



**HAL**  
open science

# Conception et optimisation de nanoparticules dendrimériques photoactivables dans le cadre d'un traitement photodynamique

Estelle Bastien

## ► To cite this version:

Estelle Bastien. Conception et optimisation de nanoparticules dendrimériques photoactivables dans le cadre d'un traitement photodynamique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0322 . tel-01571524v1

**HAL Id: tel-01571524**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01571524v1>**

Submitted on 30 Mar 2018 (v1), last revised 2 Aug 2017 (v2)

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

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



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**  
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Estelle BASTIEN**

## Conception et optimisation de nanoparticules dendrimériques photoactivables dans le cadre d'un traitement photodynamique

Le 7 décembre 2015

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

Dr. Frédéric DUCONGE	I2BM, MIRCen, CEA Fontenay-aux-Roses
Pr. Sylvain DUKIC	MEDyC –UMR 7369 CNRS, Université de Reims

**Examineurs :**

Dr. Vladimir SUKHORUKOV	Département de Biotechnologies et de Biophysique, Université de Würzburg
Pr. Raphaël SCHNEIDER	LRGP –UMR 7275 CNRS, Université de Lorraine
Dr Lina BEZDETAYA	CRAN –UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine, Institut de Cancérologie de Lorraine <i>Directeur de thèse</i>
Dr. Henri-Pierre LASSALLE	CRAN –UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine, Institut de Cancérologie de Lorraine <i>Co-directeur de thèse</i>



## Remerciement,

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse sont le fruit d'environ trois ans de recherche au sein du département Santé-Biologie-Signal du laboratoire CRAN. Ce travail a été mené à son terme grâce à la bienveillance et au soutien d'un grand nombre de personnes toujours ouvert à la discussion et au partage de leur savoir. Je désirais, ici, vous faire part de ma plus grande gratitude, tout particulièrement à certain d'entre eux sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Je suis reconnaissante au **Dr. Lina Bolotina-Bezdetnaya** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de recherche au sein de son équipe. Merci pour vos conseils, votre temps, et nos discussions centrées sur les problèmes scientifiques rencontrés au cours de ces dernières années.

Je tiens sincèrement à remercier le **Dr. Henri-Pierre Lassalle**, pour son encadrement, ses conseils scientifiques et nos longues discussions pour me guider dans la bonne direction. Votre soutien rempli de bienveillance et toujours enrobé d'humour face aux aléas scientifiques ont été pour moi d'un grand réconfort.

Je tiens à remercier le **Dr. Frédérique Ducongé** et le **Pr. Sylvain Dukic** pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. Votre vaste expérience scientifique, vos formidables commentaires et vos questions ont considérablement contribué à la finalisation de ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse et pour m'avoir donné la fabuleuse opportunité d'en discuter avec vous.

Je remercie le **Pr. Raphael Schneider** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de présider le jury de thèse. Travailler à vos côtés ces trois dernières années a été pour moi un réel plaisir. Je tenais à vous remercier sincèrement pour votre disponibilité, votre écoute ainsi que pour vos conseils.

I am very grateful to **Pr. Vladimir Sukoroukov** for his kind and gracious acceptance to take part in the thesis defense as a member of the jury, for the discussion that we have had during the defense.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe de recherche de l'institut de Cancérologie de Lorraine, mes collègues, pour ces années de travail dans une ambiance chaleureuse. Merci tout particulièrement à vous, **Dr. Aurélie Reinhard**, **M<sup>lle</sup> Aurélie François**, **M<sup>me</sup> Dominique Marius Le Prince**, **Dr. Vadim Reshetov** et **Ilya Yakovet**, pour

nos discussions plus ou moins scientifiques. I could not forget **Igor Yankovsky**, my Byelorussian co-worker, friend and the main participant of the unforgettable « broken team », with whom I enjoyed collaborating during these last years.

Je remercie le **Dr. Sophie Marchal**, pour le temps, l'écoute que vous avez toujours su m'accorder et les conseils avisés que vous m'avez prodigués.

Pour finir, merci à ma famille et à mes amis proches qui m'ont soutenu et encouragé durant ces dernières années. Merci tout particulier à mes parents, sans votre amour, vos encouragements, votre soutien et votre patience tout au long de ces trois dernières années, je n'aurais jamais pu accomplir ce travail.

Je remercie nos soutiens financiers, la ligue contre le cancer, l'institut de cancérologie de lorraine et la région lorraine sans qui ces recherches n'auraient pu aboutir.

Merci à tous,

Estelle Bastien

# Table des matières

Table des figures .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des acronymes.....	ix
Introduction .....	1
<b>1 Contexte de l'étude et problématique scientifique.....</b>	<b>3</b>
1.1 La thérapie Photodynamique .....	3
1.1.1. Historique.....	3
1.1.2. Principes de la thérapie photodynamique .....	5
1.1.2.1. Les réactions photochimiques .....	5
1.1.2.2. Mécanismes d'éradication tumorale médiés par la thérapie photodynamique.....	8
1.1.3. Les photosensibilisateurs .....	12
1.1.3.1. Les générations de photosensibilisateur .....	12
1.1.3.2. Les photosensibilisateurs approuvés en clinique.....	13
1.1.3.3. Biodistribution des photosensibilisateurs .....	14
1.1.4. La Chlorine e6.....	15
1.1.4.1. Généralités .....	15
1.1.4.2. Propriétés physicochimiques et leurs impacts sur le comportement en milieu biologique de la Chlorine e6 .....	16
1.2 L'oxygène moléculaire singulet.....	17
1.2.1. Généralités .....	17
1.2.2. L'oxygène moléculaire singulet.....	17
1.2.2.1. Structure électronique.....	17
1.2.2.2. Stabilité et relaxation .....	18
1.2.3. Génération de l'oxygène singulet .....	20
1.2.4. Détection de l'oxygène singulet.....	21
1.2.4.1. Détection indirecte.....	22
1.2.4.2. Détection directe.....	24
1.3 La vectorisation.....	27
1.3.1. Généralités .....	27

