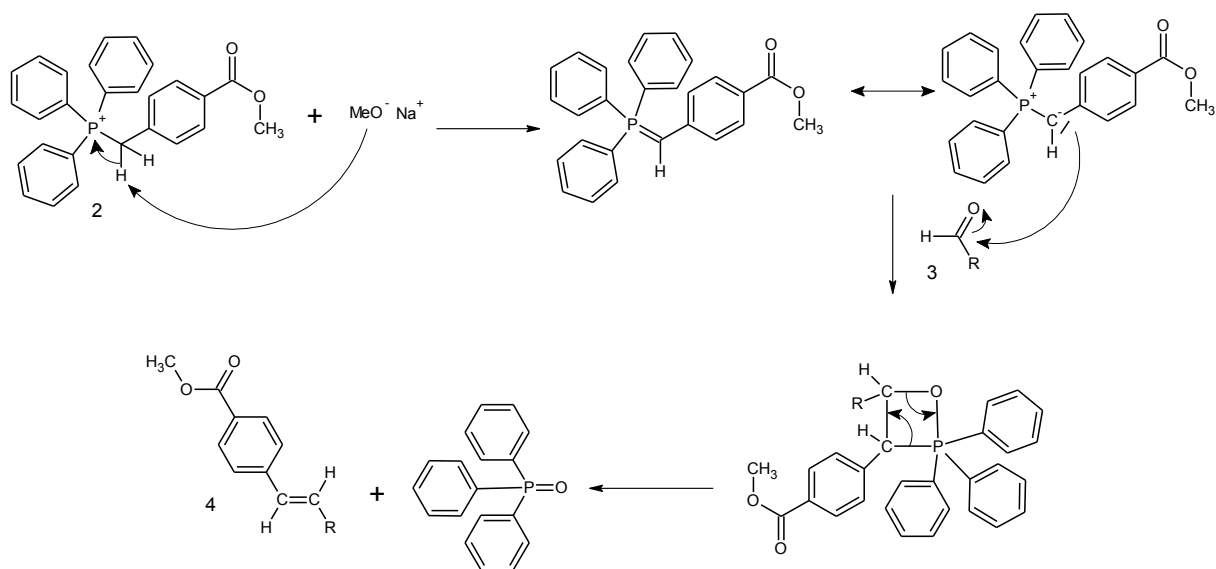


Figure 140 : Mécanisme de la réaction de Wittig (R représente le groupement caroténoïde).

Le produit final (4, Q-COOMe) est obtenu, après lavages de la phase organique à l'eau et recristallisation dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, avec un rendement de 85 %.

IV.2.1.c. Saponification de ((4), Q-COOMe) – synthèse de 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)- β -carotène ((5), Q-COOH)

La réaction se fait de façon classique en milieu basique dans un mélange THF/MeOH auquel une solution aqueuse de KOH 10 % est ajoutée. La réaction est laissée à température ambiante pendant 18 heures (Figure 138). Pour cette réaction il nous a été impossible de recristalliser le produit final.

Les synthèses concernant le caroténoïde ont été arrêtées à ce stade, au vu du travail important qu'il restait à effectuer. Les prochaines expériences mettant en jeu le caroténoïde (test de *quenching*) ont été effectuées avec la molécule (4), Q-COOMe dont la structure est indiquée sur la Figure 138 et pour laquelle la Figure 141 correspond au spectre d'absorption UV-visible.

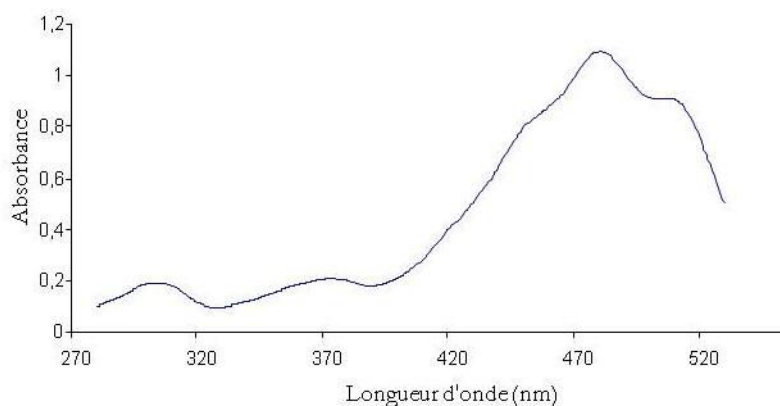


Figure 141 : Spectre UV de Q-COOMe dans le dichlorométhane.

La synthèse du *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB) se fait en synthétisant les deux parties de la molécule séparément : le caroténoïde d'une part et la partie chlorine couplée au peptide d'autre part, que nous allons détailler ci-après.

IV.2.2. Synthèse du peptide GPLGIAGQK et couplage à la TPC

IV.2.2.a. Synthèse du peptide sur support solide

La synthèse du peptide GPLGIAGQK est faite par SPPS (méthode décrite dans le Chapitre 2 et détails expérimentaux en partie expérimentale) sur une résine de Wang préchargée avec le premier acide aminé, la lysine, K, dont la chaîne latérale est protégée par un groupement Boc, Fmoc-Lys(Boc)-*Wang resin*. A part la lysine (K), seule la glutamine (Q) est protégée par un groupement trityl sur sa fonction latérale amine. Le couplage de chaque glycine a demandé une attention particulière et nous avons assuré chaque couplage en prélevant un échantillon à chacune de ces étapes pour tests colorimétriques au tribenzène sulfonique (TBNS).

En fin de synthèse, le Fmoc du dernier acide aminé, G, est enlevé pour libérer la fonction NH₂ qui va ensuite servir à établir le couplage avec la TPC.

IV.2.2.b. Couplage GPLGIAGQK à la TPC sur phase solide

Le couplage (Figure 142) se fait de façon classique en mettant en présence la TPC, préalablement activée par une fonction succinimide, TPC-NHS, dans le DCM en présence d'une base comme la DIEA.

Après 18 h de réaction, le milieu réactionnel est éliminé et on constate que la résine s'est colorée en rouge-rosé (même après plusieurs lavages) caractéristique de la présence de TPC accrochée sur la résine et donc sur le peptide.

La dernière étape est le clivage du produit final de la résine. Elle est effectuée en ajoutant 5 mL de TFA pur sur la résine et le changement de coloration de rouge à vert signe la présence de la TPC sur la résine. Le clivage s'accompagne ici des déprotections des fonctions latérales NH₂ de la lysine et de la glutamine.

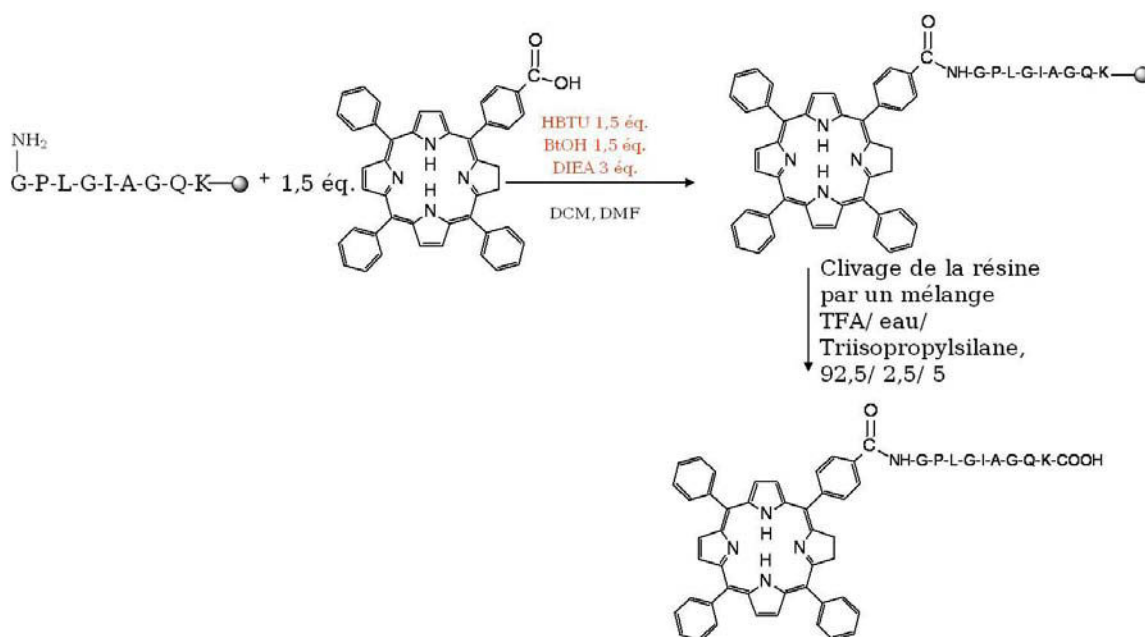


Figure 142 : Schéma de synthèse du couplage de la TPC au peptide GPLGIAGQK sur support solide

Après clivage, on récupère un produit vert (signe de la présence de la TPC en milieu acide) que l'on caractérise par spectrométrie de masse. La masse du produit est d'environ 1482,9 g/mol (Figure 143) ce qui correspond à la masse théorique attendue de 1481,74 g/mol.

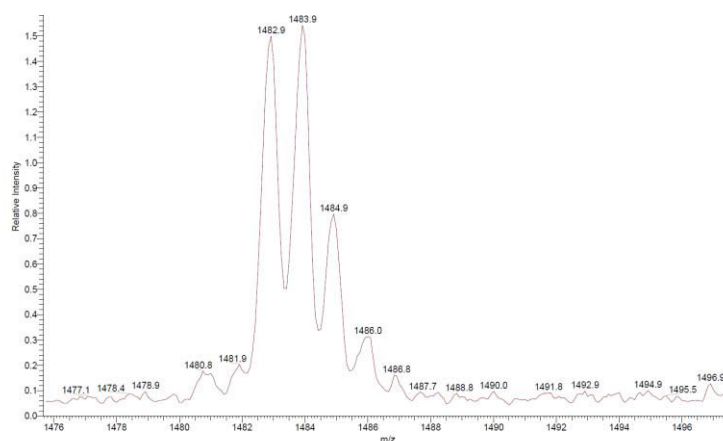


Figure 143 : Spectre de masse du produit final obtenu.

Les propriétés photophysiques sont données dans la Figure 144.

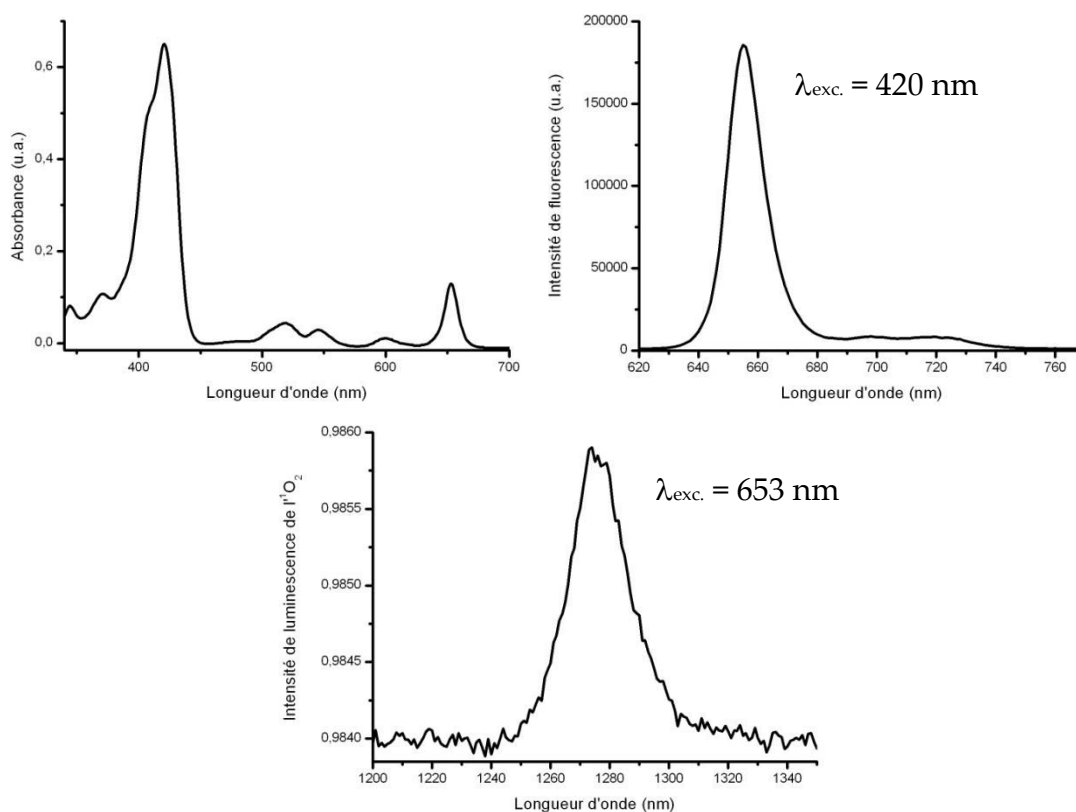


Figure 144 : Spectres UV, de fluorescence et d'émission d'oxygène singlet de TPC-GPLGIAGQK effectués dans le toluène.

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence obtenus sont conformes à ceux de la TPC. De plus, la molécule TPC-GPLGIAGQK est capable de produire de l'oxygène singlet.

IV.2.3. Premiers essais d'inhibition en solution

L'étude de l'inhibition de la production d'oxygène singlet par TPC-GPLGIAGQK en présence d'un ajout croissant de caroténoïde a été réalisée dans le toluène, après excitation à 653 nm (Figure 145).

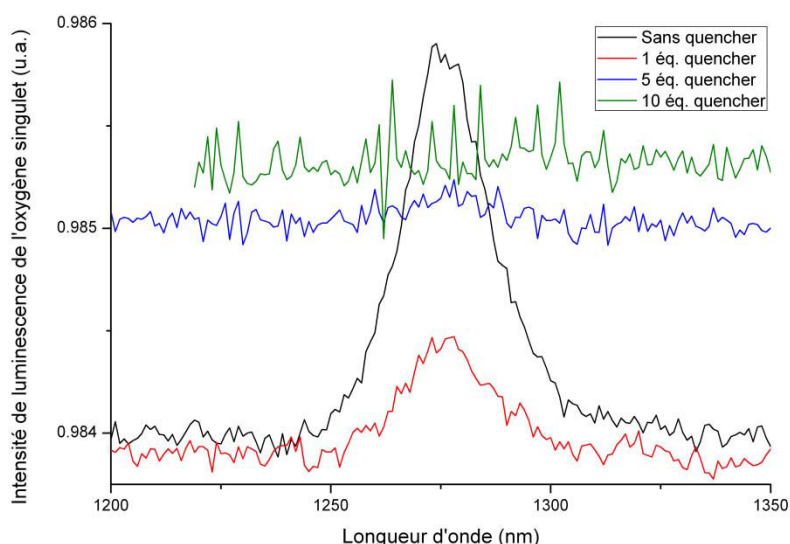


Figure 145 : Spectres superposés des émissions de l'oxygène singulet produit par TPC-GPLGIAGQK en présence de différents taux de *quencher* introduit dans le toluène.

Alors que l'émission de fluorescence n'est pas modifiée lors de l'ajout de taux croissants de caroténoïde dans le milieu, la production d'oxygène singulet diminue et est même annihilée pour l'ajout de 10 équivalents molaires. Ces résultats montrent, en solution, l'efficacité du *quenching*. Ce travail se poursuit notamment avec l'utilisation de nouveaux *quenchers* d' $^1\text{O}_2$.

Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons voulu mettre en avant l'importance que tient l'oxygène singulet dans la PDT, même s'il est indispensable de garder à l'esprit que ce n'est pas la seule espèce phototoxique responsable de la lyse cellulaire. Il n'en reste pas moins un très bon indicateur de l'activité photodynamique d'un PS. Les études *in vitro* et *in vivo* montrent que sa détection est un moyen fiable pour mesurer les dégâts subies par les cellules lors du traitement PDT.

Le développement des *Photodynamic Molecular Beacons* est un concept original et prometteur dans l'amélioration de la PDT, permettant d'augmenter la sélectivité du traitement.

Conclusions & Perspectives

Conclusions & Perspectives

La première thèse de l'équipe PDT à s'intéresser à l'utilisation de nanoparticules de silice pour une thérapie photodynamique antivasculaire, a montré de nombreux points positifs avec des premiers résultats très encourageants ouvrant ainsi le champ à des perspectives prometteuses (même si certains aspects sont encore à explorer, comme les aspects toxicologiques et environnementaux).

Tout d'abord, la faisabilité dans la conception de nouveaux objets nanométriques utilisables en thérapie photodynamique a été démontrée. En effet, l'encapsulation du photosensibilisateur dans une matrice de polysiloxane permet de conserver les propriétés photophysiques de la molécule photosensible et de l'utiliser en milieu aqueux ou biologique. Notamment, la production d'oxygène singulet mesurée de façon quantitative par émission de luminescence de l'oxygène singulet et de façon qualitative permet de prouver que l'oxygène singulet produit est capable de diffuser hors de la matrice de polysiloxane pour oxyder une sonde chimique. Une première validation biologique a permis de montrer une quasi non-toxicité à l'obscurité pour des concentrations en nanoparticules représentatives de celles utilisées pour observer un effet photodynamique sur des cellules MDA-MB-231.