1.3.2. Rationnel du développement de nanoparticules en cancérologie .....	28
1.3.3. Objectifs de la vectorisation.....	29
1.3.4. Voies de ciblage tumorales.....	30
1.3.4.1. Le ciblage passif.....	30
1.3.4.2. Le ciblage actif.....	31
1.3.5. Incorporation cellulaire des nanoparticules .....	33
1.3.5.1. Les différentes voies d'endocytose.....	33
1.3.5.2. Les méthodes d'études des voies d'internalisation des NPs .....	35
1.3.6. Vectorisation de la Chlorine e6 en PDT .....	36
1.3.6.1. Généralités .....	36
1.3.6.2. Nanoparticules reposant sur le ciblage passif ou actif.....	37
1.3.6.3. Nanoparticules multimodales .....	39
1.3.6.4. Conclusion .....	41
1.4 Les dendrimères.....	41
1.4.1. Historique .....	41
1.4.2. Architecture et composition.....	42
1.4.3. Méthodes de synthèse des dendrimères.....	44
1.4.3.1. La méthode divergente.....	45
1.4.3.2. La méthode convergente .....	45
1.4.4. Dendrimères : un excellent candidat pour des applications en biologie.....	46
1.4.4.1. Propriétés biologiques des dendrimères <i>in vitro</i> : la cytotoxicité .....	46
1.4.4.2. Evaluation des propriétés <i>in vivo</i> .....	48
1.4.5. Les dendrimères comme vecteur anticancéreux .....	53
1.4.5.1. Ciblage passif.....	53
1.4.5.2. Ciblage actif.....	54
1.4.6. Les dendrimères en PDT : Etat de l'art .....	57
1.4.6.1. L'encapsulation du photosensibilisateur.....	57
1.4.6.2. Le greffage covalent du photosensibilisateur.....	59
<b>2 Objectifs du travail.....</b>	<b>65</b>
<b>3 Optimisation de la composition des nanoparticules photoactivables</b>	
<b>à base de dendrimère.....</b>	<b>67</b>
3.1 Introduction.....	67
3.2 Matériels et méthodes .....	68
3.2.1.1. Synthèse des nanoparticules.....	68
3.2.2. Caractérisation .....	69
3.2.3. Etudes <i>in vitro</i> .....	70
3.3 Résultats et discussion .....	71
3.4 Conclusion .....	78



<b>4 Caractérisation photobiologique des nanoparticules G4.5-Ce6+/- PEG</b> .....	<b>79</b>
4.1. Potentialisation de l'efficacité photodynamique de la Chlorine e6 <i>via</i> sa conjugaison aux dendrimères PAMAM.....	79
4.1.1. Résumé.....	79
4.1.2. Publication.....	81
4.2 Etude du tumorotropisme des G4.5-Ce6+/-PEG par imagerie de fluorescence .....	92
4.2.1. Introduction .....	92
4.2.2. Matériels et méthodes .....	92
4.2.2.1. Matériels .....	92
4.2.2.2. Spectres de fluorescence .....	92
4.2.2.3. Etude du tumorotropisme des nanoparticules.....	93
4.2.3. Résultats et Discussion .....	93
4.3 Conclusion .....	96
<b>5 Nanoparticules clivables à base de dendrimère PAMAM et de Chlorine e6</b> .....	<b>98</b>
5.1 Introduction.....	98
5.2 Matériels et méthodes .....	99
5.2.1. Synthèse des nanoparticules clivables .....	99
5.2.2. Caractérisation.....	99
5.2.3. Clivage de la Chlorine e6 par augmentation du pH.....	100
5.2.4. Etude du tumorotropisme des nanoparticules.....	100
5.3 Résultats et discussion .....	101
5.4 Conclusion .....	107
<b>Discussion générale.....</b>	<b>108</b>
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>113</b>
<b>Production scientifique.....</b>	<b>115</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>117</b>



# Table des figures

FIG. 1.1 Historique du développement de la thérapie photodynamique (d'après [7]) .....	4
FIG. 1.2 Diagramme d'énergie de Jablonski.....	6
FIG. 1.3 Principes de la photodestruction de tumeurs par thérapie photodynamique.....	10
FIG. 1.4 Structure chimique de la Chlorine e6 [43].....	15
FIG. 1.5 Formation de l'orbitale moléculaire de l'oxygène moléculaire et de ses états excités [60].....	18
FIG. 1.6 Courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et des deux états excités de l'oxygène moléculaire [60].....	19
FIG. 1.7 Diagramme simplifié des niveaux d'énergie pour la production de la fluorescence retardé (SODF) (d'après [87]).....	23
FIG. 1.8 Représentation schématique de l'utilisation du ciblage passif et actif par la vectorisation [125].....	32
FIG. 1.9 Les mécanismes d'endocytose. [134].....	35
FIG. 1.10 Représentation schématique d'un dendrimère de génération 2.5 (G 2.5). .....	42
FIG. 1.11 Illustration de dendrimères possédant des structures et des compositions diverses, qui sont usuellement utilisés en thérapie anticancéreuse. [171], [173].....	43
FIG. 1.12 Représentation schématique d'un dendrimère PAMAM de génération 3 (G 3). Les générations complètes (1, 2, et 3) et les demi-générations (0.5, 1.5 et 2.5) sont délimitées sur la structure par des cercles. [173].....	44
FIG. 1.13 Méthodes de synthèse des structures dendritiques, la voie divergente et la voie convergente (d'après [177]).....	46
FIG. 1.14 Prérequis pour la vectorisation de molécules anti-cancéreuses basée sur des dendrimères (d'après [213]).....	55
FIG. 1.15 Principales stratégies de vectorisation basées sur des constructions dendrimériques utilisées en PDT (d'après [215]).....	57
FIG. 1.16 Représentation schématique d'une nanoplateforme de théranostique à base de dendrimère PPI encapsulant de la Phthalocyanine et fonctionnalisé avec des groupements de furtivité (PEG) et des peptides de ciblage (d'après [217]).....	59

FIG. 1.17 Structure des dendrimères à base de Zn-phthalocyanine (A) et représentation schématique d'un complexe micellaire polyionique sphérique PIC(-) (B) [220], [226].....	61
FIG. 1.18 Structure chimique des dendrimères 18m-ALA et représentation schématique simplifiée du mode d'action de l'acide 5-aminolevulinique (ALA) après son incorporation cellulaire. (d'après [232]) .....	63
FIG. 3.1 Synthèse des nanoparticules G5-Ce6. ....	68
FIG. 3.2 Cytotoxicité à l'obscurité de la Ce6 libre (rond noir) et conjuguée aux dendrimères G4.5 sans PEG (G4.5-Ce6 ; triangle rouge), aux dendrimères G4.5 PEGylés (G4.5-Ce6-PEG ; triangle-inversé bleu), et aux dendrimère G5 (G5-Ce6 ; losange vert). ....	75
FIG. 3.3 Efficacité photodynamique de la Ce6 libre (rond noir) et conjuguée aux dendrimères G4.5 sans PEG (G4.5-Ce6 ; triangle rouge), aux dendrimères G4.5 PEGylés (G4.5-Ce6-PEG ; triangle-inversé bleu), et aux dendrimère G5 (G5-Ce6 ; losange vert). ....	75
FIG. 3.4 Cinétique d'incorporation cellulaire des différents composés. ....	76
FIG. 4.1 Imagerie de fluorescence de souris « <i>nude</i> » xéno greffée avec des cellules FaDu, injectée en i.v. avec une solution de Chlorine e6 (2,5 mg/kg).....	94
FIG. 4.2 Imagerie de fluorescence de souris « <i>nude</i> » xéno greffée avec des cellules FaDu, injectée avec une solution de G4.5-Ce6-PEG (Ce6 = 2,5 mg/kg). ....	95
FIG. 4.3 Spectres de fluorescence de la Ce6 (noir) et des G4.5-Ce6-PEG (rouge) dans du milieu de culture RPMI supplémenté avec 9 % de sérum de veau fœtaux.....	96
FIG. 5.1 Spectres d'absorption (A) et spectres de fluorescence (B) des nanoparticules clivables (rouge) et de la Chlorine e6 (bleu) dans l'éthanol.....	102
FIG. 5.2 Spectres d'absorptions des NPs après alcalinisation et neutralisation du pH dans l'eau (jaune), et à la suite de leur filtration à 10KDa sur le surnagent (bleu) et sur le filtrat (violet).....	103
FIG. 5.3 Production d'oxygène singulet par les nanoparticules clivables, avant clivage et à la suite du clivage dans une solution aqueuse à pH basique (pH = 11) ou neutre (pH = 7).....	104
FIG. 5.4 Imagerie de fluorescence de souris « <i>nude</i> » porteuses de tumeur HT29 injectée en i.v. avec une solution de nanoparticules clivables ([Ce6] = 2,5 mg/kg).....	106

# Liste des tableaux

TAB. 1.1 Liste des photosensibilisateurs actuellement utilisés en clinique (d'après [9]).	13
TAB. 1.2 Propriétés photophysiques de la Chlorine e6 (dans l'éthanol) (d'après [44]).	15
TAB. 1.3 Rendements quantiques d'oxygène singulet des principaux photosensibilisateurs habituellement utilisés en PDT, dans une solution de méthanol.	21
TAB. 1.4 Avantages et limitations des principales méthodes de détection de l'oxygène singulet moléculaire d'après [73].	26
TAB. 1.5 Formulations à base de nanoparticules approuvées pour le traitement des tumeurs solides (D'après [113]).	27
TAB. 1.6 Dendrimères vectorisant des agents de chimiothérapie : composition, avantages et désavantages d'après [209]	56
TAB. 3.1 Propriétés photophysiques des conjugués à base de Ce6 dans l'éthanol.	72
TAB. 3.2 Production d'oxygène singulet <i>in vitro</i> .	74
TAB. 5.1 Temps de vie de l'état triplet des nanoparticules clivables et le temps de vie de l'oxygène singulet dans les différentes solutions (eau, pH = 11 et pH = 7).	105



# Liste des acronymes

$\lambda$	Longueur d'onde
$\tau_T$	Temps de vie de l'état triplet du photosensibilisateur
$\tau_\Delta$	Temps de vie de l'oxygène singulet
$\Phi_{FL}$	Rendement quantique de fluorescence
$\Phi_\Delta$	Rendement quantique d'oxygène singulet
<b>ALA</b>	Acide 5-aminolevulinique
<b>AMM</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>C-dots</b>	Carbon Dots
<b>Ce6</b>	Chlorine e6
<b>Da</b>	Dalton
<b>DLI</b>	« <i>Drug-Light Interval</i> » ou Intervalle « Drogue-Lumière »
<b>DOX</b>	Doxorubicine
<b>DPc</b>	Dendrimère à cœur de Phthalocyanine
<b>DPZn</b>	Dendrimère de Zinc-Porphyrine
<b>EPR</b>	« <i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i> »
<b>ERO</b>	Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>FDA</b>	« <i>Food and Drug Administration</i> »
<b>FRET</b>	« <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> » ou Transfert d'Énergie par Résonance de Type Förster
<b>G 0, 1, 2, ...</b>	Génération 0, 1, 2, ...
<b>G4.5-Ce6</b>	Dendrimère PAMAM génération 4.5 fonctionnalisé avec la Ce6
<b>G4.5-Ce6-PEG</b>	Dendrimère PAMAM génération 4.5 fonctionnalisé avec la Ce6 et des groupements PolyÉthylène(Glycol)
<b>G5-Ce6</b>	Dendrimère PAMAM génération 5 fonctionnalisé avec la Ce6

<b>HCL</b>	Chlorure d'hydrogène
<b>HpD</b>	Hématoporphyrine Dérivé
<b>i.p.</b>	Intra-Péritonéale
<b>i.v.</b>	Intra-Veineuse
<b>IC<sub>50</sub></b>	« <i>Half maximal Inhibitory Concentration</i> » ou Concentration d'incubation inhibant 50% de la Survie cellulaire
<b>LDL</b>	« <i>Low Density Lipoprotein</i> » ou Lipoprotéines de faible densité
<b>me-PEG</b>	méthyl-PolyEthylène Glycol
<b>MTX</b>	Méthotrexane
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>NIR</b>	« Near InfraRed » ou Proche infra-rouge
<b>NP</b>	Nanoparticule
<b>PAMAM</b>	Poly(AmidoAmine)
<b>Pc</b>	Phthalocyanine
<b>PCI</b>	« PhotoChemical Internalisation » ou Internalisation photochimique
<b>PDA</b>	Polymères Poly(DopAmine)
<b>PDD</b>	« <i>Photodynamic Diagnosis</i> » ou Diagnostic photodynamique
<b>PDT</b>	« <i>Photodynamic Therapy</i> » ou Thérapie photodynamique
<b>PEG</b>	PolyEthylène(Glycol)
<b>Pheo-a</b>	Phéophorbide a
<b>PIC</b>	« PolyIon Complex » ou complexes polyioniques
<b>PPI (ou DAB)</b>	Poly(ProPylenimine)
<b>PpIX</b>	Protoporphyrine IX
<b>PS</b>	PhotoSensibilisateur
<b>PTT</b>	« <i>Photothermal Therapy</i> » ou Thérapie photothermique
<b>PTX</b>	Paclitaxel
<b>PVP</b>	PolyVinylPyrrolidone
<b>Q-dots</b>	Quantum Dots
<b>RB</b>	Rose Bengal
<b>RES</b>	« <i>ReticuloEndothelial System</i> » ou système réticulo-endothélial



<b>S<sub>0</sub></b>	Etat fondamental
<b>S<sub>1</sub></b>	Etat singulet
<b>S<sub>n</sub></b>	Etat excité
<b>T<sub>1</sub></b>	Etat triplet
<b>UCNP</b>	« <i>UpConversion NanoParticle</i> »



# Introduction

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé au CRAN (Centre de Recherche en Automatique de Nancy) dans le département SBS (Signal-Biologie-Santé) en étroite collaboration avec l'ICL (Institut de Cancérologie de Lorraine). C'est un projet multidisciplinaire qui a fait intervenir un Laboratoire de Chimie, le LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy), et le Laboratoire de Photophysique de l'Université de Humboldt (Berlin, Allemagne). Il s'insère dans l'une des thématiques de recherche du département SBS visant à concevoir, développer et caractériser de nouvelles formulations nanoparticulaires de molécules actives. Le champ d'application de ce travail concerne le traitement par thérapie photodynamique des lésions cancéreuses superficielles, et plus particulièrement des cancers de la tête et du cou.