La capacité de ces nanoparticules à être reconnues par le récepteur NRP-1 qui est surexprimé sur les cellules endothéliales activées a été validée. Pour cela, nous avons dû mettre au point la méthodologie du couplage entre le peptide ATWLPPR ainsi que les nombreuses étapes de purification. Nous avons envisagé deux méthodes de couplage :

- ★ Une première consistait à faire le couplage entre les nanoparticules et le peptide sur son support solide de synthèse. Malheureusement, cette technique pourtant séduisante dans sa mise en œuvre a dû être abandonnée à cause d'un contrôle non satisfaisant de la pureté et des proportions de peptide couplé.
- ★ La seconde méthode, en revanche, consistant à purifier le peptide sous forme protégée et à effectuer le couplage en phase liquide a conduit, après optimisation, aux résultats attendus.

L'optimisation a consisté majoritairement à s'assurer que les espèces à éliminer l'étaient bien après les étapes de purification. Les spectroscopies de fluorescence et d'absorbance ont permis de contrôler l'élimination du peptide non couplé notamment et d'estimer la qualité du couplage du peptide sur les nanoparticules. Enfin, à partir de ces premiers lots de nanoparticules fonctionnalisées par une quantité de l'ordre de 4 à 5 peptides par nanoparticule, les tests d'affinité moléculaire pour NRP-1 ont été concluants et même meilleurs que ceux obtenus pour une chlorure liée au peptide ATWLPPR. Cette comparaison nous pousse à envisager un effet de synergie dû à la présence de 4 peptides ATWLPPR pour une nanoparticule. Ces essais doivent néanmoins d'être complétés par des tests *in vitro* de compétition d'incorporation avec du VEGF165 sur des cellules MDA-MB-231. Outre l'affinité, la phototoxicité a aussi conduit à des résultats prometteurs en termes de potentiel applicatif. De façon analogue aux résultats obtenus pour le conjugué PS-peptide, les nanoparticules, fonctionnalisées ou non, ont une toxicité *in vitro* à court terme à l'obscurité pour une concentration en PS supérieur ou égal à 10 $\mu\text{mol/L}$. Pour des concentrations inférieures, l'effet photodynamique est observé avec un effet concentration et fluence dépendant. *In vitro*, il n'y pratiquement pas d'influence de la fonctionnalisation par le peptide sur les résultats de phototoxicité, le temps de contact de 24 h avant irradiation favorisant l'incorporation non-spécifique (ce qui ne sera probablement pas le cas *in vivo*). Afin d'observer un effet d'incorporation

spécifique dû à la présence de peptide en surface des nanoparticules, des essais de compétition, avec des temps de contact plus courts doivent être menés.

Le type de nanoparticules retenu ne répondait cependant pas à un des critères de départ qui est le diagnostic IRM. Suite à des améliorations dans la formation des cœurs d'oxyde de gadolinium et dans la synthèse des nanoparticules, l'équipe lyonnaise a pu développer en parallèle des nanoparticules de plus petite taille renfermant de la TPC et ayant des propriétés de rehaussement de contraste IRM satisfaisantes.

Le second lot testé fourni par le LPCML a constitué une base de travail plus poussée en termes de greffage de la TPC dans la couche de polysiloxane et de fonctionnalisation de surface par le peptide ATWLPPR. Les études spectroscopiques ont permis de déterminer une gamme de taux de greffage de TPC optimal pour ne pas observer de baisse des rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet ainsi que d'une estimation d'un taux « idéal » de fonctionnalisation des nanoparticules par le peptide ATWLPPR.

Après ces optimisations, les études spectroscopiques et biologiques ont permis de confirmer la pertinence de ce lot de nanoparticules avec les paramètres déterminés. De plus, les premiers essais de diagnostic par IRM sur petit animal ont permis de valider la faisabilité d'un traitement PDT guidé par IRM sur petit animal ; ce travail est en cours.

Compte-tenu du grand nombre de paramètres d'influence, une méthodologie de plan d'expériences permettrait de cribler différents lots de nanoparticules fondés sur le type de nanoparticules décrit plus haut. En effet, si nous avons dégagé des gammes de concentration de chaque éléments (TPC, Si, Gd_2O_3 et peptide), plusieurs types de nanoparticules peuvent être synthétisés en considérant différentes valeurs pour chaque élément afin d'en faire ressortir une nanoparticule « idéale ». Ici encore, ces expérimentations sont en cours.

Le domaine des nanotechnologies dispose déjà de nombreuses applications industrielles et fait l'objet d'un soutien important des points de vue recherches fondamentales et finalisées dans les pays développés ; cependant, à l'exemple antérieur des OGM, la Société émet des doutes sur des risques possibles pour la santé des Hommes et sur l'environnement. Dans cette thématique, comme dans d'autres, il est donc légitime d'engager les recherches dans un cadre revisité où le citoyen n'est plus placé « en bout de chaîne ». C'est sur cette nécessité sociale qu'INSIS-CNRS a développé le concept de « Recherche Socialement Responsable » (RSR). Etre responsable, c'est déjà respecter la loi mais c'est également pouvoir prendre une décision en situation d'incertitude. C'est ainsi qu'il existe des « contraintes » introduites par l'Union Européenne, par exemple dans la charte européenne des chercheurs (2005) qui rassemble des éléments de déontologie, d'éthique de la recherche. Ainsi, les fondements de la RSR, éléments des chartes du développement durable, sont les suivants :

- La RSR couvre dans l'activité d'une équipe de recherche les matières sociales et environnementales liées étroitement aux axes et futurs projets de recherche de cette équipe ;

- La RSR n'est pas et ne devrait pas être séparée de la stratégie d'action de l'Unité de Recherche puisqu'il s'agit d'intégrer les préoccupations sociales et environnementales dans les activités ;

- La RSR est un concept volontaire ;

- un aspect important de la RSR est la manière dont les laboratoires interagissent avec leurs parties prenantes internes et externes (« employés », clients, environnement proche, tutelles, partenaires, etc.).

Une liste, non limitative d'actions à ce stade de la réflexion, est présentée ci-après :

- Traçabilité : cet investissement est essentiel pour renforcer la confiance entre partenaires, en particulier avec les entreprises et la Société ;

- Responsabilité : respect de la réglementation relativement aux opérations de recherche : protection des chercheurs et de l'environnement ;
- Respect des lois notamment sur l'éthique ;
- Originalité/nouveauté ;
- Analyse consciente des usages des résultats de la recherche pour la Société ;
- Revisite périodique des différents items en fonction de l'avancée des connaissances scientifiques et de leurs effets ;
- Mission d'alerte.

Ainsi, une équipe/unité de recherche, engagée en «Recherche Socialement Responsable» dans son fonctionnement, doit :

- Respecter en interne des principes «ALARA» (as low as reasonably achievable) ou de précaution généraux ;
- S'engager dans une analyse des connaissances sur les risques pour (re)définir des modes de protection adaptés ;
- Informer les autres laboratoires concernés (mutualisation des progrès).

Dans le contexte de cette thèse le sujet a juste été engagé faute de temps ; il est prévu de l'approfondir dans un autre cadre parce que l'aspect recherche ne peut pas se limiter à une approche réductrice purement scientifique et technique. Il a permis cependant la publication d'un article sur l'utilisation des nanoparticules dans le contexte médical s'appuyant sur ce concept de RSR³⁵⁵.

En cela, le chercheur ne doit pas se couper de la réalité qui l'entoure et être un partenaire de l'évolution des sociétés. Il s'agit d'un élargissement de l'interdisciplinarité en explorant les thèmes définis ci-dessus. Edgar Morin qui prônait l'interdisciplinarité au CNRS³⁵⁶ écrivait : *« Toute connaissance (et conscience) qui ne peut concevoir l'individualité, la subjectivité, qui ne peut inclure l'observateur dans son observation, est infirme pour penser tous problèmes, surtout les problèmes éthiques. Elle peut être efficace pour la domination des objets matériels, le contrôle des énergies et les*

manipulations sur le vivant. Mais elle est devenue myope pour appréhender les réalités humaines et elle devient une menace pour l'avenir humain »³⁵⁷.

Ce sujet de thèse est imprégné d'interdisciplinarité car, comme mentionné plusieurs fois, l'équipe de recherche est construite autour de différentes compétences. Une difficulté est de ne pas négliger un axe de pensée au profit d'un autre et étant chimiste de formation, il m'a fallu apprendre à considérer les différents points de vue afin d'obtenir les résultats présentés dans ce mémoire et c'est sûrement ce qui en fait pour moi la plus grande richesse.

Il y a donc débat entre un approfondissement indispensable et association entre disciplines engagées en vue d'un objectif commun (Cf. Annexe « Interdisciplinarité et travail de thèse »).

Annexe

Matériels & Méthodes

Annexe Matériels & Méthodes

Matériels

Mesure d'absorption UV-visible

L'absorption UV-visible a été mesurée sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin Elmer EZ 210. Cet appareil permet de mesurer l'absorbance ou densité optique (DO) d'une substance en fonction de la longueur d'onde en utilisant la loi de Beer-Lambert-Bouguer (Équation 5).

Équation 5 : Loi de Beer-Lambert-Bouguer.

$$DO_{\lambda} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Nos analyses ont été effectuées en utilisant deux cuves en Quartz d'un centimètre de trajet optique dont une sert pour l'échantillon à analyser et l'autre, servant de référence, comporte le solvant dans lequel l'échantillon est dilué ou dispersé.

Mesure de fluorescence statique

Les spectres de fluorescence ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin-Yvon Horiba S.A.S.) équipé d'une lampe à arc basse pression contenant du xénon (450 W), d'un double monochromateur à l'excitation, de deux doubles monochromateurs à l'émission et d'un compartiment échantillon thermostaté à par effet Peltier. La température de consigne a été maintenue à 25 °C. Nos études se faisant de manière classique (analyse à 90 °), il est nécessaire, pour effectuer des mesures quantitatives, de se placer à une concentration en chromophore adéquate. En effet, l'existence de l'effet de peau nous impose d'utiliser une concentration de produit pour laquelle l'absorbance est de l'ordre de 0,2

(homogénéité de fluorescence par rapport au cône de réception du monochromateur d'analyse).

Pour nos analyses, nous avons utilisé des cuves en quartz d'un centimètre de parcours optique.

Pour le calcul des rendements quantiques de fluorescence (Équation 6), la référence utilisée est la TPP qui possède un spectre d'émission dans la même zone spectrale (600 – 750 nm) que les solutions à analyser. L'utilisation de cette référence permet de ne pas tenir compte des corrections de la fonction d'appareil. En revanche, une correction de l'indice de réfraction doit être appliquée si l'échantillon et la référence ne sont dilués dans le même solvant.

Équation 6 : Formule utilisée pour le calcul des rendements quantiques de fluorescence.

$$\phi_f = \phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2$$

Mesure de fluorescence résolue en temps

Les mesures de temps de vie de fluorescence ont été effectuées par la technique de comptage de photon unique corrélé en temps (*Time Correlated Single Photo Counting*, TCSPC). Pour ces mesures, une diode laser pulsée à 407 nm (diode laser pulsée LDH-P-C-405 PicoQuant GmbH de 25 mW de puissance moyenne couplée à un *driver* PDL 800-D PicoQuant GmbH) a été utilisée comme source d'excitation. Une photodiode à avalanches SPCM-AQR-15, EG&G et un filtre passe-haut 650 nm ont été utilisés pour la détection. Le système d'acquisition est un module PicoHarp 300 couplé un routeur 4 canaux PHR-800 qui permet une acquisition sur plusieurs voies de détection selon un mode d'étiquetage de chacun des photons comptés (*Time-Tagged Time-Resolved*, TTTR). La résolution du système peut atteindre 4 picosecondes par canal sur 4096 canaux en fonction de la fréquence de tir utilisée par la diode laser

(32,5 kHz à 80MHz). Le logiciel FluoFitPro V 4.2 (PicoQuant GmbH) est l'outil qui a permis le calcul de l'estimation des temps de vie de fluorescence. Il est issu du traitement des données brutes et de la déconvolution des courbes de demi-vie par rapport à la réponse impulsionnelle du système (IRF obtenue par diffusion directe de la source sur le détecteur).

Mesure des rendements quantiques de production d'oxygène singulet

Ces mesures ont été effectuées sur un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Jobin-Yvon Horiba S.A.S.). L'excitation a été assurée par une lampe à arc basse pression contenant du xénon (450 W) et la détection à 1270 nm a été effectuée à l'aide d'un monochromateur double réseau PTI S/N 1565 et d'un détecteur IR InGaAs, refroidi à l'azote liquide, de la société *Electro Optical Systems INC* (modèle DSS-16A020L). Le compartiment échantillon est thermostaté par effet Peltier. La température de consigne a été maintenue à 25 °C

Le Rose Bengale dans l'éthanol a été utilisé comme référence pour le calcul des rendements quantiques de production d'oxygène singulet (Équation 7). Pour des mesures quantitatives, il faut se placer dans le même solvant que la référence car la concentration d'oxygène dissous varie fortement d'un solvant à l'autre.

Équation 7 : Formule utilisée pour le calcul des rendements quantiques de production d'oxygène singulet.

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO}$$

Les échantillons étudiés devaient être préparés avec une densité optique de l'ordre de 0,2 à la longueur d'onde d'excitation.

Mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière

Ces mesures ont été faites à l'aide d'un Zetasizer NanoZS (Malvern) équipé d'un laser He-Ne à 633 nm. Une filtration des échantillons sur une membrane en cellulose à porosité de 0,2 μm était effectuée avant chaque mesure.

Mesure de potentiel Zêta

Les mesures des potentiels Zêta des nanoparticules ont été effectuées sur un Zetasizer NanoZS (Malvern) équipé d'un laser He-Ne à 633 nm. Avant mesure, les échantillons ont été dispersés dans une solution saline de NaCl à 0,01 mol/L et ajustées au pH désiré par ajout de solution de HCl ou de NaOH.

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été effectués par Olivier Fabre du LCPM, service commun de RMN à l'aide d'un Bruker 300 MHz. Les modes appelés COSY et TOCSY permettent de mesurer les couplages en hydrogène à plus de trois liaisons pour le TOCSY et moins de trois liaisons pour le mode COSY. A l'aide d'une table de référence des figures 2D des acides aminés, on peut attribuer les signaux des protons et assurer l'enchaînement souhaité des acides aminés du peptide. Une autre technique de RMN 2D est la NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), qui n'a pas été utilisée ici, et qui permet d'observer les couplages en hydrogène à travers l'espace et non plus à travers les liaisons chimiques de la molécule. Ces techniques sont explicitées dans la Figure 146.

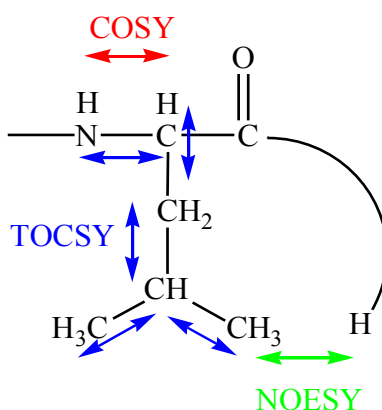


Figure 146 : Représentation des différentes techniques de RMN 2D.

Synthèse peptidique sur support solide

Les synthèses de peptide sur support solide ont été effectuées au LCPM sur un synthétiseur automatique ResPepXL (Intavis AG) en stratégie Fmoc.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques CCM qui ont été employées sont à gel de silice 60 F254 (Merck Chimie S.A.S.).

Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les séparations par HPLC ont été effectuées sur une HPLC préparative Varian ProStar PrepStar 218 en phase inverse, colonne C18, 5 μm , 250 x 21,2 mm, (Varian Pursuit). La détection est assurée à la fois par un détecteur de fluorescence ProStar 363 et une barrette de diode ProStar 335.

Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses LC-MS ont été faites à l'aide d'un système Shimadzu composé d'un module de chromatographie liquide haute-performance LC-20AB, un module

de détection par barrette de diode SPD-M20A et d'un spectromètre de masse LCMS 2010-EV. La source d'ionisation employée est une source ESI (*Electron Spray Ionization*).

Dialyse

Les dialyses ont été effectuées avec des boudins de dialyse (SpectraPor) avec un seuil de coupure à 5000 Da en cellulose.

Ultrafiltration

Les étapes d'ultrafiltration ont été effectuées à l'aide de tubes Vivaspın en cellulose avec un seuil de coupure à 5000 Da.

La centrifugeuse utilisée est une Heraeus Labofuge 400.

Produits chimiques

Les solvants et les réactifs ont été achetés chez différents fournisseurs (Novabiochem, Accros, Merck, Invitrogen, SpectraPor, Carlo Erba, Sigma Aldrich).

Les solvants de qualité HPLC sont des Chromasolv de chez Sigma Aldrich.

Les solvants de qualité spectroscopique proviennent de chez Carlo Erba.

Synthèses

★ 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, P1COOH

Du pyrrole (15 mmol = 4 éq., 1 g), du benzaldéhyde (11,25 mmol = 3 éq., 1,14 mL) et du carboxybenzaldéhyde (3,75 mmol = 1 éq., 562 mg) sont dissous dans 1,5 L de dichlorométhane (DCM) et sous argon. Le mélange est alors agité durant 15 minutes. 185 μ L (1,5 mmol) de BF₃ étherate sont ajoutés à la solution. Après 2 heures d'agitation supplémentaire, 2,77 g (11,3 mmol) de tétrachloro-1,4-benzoquinone (*p*-chloranil), est ajouté au mélange qui est ensuite porté à reflux pendant 2 heures à l'abri de la lumière. Après réaction, le brut réactionnel est mélangé à de la silice et au DCM afin d'éliminer les coproduits de réactions. Les goudrons, polymères de pyrrole à l'aspect noir sont notamment adsorbés sur la silice et non désorbés par le DCM. Après filtration et plusieurs lavages de la silice avec CH₂Cl₂, la solution restante est évaporée pour conduire à un solide violet foncé. Le produit est purifié sur deux colonnes chromatographiques de silice successives (élutions : CH₂Cl₂/éthanol, 97/3, et acétone/éthanol, 90/10, v/v). La masse de produit obtenue est de 490 mg sous forme d'une poudre violette.

Rendement : 20 %, **Rf** : 0,40 (SiO₂, 4/96, EtOH/CH₂Cl₂, v/v), **RMN** ¹H (300 MHz) (CDCl₃) : δ (ppm) -2,76 (s, 2 H, NH), 7,77 (s, 9 H, ArH), 8,22 (3, 6 H, ArH), 8,36, 8,52 (4 H, d, ArH, *J* = 8,2 Hz), 8,86 (m, 8 H, pyrrole-H), **Masse** : MS (MALDI-TOFMS) *m/z* : 658,1 Da, **HPLC analytique** : T_R (C₁₈, 5 mm, 250 x 4,6 mm) = 27 min, débit 1 mL/min, gradient : MeOH/[H₂O, 0,1 % TFA], 75/25 en 15 mn, puis 100 % MeOH, **mp** : 260°C.

★ 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine, TPC

200 mg de P1COOH (0,304 mmol), 283 mg (5 éq.) de *p*-toluènesulfonylhydrazide (*p*-TSH, agent réducteur), 420 mg (10 éq.) de carbonate de potassium anhydre et 20 mL de pyridine fraîchement distillée sont mélangés dans un tricol. La solution est placée sous agitation magnétique, chauffée à reflux à 107°C sous courant d'azote durant 7 heures à l'abri de la lumière. Toutes les heures, les mêmes quantités de *p*-TSH et de K₂CO₃ qu'initialement, dilués dans 2 mL de pyridine, sont ajoutées. Après 7 ajouts successifs, la solution est laissée une nuit sous agitation et à reflux.

30 mL d'acétate d'éthyle et 15 mL d'eau distillée sont ajoutés et la solution est maintenue 1 heure à reflux à 90°C.

Une fois le mélange refroidi, la phase organique, acétate d'éthyle, est extraite et lavée avec 40 mL d'acide chlorhydrique (10%), 40 mL d'eau distillée et 40 mL d'une solution aqueuse saturée en Na₂CO₃. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄. A ce stade de la synthèse, le produit obtenu contient à la fois la chlorine et la bactériochlorine, les deux produits de réduction. Une étape de ré-oxydation sélective est donc obligatoire pour oxyder ainsi la bactériochlorine en chlorine. A la phase organique, sont ajoutés 30 mg de tétrachloro-1,2-benzoquinone (*o*-chloranil). L'ensemble est agité durant 15 min à température ambiante. On réédite l'opération jusqu'à disparition de la bande d'absorption caractéristique de la bactériochlorine à ~740 nm. Une fois la réaction terminée, la phase organique est lavée successivement avec 40 mL d'eau distillée, 40 mL d'une solution aqueuse de NaOH à 0,1 M, 40 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, puis le solvant est évaporé.

Le produit est purifié par HPLC. L'échantillon solubilisé dans un minimum de DMSO puis dispersé dans le méthanol et ensuite filtré sur des membranes en PTFE de 0,2 µm avant injection. Colonne : C₁₈ phase inverse (5 µm, 150 x 21,2 mm),

Gradient : 0-15 min, 75 % [MeOH] / 25 % [H₂O, 0.1%TFA], 15-30 min, 100 % MeOH, débit : 21 mL/min, t_R = 14-17 min. La masse de produit obtenue est de 40 mg sous forme d'une poudre violette.

Rendement : 20%, **Rf** : 0,31(SiO₂, CH₂Cl₂/EtOH, 96/4, v/v), **RMN ¹H** (300 MHz) (DMSO-d₆) : δ (ppm) -1,76 et -1,78 (s, 2 H, NH), 4,20 (s, 4 H, CH₂-CH₂ liaison réduite de la chlorine), 7,77 (s, 9 H, ArH), 8,20 (s, 6 H, ArH), 8,31, 8,53 (4 H, m, ArH), 8,80 (m, 6 H, pyrrole-H), **Masse** : MS (MALDI-TOFMS) m/z : 660,1 Da.

★ Synthèse du dérivé succinimide de la TPC, TPC-NHS

50 mg de TPC (0,076 mmol) sont solubilisés dans 3 mL de DCM préalablement distillé. 1,1 éq. de *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 0,084 mmol, 9,7 mg) et 1,1 éq. *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 0,084 mmol, 17,3 mg) sont ajoutés. 2 éq. de 4-diméthylaminopyridine sont ajoutés au milieu. La réaction est maintenue sous atmosphère inerte, à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 4 h. La réaction est suivie par CCM dans un éluant CH₂Cl₂/MeOH, 97/3, v/v.

Le produit de réaction est ensuite purifié sur colonne de silice avec un éluant à CH₂Cl₂/MeOH, 97/3, v/v. Le premier produit est la TPC-NHS et est obtenu avec un **rendement** de 85 %, 49 mg sous forme de poudre violette.

Rf = 0,9 CH₂Cl₂/MeOH, 97/3, v/v, **RMN ¹H** (300 MHz) (CDCl₃) : δ (ppm) -1,50 (s, 1 H, NH), -1,36 (s, 1 H, NH), 3,00 (s, 4 H, NHS), 4,15 (m, 4 H, CH₂-CH₂ liaison réduite de la chlorine), 7,77 (m, 9 H, ArH), 8,22 (3, 6 H, ArH), 8,36, 8,52 (4 H, m, ArH), 8,86 (m, 6 H, pyrrole-H), **Masse** : MS (ESI) m/z : 758,30 Da.

★ Peptide ATWLPPR protégé

La synthèse peptidique sur support solide est effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatisé ResPepXL (Intavis AG) en stratégie Fmoc.

La synthèse est réalisée dans un réacteur de synthèse, comportant un fritté, contenant une résine insoluble. La résine commerciale (Novabiochem) utilisée est une résine chlorotriptyl, Fmoc-Arg(Pbf)-Trt, et est donnée avec un taux de greffage de 0,58 mmol de sites réactionnels pour 1 gramme de résine. Cela revient à utiliser 345 mg de résine par réacteur. La masse de chaque acide aminé à ajouter (3 équ.) est donnée dans le Tableau 17. Toutes les étapes de couplage et de déprotection se font dans la *N,N*-diméthylformamide, DMF.

Tableau 17 : Quantités d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée.

Acide aminé	Formulation	Masse à ajouter
Alanine	Fmoc-NH-Ala-OH	1278 mg
Thréonine	Fmoc-NH-Thr(tBu)-OH	1632 mg
Tryptophane	Fmoc-NH-Trp(Boc)-OH	2162 mg
Leucine	Fmoc-NH-Leu-OH	1451 mg
Proline	Fmoc-NH-Pro-OH	2770 mg

Les quantités d'agent de couplage, de *capping* et de solvant de lavages sont données dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Quantités d'agents de couplage, de *capping* et de solvant de lavages à ajouter.

Molécule	Action	Masse ou volume de molécule	Volume de DMF
HBTU	Activateur	9,3 g	40,6 mL
NMM	Base	5,5 mL	6,8 mL
NMP	Aide à la solubilisation	1 mL	-
DCM	Solvant de lavage	337 mL	-
MeOH	Solvant de lavage	145 mL	-
Anhydride acétique	Capping	3,7 mL	69 mL
Pipéridine	Déprotection du Fmoc	28,8 mL	116 mL

La pipéridine utilisée est à 20 % et l'anhydride acétique à 5 % en volumes dans le DMF.

La résine en fin de synthèse est séchée sous vide poussé durant 1 nuit. Le peptide est clivé de son support solide par ajout d'un mélange d'acide acétique, de trifluoroéthanol et de dichlorométhane, AcOH/TFE/DCM, 2/2/6, v/v/v, pendant 2 h. Ce mélange permet de cliver le peptide du support solide sans déprotéger les chaînes latérales. La résine est lavée successivement 3 fois avec ce mélange, 3 fois avec du méthanol puis 3 fois avec du DCM. La solution est évaporée sous vide en ajoutant plusieurs fois de l'hexane afin d'éliminer un maximum d'acide acétique. Le produit obtenu est ensuite lyophilisé puis redilué dans un mélange DMSO/ACN, 1/9, v/v pour être purifié par HPLC.

HPLC : Colonne C₁₈, 5 µm (150 x 21,2 mm) (Varian Pursuit), gradient présenté dans le Tableau 19, détection UV à 280 nm et fluorescence, $\lambda_{exc.} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 350 \text{ nm}$. Pic majoritaire à 15,3 minutes.

Tableau 19 : Gradient d'élution pour la purification d'ATWLPPR protégé.

Temps (min)	% ACN	% [H ₂ O, 0,1 % TFA]
0	40	60
15	50	50
17	100	0
25	100	0

LC-MS : Colonne C18, 5 µm (150 x 21,2 mm) (Varian Pursuit), gradient présenté dans le Tableau 19, détection (Figure 147) UV à 280 nm, détection MS (ESI) : m/z entre 1243 et 1253 ; m/z entre 620 et 630 nm.

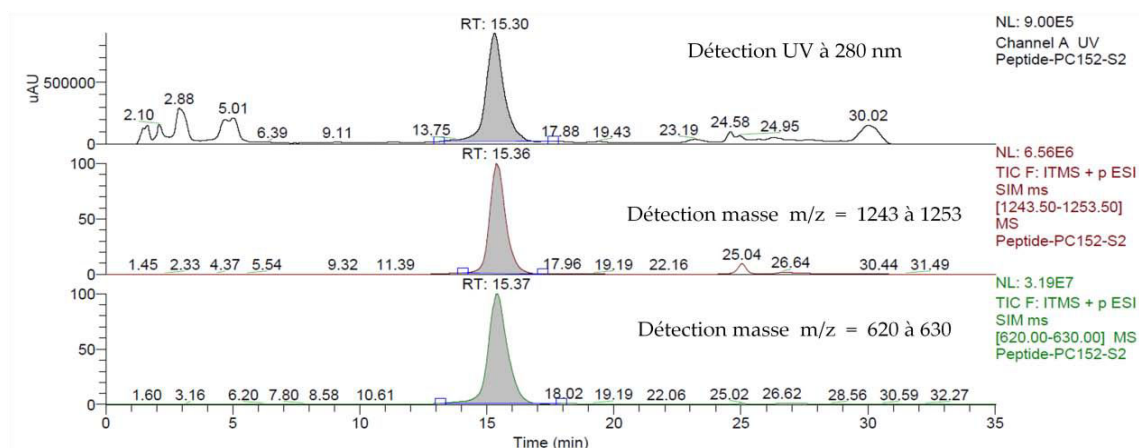


Figure 147 : Profil LC-MS d'ATWLPPR protégé, colonne C₁₈, 5µm (250 x 10 mm), gradient en Tableau 3, détections : UV à 280 nm (haut), MS (ESI) : m/z entre 1243 et 1253 (milieu) et m/z entre 620 et 630 (bas).

RMN : Les spectres RMN ont été effectués dans le DMSO-d₆ et les déplacements chimiques sont présentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide ATWLPPR protégé.

	N-H	α-H	β-H	γ-H	δ-H	Autres hydrogènes
Ala	-	3,95	1,05 ; 1,03	-	-	-
Thr	8,46	3,84	4,09	0,92	-	tBu = 1,12
Trp	7,59	4,71	3,06	-	-	Boc = 1,64 ; 5H = 6,95 ; 2H, 6H = 6,97 ; 7H = 7,30 ; 4H = 7,53
Leu	7,91	4,53	1,38	1,48	0,85	-
Pro	-	4,65	2,08 ; 1,89	1,81	3,43	-
Pro	-	4,45	2,02 ; 1,78	1,92	3,61	-
Arg	7,98	4,13	1,82 ; 1,56	1,42	3,03	ε-NH = 7,52 Pbf = 1,31 ; 1,41 ; 2,14 ; 2,20

★ Peptide LWRPTPA protégé

La synthèse de ce peptide se fait sur le même synthétiseur que précédemment avec les mêmes paramètres d'appareil et la même méthode de synthèse (seul l'enchaînement des acides aminés est modifié dans la méthode).

La synthèse est réalisée dans un réacteur de synthèse, comportant un fritté, pouvant contenant une résine insoluble. La résine commerciale (Novabiochem) utilisée est une résine chlorotriptyl, Fmoc-Ala-Trt, et est donnée avec un taux de greffage de 0,68 mmol de sites de réactions pour 1 gramme de résine. Cela revient à utiliser 294 mg de résine par réacteur (100 μ mol). La masse de chaque acide aminé à ajouter (3 éq.) est donné dans le Tableau 17. Toutes les étapes de synthèse se font dans le *N,N*-diméthylformamide, DMF.

Tableau 21 : Quantités d'acides aminés à ajouter pour la synthèse automatisée.

Acide aminé	Formulation	Masse à ajouter
Arginine	Fmoc-NH-Arg(Pbf)-OH	1332 mg
Thréonine	Fmoc-NH-Thr(tBu)-OH	816 mg
Tryptophane	Fmoc-NH-Trp(Boc)-OH	1081 mg
Leucine	Fmoc-NH-Leu-OH	726 mg
Proline	Fmoc-NH-Pro-OH	1385 mg

Les quantités d'agent de couplage, de *capping* et de solvant de lavages sont données dans le Tableau 18.

Tableau 22 : Quantités d'agents de couplage, de *capping* et de solvant de lavages à ajouter.

Molécule	Action	Masse ou volume de molécule	Volume de DMF
HBTU	Activateur	4,7 g	20,3 mL
NMM	Base	2,8 mL	6,1 mL
NMP	Aide à la solubilisation	0,51 mL	-
DCM	Solvant de lavage	170 mL	-
MeOH	Solvant de lavage	72,8 mL	-
Anhydride acétique	Capping	1,8 mL	36,2 mL
Pipéridine	Déprotection du Fmoc	12 mL	60 mL

La pipéridine utilisée est à 20 % et l'anhydride acétique à 5 % en volumes dans le DMF.

La résine en fin de synthèse est séchée sous vide poussé durant 1 nuit. Le peptide est clivé de son support solide par ajout d'un mélange d'acide acétique, de trifluoroéthanol et de dichlorométhane, AcOH/TFE/DCM, 2/2/6, v/v/v, pendant 2 h. Ce mélange permet de cliver le peptide du support solide sans déprotéger les chaînes latérales. La résine est lavée successivement 3 fois avec ce mélange, 3 fois avec du méthanol puis 3 fois avec du DCM. La solution est évaporée sous vide en ajoutant plusieurs fois de l'hexane afin d'éliminer un maximum d'acide acétique. Le produit obtenu est ensuite lyophilisé puis redilué dans un mélange DMSO/ACN, 1/9, v/v pour être purifié par HPLC.

HPLC : Colonne C₁₈, 5 µm (150 x 10 mm) (Delta Pak), gradient voir Tableau 19, détection UV à 280 nm (Figure 148). t_R = 16,4 min (pic majoritaire LWRPTPA protégé).

Tableau 23 : Gradient d'élution pour la purification d'ATWLPPR protégé.

Temps (min)	% ACN	% [H ₂ O, 5 % ACN]
0	5	95
25	70	30
30	70	30
35	5	95

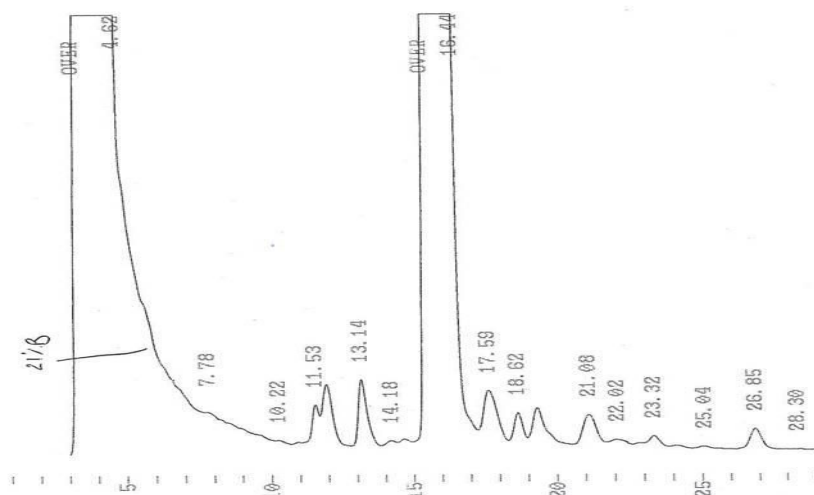


Figure 148 : Chromatogramme HPLC de LWRPTPA protégé brut. Détection UV à 280 nm.

RMN ^1H : Les spectres RMN ont été effectués sur une RMN Bruker 300 MHz par le service commun de RMN, dans le DMSO- d_6 et les déplacements chimiques sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide LWRPTPA protégé.

	N-H	α -H	β -H	γ -H	δ -H	Autres hydrogènes
Leu	-	3,68	1,38	1,51	0,83	-
Trp	7,89	4,66	3,06 ; 2,99	-	-	Boc = 1,67 ; 5H = 6,98 ; 2H,6H = 6,97 ; 7H = 7,32 ; 4H = 7,58
Arg	8,09	4,23	1,80 ; 1,58	1,45	3,07	ϵ -NH = 7,17 Pbf = 1,34 ; 1,42 ; 2,14 ; 2,25
Pro	-	4,19	2,08 ; 1,99	1,81	3,58	-
Thr	8,46	4,00	4,06	1,05	-	tBu = 1,11
Pro	-	4,52	2,12 ; 1,78	1,92	3,52	-
Ala	7,09	4,31	1,49	-	-	-

MS (ESI) : en injection directe du pic majoritaire obtenu en HPLC (Figure 147). Caractérisation du pic de l'ion moléculaire M^+ à 1249 g/mol et de l'ion chargé $(M + 2H)^{2+}$ à $m/z = 825$.