La thérapie photodynamique (PDT) est une modalité de traitement des petites tumeurs superficielles accessibles à la lumière. Cette méthode repose sur l'activité d'une molécule photoactivable, le photosensibilisateur (PS), qui à la suite de son administration s'accumule préférentiellement dans les tissus néoplasiques. Sous l'action d'une irradiation lumineuse et en présence d'oxygène moléculaire, le PS génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) cytotoxiques. Parmi les ERO photoproduites, l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) est reconnu pour être le principal acteur de l'effet PDT. Lors de sa production, cette espèce extrêmement réactive oxyde de nombreux substrats biologiques et provoque ainsi la mort de la cellule cancéreuse. La capacité des PSs à produire de l'oxygène singulet est donc un paramètre clé qui conditionne leur efficacité PDT.

Actuellement, les caractéristiques physicochimiques d'un grand nombre de PSs limitent les applications cliniques de la PDT. Ils présentent notamment une faible sélectivité tumorale qui induit une efficacité PDT limitée, associée à de nombreux effets secondaires parmi lesquels la photosensibilité cutanée est la plus redoutée. De surcroît, la plupart des PSs ont une absorption limitée dans la fenêtre spectrale thérapeutique (proche infrarouge), là où la lumière pénètre en profondeur dans les tissus biologiques. Cette faible absorption restreint l'application de la PDT aux tumeurs superficielles. Dans le but de pallier ces limitations, les recherches actuelles se concentrent sur la conception de nouveaux composés aux propriétés photophysiques favorables, capables de cibler spécifiquement les tissus néoplasiques.

La vectorisation repose sur la conjugaison des PSs à des particules d'une taille de 2 à plusieurs centaines de nanomètre appelées nanoparticules (NPs), capables d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité des PSs ainsi que de cibler les tumeurs grâce aux propriétés physiopathologiques des tissus néoplasiques. A ce jour, de nombreuses NPs aux structures chimiques, propriétés et formes diverses ont été développées et testées. Elles ont d'ores et déjà démontré leur potentialité en PDT. Parmi ces NPs, les dendrimères ont émergé il y a quelques années en suscitant un grand intérêt auprès de la communauté scientifique. Ces structures synthétiques aux propriétés uniques, qui seront développées dans ce manuscrit, présentent des avantages pour la vectorisation de molécules thérapeutiques.

Dans cette étude, les dendrimères sont employés afin de vectoriser la Chlorine 6, un PS qui est amplement étudié pour ses propriétés photophysiques favorables. Ce PS est actuellement utilisé en clinique en Europe de l'Est sous une formulation appelée Radachlorin® pour le traitement des cancers de la peau.

Ainsi, les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont pour but de concevoir, caractériser et optimiser une nouvelle NP photoactivable dans le cadre d'un traitement PDT des cancers de la tête et du cou.

*Plus précisément nos travaux portent sur :*

- **La caractérisation en solution des propriétés photophysiques** des NPs. Notamment, nous étudierons la capacité des NPs à produire de l'oxygène singulet, qui est la caractéristique représentative du pouvoir phototoxique des PSs. Cette étude nous a permis d'optimiser la composition de la NP pour la suite des travaux de recherche.
- **L'analyse *in vitro* de l'efficacité photodynamique** sur des cellules de carcinome de pharynx humaines. Le **mécanisme d'action** de la NP pour favoriser l'effet PDT de la Ce6 a été étudié, par des études de la localisation intracellulaire et du mécanisme d'internalisation des NPs.
- **L'étude *in vivo* par imagerie de fluorescence de l'accumulation tumorale** des NPs sur un modèle de souris porteuses de tumeur.

# Contexte de l'étude et problématique scientifique

Ce chapitre présente, dans un premier temps les grands principes, les avantages et les limites de la thérapie photodynamique en se concentrant sur un acteur clé du traitement : l'oxygène singulet. Dans un deuxième temps, une étude bibliographique des méthodes de vectorisation des agents anticancéreux est présentée : principes, applications actuelles en cancérologie, avantages et limites. La dernière partie propose un état de l'art de l'application des dendrimères, vecteur utilisé dans notre étude, en cancérologie et tout particulièrement en thérapie photodynamique.

## 1.1 La thérapie Photodynamique

### 1.1.1. Historique

Au cours du siècle dernier la thérapie photodynamique (PDT) a été introduite comme modalité de traitement des petites tumeurs accessibles à la lumière (FIG. 1.1). La PDT est basée sur l'administration d'une molécule, appelée photosensibilisateur (PS), ayant une localisation tumorale préférentielle qui augmente la sensibilité des tissus lors d'une irradiation lumineuse dans le visible. A la suite de cette irradiation, le photosensibilisateur (PS) va produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) capables d'endommager les substrats biologiques et d'induire la mort cellulaire [1].

Connue depuis de nombreuses années, la PDT s'est développée à partir des années 1960 à la suite de la découverte de l'hématoporphyrine dérivée (HpD) [2]. Ce dérivé sert de fluorophore pour la détection tumorale [3], tout en étant administré à des concentrations bien plus faibles que l'hématoporphyrine (Hp). L'HpD est alors apparu comme un outil prometteur pour le diagnostic. Les applications cliniques de la PDT ont débuté dans les années 1970, principalement grâce aux efforts considérables du Pr. Thomas Dougherty et de ses collaborateurs de l'Institut du Cancer Roswell Park (Université de Buffalo, USA). Leurs études ont montré l'efficacité à long terme d'un

traitement PDT à base d'HpD sur des modèles animaux ainsi que sur l'homme [4]. Par la suite, l'isolation par chromatographie d'exclusion de l'HpD a conduit au développement du photosensibilisateur : le Photofrin. Le Photofrin a été approuvé pour la première fois au Canada en 1993 pour le traitement du papillome de la vessie. Par la suite son utilisation s'est diffusée aux Etats-Unis, en Europe et au Japon pour le traitement des tumeurs des voies aérodigestives supérieures [5]. Le nombre croissant d'études portant sur la PDT a conduit à une meilleure compréhension des différents facteurs qui régissent cette thérapie.

Les applications actuelles de la PDT s'étendent du traitement des lésions cancéreuses ou précancéreuses à des activités antimicrobiennes, en passant par le traitement de la dégénérescence maculaire [6]. Les recherches actuelles se concentrent sur le développement et la vectorisation de nouveaux photosensibilisateurs, sur la mise au point de sources lumineuses et sur l'optimisation des protocoles de traitement, afin d'améliorer l'efficacité de la PDT. En particulier, les propriétés photophysiques, le mode d'administration, les systèmes de délivrance des PSs ainsi que l'administration, les caractéristiques de la source lumineuse et l'intervalle drogue – lumière, doivent être optimisés en fonction des caractéristiques morphologiques spécifiques des tumeurs.

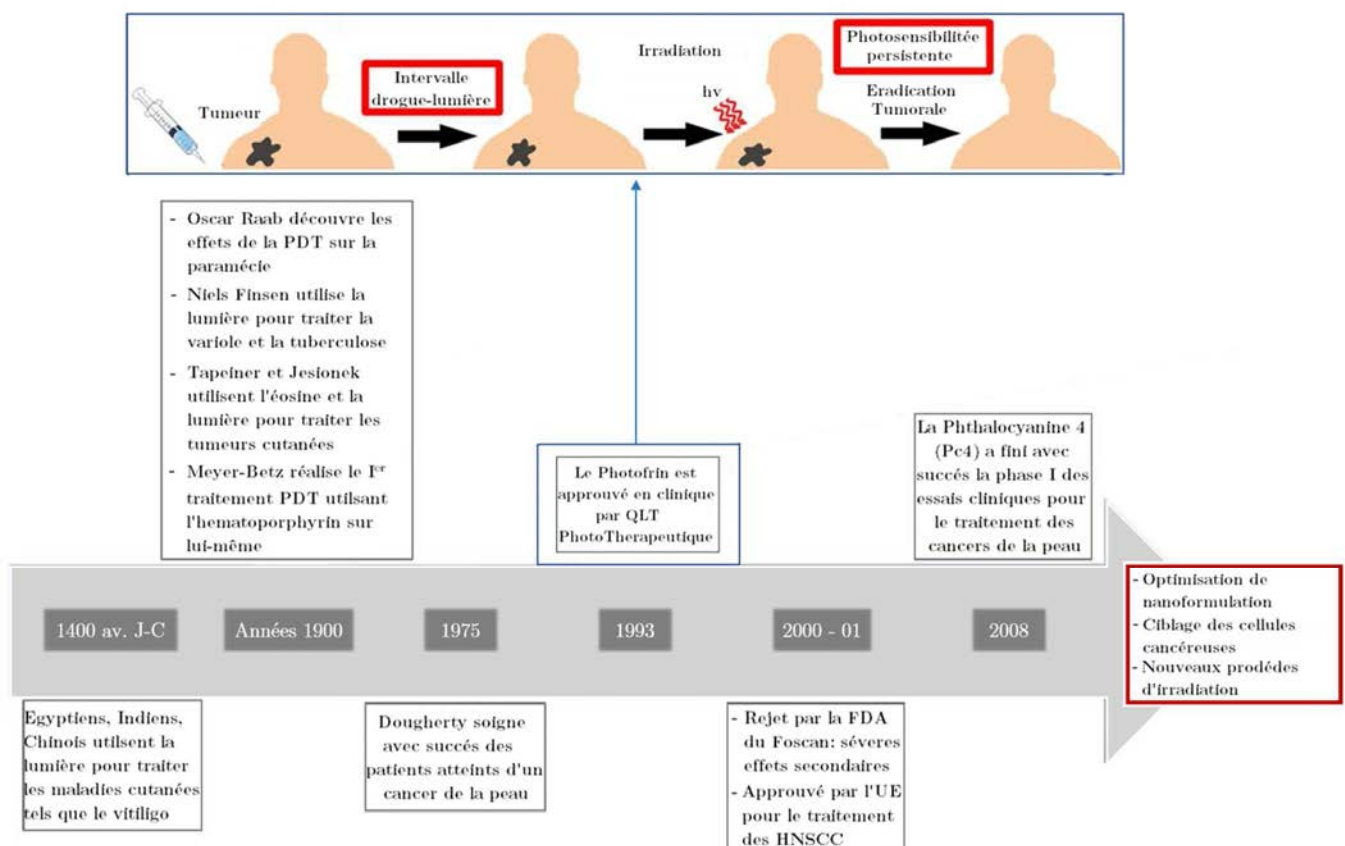


FIG. 1.1 Historique du développement de la thérapie photodynamique (d'après [7])

Actuellement la PDT est surtout utilisée pour le traitement de tumeurs superficielles directement accessibles telles que les tumeurs cutanées, ou pour les tumeurs accessibles par voie endoscopique comme les tumeurs vésicales ou œsophagiennes. Toutefois certaines tumeurs solides (ex. prostate, pancréas, foie) peuvent également être traitées par insertion de fibres optiques dans l'interstium tumoral. La PDT est utilisée pour le traitement curatif des cancers superficiels de stade précoce, ou en traitement palliatif en cas d'échec des traitements anticancéreux habituels. Comparé à la radiothérapie, le rayonnement utilisé en PDT est de moindre énergie et donc non mutagène. La limitation des principaux effets secondaires ainsi que l'absence de résistance développée suite au traitement, sont des atouts majeurs de la PDT par rapport à la chimiothérapie [8].

### 1.1.2. Principes de la thérapie photodynamique

La PDT repose sur une réaction photochimique qui combine trois composants, une molécule photoactivable (le photosensibilisateur ; PS), une source lumineuse émettant à une longueur d'onde spécifique capable d'exciter le PS, et une concentration d'oxygène moléculaire adéquate qui sous l'action du PS donnera des espèces réactives de l'oxygène (ERO) provoquant des dommages cellulaires sur le site d'action [9]. L'absence d'un de ces composants se traduit par une abolition de l'effet PDT. En clinique, le PS est généralement administré par voie intraveineuse (i.v.) ou par une application topique. A la suite d'un intervalle de temps appelé « *drug - light interval* » (DLI) déterminé selon les caractéristiques du PS et du tissu pathologique ciblé, la tumeur est irradiée avec une source lumineuse adaptée.

#### 1.1.2.1. Les réactions photochimiques

L'absorption de photons par le PS est l'étape préliminaire à toute photoréaction. Comme l'illustre le diagramme de Jablonski (FIG. 1.2), l'énergie quantique absorbée permet le passage du PS de son état électronique fondamental à un état excité. A température ambiante, la majorité des PSs sont dans un état fondamental, qui est l'état électronique de plus faible niveau d'énergie associé à une configuration où tous les électrons sont disposés en orbitale appariée. Durant la transition électronique, l'un des électrons est transféré à partir d'une orbitale initiale occupée vers l'orbitale suivante non-occupée de plus forte énergie. Par conséquent, l'état excité  $S_1$  présente une distribution électronique différente de celle de l'état fondamental  $S_0$  et est énergiquement moins stable que  $S_0$ . La désexcitation de cet état doit alors prendre place pour permettre le relargage du surplus d'énergie accumulé. Diverses voies physiques conduisant à la dissipation d'énergie existent. Elles sont toutes associées à une probabilité d'occurrence, et sont représentées sur le diagramme de Jablonski présenté en FIG. 1.2.