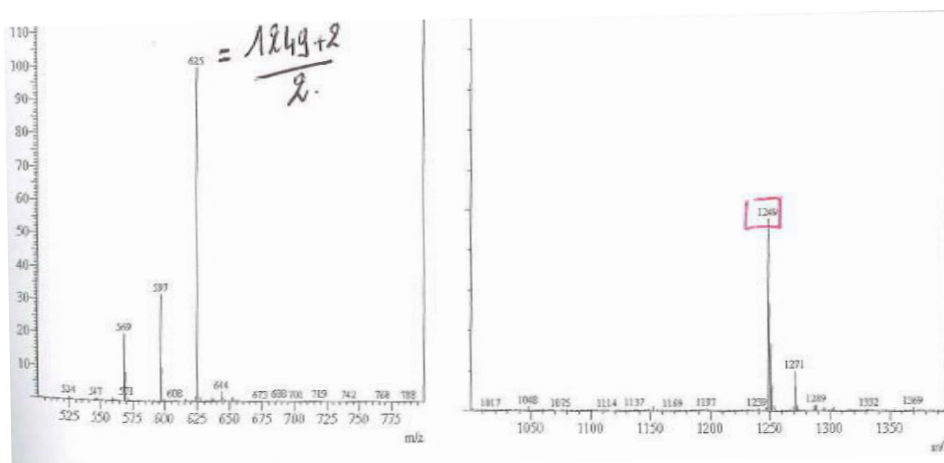


Figure 149 : Spectres de masses (ESI) du pic majoritaire (LWRPTPA protégé) ; gauche : $(M + 2)/2 = 625$ g/mol ; droite : pic de l'ion moléculaire à 1249 g/mol.

★ NP-TPC-PEG – ATWLPPR

$1,67 \times 10^{-8}$ mol de nanoparticules NP-TPC-PEG sont dispersées dans 7 mL de diméthylformamide (DMF). Les fonctions acides carboxyliques des PEG sont activées par un mélange HOBt/HBTU (5 éq., $8,3 \times 10^{-8}$ mol, 12 μ g de HOBt, 5 éq., $8,3 \times 10^{-8}$ mol, 32 μ g de HBTU) en présence de DIEA (10 μ L) pendant 10 min. 5 éq. de peptide protégé sont ajoutés ($8,3 \times 10^{-8}$ mol, 105 μ g) et la solution est laissée sous agitation pendant 18 h à l'abri de la lumière. Le DMF est éliminé au maximum par évaporation puis 5 mL de TFA sont ajoutés et la réaction de déprotection des chaînes latérales du peptide est laissée pendant 2 h sous agitation et à l'abri de la lumière. 5 mL d'eau sont ajoutés. La solution est évaporée au maximum afin d'éliminer le TFA. Les étapes de purification afin d'éliminer les résidus de TFA, de DMF et de produits n'ayant pas réagi sont les suivantes :

- Dialyse sur membrane 5 kDa en cellulose contre un mélange eau/TFA, 20/1 durant 2 à 3 h.
- Dialyse sur membrane 5 kDa en cellulose contre l'eau ultra-pure durant 2 à 3 h.
- 10 cycles d'ultrafiltrations (Vivaspin®, membrane cellulose 5 kDa) de 7 min à 3500 rpm

Ces derniers cycles sont effectués afin d'assurer l'élimination des sous-produits et pour reconcentrer l'échantillon.

★ NP-TPC-DTPA – ATWLPPR et NP-TPC-DTPA – LWRPTPA

Les protocoles de couplage d'ATWLPPR et de LWRPTPA sur les nanoparticules NP-TPC-DTPA sont identiques.

$1,18 \times 10^{-8}$ mol de nanoparticules NP-TPC-DTPA sont dispersées dans 5 mL d'un mélange eau/DMSO, 2/1. Les fonctions acides carboxyliques des DTPA de surface sont activées en par un mélange EDC/HBTU équimolaire (5 éq., $4,2 \times 10^{-8}$ mol, 9 µg d'EDC, 5 éq., $4,2 \times 10^{-8}$ mol, 32 µg de HBTU) en présence de DIEA (10 µL) pendant 10 min. 5 éq. de peptide protégé (ATWLPPR ou LWRPTPA) sont ajoutés ($4,2 \times 10^{-8}$ mol, 105 µg) pendant 18 h sous agitation et à l'abri de la lumière. Le DMSO et l'eau sont éliminés au maximum par évaporation puis 5 mL de TFA sont ajoutés et la réaction de déprotection des chaînes latérales du peptide est laissée pendant 2 h sous agitation et à l'abri de la lumière. Ensuite 5 mL d'eau sont ajoutés puis on évapore au maximum afin d'éliminer du TFA. Les étapes de purification afin d'éliminer les résidus de TFA, de DMF et de produits n'ayant pas réagi sont les suivantes :

- Dialyse sur membrane 5 kDa en cellulose contre un mélange eau/TFA, 20/1 durant 2 à 3 h.
- Dialyse sur membrane 5 kDa en cellulose contre l'eau ultra-pure durant 2 à 3 h.
- 10 cycles d'ultrafiltrations (Vivaspin®, membrane cellulose 5 kDa) de 7 min à 3500 rpm
- Ces derniers cycles sont effectués afin d'assurer l'élimination des sous-produits et pour reconcentrer l'échantillon.

★ Peptide GPLGIAGQK

La synthèse de ce peptide est effectuée sur le même synthétiseur que celui décrit précédemment. La résine utilisée est une résine Wang-Lys(Boc)-Fmoc (150 mg, Novabiochem) à 0,67 sites de réaction par gramme de résine (100 μ mol de sites de réaction) et les quantités d'acides aminés sont résumées dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Quantités d'acides aminés utilisées pour la synthèse de GPLGIAGQK.

Acide aminé	Formulation	Masse à ajouter
Glutamine	Fmoc-NH-Gln(Trt)-OH	224 mg
Glycine	Fmoc-NH-Gly-OH	160 mg
Alanine	Fmoc-NH-Ala-OH	58 mg
Isoleucine	Fmoc-Ile-OH	75 mg
Proline	Fmoc-NH-Pro-OH	69 mg

Après synthèse du peptide, la résine est séchée sous vide poussé pendant 1 nuit. Un prélèvement de produit passé en LC-MS, en infusion directe (ESI) a permis de confirmer la présence du peptide avec une masse de 839,49 Da. La RMN de l'échantillon nous confirme que le produit synthétisé est bien GPLGIAGQK, dont les déplacements chimiques sont présentés dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Déplacements chimiques des différents protons du peptide GPLGIAGQK.

	N-H	α -H	β -H	γ -H	δ -H	Autres hydrogènes
Gly	4,33	3,8 ; 3,8	-	-	-	-
Pro	4,33	2,05 ; 1,83	1,91	3,70	-	-
Leu	8,00	4,52	1,6 ; 1,38	1,60	0,85	-
Gly	-	3,8 ; 3,8	-	-	-	-
Ile	-	-	-	-	-	-
Ala	8,01	4,33	1,17 ; 1,15	8,01	4,33	-
Gly	-	3,8 ; 3,8	-	-	-	-
Gln	8,23	4,31	2,14 ; 1,97	2,37 ; 2,35	δ NH ₂ = 7,23 ; 6,77	

Ensuite l'étape de greffage de la TPC-NHS sur le peptide sur support solide est présentée ci-après.

★ TPC – GPLGIAGQK

4 mL de DCM sont introduit dans le réacteur contenant le peptide GPLGIAGQK, puis 1,1 éq. de TPC-NHS sont introduits dans le réacteur (83,4 mg, 110 μ mol) et 500 μ L de triéthylamine. La réaction est laissée durant 14 h à l'abri de la lumière et sous agitation latérale.

Après réaction, on élimine la TPC-NHS n'ayant pas réagi et on lave la résine 3 fois au DCM. La résine est ensuite séchée sous vide poussé durant 1 nuit puis on clive le conjugué TPC-GPLGIAGQK de la résine en ajoutant 4 mL de TFA pendant 2 h. Ensuite, le produit obtenu est lyophilisé et en cours de purification par HPLC.

MS (ESI) : Pic de l'ion moléculaire $m/z = 1483,9$ Da (Figure 150).

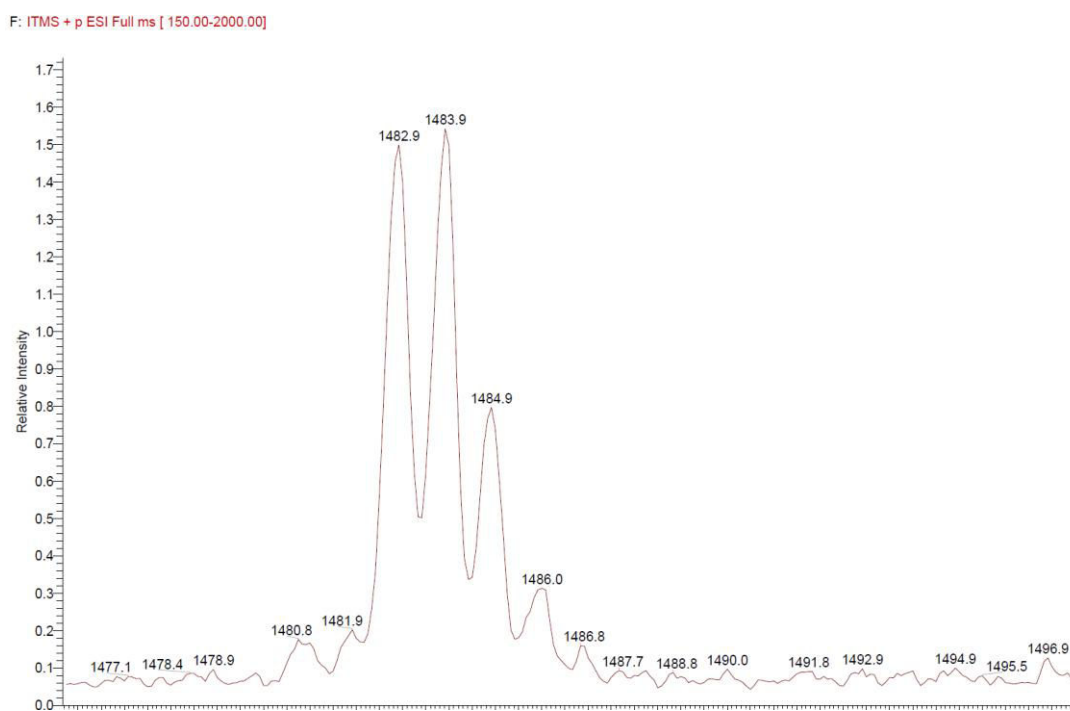


Figure 150 : Spectre de masse (ESI) du brut réactionnel. Pic de l'ion moléculaire à 1483,9 Da.

★ Synthèse du Quencher de type caroténoïde

Bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (2)

Dans un tricol inerté sous N₂ et surmonté d'un réfrigérant, 2,06 g de méthyl- α -bromo-*p*-toluate (8,74 mmol) et 2,30 g de triphénylphosphine (8,74 mmol) sont dilués dans 100 mL de toluène sec et porté à reflux durant 2 h. Après l'avoir laissé refroidir, le mélange réactionnel est filtré sur fritté sous vide en lavant avec du toluène et on récupère un solide blanc (*m* = 2,5 g). Le produit est obtenu avec 62 % de rendement.

RMN ¹H (300 MHz) (CDCl₃) : δ (ppm) 3,90 (s, 3 H, CH₃), 5,71 (d, ²*J*_{PH} = 16 Hz, 2 H, CH₂), 7,20-8,00 (m, 12 H, H_{aryl}).

7'-Apo-7'-(4-carbométhoxyphenyl)- β -carotène, Q-COOMe (4)

Dans un tricol inerté sous N₂ et équipé d'un réfrigérant, on place 1 g de 8'-apo- β -caroténal (2,4 mmol), 50 mL de DMSO, 1,4 g de bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (2,9 mmol) et 0,17 g de NaOMe (3,1 mmol). La suspension est chauffée à 80°C sous N₂. Après 16 h, une quantité supplémentaire de bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (1,2 g, 2,4 mmol) et de NaOMe (130 mg, 2,4 mmol) sont ajoutées et le mélange réactionnel est de nouveau agité à 80°C pendant 16 h. Le mélange réactionnel est jeté dans 800 mL de diéther. La phase organique est lavée 6 fois avec 150 mL d'eau pour enlever le DMSO, puis séchée sur MgSO₄, concentrée sous vide pour fournir le produit pur sous forme d'une poudre orangée-rouge après recristallisation dans un mélange CH₂Cl₂/méthanol (*m* = 1,1 g).

Rendement : 85%, **RMN ¹H** (300 MHz) (CDCl₃) : δ (ppm) 1,03 (s, 6 H, CH₃), 1,10-1,80 (m, 6 H, CH₂), 1,72 (s, 3 H, CH₃), 1,98 (s, 9 H, CH₃), 2,06 (s, 3 H, CH₃), 6,10-7,00 (m, 14 H, H_{vinyl}), 7,05 (d, ²*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2 H, H_{aryl}) et 8,05 (d, ²*J*_{HH} = 8,3 Hz, 2 H, H_{aryl}).

7'-Apo-7'-(4-carboxy)- β -carotene, Q-COOH (5)

Dans un réacteur de Schlenk inerté sous N_2 , on place 110 mg de l'ester (0,2 mmol) dans 16 mL d'un mélange THF/MeOH 3:1. 2 mL d'une solution aqueuse de KOH 10% sont ajoutés et le mélange réactionnel est placé sous agitation pendant 18 h à température ambiante. 10 mL d'un mélange chloroforme/HCl (pH 1-2) est ajouté. La phase aqueuse est extraite au chloroforme jusqu'à extraction complète du carotène. Les phases organiques combinées sont séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous vide pour fournir le produit pur sous forme d'une poudre orangée-rouge après recristallisation dans un mélange DCM/éther de pétrole (m = 97 mg).

Rendement : 91%, **RMN 1H** (300 MHz) ($CDCl_3$) : δ (ppm) 1,03 (s, 6 H, CH_3), 1,40-2,10 (m, 6 H, CH_2), 1,72 (s, 3 H, CH_3), 1,99 (s, 9 H, CH_3), 2,06 (s, 3 H, CH_3), 6,00-7,00 (m, 14 H, H_{vinyl}), 7,40 (m, 2 H, H_{aryl}) et 8,10 (m, 2 H, H_{aryl}).

Annexe

« Interdisciplinarité et
travail de thèse »

par Jean-Claude André

Annexe « Interdisciplinarité et travail de thèse », par Jean-Claude André^{358, 359}.

Durant ce travail de thèse, j'ai été amené à discuter avec les permanents de l'équipe PDT sur l'articulation entre recherche menée dans le cadre d'une thèse, vue pour une part importante sous forme de maîtrise et d'approfondissements de concepts et activité sur des « objets ». Cette dernière est par essence interdisciplinaire et inter-partenariale et conduit à des approches apparemment disjointes et qui peuvent faire débat. Jean Claude André en charge des aspects recherche socialement responsable au CNRS-INSIS a accepté de me fournir quelques réflexions sur ce sujet, réflexions présentées ci-après.

- : - : -

Dans l'esprit, une thèse est une proposition ou une théorie que l'on tient pour vraie et que l'on soutient par une argumentation pour la défendre contre d'éventuelles objections de natures diverses : originalité de la problématique, expérimentation, modèle théorique, conclusions, etc. Il s'agit d'une proposition ou d'une série de propositions que le candidat s'engage à soutenir publiquement dans une université. Le travail doit être présenté sous forme d'ouvrage, le manuscrit, exposant une recherche scientifique normalement originale et ses résultats dans un établissement d'enseignement supérieur habilité, soumis à soutenance publique devant un jury pour l'obtention du grade de docteur (même si, pour des raisons de confidentialité, les personnes présentes seront amenées à signer une clause de non communication à tiers d'informations issues de ce travail !).

Durant sa thèse, le doctorant mène un projet de recherche encadré par un chercheur confirmé, le directeur de thèse, titulaire d'une habilitation. Dans les faits, le

chercheur encadrant définit, avec le doctorant, le sujet de la thèse et discute avec lui régulièrement pour faire le point sur l'avancée de son projet et lui faire profiter de son expérience. Cette situation ambiguë est aujourd'hui une nécessité à cause de temporalités de plus en plus courtes et conduit à un travail individuel (la thèse) menée dans un cadre collectif (l'équipe de recherche). Elle devient de plus en plus complexe quand l'équipe est engagée dans des recherches intentionnelles, sur des objets, recherches traduites en actions interdisciplinaires. Tel est le cas des travaux sur la PDT associant de nombreuses disciplines pour l'action créative.