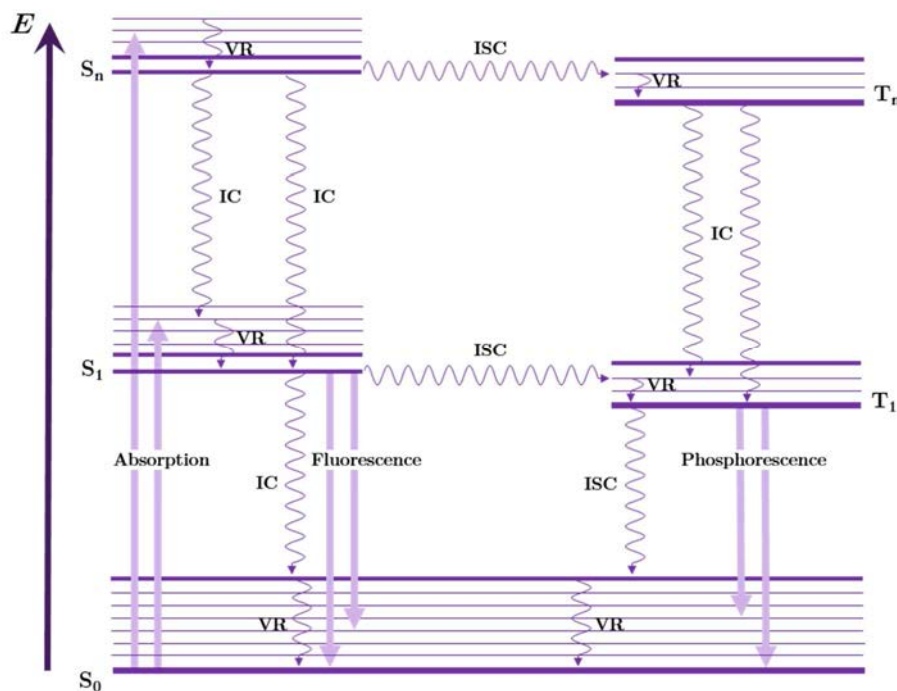


FIG. 1.2 Diagramme d'énergie de Jablonski.

VR : relaxation vibrationnelle, IC : conversion interne et ISC : conversion inter-système

Une molécule avec un fort niveau vibrationnel d'un état excité S<sub>n</sub> (n étant dépendant du PS et de la longueur d'onde utilisée) peut rapidement retourner à un niveau vibrationnel inférieur de cet état, par un processus nommé relaxation vibrationnelle. De plus, une molécule dans un état excité élevé S<sub>n</sub> peut finalement retourner à un premier état excité S<sub>1</sub> par conversion interne. Pendant cette conversion interne, l'excès d'énergie de l'état singulet est libéré sous forme de chaleur qui se dissipera dans le milieu environnant. Par la suite, l'état singulet (S<sub>1</sub>) peut rapidement retourner à son état fondamental S<sub>0</sub> par deux mécanismes : un processus radiatif (fluorescence) ou un processus non-radiatif (conversion interne). Du fait que l'énergie du photon émis, lors du processus radiatif, est égale à l'écart d'énergie entre l'état S<sub>0</sub> et S<sub>1</sub>, cela implique que la fluorescence émise ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation. La détection par fluorescence utilisée dans des applications de diagnostic s'appuie sur les propriétés d'émission de fluorescence du PS. Le rendement quantique de fluorescence d'un PS peut être calculé, mettant ainsi en évidence sa capacité à émettre de la fluorescence en fonction des photons absorbés lors de l'irradiation. En effet, il est défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule (Equation 1).

$$\Phi_{FL} = I_f / I_a \quad (1)$$

Avec :

$\Phi_{FL}$  : Rendement quantique de fluorescence

$I_f$  : Amplitude d'émission de fluorescence

$I_a$  : Amplitude d'absorption



Parallèlement aux réactions radiatives ou non radiatives, le PS peut engendrer des réactions photochimiques en passant par croisement inter-système d'un état  $S_{1(n)}$  à un état triplet nommé  $T_1$ . Il existe de nombreuses voies par lesquelles l'état  $T_1$  peut retourner à l'état  $S_0$ . La désactivation de  $T_1$  peut se réaliser par émission d'un photon (phosphorescence), ou par croisement inter-système suivi de relaxations vibrationnelles. Le temps de vie de l'état triplet est plus long ( $\tau < 10^{-7}$  s) que celui de l'état singulet ( $\tau < 10^{-9}$  s), ce qui augmente considérablement sa probabilité de réagir avec les molécules environnantes. Ainsi,  $T_1$  peut initier des réactions photochimiques *via* son interaction directe avec un substrat donnant lieu à des radicaux libres (Réaction de type I), ou par transfert d'énergie à l'état fondamental de l'oxygène moléculaire qui engendre la production d'ERO (Réaction de type II) [10].

### - Réaction de type I

Les réactions de type I se traduisent par la production de radicaux libres et d'ions radicalaires à la suite d'un transfert d'électrons ou d'hydrogène du PS à l'état triplet vers des substrats biologiques. Les deux, le PS et les états fondamentaux des substrats peuvent agir comme donneur ou accepteur d'électron et d'hydrogène. Les radicaux libres générés lors de ces processus peuvent par la suite participer à différents types de réactions. En présence d'oxygène, par exemple, les formes oxydées du PS ou du substrat peuvent rapidement réagir avec l'oxygène moléculaire présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation. Les formes semi-réduites du PS ou du substrat peuvent également interagir efficacement avec l'oxygène, et le transfert d'électron génère des ERO tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ). Ces radicaux sont reconnus comme étant de puissants oxydants d'une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine) [11].

### - Réaction de type II

Durant les procédés de type II, les réactions reposent sur un transfert d'énergie de l'état excité triplet du PS à l'état fondamental (triplet) de l'oxygène moléculaire. L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) peut être produit à partir des PSs, seulement si l'écart d'énergie entre son état triplet et fondamental est supérieur à l'énergie nécessaire pour exciter l'oxygène moléculaire de son état fondamental (triplet) vers son état excité (singulet) (94 kJ/mol, [12]). En théorie toutes les molécules absorbant à des longueurs d'ondes inférieures à 1260 nm peuvent aboutir à cette production de  $^1O_2$ . L'oxygène singulet est une espèce hautement réactive qui oxyde rapidement de nombreuses biomolécules et induit par conséquent des dommages cellulaires. L'ensemble des mécanismes référant à l' $^1O_2$  sont décrits au sein du §1.2. Un mécanisme alternatif est le transfert d'un électron directement de l'état triplet du PS vers l'oxygène moléculaire. Cette réaction produit de l'anion superoxyde mais reste minoritaire en PDT.

### 1.1.2.2. Mécanismes d'éradication tumorale médiés par la thérapie photodynamique

Les mécanismes impliqués dans l'éradication tumorale induite par la PDT sont décrits en FIG. 1.3. L'administration du PS est suivie par l'irradiation de la tumeur avec une DLI appropriée permettant une accumulation tumorale optimale du PS. Les résultats de nombreuses études mettent en évidence trois mécanismes d'éradication tumorale en réponse à un traitement photodynamique. La PDT peut directement induire la mort des cellules tumorales *via* des mécanismes de mort cellulaire par apoptose, nécrose ou autophagie [13]. Lors d'un traitement PDT, les dommages subis par l'endothélium vasculaire peuvent conduire à l'altération de la vascularisation et entraîner une destruction indirecte de la tumeur par privation d'oxygène et de nutriments. Pour finir, la PDT peut induire une forte réaction inflammatoire qui peut donner lieu à la mise en place d'une immunité systémique. La contribution relative de chacun de ces mécanismes est dépendante du type de PS utilisé, de la DLI, de l'oxygénation des tissus et des paramètres d'irradiation [9], [14]. Cependant c'est la combinaison de ces trois facteurs qui assure l'efficacité à long terme de l'activité anti-tumorale de la PDT.

#### - Destruction directe des cellules tumorales

La PDT peut induire la mort cellulaire principalement selon trois voies principales : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie [9]. Le type de mort cellulaire photoinduite est étroitement lié à la localisation subcellulaire du PS en raison de l'action localisée de l'oxygène singulet (§1.2.2.2).

L'apoptose est la voie de mort cellulaire prédominante lors d'un traitement PDT. Elle se caractérise morphologiquement par des bourgeonnements de la membrane plasmique, une fragmentation de l'ADN internucléosomal, une condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques (formation de vésicules). Trois voies d'induction de l'apoptose par la PDT ont été décrites [15]. Les deux premières voies, la voie intrinsèque faisant intervenir des récepteurs membranaires de la superfamille des TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) et la voie indépendante des caspases, ont un impact mineur par rapport à la voie intrinsèque où intervient la mitochondrie. En effet, étant donné l'importance du stress oxydant produit au niveau des organites cellulaires, la voie intrinsèque de l'apoptose (caspase-dépendante) est majoritaire en PDT.

La voie intrinsèque de l'apoptose se caractérise principalement par la libération rapide du cytochrome c mitochondrial vers le cytosol [16], [17] qui conduira à l'activation de la cascade des caspases, principalement des caspases effectrices 3, 6 et 7 qui sont les éléments centraux dans le processus de mort cellulaire programmée [17], [18]. Cette réponse apoptotique intrinsèque induite lors d'un traitement photodynamique s'explique, en outre, par le fait que de nombreux PS ont une localisation mitochondriale préférentielle [19], [20]. De plus, certains PSs se localisant dans d'autres organites tels

que les lysosomes, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi [21]–[23] peuvent induire une apoptose cellulaire par l'intermédiaire de signaux qui convergeront vers la mitochondrie. Celle-ci joue donc un rôle central dans le processus apoptotique. Cependant, il faut noter qu'une localisation du PS au sein des lysosomes ou des membranes plasmiques conduira généralement à une mort cellulaire de type nécrose [13].

La nécrose est traditionnellement considérée comme une forme de mort cellulaire passive et non régulée. Les réactions de photo-oxydation vont engendrer une perte de l'intégrité membranaire et de l'homéostasie ionique de la cellule, qui vont se caractériser par un gonflement et une vacuolisation du cytoplasme. La rupture de la membrane cytoplasmique qui s'en suit, conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique qui déclenchera généralement une réaction inflammatoire. Classiquement, la nécrose est le résultat d'un accident traumatique à la suite de certaines pathologies ou de déficits métaboliques. Elle se caractérise essentiellement par l'absence d'activation de la voie des caspases, de libération du cytochrome c et de fragmentation de l'ADN [9].

L'autophagie se caractérise par une vacuolisation massive du cytoplasme, qui nécessite la formation de structures vacuolaires délimitées par une double membrane appelées autophagosome. La fusion de ces autophagosomes avec les lysosomes entraînent la dégradation du contenu cytoplasmique. L'autophagie peut avoir un effet cytoprotecteur ou promoteur de la mort cellulaire [24]. En PDT, il a été démontré que l'autophagie est un mécanisme de préservation de la viabilité cellulaire à la suite de dommage photoinduit [25]. Une localisation lysosomale des PSs peut compromettre le procédé d'autophagie et favoriser la phototoxicité sur des cellules sensibles à l'apoptose [25].

Pour conclure, il est important de noter que le noyau n'est pas un organe cible des PSs, ce qui dans un contexte clinique, se révèle d'une importance capitale pour éviter la formation de dommages au niveau de l'ADN potentiellement carcinogène. La PDT se révèle être par conséquent un traitement faiblement mutagène.