Or, la création scientifique n'est possible qu'avec la coopération de principes de profusion, d'imagination, de désordre par rapport aux idées reçues, et d'un principe de rigueur, de méthode, de critique, de mise en ordre réglée, et ils doivent travailler ensemble, ce qui ne va pas sans tensions. La conduite des projets interdisciplinaires nécessite donc de vrais espaces de liberté pour l'action. Or, la médiation créatrice est celle qui a pour but de susciter, entre des personnes ou des groupes, des liens qui n'existaient pas entre eux auparavant, liens qui leur seront bénéfiques aux uns et aux autres. D'un point de vue « tactique », pour qu'une opération menée sous forme de projet soit productive dans une culture plutôt individualiste, il faut naturellement que se rencontrent une vision et une capacité scientifique et technique pour passer à l'action, un soutien de la hiérarchie, la maîtrise du temps, avec une organisation souple et flexible. L'art de la « combinaison » des compétences est un facteur important pour le succès d'une opération de ce type en ce qu'elle autorise une créativité dont les prémisses sont toujours très fragiles et fugaces... Par ailleurs, plus l'environnement d'un projet est incertain et turbulent, c'est à dire risqué, plus l'équipe projet doit être autonome en termes de processus, d'organisation et d'objectifs. Cette situation « normale » investissant la complexité des systèmes à étudier et/ou à créer nécessite des équipes d'origines diverses pour permettre la concertation des points de vue et l'expérimentation, en allant, chaque fois que c'est possible, jusqu'au démonstrateur, seul susceptible de permettre par retour d'expérience des progrès

mesurables et l'émergence de verrous scientifiques généralement disciplinaires. Une difficulté classique réside dans la non flexibilité des modes de pensée et d'action, s'appuyant sur la seule logique déductive sans tenir compte des compromis permettant (quand même) le progrès.

Dans un « silo » disciplinaire, chacun fonctionne dans sa culture, son marquage social, son formatage culturel, sa perception d'une réalité complexe (réduction de la traduction disciplinaire de cette perception), dans un cadre qui force à aller à l'essentiel, c'est-à-dire à la « meilleure » production scientifique (donc, en général, au quantitatif et à l'immédiat). Par ailleurs, le contexte administrativo-financier actuel peut limiter la prise de risque, le développement du dialogue dans l'unité de recherche et, par ricochet, à reporter éventuellement à plus tard (pour le prochain appel d'offre...) l'action à mener avec d'autres partenaires. Il est clair que certaines tendances centrifuges, les nouvelles formes d'organisation de la recherche (de son évaluation et de son financement) et des contraintes temporelles peuvent constituer des facteurs susceptibles de limiter le dialogue disciplinaire et encore plus interdisciplinaire. Un résultat net observable est une perte en créativité, une certaine désocialisation, le renforcement de l'individualisme et des formes irréversibles de « perte de mémoire ». Tel n'a pas été le cas dans l'activité centrée sur le thème de la photothérapie dynamique pour différentes raisons :

- Des responsables plus seniors (des aînés compétents) volontaires et enthousiastes pour l'action interdisciplinaire,
- Des soutiens financiers à l'interdisciplinarité gagés par une production scientifique conséquente,
- Un « réseautage » ouvert traduit par des activités partenariales diverses.
- Une équipe locale à masse critique suffisante pour être un noyau de dynamisme associant des représentants de trois unités de recherche.

Pour que ça marche le besoin d'une volonté supérieure d'origine collective (du moins en partie), l'accord de ceux qui sont entraînés dans une opération où plusieurs acteurs disciplinaires souhaitent travailler ensemble et un(des) « facilitateur(s) » est une évidence qui n'a jamais été exprimée dans ce groupe parce que la confiance a toujours été un ciment stimulant des travaux de recherche. Cette intelligence collective est indispensable pour permettre l'identification des enjeux du projet interdisciplinaire, réunir les acteurs concernés disposant des compétences adaptées, pouvoir échanger avec eux, etc.

Or, d'une manière générale, toute l'expression politique de nombre de responsables d'organismes de recherche scientifique vise le soutien à l'interdisciplinarité, association susceptible, et cela est vérifiable, d'entraîner des chercheurs dans des actions originales par rapprochement de domaines jusqu'ici trop disjoints (même si des problèmes non résolus persistent). C'est une façon d'élargir la créativité qui n'est plus uniquement verticale mais plus large. Ce besoin d'ouverture correspond en partie à ce qui se passe dans la Société, où tous les corps de savoirs sont normalement convoqués en vue d'une fin (et en plus, il existe des règles imposées). Le discours sur l'interdisciplinarité est donc considéré comme plutôt une bonne chose, car permettant d'entraîner certains dans des voies plus « profitables » à la Société. Dans les faits, l'interdisciplinarité peut être caractérisée par l'exigence d'une forme de commande (quelle que soit son origine). Elle se présente cependant plutôt de manière anti-culturelle dans le monde de la recherche comme l'envers de l'organisation scientifique du travail (OST) en disciplines reconnues avec une recomposition collective. Et cette situation est également à prendre en compte dans une thèse visant à prouver la capacité du thésard à approfondir un certain nombre de concepts scientifiques, plutôt que de « papillonner » entre disciplines... entre chimie, photophysique, biologie, etc.

Hors discipline (avec son évaluation adaptée), où est alors le salut ? où se retrouve ce pauvre thésard passionné par le travail des autres, la nécessité de comprendre ce qu'ils font et pourquoi, et obligé en plus d'approfondir ses capacités cognitives dans son domaine de compétences initial ? Or, c'est sur des bases plutôt disciplinaires que se construit l'excellence scientifique, validée par les « pairs », ce qui sous-tend des normes établies ou tacites qui sont peu ou prou imposées à celui qui se forme par la recherche.

Après avoir été instruit des différentes facettes des recherches PDT, il me semble qu'il a été nécessaire à Pierre de prendre un peu de temps pour commencer à réfléchir et à se poser des questions (en concertation avec son directeur de thèse) : Que faire ? Pourquoi entreprendre ce travail ? Quelles sont mes motivations ? Quels sont mes points faibles et mes points forts me permettant d'orienter mon travail ? Quelles sont mes chances d'apporter un petit plus à l'édifice PDT qui se construit, non seulement à Nancy, mais dans un cadre de compétition de plus en plus mondial, etc. ? Il est difficile de reprendre ces différents items dans le mémoire qui illustre des actes de création avec des périodes d'enthousiasme, de partage et aussi d'activités un peu douloureuses dans la rédaction du présent document... Faire une thèse dans un contexte de fusion interdisciplinaire c'est aussi « avaler », ingérer des concepts pour l'approfondissement et pour l'ouverture, maîtriser un jargon disciplinaire et comprendre celui des autres, c'est aussi prendre le risque de ne pas faire avancer la « science » dans la bonne direction...

Dans les sciences exactes disciplinaires, la thèse comporte une partie bibliographique (étude des articles déjà parus sur le sujet ou sur un sujet connexe) et peut s'accompagner de la rédaction d'une revue de littérature, une partie réflexion théorique et une partie réalisation : définition d'une problématique, établissement d'un protocole, réalisation d'expériences. Cet enchaînement peut être plus ou moins bien observé selon la nature des travaux de thèse (en termes d'innovation, de domaine d'application, d'un penchant plutôt théorique ou expérimental, etc.). Tel a

été le fil conducteur lié à la rédaction du document soumis à l'évaluation. Or, et on l'aura compris, l'isolement du thésard n'a été ni revendiqué, ni possible dans la dynamique turbulente et enthousiaste qui l'a entouré (et peut-être à laquelle il a un peu contribué). Pour la rédaction du manuscrit il a donc été amené à réaliser un élagage probablement douloureux pour se centrer sur une ligne directrice principale, pour garantir, autant que faire se peut, l'équilibre entre concepts et démonstration.

Ce fil conducteur répond à un engagement responsable à l'intérieur d'un cadre lié à l'obtention d'un diplôme important. En dégageant dans un travail d'équipe ce qui correspond à son activité personnelle, Pierre engagé dans l'action ne veut certainement pas oublier tous ceux qui ont participé directement ou indirectement à ce travail, ni mettre de côté les travaux des « autres » partenaires avec lesquels il a été amené à intervenir. Ces éléments pour utiles qu'ils soient dans sa formation personnelle ne peuvent pour les raisons exposées ci-dessus être présentées dans ce mémoire, et pourtant...

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Ebers, Papyrus Ebers – Das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift. *Liepzig University* **1875**.
2. Pitot, H. C.; Dragan, Y. P., Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB Journal* **1991**, 5 (9), 2280-2286.
3. Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, 82 (1), 4-6.
4. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1995**, 1 (1), 27-31.
5. Reynolds, L. P.; Redmer, D. A., Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction* **2001**, 64 (4), 1033-1040.
6. Bonnet, C. S.; Walsh, D. A., Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* **2005**, 44 (1), 7-16.
7. Kojda, G.; Hambrecht, R., Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovascular Research* **2005**, 67 (2), 187-197.
8. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **1997**, 386 (6626), 671-4.
9. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **2003**, 9 (6), 653-60.
10. Vagnucci Jr, A. H.; Li, W. W., Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet* **2003**, 361 (9357), 605-608.
11. Djonov, V.; Baum, O.; Burri, P. H., Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* **2003**, 314 (1), 107-17.
12. Scoazec, J., [Tumor angiogenesis]. *Ann Pathol* **2000**, 20 (1), 25-37.
13. Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L.; Akhtar, N., Angiogenesis assays: A critical overview. *Clinical Chemistry* **2003**, 49 (1), 32-40.
14. Hanahan, D.; Folkman, J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, 86 (3), 353-64.
15. Tirand, L. Développement d'un photosensibilisateur couplé à un peptide ciblant la neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour des applications en cancérologie. Synthèse, purifications, caractérisation chimique et photophysique, études in vitro et in vivo. Nancy, 2003-2007.
16. Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Susan Harvey, V.; Dvorak, H. F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **1983**, 219 (4587), 983-985.
17. Ferrara, N.; Henzel, W. J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**, 161 (2), 851-858.

18. Keck, P. J.; Hauser, S. D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D. T., Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **1989**, 246 (4935), 1309-1312.
19. Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **1989**, 246 (4935), 1306-1309.
20. Berse, B.; Brown, L. F.; Van de Water, L.; Dvorak, H. F.; Senger, D. R., Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Molecular Biology of the Cell* **1992**, 3 (2), 211-220.
21. Ferrara, N.; Davis-Smyth, T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **1997**, 18 (1), 4-25.
22. Freeman, M. R.; Schneck, F. X.; Gagnon, M. L.; Corless, C.; Soker, S.; Niknejad, K.; Peoples, G. E.; Klagsbrun, M., Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: A potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Research* **1995**, 55 (18), 4140-4145.
23. Melter, M.; Reinders, M. E. J.; Sho, M.; Pal, S.; Geehan, C.; Denton, M. D.; Mukhopadhyay, D.; Briscoe, D. M., Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* **2000**, 96 (12), 3801-3808.
24. Brogi, E.; Wu, T.; Namiki, A.; Isner, J. M., Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **1994**, 90 (2), 649-652.
25. Goldberg, M. A.; Schneider, T. J., Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269 (6), 4355-4359.
26. Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E., Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**, 359 (6398), 843-845.
27. Vincenti, V.; Cassano, C.; Rocchi, M.; Persico, G., Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **1996**, 93 (8), 1493-5.
28. Houck, K. A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, D. W., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* **1991**, 5 (12), 1806-14.
29. Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; Abraham, J. A., The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **1991**, 266 (18), 11947-54.

30. Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; De Vos, A. M., The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: Multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* **1997**, 5 (10), 1325-1338.
31. Dvorak, H. F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology* **2002**, 20 (21), 4368-4380.
32. Kim, K. J.; Li, B.; Winer, J.; Armanini, M.; Gillett, N.; Phillips, H. S.; Ferrara, N., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **1993**, 362 (6423), 841-844.
33. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* **2004**, 9 Suppl 1, 2-10.
34. Ferrara, N.; Gerber, H. P., The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* **2001**, 106 (4), 148-56.
35. Benjamin, L. E.; Golijanin, D.; Itin, A.; Pode, D.; Keshet, E., Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *Journal of Clinical Investigation* **1999**, 103 (2), 159-165.
36. Gerber, H. P.; Dixit, V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (21), 13313-13316.
37. Gerber, H. P.; McMurtrey, A.; Kowalski, J.; Yan, M.; Keyt, B. A.; Dixit, V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: Requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (46), 30336-30343.
38. Connolly, D. T.; Olander, J. V.; Heuvelman, D.; Nelson, R.; Monsell, R.; Siegel, N.; Haymore, B. L.; Leimgruber, R.; Feder, J., Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264 (33), 20017-20024.
39. Shulman, K.; Rosen, S.; Tognazzi, K.; Manseau, E. J.; Brown, L. F., Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *Journal of the American Society of Nephrology* **1996**, 7 (5), 661-666.
40. Clauss, M.; Gerlach, M.; Gerlach, H.; Brett, J.; Wang, F.; Familletti, P. C.; Pan, Y. C. E.; Olander, J. V.; Connolly, D. T.; Stern, D., Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *Journal of Experimental Medicine* **1990**, 172 (6), 1535-1545.
41. Gabrilovich, D.; Ishida, T.; Oyama, T.; Ran, S.; Kravtsov, V.; Nadaf, S.; Carbone, D. P., Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* **1998**, 92 (11), 4150-4166.
42. Hattori, K.; Dias, S.; Heissig, B.; Hackett, N. R.; Lyden, D.; Tatenos, M.; Hicklin, D. J.; Zhu, Z.; Witte, L.; Crystal, R. G.; Moore, M. A. S.; Rafii, S., Vascular endothelial

growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* **2001**, 193 (9), 1005-1014.

43. Sawano, A.; Iwai, S.; Sakurai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Nakahata, T.; Shibuya, M., Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* **2001**, 97 (3), 785-91.

44. Hattori, K.; Heissig, B.; Wu, Y.; Dias, S.; Tejada, R.; Ferris, B.; Hicklin, D. J.; Zhu, Z.; Bohlen, P.; Witte, L.; Hendrikx, J.; Hackett, N. R.; Crystal, R. G.; Moore, M. A.; Werb, Z.; Lyden, D.; Rafii, S., Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* **2002**, 8 (8), 841-9.

45. Huang, K.; Andersson, C.; Roomans, G. M.; Ito, N.; Claesson-Welsh, L., Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* **2001**, 33 (4), 315-24.

46. Neagoe, P. E.; Lemieux, C.; Sirois, M. G., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* **2005**.

47. Gluzman-Poltorak, Z.; Cohen, T.; Herzog, Y.; Neufeld, G., Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* **2000**, 275 (38), 29922.

48. Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H. Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M., Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell* **1998**, 92 (6), 735-745.

49. Takagi, S.; Hirata, T.; Agata, K.; Mochii, M.; Eguchi, G.; Fujisawa, H., The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* **1991**, 7 (2), 295-307.

50. He, Z.; Tessier-Lavigne, M., Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* **1997**, 90 (4), 739-751.

51. Kolodkin, A. L.; Levengood, D. V.; Rowe, E. G.; Tai, Y. T.; Giger, R. J.; Ginty, D. D., Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **1997**, 90 (4), 753-762.

52. Ellis, L. M., The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* **2006**, 5 (5), 1099-107.

53. Gagnon, M. L.; Bielenberg, D. R.; Gechtman, Z.; Miao, H. Q.; Takashima, S.; Soker, S.; Klagsbrun, M., Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97 (6), 2573-8.

54. Parikh, A. A.; Fan, F.; Liu, W. B.; Ahmad, S. A.; Stoeltzing, O.; Reinmuth, N.; Bielenberg, D.; Bucana, C. D.; Klagsbrun, M.; Ellis, L. M., Neuropilin-1 in human colon cancer: Expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *American Journal of Pathology* **2004**, 164 (6), 2139-2151.

55. Soker, S.; Miao, H. Q.; Nomi, M.; Takashima, S.; Klagsbrun, M., VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **2002**, 85 (2), 357-68.
56. Bernatchez, P. N.; Rollin, S.; Soker, S.; Sirois, M. G., Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration, and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *Journal of Cellular Biochemistry* **2002**, 85 (3), 629-639.
57. Rollin, S.; Lemieux, C.; Maliba, R.; Favier, J.; Villeneuve, L. R.; Allen, B. G.; Soker, S.; Bazan, N. G.; Merhi, Y.; Sirois, M. G., VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: Role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood* **2004**, 103 (10), 3789-3797.
58. Brooks, P. C.; Clark, R. A. F.; Chersesh, D. A., Requirement of vascular integrin $\alpha(v)\beta3$ for angiogenesis. *Science* **1994**, 264 (5158), 569-571.
59. Hynes, R. O., A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Medicine* **2002**, 8 (9), 918-921.
60. Hynes, R. O.; Lively, J. C.; McCarty, J. H.; Taverna, D.; Francis, S. E.; Hodivala-Dilke, K.; Xiao, Q., The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. 2002; Vol. 67, pp 143-153.
61. Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson, S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dilke, K. M., Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking $\beta3$ integrin or $\beta3$ and $\beta5$ integrins. *Nature Medicine* **2002**, 8 (1), 27-34.
62. Jayet, C.; Deperthes, D.; Leisinger, H. J., Angiogenesis and bladder cancer: Trendy prognostic factor or new therapeutic target? *Angiogenèse et cancer de vessie: Marqueur tumoral à la mode ou nouvelle cible thérapeutique?* **2002**, 36 (4), 258-263.
63. Brown, S.; Bernardo, M. M.; Li, Z. H.; Kotra, L. P.; Tanaka, Y.; Fridman, R.; Mobashery, S., Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases [18]. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122 (28), 6799-6800.
64. Verma, R. P.; Hansch, C., Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, 15 (6), 2223-2268.
65. Nguyen, M.; Arkell, J.; Jackson, C. J., Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2001**, 33 (10), 960-970.
66. Raab, O., Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z Biol* **1900**, 39, 524-530.
67. Von Tappeiner, H.; Jesionek, A., Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Munch Med Wochenschr* **1903**, 47, 2042-2044.
68. Von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A., Ueber Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch Arch K/in Med* **1904**, 80, 427-487.

69. Von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A., Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen. Gasammelte Untersuchungen Über die Photodynamische Erscheinung. *FCW Vogel, Leipzig* **1907**.
70. Policard, A., Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de wood. *CR Soc. Biol.* **1924**, *91*, 1423-1424.
71. Figge, F. H. J.; Weiland, G. S.; Manganiello, L. J., Cancer détection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloprophyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* **1948**, *68*, 640-641.
72. Schwartz, S.; Absolon, K.; Vermund, H., Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Med Bull* **1955**, *68*, 7-13.
73. Lipson, R. L.; Baldes, E. J., Histamine and photodynamic action. *Archives of dermatology* **1961**, *83*, 417-419.
74. Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A., Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Research* **1978**, *38* (8), 2628-2635.
75. Dougherty, T. J., Photosensitization of malignant tumors. *Seminars in Surgical Oncology* **1986**, *2* (1), 24-37.
76. Kasha, M., Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19.
77. Vidoczy, T., Type I and Type II photosensitized reactions: Reasons for dispute. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1992**, *14* (1-2), 139-142.
78. Darwent, J. R.; Douglas, P.; Harriman, A.; Porter, G.; Richoux, M. C., Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coordination Chemistry Reviews* **1982**, *44* (1), 83-126.
79. Foote, C. S., Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* **1968**, *162* (3857), 963-970.
80. Foote, C. S., Mechanisms of photooxygenation. *Progress in clinical and biological research* **1984**, *170*, 3-18.
81. Foote, C. S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *54* (5), 659.
82. Ochsner, M., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* **1997**, *39* (1), 1-18.
83. Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M., Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: A personal view of recent controversies. *Free Radical Research* **1999**, *31* (6), 651-669.
84. Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo inactivation of a murine tumor. *Cancer Research* **1976**, *36* (7).
85. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* **1992**, *55* (1), 145-157.
86. Bonnet, R., *Chemical aspects of Photodynamic Therapy*. Advanced Chemistry Texts ed.; Gordon and Breach Science Publishers: 2000.

87. Bechet, D.; Tirand, L.; Faivre, B.; Plénat, F.; Bonnet, C.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Neuropilin-1targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. *Pharm Res* **2010**, 27 (3), 468-479.
88. Piette, J.; Volanti, C.; Vantieghem, A.; Matroule, J. Y.; Habraken, Y.; Agostinis, P., Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* **2003**, 66 (8), 1651-9.
89. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther* **2005**, 2 (1 SPEC. ISS.), 1-23.
90. Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 96 (1), 1-8.
91. , C. A.; Linden, R., Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* **2004**, 271 (9), 1638-1650.
92. Fabris, C.; Valduga, G.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Jori, G.; Garbisa, S.; Reddi, E., Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Research* **2001**, 61 (20), 7495-7500.
93. Kessel, D., Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2002**, 1 (11), 837-840.
94. Dellinger, M., Apoptosis or necrosis following photofrin® photosensitization: Influence of the incubation protocol. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 64 (1), 182-187.
95. Hsieh, Y. J.; Wu, C. C.; Chang, C. J.; Yu, J. S., Subcellular localization of photofrin® determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. *Journal of Cellular Physiology* **2003**, 194 (3), 363-375.
96. Kessel, D., Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients. *J Photochem Photobiol B* **1997**, 39 (1), 81-3.
97. Kriska, T.; Korytowski, W.; Girotti, A. W., Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2005**, 433 (2), 435-446.
98. Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I., The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* **2002**, 1 (1), 1-21.
99. Almeida, R. D.; Manadas, B. J.; Carvalho, A. P.; Duarte, C. B., Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **2004**, 1704 (2), 59-86.
100. Agostinis, P.; Buytaert, E.; Breysens, H.; Hendrickx, N., Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* **2004**, 3 (8), 721-9.

101. Kessel, D.; Oleinick, N. L., Chapter 1: Initiation of Autophagy by Photodynamic Therapy. *Methods in Enzymology* **2009**, 453 (C), 1-16.
102. Kessel, D.; Vicente, M. G. H.; Reiners Jr, J. J., Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy* **2006**, 2 (4), 289-290.
103. Buytaert, E.; Callewaert, G.; Hendrickx, N.; Scorrano, L.; Hartmann, D.; Missiaen, L.; Vandenheede, J. R.; Heirman, I.; Grooten, J.; Agostinis, P., Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB Journal* **2006**, 20 (6), 756-758.
104. Kessel, D.; Arroyo, A. S., Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2007**, 6 (12), 1290-1295.
105. Xue, L. Y.; Chiu, S. M.; Azizuddin, K.; Joseph, S.; Oleinick, N. L., The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, 83 (5), 1016-1023.
106. Hamblin, M. R.; Mroz, P., *Advances in Photodynamic Therapy, Basic, Translational and clinical*. Artech House: 2008.
107. Leung, W. N.; Sun, X.; Mak, N. K.; Yow, C. M. N., Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: Photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, 75 (4), 406-411.
108. He, J.; Oleinick, N. L., Cell death mechanisms vary with photodynamic therapy dose and photosensitizer. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* **1995**, 2371, 92-96.
109. Kessel, D.; Luo, Y., Delayed oxidative photodamage induced by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 64 (3), 601-604.
110. Luo, Y.; Chang, C. K.; Kessel, D., Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 63 (4), 528-534.
111. Cecic, I.; Korbelik, M., Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Letters* **2002**, 183 (1), 43-51.
112. Granville, D. J.; McManus, B. M.; Hunt, D. W. C., Photodynamic therapy: Shedding light on the biochemical pathways regulating porphyrin-mediated cell death. *Histology and Histopathology* **2001**, 16 (1), 309-317.
113. Zhou, C., New trends in photobiology. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **1989**, 3 (3), 299-318.
114. Abels, C., Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci* **2004**, 3 (8), 765-71.
115. Fingar, V. H.; Taber, S. W.; Haydon, P. S.; Harrison, L. T.; Kempf, S. J.; Wieman, T. J., Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view

and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo* **2000**, 14 (1), 93-100.

116. Fingar, V. H.; Wieman, T. J.; Wiehle, S. A.; Cerrito, P. B., The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res* **1992**, 52 (18), 4914-21.

117. McMahon, G., VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* **2000**, 5 Suppl 1, 3-10.

118. Wieman, T. J.; Mang, T. S.; Fingar, V. H.; Hill, T. G.; Reed, M. W. R.; Corey, T. S.; Nguyen, V. Q.; Render Jr, E. R., Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery* **1988**, 104 (3), 512-517.

119. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* **1998**, 90 (12), 889-905.

120. Gilissen, M. J.; Van de Merbel-de Wit, L. E. A.; Star, W. M.; Koster, J. F.; Sluiter, W., Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Research* **1993**, 53 (11), 2548-2552.

121. Fingar, V. H.; Siegel, K. A.; Wieman, T. J.; Doak, K. W., The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* **1993**, 58 (3), 393-399.

122. Krammer, B., Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res* **2001**, 21 (6B), 4271-7.

123. Schmidt-Erfurth, U. M.; Pruenste, C., Management of neovascular age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **2007**, 26 (4), 437-51.

124. Mordon, S., Vascular-targeted photodynamic therapy: a new technique for port wine stain treatment. *Ann Dermatol Venereol* **2007**, 134 (3 Pt 1), 281-6.

125. Eggener, S. E.; Coleman, J. A., Focal treatment of prostate cancer with vascular-targeted photodynamic therapy. *Sci World J* **2008**, 8, 963-73.

126. Fahmy, I. R.; Abushady, H.; Schönberg, A.; Sina, A., A crystalline principle from *Ammi majus* L. [11]. *Nature* **1947**, 160 (4066), 468-469.

127. Mohr, H.; Lambrecht, B.; Selz, A., Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunological Investigations* **1995**, 24 (1-2), 73-85.

128. Jockusch, S.; Lee, D.; Turro, N. J.; Leonard, E. F., Photo-induced inactivation of viruses: Adsorption of methylene blue, thionine, and thiopyronine on Q β bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93 (15), 7446-7451.

129. Wainwright, M., Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chemical Society Reviews* **1996**, 25 (5), 351-359.

130. Koren, H.; Schenk, G. M.; Jindra, R. H.; Alth, G.; Ebermann, R.; Kubin, A.; Koderhold, G.; Kreitner, M., Hypericin in phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, 36 (2), 113-119.

131. Gollnick, K.; Schenck, G. O., Mechanism and stereoselectivity of photosensitized oxygen transfer reactions. *Pure and Applied Chemistry* **1964**, 9 (4), 507-526.
132. Gerba, C. P.; Wallis, C.; Melnick, J. L., Disinfection of wastewater by photodynamic oxidation. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **1977**, 49 (4), 575-583.
133. Bezman, S. A.; Burtis, P. A.; Izod, T. P. J.; Thayer, M. A., Photodynamic inactivation of *E. coli* by rose bengal immobilized on polystyrene beads. *Photochemistry and Photobiology* **1978**, 28 (3), 325-329.
134. BiotechPharmaLTD <http://foscan.net/>.
135. Compagnin, C.; Ba, L.; Mognato, M.; Celotti, L.; Miotto, G.; Arduini, M.; Moret, F.; Fede, C.; Selvestrel, F.; Echevarria, I. M. R.; Mancin, F.; Reddi, E., The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology* **2009**, 20 (34).
136. D'Hallewin, M. A.; Kochetkov, D.; Viry-Babel, Y.; Leroux, A.; Werkmeister, E.; Dumas, D.; Gräfe, S.; Zorin, V.; Guillemain, F.; Bezdetnaya, L., Photodynamic therapy with intratumoral administration of lipid-based mTHPC in a model of breast cancer recurrence. *Lasers in Surgery and Medicine* **2008**, 40 (8), 543-549.
137. Kachatkou, D.; Sasnouski, S.; Zorin, V.; Zorina, T.; D'Hallewin, M. A.; Guillemain, F.; Bezdetnaya, L., Unusual photoinduced response of mTHPC liposomal formulation (foslip). *Photochemistry and Photobiology* **2009**, 85 (3), 719-724.
138. Lassalle, H. P.; Wagner, M.; Bezdetnaya, L.; Guillemain, F.; Schneckenburger, H., Fluorescence imaging of Foscan® and Foslip in the plasma membrane and in whole cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2008**, 92 (1), 47-53.
139. Pegaz, B.; Debefve, E.; Ballini, J. P.; Wagnières, G.; Spaniol, S.; Albrecht, V.; Scheglmann, D. V.; Nifantiev, N. E.; Van Den Bergh, H.; Konan-Kouakou, Y. N., Photothrombic activity of m-THPC-loaded liposomal formulations: Pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 28 (1-2), 134-140.
140. Kachatkou, D. Propriétés photophysiques et photobiologiques des formes liposomales de la mTHPC. Université de Nancy, 2009.
141. Hasan, T.; Moor, A. C. E.; Ortel, B., Photodynamic Therapy of Cancer. In *Cancer Medicine, 5th Edition*, Bast, R. C. J.; Kufe, D. W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R. R.; Holland, J. F.; Frei, E., Eds. B C Decker: Hamilton (ON), 2000; Vol. 5, p Section 11.
142. Kennedy, J. C.; Pottier, R. H., Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1992**, 14 (4), 275-292.
143. Mustajoki, P.; Timonen, K.; Gorchein, A.; Seppäläinen, A. M.; Matikainen, E.; Tenhunen, R., Sustained high plasma 5-aminolaevulinic acid concentration in a

volunteer: No porphyric symptoms. *European Journal of Clinical Investigation* **1992**, 22 (6), 407-411.

144. Grant, W. E.; Hopper, C.; MacRobert, A. J.; Speight, P. M.; Bown, S. G., Photodynamic therapy of oral cancer: Photosensitisation with systemic aminolaevulinic acid. *Lancet* **1993**, 342 (8864), 147-148.

145. Barr, H.; Shepherd, N. A.; Dix, A.; Roberts, D. J. H.; Tan, W. C.; Krasner, N., Eradication of high-grade dysplasia in columnar-lined (Barrett's) oesophagus by photodynamic therapy with endogenously generated protoporphyrin IX. *Lancet* **1996**, 348 (9027), 584-585.

146. Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne) for macular degeneration. *Medical Letter on Drugs and Therapeutics* **2000**, 42 (1086), 81-82.

147. Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T., Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science* **2009**, 24 (2), 259-268.

148. Lindsey, J. S.; Hsu, H. C.; Schreiman, I. C., Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27 (41), 4969-4970.

149. Little, R. G., The Mixed-Aldehyde Synthesis of Difunctional Tetraarylporphyrins. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1981**, 18, 129-133.

150. Little, R. G.; Anton, J. A.; Loach, P. A.; Ibers, J. A., The Synthesis of Some Substituted Tetraarylporphyrins. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1975**, 12, 343-349.

151. Boudif, A.; Momenteau, M., Synthesis of a porphyrin-2,3-diacrylic acid using a new '3 + 1' type procedure. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (18), 2069-2070.

152. Bourré, L.; Simonneaux, G.; Ferrand, Y.; Thibaut, S.; Lajat, Y.; Patrice, T., Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2003**, 69 (3), 179-192.

153. Ferrand, Y.; Bourré, L.; Simonneaux, G.; Thibaut, S.; Odobel, F.; Lajat, Y.; Patrice, T., Hydroporphyrins as tumour photosensitizers: Synthesis and photophysical studies of 2,3-dihydro-5,15-di(3,5-dihydroxyphenyl) porphyrin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13 (5), 833-835.

154. Lash, T. D., Porphyrin synthesis by the '3+1' approach: New applications for an old methodology. *Angewandte Chemie - International Edition in English* **1996**, 35 (19), 1197-1200.

155. Berg, K.; Bommer, J. C.; Winkelman, J. W.; Moan, J., Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphyrines. *Photochemistry and Photobiology* **1990**, 52 (4), 775-781.

156. Nyman, E. S.; Hynninen, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2004**, 73 (1-2), 1-28.

157. Rosenkranz, A. A.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S., Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and Cell Biology* **2000**, 78 (4), 452-464.
158. Gregoriadis, G., The carrier potential of liposomes in biology and medicine. II. *New England Journal of Medicine* **1976**, 295 (14), 765-770.
159. Damoiseau, X.; Schuitmaker, H. J.; Lagerberg, J. W. M.; Hoebeke, M., Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2001**, 60 (1), 50-60.
160. Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allemann, E., State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **2002**, 66 (2), 89-106.
161. Le Garrec, D.; Taillefer, J.; Van Lier, J. E.; Lenaerts, V.; Leroux, J. C., Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model. *Journal of Drug Targeting* **2002**, 10 (5), 429-437.
162. Van Nostrum, C. F., Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (1), 9-16.
163. Mondon, K.; Gurny, R.; Möller, M., Colloidal drug delivery systems - Recent advances with polymeric micelles. *Chimia* **2008**, 62 (10), 832-840.
164. Nishiyama, N.; Morimoto, Y.; Jang, W. D.; Kataoka, K., Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, 61 (4), 327-338.
165. Sibani, S. A.; McCarron, P. A.; Woolfson, A. D.; Donnelly, R. F., Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 2: Systemic carrier platforms. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, 5 (11), 1241-1254.
166. Knop, K.; Mingotaud, N.; El Akra, N.; Violleau, F.; Souchard, J.-P., Monomeric pheophorbide(a)-containing poly(etyleneglycol-b-ε-caprolactone) micelles for photodynamic therapy. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2009**, 8 (3), 396-404.
167. Morosini, V.; Frochot, C.; Barberi-Heyob, M.; Schneider, R., Divergent synthesis of novel unsymmetrical dendrons containing photosensitizing units. *Tetrahedron letters* **2006**, 47 (49), 8745-8749.
168. Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* **2008**.
169. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J. O., Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* **2010**, 2 (7), 1083-1095.
170. Soeller, C.; Cannell, M. B., Two-photon microscopy: Imaging in scattering samples and three- dimensionally resolved flash photolysis. *Microscopy Research and Technique* **1999**, 47 (3), 182-195.

171. Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W., Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **1990**, *248* (4951), 73-76.
172. Bhawalkar, J. D.; Kumar, N. D.; Zhao, C. F.; Prasad, P. N., Two-photon photodynamic therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery* **1997**, *15* (5), 201-204.
173. Nickel, E.; Spangler, C. W.; Rebane, A. Porphyrins with enhanced multi-photon absorption cross-section for photodynamic therapy. US 6,953,570, 2005.
174. Starkey, J. R.; Rebane, A. K.; Drobizhev, M. A.; Meng, F.; Gong, A.; Elliott, A.; Mc Innerney, K.; Spangler, C. W., New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (20), 6564-6573.
175. Kim, S.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Pandey, R. K.; Prasad, P. N., Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (9), 2669-2675.
176. Demas, J. N.; DeGraff, B. A., Design and applications of highly luminescent transition metal complexes. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (17), 829-837.
177. Villien, M. Synthèse et Etudes d'Oligonucléotides et de Peptides comportant un Complexe Photoactivable de Ruthénium(II). Université de Grenoble 1, 2007.
178. Lemerrier, G.; Bonne, A.; Four, M.; Lawson-Daku, L. M., 3MLCT excited states in Ru(II) complexes: Reactivity and related two-photon absorption applications in the near-infrared spectral range. *Comptes Rendus Chimie* **2008**, *11* (6-7), 709-715.
179. Boca, S. C.; Four, M.; Bonne, A.; Van Der Sanden, B.; Astilean, S.; Baldeck, P. L.; Lemerrier, G., An ethylene-glycol decorated ruthenium(ii) complex for two-photon photodynamic therapy. *Chemical Communications* **2009**, (30), 4590-4592.
180. Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Süss-Fink, G.; Wee, H. A.; Dyson, P. J.; Juillerat-Jeanneret, L.; Therrien, B., Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (6), 1811-1816.
181. Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Zava, O.; Süss-Fink, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Therrien, B., Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, *14* (1), 101-109.
182. Schmitt, F.; Auzias, M.; Štěpnička, P.; Sei, Y.; Yamaguchi, K.; Süss-Fink, G.; Therrien, B.; Juillerat-Jeanneret, L., Sawhorse-type diruthenium tetracarbonyl complexes containing porphyrin-derived ligands as highly selective photosensitizers for female reproductive cancer cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, *14* (5), 693-701.
183. Poon, C. T.; Chan, P. S.; Man, C.; Jiang, F. L.; Wong, R. N. S.; Mak, N. K.; Kwong, D. W. J.; Tsao, S. W.; Wong, W. K., An amphiphilic ruthenium(II)-

polypyridyl appended porphyrin as potential bifunctional two-photon tumor-imaging and photodynamic therapeutic agent. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, 104 (1), 62-70.

184. Barberi-Heyob, M.; Frochot, C.; Bezdetnaya-Bolotina, L.; Brault, D.; Dumas, D.; Guillemain, F.; Krausz, P.; Maillard, P.; Maunit, B.; Merlin, J. L.; Mordon, S.; Muller, J. F.; Patrice, T.; Simonneaux, G.; Tanielian, C., The photodynamic therapy. *La thérapie photodynamique* **2007**, (308-309), 26-34.

185. Ferguson, A. T.; Lapidus, R. G.; Davidson, N. E., The regulation of estrogen receptor expression and function in human breast cancer. *Cancer treatment and research* **1998**, 94, 255-278.

186. Murphy, L. C.; Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Coutts, A.; Watson, P., The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, 65 (1-6), 175-180.

187. Swamy, N.; James, D. A.; Mohr, S. C.; Hanson, R. N.; Ray, R., An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2002**, 10 (10), 3237-3243.

188. El Akra, N.; Noirot, A.; Faye, J.-C.; Souchard, J.-P., Synthesis of estradiol-pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells. *Photochem Photobiol* **2006**, 5, 996-999.

189. Gravier, J. Photosensibilisateurs vectorisés par l'acide folique pour une thérapie photodynamique ciblée. Nancy, 2004-2008.

190. Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. *J Med Chem* **2008**, 51 (13), 3867-77.

191. Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemain, F.; Muller, J. F.; Barberi-Heyob, M., Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* **2005**, 13 (8), 2799-808.

192. Morosini, V. Pour une amélioration de la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie : Potentialités des dendrimères poly(amidoamine) et des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique. Nancy, 2006-2010.

193. Di Stasio, B. Etudes de nouveaux photosensibilisants pour des applications en thérapie photodynamique. Nancy, 2003-2007.

194. Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Muller, A.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M., The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* **2005**, 40 (11), 1111-22.

195. Frochot, C.; Di Stasio, B.; Barberi-Heyob, M.; Carre, M. C.; Zwier, J. M.; Guillemain, F.; Viriot, M. L., New glycosylated porphyrins for PDT applications. *Ophthalmologia* **2003**, *56* (1), 62-6.
196. Kaldapa, C.; Blais, J. C.; Carre, V.; Granet, R.; Sol, V.; Guilloton, M.; Spiro, M.; Krausz, P., Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrin dimers. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41* (3), 331-335.
197. Sol, V.; Blais, J. C.; Carre, V.; Granet, R.; Guilloton, M.; Spiro, M.; Krausz, P., Synthesis, spectroscopy, and photocytotoxicity of glycosylated amino acid porphyrin derivatives as promising molecules for cancer phototherapy. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64* (12), 4431-4444.
198. Sol, V.; Chaleix, V.; Champavier, Y.; Granet, R.; Huang, Y. M.; Krausz, P., Glycosyl bis-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in PDT. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14* (23), 7745-60.
199. Sol, V.; Charmot, A.; Krausz, P.; Trombotto, S.; Queneau, Y., Synthesis of new glucosylated porphyrins bearing an α -D-linkage. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2006**, *25* (4), 345-360.
200. Casero R.A, Jr.; Woster, P. M., Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44* (1), 1-26.
201. Sol, V.; Lamarche, F.; Enache, M.; Garcia, G.; Granet, R.; Guilloton, M.; Blais, J. C.; Krausz, P., Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14* (5), 1364-77.
202. Tozer, G. M.; Bicknell, R., Therapeutic targeting of the tumor vasculature. *Seminars in Radiation Oncology* **2004**, *14* (3), 222-232.
203. Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C., Disrupting tumour blood vessels. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5* (6), 423-435.
204. Allen, C. M.; Sharman, W. M.; La Madeleine, C.; Weber, J. M.; Langlois, R.; Ouellet, R.; van Lier, J. E., Photodynamic therapy: tumor targeting with adenoviral proteins. *Photochem Photobiol* **1999**, *70* (4), 512-23.
205. Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olié, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains, J. B.; Frochot, C., Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins. *Tetrahedron* **2008**, *64* (16), 3494-3504.
206. Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P., Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tetrahedron Lett* **2004**, *45*, 5295-99.
207. Chaleix, V.; Sol, V.; Huang, Y.-M.; Guilloton, M.; Granet, R.; Blais, J.-C.; Krausz, P., RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy. *Eur J Org Chem* **2003**, *8*, 1486-93.
208. Sol, V.; Chaleix, V.; Granet, R.; Krausz, P., An efficient route to dimeric porphyrin-RGD peptide conjugates via olefin metathesis. *Tetrahedron* **2008**, *64* (2), 364-371.

209. Jin, Z. H.; Josserand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M. C.; Dumy, P.; Coll, J. L., Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4. *Molecular imaging : official journal of the Society for Molecular Imaging* **2006**, 5 (3), 188-197.
210. Frochot, C.; Di Stasio, B.; Vanderesse, R.; Belgy, M. J.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M., Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg Chem* **2007**, 35 (3), 205-20.
211. Chen, J.; Stefflova, K.; Niedre, M. J.; Wilson, B. C.; Chance, B.; Glickson, J. D.; Zheng, G., Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (37), 11450-11451.
212. Knight, C. G.; Willenbrock, F.; Murphy, G., A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Letters* **1992**, 296 (3), 263-266.
213. Zheng, G.; Chen, J.; Stefflova, K.; Jarvi, M.; Li, H.; Wilson, B. C., Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104 (21), 8989-94.
214. Mansour, A. M.; Drevs, J.; Esser, N.; Hamada, F. M.; Badary, O. A.; Unger, C.; Fichtner, I.; Kratz, F., A new approach for the treatment of malignant melanoma: Enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2. *Cancer Research* **2003**, 63 (14), 4062-4066.
215. Thomas, N. Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par adressage du co-récepteur neuropiline-1 : Vers la valorisation de peptides biologiquement plus stables. Nancy, 2005-2009.
216. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **2006**, 111 (1-2), 153-64.
217. Thomas, N.; Bechet, D.; Becuwe, P.; Tirand, L.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, 96 (2), 101-108.
218. Von Wronski, M. A.; Raju, N.; Pillai, R.; Bogdan, N. J.; Marinelli, E. R.; Nanjappan, P.; Ramalingam, K.; Arunachalam, T.; Eaton, S.; Linder, K. E.; Yan, F.; Pochon, S.; Tweedle, M. F.; Nunn, A. D., Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (9), 5702-5710.

219. Pinel, S.; Barberi-Heyob, M.; Cohen-Jonathan, E.; Merlin, J. L.; Delmas, C.; Plenat, F.; Chastagner, P., Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2004**, 59 (1), 250-259.
220. Pinel, S.; Chastagner, P.; Merlin, J. L.; Marchal, C.; Taghian, A.; Barberi-Heyob, M., Topotecan can compensate for protracted radiation treatment time effects in high grade glioma xenografts. *Journal of Neuro-Oncology* **2006**, 76 (1), 31-38.
221. Thomas, N.; Tirand, L.; Chatelut, E.; Plenat, F.; Frochot, C.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci* **2008**, 7 (4), 433-41.
222. Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **2006**, 6 (5), 469-88.
223. Tirand, L.; Thomas, N.; Dodeller, M.; Dumas, D.; Frochot, C.; Maunit, B.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab Dispos* **2007**, 35 (5), 806-13.
224. Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, R.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; François, A.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochemical Pharmacology* **2010**, 80 (2), 226-235.
225. Tirand, L.; Bastogne, T.; Bechet, D.; Linder, M.; Thomas, N.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Response Surface Methodology: An Extensive Potential to Optimize in vivo Photodynamic Therapy Conditions. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2009**, 75 (1), 244-252.
226. Bechet, D.; Tirand, L.; Faivre, B.; Plénat, F.; Bonnet, C.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. *Pharmaceutical Research* **2010**, 27 (3), 468-479.
227. Louis, C.; Bazzi, R.; Marquette, C. A.; Bridot, J. L.; Roux, S.; Ledoux, G.; Mercier, B.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O., Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling. *Chemistry of Materials* **2005**, 17 (7), 1673-1682.
228. Engström, M.; Klasson, A.; Pedersen, H.; Vahlberg, C.; Käll, P. O.; Uvdal, K., High proton relaxivity for gadolinium oxide nanoparticles. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* **2006**, 19 (4), 180-186.

229. MacDonald, M. A.; Watkin, K. L., Small Particulate Gadolinium Oxide and Gadolinium Oxide Albumin Microspheres as Multimodal Contrast and Therapeutic Agents. *Investigative Radiology* **2003**, 38 (6), 305-310.
230. Perriat, P.; Louis, C.; Marquette, C. A.; Bazzi, R.; Roux, S.; Tillement, O.; Ledoux, G. Hybrid Nanoparticles Comprising a Core of Rare Earth Sesquioxide Carrying Biological Ligands. Fr2005/000491, 2005.
231. Roberts, D.; Zhu, W. L.; Frommen, C. M.; Rosenzweig, Z., Synthesis of gadolinium oxide magnetoliposomes for magnetic resonance imaging. *Journal of Applied Physics* **2000**, 87 (9 III), 6208-6210.
232. Bridot, J. L.; Faure, A. C.; Laurent, S.; Rivière, C.; Billotey, C.; Hiba, B.; Janier, M.; Josserand, V.; Coll, J. L.; Elst, L. V.; Muller, R.; Roux, S.; Perriat, P.; Tillement, O., Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: Multimodal contrast agents for in vivo imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (16), 5076-5084.
233. Faure, A. C.; Hoffmann, C.; Bazzi, R.; Goubard, F.; Pauthe, E.; Marquette, C. A.; Blum, L. J.; Perriat, P.; Roux, S.; Tillement, O., Functionalization of luminescent aminated particles for facile bioconjugation. *ACS Nano* **2008**, 2 (11), 2273-2282.
234. Faure, A. C.; Dufort, S.; Josserand, V.; Perriat, P.; Coll, J. L.; Roux, S.; Tillement, O., Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small* **2009**, 5 (22), 2565-2575.
235. Faure, A. C.; Barbillon, G.; Ou, M.; Ledoux, G.; Tillement, O.; Roux, S.; Fabregue, D.; Descamps, A.; Bijeon, J. L.; Marquette, C. A.; Billotey, C.; Jamois, C.; Benyatou, T.; Perriat, P., Core/shell nanoparticles for multiple biological detection with enhanced sensitivity and kinetics. *Nanotechnology* **2008**, 19 (48).
236. Barbillon, G.; Faure, A. C.; El Kork, N.; Moretti, P.; Roux, S.; Tillement, O.; Ou, M. G.; Descamps, A.; Perriat, P.; Vial, A.; Bijeon, J. L.; Marquette, C. A.; Jacquier, B., How nanoparticles encapsulating fluorophores allow a double detection of biomolecules by localized surface plasmon resonance and luminescence. *Nanotechnology* **2008**, 19 (3).
237. Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, P.; Jain, N. K., Pegnology: A review of PEG-ylated systems. *Pharmazie* **2002**, 57 (1), 5-29.
238. Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M., A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (23), 7206-7211.
239. Kohler, N.; Sun, C.; Fichtenholtz, A.; Gunn, J.; Fang, C.; Zhang, M., Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* **2006**, 2 (6), 785-792.
240. Milton Harris, J.; Chess, R. B., Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2 (3), 214-221.
241. Moghimi, S. M., Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: The effect of the ethylene oxide chain configuration. *FEBS Letters* **2003**, 540 (1-3), 241-244.

242. 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.
243. 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.
244. Monfardini, C.; Veronese, F. M., Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate Chemistry* **1998**, 9 (4), 418-450.
245. Carignano, M. A.; Szleifer, I., Prevention of protein adsorption by flexible and rigid chain molecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, 18 (3-4), 169-182.
246. Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G., Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *Journal of Colloid And Interface Science* **1991**, 142 (1), 149-158.
247. Weiss, C. K.; Lorenz, M. R.; Landfester, K.; Mailänder, V., Cellular uptake behavior of unfunctionalized and functionalized PBCA particles prepared in a miniemulsion. *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7 (7), 883-896.
248. Lee, J. H.; Lee, H. B.; Andrade, J. D., Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **1995**, 20 (6), 1043-1079.
249. Li, S. D.; Huang, L., Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5 (4), 496-504.
250. Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C., Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5 (4), 505-515.
251. Kim, D.; Park, S.; Jae, H. L.; Yong, Y. J.; Jon, S., Erratum: Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging (Journal of the American Chemical Society (2007) 129, (7661-7665)). *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (41), 12585.
252. Kim, D.; Park, S.; Jae, H. L.; Yong, Y. J.; Jon, S., Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (24), 7661-7665.
253. Levchenko, T. S.; Rammohan, R.; Lukyanov, A. N.; Whiteman, K. R.; Torchilin, V. P., Liposome clearance in mice: The effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 240 (1-2), 95-102.
254. Van Schooneveld, M. M.; Vucic, E.; Koole, R.; Zhou, Y.; Stocks, J.; Cormode, D. P.; Tang, C. Y.; Gordon, R. E.; Nicolay, K.; Meijerink, A.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. M., Improved biocompatibility and pharmacokinetics of silica nanoparticles by means of a lipid coating: A multimodality investigation. *Nano Letters* **2008**, 8 (8), 2517-2525.
255. Peracchia, M. T.; Fattal, E.; Desmaële, D.; Besnard, M.; Noël, J. P.; Gomis, J. M.; Appel, M.; D'Angelo, J.; Couvreur, P., Stealth® PEGylated polycyanoacrylate

- nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release* **1999**, 60 (1), 121-128.
256. Peracchia, M. T.; Harnisch, S.; Pinto-Alphandary, H.; Gulik, A.; Dedieu, J. C.; Desmaële, D.; D'Angelo, J.; Müller, R. H.; Couvreur, P., Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth® polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* **1999**, 20 (14), 1269-1275.
257. Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A. C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C., Peptide-conjugated nanoparticles for photodynamic therapy targeting neuropilin-1. *Nanomedicine* **2011**.
258. Whitlock Jr, H. W.; Hanauer, R.; Oester, M. Y.; Bower, B. K., Diimide reduction of porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, 91 (26), 7485-7489.
259. Stober, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid And Interface Science* **1968**, 26 (1), 62-69.
260. Lombardi, A.; Nastri, F.; Pavone, V., Peptide-based heme-protein models. *Chem Rev* **2001**, 101 (10), 3165-89.
261. Friedman, M., Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem* **1999**, 47 (9), 3457-79.
262. Rawlings, N. D.; Barrett, A. J., Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **1993**, 290 (1), 205-218.
263. 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.
264. Liong, M.; Lu, J.; Kovochich, M.; Xia, T.; Ruehm, S. G.; Nel, A. E.; Tamanoi, F.; Zink, J. I., Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano* **2008**, 2 (5), 889-896.
265. Reddy, G. R.; Bhojani, M. S.; McConville, P.; Moody, J.; Moffat, B. A.; Hall, D. E.; Kim, G.; Koo, Y. E. L.; Woolliscroft, M. J.; Sugai, J. V.; Johnson, T. D.; Philbert, M. A.; Kopelman, R.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D., Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clinical Cancer Research* **2006**, 12 (22), 6677-6686.
266. Janssen, A. P. C. A.; Schiffelers, R. M.; Ten Hagen, T. L. M.; Koning, G. A.; Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Storm, G.; Molema, G., Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 254 (1), 55-58.
267. Nasongkla, N.; Bey, E.; Ren, J.; Ai, H.; Khemtong, C.; Guthi, J. S.; Chin, S. F.; Sherry, A. D.; Boothman, D. A.; Gao, J., Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Letters* **2006**, 6 (11), 2427-2430.
268. Aubin-Tam, M. E.; Hamad-Schifferli, K. In *Site-specific labeling of active proteins with gold nanoparticles*, 2005; pp 24-29.

269. Invitrogen <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Generating-and-Detecting-Reactive-Oxygen-Species.html>.
270. Dobrovolskaia, M. A.; Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McNeil, S. E., Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5 (4), 487-495.
271. Soo Choi, H.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Itty Ipe, B.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V., Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* **2007**, 25 (10), 1165-1170.
272. Milton Harris, J.; Martin, N. E.; Modi, M., Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, 40 (7), 539-551.
273. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chemical Reviews* **1999**, 99 (9), 2293-2352.
274. Lauffer, R. B., Paramagnetic contrast agents for MRI. *Applied Radiology* **1987**, 16 (11), 163-169.
275. Lauffer, R. B., Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: Theory and design. *Chemical Reviews* **1987**, 87 (5), 901-927.
276. Le Mignon, M. M.; Chambon, C.; Warrington, S.; Davies, R.; Bonnemain, B., Pharmacokinetics and tolerability after intravenous injection into healthy volunteers. *Investigative Radiology* **1990**, 25 (8), 933-937.
277. Weinmann, H. J.; Brasch, R. C.; Press, W. R.; Wesbey, G. E., Characteristics of gadolinium-DTPA complex: A potential NMR contrast agent. *American Journal of Roentgenology* **1984**, 142 (3), 619-624.
278. Weinmann, H. J.; Laniado, M.; Mutzel, W., Pharmacokinetics of GdDTPA/dimeglumine after intravenous injection into healthy volunteers. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* **1984**, 16 (2), 167-172.
279. Rocklage, S. M.; Worah, D.; Kim, S. H., Metal ion release from paramagnetic chelates: What is tolerable? *Magnetic Resonance in Medicine* **1991**, 22 (2), 216-221.
280. Ersoy, H.; Rybicki, F. J., Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2007**, 26 (5), 1190-1197.
281. Bousquet, J. C.; Saini, S.; Stark, D. D.; Hahn, P. F.; Nigam, M.; Wittenberg, J.; Ferrucci Jr, J. T., Gd-DOTA: Characterization of a new paramagnetic complex. *Radiology* **1988**, 166 (3), 693-698.
282. Starzec, A.; Vassy, R.; Martin, A.; Lecouvey, M.; Di Benedetto, M.; Crepin, M.; Perret, G. Y., Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* **2006**, 79 (25), 2370-81.

283. Kosmulski, M.; Eriksson, P.; Gustafsson, J.; Rosenholm, J. B., Specific adsorption of nickel and ζ potential of silica at various solid-to-liquid ratios. *Journal of Colloid And Interface Science* **1999**, 220 (1), 128-132.
284. Kosmulski, M.; Gustafsson, J.; Rosenholm, J. B., Ion specificity and viscosity of rutile dispersions. *Colloid and Polymer Science* **1999**, 277 (6), 550-556.
285. Prijic, S.; Scancar, J.; Romih, R.; Cemazar, M.; Bregar, V. B.; Znidarsic, A.; Sersa, G., Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. *Journal of Membrane Biology* **2010**, 236 (1), 167-179.
286. Benoist, D.; Tourbier-Germain, S.; Tourbier, Y., *Plans d'expériences: Construction et analyse*. Lavoisier: 1994.
287. Goupy, J., *La méthode des plans d'expériences - Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*. Dunod - Paris: 1988.
288. Goupy, J., "Etude comparative de divers plans d'expériences, *Rev. Statistique Appliquée* **1990**, 38 (4), 5-44.
289. Goupy, J., *Introduction aux plans d'expériences*. Dunod, Paris, 2e édition ed.: 2001.
290. Pillet, M., *Introduction aux plans d'expériences par la méthode Taguchi*. Les Editions d'Organisation: 1992.
291. Briviba, K.; Klotz, L. O.; Sies, H., Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological Chemistry* **1997**, 378 (11), 1259-1265.
292. Herzberg, G., Photography of infrared solar spectrum to wavelength 12,900Å. *Nature (London)* **1934**, 133, 759.
293. Mallet, L., *Comptes Rendus Acad Sci. Paris*. **1927**, 185, 352.
294. Kautsky, H.; Hirsch, A., Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. *Die Naturwissenschaften* **1931**, 19 (48), 964.
295. Mulliken, R. S., Interpretation of the Atmospheric Oxygen Bands; Electronic Levels of the Oxygen Molecul. *Nature* **1928**, 122, 505-505.
296. Mulliken, R. S., The interpretation of band spectra part III. Electron quantum numbers and states of molecules and their atoms. *Reviews of Modern Physics* **1932**, 4 (1), 1-86.
297. Khan, A. U.; Kasha, M., Red chemiluminescence of oxygen in aqueous solution. *J Chem Physics* **1963**, 39, 2105-6.
298. Khan, A. U.; Kasha, M., Rotational structure in the chemiluminescence spectrum of molecular oxygen in aqueous systems. *Nature (London)* **1964**, 204, 4955.
299. Khan, A. U.; Kasha, M., Physical theory of chemiluminescence in systems evolving molecular oxygen. *J Am Chem Soc* **1966**, 88, 1574-6.
300. Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W., Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection [1]. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92 (17), 5216-5218.

301. Foote, C. S.; Denny, R. W., Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene [14]. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, 90 (22), 6233-6235.
302. Evans, D. F., Magnetic perturbation of singlet-triplet transitions. Part V. Mechanism. *J Chem Soc* **1961**, 1987-1993.
303. Tsubomura, H.; Mulliken, R. S., Molecular Complexes and their Spectra. XII. Ultraviolet Absorption Spectra Caused by the Interaction of Oxygen with Organic Molecules¹. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82 (23), 5966-5974.
304. Dexter, D. L., A theory of sensitized luminescence in solids. *The Journal of Chemical Physics* **1953**, 21 (5), 836-850.
305. Ellis, J. W.; Kneser, H. O., A combination relation in the absorption spectrum of liquid oxygen [6]. *Physical Review* **1933**, 44 (5), 420.
306. Gollnick, K., *Adv.Photochem.* **1968**, 6 (1).
307. Foote, C. S.; Chang, Y. C.; Denny, R. W., Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism [2]. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92 (17), 5218-5219.
308. Bland, J., Biochemical effects of excited state molecular oxygen. *J Chem Educ* **1976**, 53, 274-9.
309. Schenck, G. O., Zur Theorie der photosensibilisierten Reaktion mit molekularem Sauerstoff. *Die Naturwissenschaften* **1948**, 35 (1), 28-29.
310. Dewar, M. J. S.; Thiel, W., MINDO/3 study of the addition of singlet oxygen ($1\Delta_g\text{O}_2$) to 1,3-butadiene [2]. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99 (7), 2338-2339.
311. Ameta, S. C.; Punjabi, P. B.; Chobisa, C. S.; Mangal, N.; Bhardwaj, R., Singlet Molecular Oxygen. *Asian Journal of Chemistry Reviews* **1990**, 1 (2), 106-124.
312. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., *Free Radical in Biology and Medicine. Second Edition*. Clarendon Press: Oxford., 1982.
313. Leach, A. G.; Houk, K. N., Diels-alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinediones: Transition states and mechanisms from contemporary theory. *Chemical Communications* **2002**, (12), 1243-1255.
314. Moan, J.; Berg, K., The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **1991**, 53, 549-553.
315. Egorov, S. Y.; Kamalov, V. F.; Koroteev, N. I.; Krasnovsky Jr, A. A.; Toleutaev, B. N.; Zinukov, S. V., Rise and decay kinetics of photosensitized singlet oxygen luminescence in water. Measurements with nanosecond time-correlated single photon counting technique. *Chemical Physics Letters* **1989**, 163 (4-5), 421-424.
316. Rodgers, M. A. J.; Snowden, P. T., Lifetime of $\text{O}_2(1\Delta_g)$ in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104 (20), 5541-5543.

317. Ogilby, P. R.; Foote, C. S., Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (11), 3423-3430.
318. Hatz, S.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R., Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: Addressing the issue of cell viability. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2007**, *6* (10), 1106-1116.
319. Kuimova, M. K.; Yahiolu, G.; Ogilby, P. R., Singlet oxygen in a cell: Spatially dependent lifetimes and quenching rate constants. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (1), 332-340.
320. Kuimova, M. K.; Botchway, S. W.; Parker, A. W.; Balaz, M.; Collins, H. A.; Anderson, H. L.; Suhling, K.; Ogilby, P. R., Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nature Chemistry* **2009**, *1* (1), 69-73.
321. Niedre, M. J.; Secord, A. J.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C., In Vitro Tests of the Validity of Singlet Oxygen Luminescence Measurements as a Dose Metric in Photodynamic Therapy. *Cancer Research* **2003**, *63* (22), 7986-7994.
322. Niedre, M. J.; Yu, C. S.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C., Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br J Cancer* **2005**.
323. Niedre, M. J.; Patterson, M. S.; Giles, A.; Wilson, B. C., Imaging of photodynamically generated singlet oxygen luminescence in vivo. *Photochemistry and Photobiology* **2005**, *81* (4), 941-943.
324. Zhao, B.; Yin, J. J.; Bilski, P. J.; Chignell, C. F.; Roberts, J. E.; He, Y. Y., Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *241* (2), 163-172.
325. Cheng, S. H.; Lee, C. H.; Yang, C. S.; Tseng, F. G.; Mou, C. Y.; Lo, L. W., Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: Potential cancer theranostics. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19* (9), 1252-1257.
326. Spiller, W.; Kliesch, H.; Wohrle, D.; Hackbarth, S.; Roder, B.; Schnurpfeil, G., Singlet oxygen quantum yields of different photo-sensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, *2* (2), 145-158.
327. Tada, D. B.; Vono, L. L. R.; Duarte, E. L.; Itri, R.; Kiyohara, P. K.; Baptista, M. S.; Rossi, L. M., Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir* **2007**, *23* (15), 8194-8199.
328. Tu, H. L.; Lin, Y. S.; Lin, H. Y.; Hung, Y.; Lo, L. W.; Chen, Y. F.; Mou, C. Y., In vitro studies of functionalized mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Advanced Materials* **2009**, *21* (2), 172-177.
329. Chen, Z. L.; Sun, Y.; Huang, P.; Yang, X. X.; Zhou, X. P., Studies on preparation of photosensitizer loaded magnetic silica nanoparticles and their anti-

tumor effects for targeting photodynamic therapy. *Nanoscale Research Letters* **2009**, 4 (5), 400-408.

330. Fernandez, J. M.; Bilgin, M. D.; Grossweiner, L. I., Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, 37 (1-2), 131-140.

331. Liu, F.; Zhou, X.; Chen, Z.; Huang, P.; Wang, X.; Zhou, Y., Preparation of purpurin-18 loaded magnetic nanocarriers in cottonseed oil for photodynamic therapy. *Materials Letters* **2008**, 62 (17-18), 2844-2847.

332. Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Bergey, E. J.; Oseroff, A. R.; Morgan, J.; Dougherty, T. J.; Prasad, P. N., Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (26), 7860-7865.

333. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C., Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2005**, 65 (2-3), 45-80.

334. Lavi, A.; Weitman, H.; Holmes, R. T.; Smith, K. M.; Ehrenberg, B., The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Biophysical Journal* **2002**, 82 (4), 2101-2110.

335. Yan, F.; Kopelman, R., The Embedding of Meta-tetra(Hydroxyphenyl)-Chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties. *Photochemistry and Photobiology* **2003**, 78 (6), 587-591.

336. Flors, C.; Fryer, M. J.; Waring, J.; Reeder, B.; Bechtold, U.; Mullineaux, P. M.; Nonell, S.; Wilson, M. T.; Baker, N. R., Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green®. *Journal of Experimental Botany* **2006**, 57 (8), 1725-1734.

337. Price, M.; Reiners, J. J.; Santiago, A. M.; Kessel, D., Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* **2009**, 85 (5), 1177-1181.

338. Wei, Y. C.; Li, Y. Y.; Jia, X. S. In *Real time monitoring singlet oxygen in photodynamic therapy with chemiluminescence*, 2009.

339. Sakai, H., Detection of singlet oxygen from hematoporphyrin derivative (HpD) using luminol. *Journal of Tokyo Medical College* **1985**, 43 (6), 940-949.

340. Tromberg, B. J.; Dvornikov, T.; Berns, M. W., Indirect spectroscopic detection of singlet oxygen during photodynamic therapy. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* **1991**, 1427, 101-108.

341. Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Looock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J. O., Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chemical Communications* **2009**, (12), 1475-1477.

342. Hocine, O.; Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Fontanel, S.; Raehm, L.; Richeter, S.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Charnay, C.; Derrien, G.; Smaïhi, M.; Sahmoune, A.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J. O., Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, 402 (1-2), 221-230.
343. Hao, E.; Friso, E.; Miotto, G.; Jori, G.; Soncin, M.; Fabris, C.; Sibrian-Vazquez, M.; Vicente, M. G. H., Synthesis and biological investigations of tetrakis(p-carboranylthio- tetrafluorophenyl)chlorin (TPFC). *Organic and Biomolecular Chemistry* **2008**, 6 (20), 3732-3740.
344. East, L.; Isacke, C. M., The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2002**, 1572 (2-3), 364-386.
345. Sturge, J.; Wienke, D.; East, L.; Jones, G. E.; Isacke, C. M., GPI-anchored uPAR requires Endo180 for rapid directional sensing during chemotaxis. *Journal of Cell Biology* **2003**, 162 (5), 789-794.
346. Achelle, S.; Couleaud, P.; Baldeck, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Maillard, P., Carbohydrate-porphyrin conjugates with two photon absorption properties as potential photosensitizing agents for photodynamic therapy. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, Soumise.
347. Ringot, C.; Sol, V.; Saad, N.; Bressollier, P.; Granet, R.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Krausz, P., Triazinyl porphyrin-based photoactive cotton fabrics: preparation, characterization and antibacterial activity *Biomacromolecules* **2011**, Soumise.
348. Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villanueva, A.; Jori, G., Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, 32 (3), 153-157.
349. Merchat, M.; Spikes, J. D.; Bertoloni, G.; Jori, G., Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, 35 (3), 149-157.
350. Verhille, M.; Couleaud, P.; Vanderesse, R.; Brault, D.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C., Modulation of Photosensitization Processes for an Improved Targeted Photodynamic Therapy. *Curr Med Chem* **2010**, 17 (32), 3925-3943.
351. Berthelot, T.; Lasne, M. C.; Déléris, G., New trends in molecular imaging of tumor angiogenesis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, 8 (5), 497-522.
352. Kline, T.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cervený, C. G.; Senter, P. D., Novel antitumor prodrugs designed for activation by matrix metalloproteinases-2 and -9. *Mol Pharm* **2004**, 1 (1), 9-22.
353. Wittig, G.; Schöllkopf, U., *Chemische Berichte* **1954**, 97, 1318-1330.
354. Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Liddell, P. A., Synthesis of carotenoporphyrin models for photosynthetic energy and electron transfer *Methods in Enzymology* **1992**, 213, 87-100.

355. Couleaud, P.; Faure, M.; Verhille, M.; Manigat, R.; André, J. C., From public to occupational health: Towards an inverse push-pull paradigm in nanotechnologies innovation. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia* **2010**, 32 (4), 400-402.
356. Morin, E., Sur l'interdisciplinarité. *Bulletin interactif du Centre International de Recherches Interdisciplinaires* **1994**, 2.
357. Morin, E., *Éthique (La méthode 6)*. Seuil: 2004; p 65.
358. André, J.-C., Vers le développement d'une recherche durable... ou vers une (ré)humanisation des sciences des artefacts. *Environnement, Risques et Santé* **2008**, 7, 47-54.
359. André, J.-C., Réflexion sur la gestion des risques et de la nanonormalisation. *ADSP* **2008**, 64, 38-39.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Gilles LEMERCIER, Professeur, ICMR, Université de Reims, Reims

Monsieur Jean-Pierre SOUCHARD, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur COULEAUD Pierre

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles
pour de la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

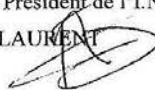
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des Procédés et des Produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 9 février 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1

Le développement de la thérapie photodynamique s'oriente vers la conception de photosensibilisateurs de 3^{ème} génération, assemblages moléculaires adressés vers une cible biologique spécifique. Les nanoparticules développées dans un cadre de cette thèse sont constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium recouvert d'une couche de polysiloxane. Une chlorine est couplée de façon covalente dans cette couche de polysiloxane. Un surfactant hydrophile recouvre la surface des nanoparticules afin de les rendre biocompatibles. Enfin, les nanoparticules sont fonctionnalisées par le peptide ATWLPPR ciblant le récepteur d'intérêt neuropiline-1, surexprimé par les cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse tumorale. La stratégie est double : d'une part, il s'agit de traiter les lésions cancéreuses par thérapie photodynamique, d'autre part d'asphyxier le tissu tumoral en s'attaquant au réseau vasculaire qui l'alimente en nutriments et en oxygène. L'optimisation de la nanoplate-forme a porté sur la taille du cœur d'oxyde de gadolinium pour une intensité du signal IRM rehaussée, l'épaisseur de la coquille pour permettre la diffusion de l'oxygène indispensable à la réaction photodynamique donc à l'efficacité thérapeutique, le choix et la quantité d'unités peptidique couplées pour une sélectivité maximale pour les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains.

Thérapie photodynamique, nanoparticule, adressage, peptide, IRM

Peptide functionalization of multifunctional hybrid nanoparticles for photodynamic therapy targeting neuropilin-1

The development of photodynamic therapy (PDT) is focused on the conception of 3rd generation of photosensitizers which are molecular constructs targeted to specific biological receptors. The nanoparticles we have developed in this thesis are made of a gadolinium oxide core, a polysiloxane shell in which are covalently entrapped chlorins. Hydrophilic surfactants are grafted on the nanoparticles in order to make it biocompatible. Finally, the nanoparticles are functionalized by ATWLPPR peptide to target neuropilin-1 which is over-expressed on endothelial cells during tumoral angiogenesis. The aim of this strategy is both to treat cancer lesion by photodynamic therapy and to asphyxiate the tumoral tissue by destroying the vasculature that brings nutrients and oxygen to the tumor. The optimization of the nanoplate-form has been done by modifying the size of the gadolinium core for the best MRI signal, the size of the polysiloxane shell in order to let the oxygen diffuse in and out of the nanoparticle, the type and the amount of peptides coupled to the surfactant for the best selectivity for tumoral tissue compared to normal tissue.

Photodynamic therapy, nanoparticle, targeting, peptide, MRI