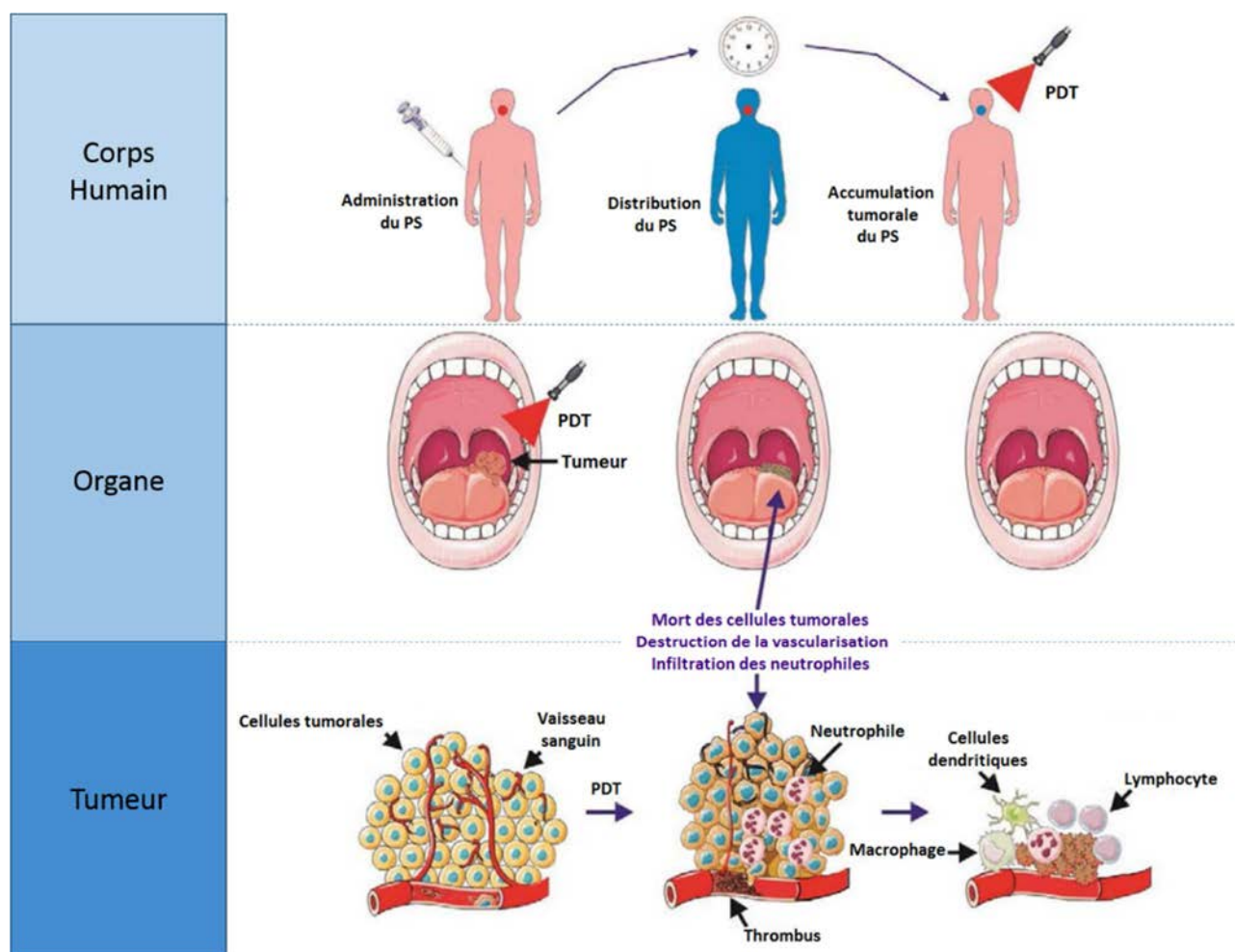


FIG. 1.3 Principes de la photodestruction de tumeurs par thérapie photodynamique. Un photosensibilisateur (PS) est administré par voie systémique ou topique. A la suite de l'intervalle « drogue – lumière » (DLI) qui permet au PS de s'accumuler sélectivement dans la tumeur. L'irradiation de la tumeur active le PS et induit la production de l'oxygène singulet moléculaire ( $^1O_2$ ). Les dommages cellulaires irréparables produits conduisent à la mort des cellules via des mécanismes d'apoptose, de nécrose, ou d'autophagie. Ces mécanismes s'accompagnent par l'induction d'une inflammation aigüe accrue qui participe à l'élimination des cellules mortes, à la restauration de l'homéostasie des tissus sains, et, parfois au développement d'une immunité systémique. (d'après [9])

#### - Dommages vasculaires

La PDT associée à une localisation vasculaire du PS, peut altérer la néovascularisation en endommageant l'endothélium vasculaire et ainsi potentialiser l'éradication tumorale par ischémie en privant la tumeur d'oxygène et de nutriments. Cette altération vasculaire de la PDT fut rapportée pour la première fois en 1963. Lors de cette étude menée sur un modèle de chambre vital chez le rat porteur de tumeur mammaires traité par HpD-PDT, la vasoconstriction initiale des vaisseaux tumoraux a

été mise en évidence [26]. Cette vasoconstriction fut suivie de réponses hétérogènes notamment composées d'un arrêt du flux sanguin, des hémorragies ou de formation d'agrégats plaquettaires au niveau des plus larges vaisseaux.

#### - **Activation du système immunitaire**

De nombreuses études précliniques sur divers modèles animaux suggèrent que en plus de son effet cellulaire direct et de son effet vasculaire, la PDT a des effets pro-inflammatoires capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale [27]–[29].

Des résultats suggèrent que l'occlusion des vaisseaux, l'ischémie et la destruction directe des cellules tumorales induits à la suite d'un traitement PDT, génèrent une importante réaction inflammatoire locale [28], [30]. Cette forte réaction inflammatoire caractérisée par un œdème au niveau des tissus cibles, résultant d'un fort stress oxydant, est souvent observée à la suite d'un traitement PDT [1]. La PDT est reconnu par l'hôte comme un trauma, et la réponse immunitaire est le principal processus de protection des tissus mis en place dans ce contexte. Les dommages induits par la PDT, engendrent la libération de nombreux signaux d'alarmes (médiateurs de l'inflammation) qui seront détectés par l'immunité innée [31]. Parmi ces signaux, on retrouve lors de la dégradation photo-oxydative des membranes lipidiques, la libération des métabolites de l'acide arachidonique (constituant des membranes cellulaires), médiateurs importants de l'inflammation [32]. Cette libération combinée à la production d'histamine et de sérotonine par les vaisseaux endommagés, provoque l'infiltration de la tumeur par diverses populations de cellules immunitaires (neutrophile, mastocytes et macrophages) dans le but d'éliminer les débris cellulaires [28]. Les cellules immunitaires activées vont également produire une grande diversité de médiateurs de l'inflammation qui permettront le recrutement massif des cellules immunitaires [28], [30]. Les antigènes tumoraux libérés à la suite des dommages cellulaires induits par la PDT pourront être phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages ou les cellules dendritiques, et seront ensuite présentés aux autres cellules immunitaires afin de mettre en place une immunité adaptative [9], [30].

Il apparaît que l'effet de la PDT sur le système immunitaire dépend à la fois de la zone traitée, de la nature du PS utilisé [33] et de l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi malgré une efficacité PDT similaire à court terme, la réponse tumorale à long terme est diminuée ou même absente sur un modèle de souris immunodéficientes [32], [34]. La réponse immunitaire est requise pour éradiquer les cellules tumorales survivantes [34].

### 1.1.3. Les photosensibilisateurs

L'archétype du PS est le Photofrin® (purifié à partir de l'hématoporphyrine HpD). C'est un mélange complexe de nombreuses porphyrines dérivées du sang. Le Photofrin® possède une large bande de Soret centrée à 400 nm avec de nombreuses petites bandes Q à des longueurs d'onde plus importantes. Cependant, malgré son utilisation actuelle, il présente de nombreux désavantages qui incluent une longue photosensibilité cutanée associée à une faible absorption à 630 nm. Ce composé est un producteur modéré d'oxygène singulet, ce qui induit un temps de traitement relativement long. En tenant compte de ces inconvénients, les propriétés d'un PS idéal ont été définies [9], [35].

Le PS idéal doit répondre à un certain nombre de critères :

- Composé pur et facile à synthétiser
- Faible toxicité à l'obscurité et photosensibilité cutanée limitée
- Bonne sélectivité tumorale
- Clairance rapide
- Rendement quantique en oxygène singulet élevé
- Forte absorption entre 620 et 800 nm (fenêtre thérapeutique) permettant une pénétration tissulaire optimale
- Solubilité en milieu aqueux afin de faciliter l'administration systémique

#### 1.1.3.1. Les générations de photosensibilisateur

Afin de respecter les critères du PS idéal présentés précédemment, de nouveaux PS dits de deuxième génération ont été élaborés. Ce sont des molécules synthétiques et parfaitement définies. La plupart absorbent dans les longueurs d'onde rouges du spectre et possèdent un rendement quantique en oxygène singulet élevé. Ces PS possèdent des structures chimiques variées incluant notamment la Chlorine e6, PS utilisé dans notre étude. Néanmoins de nombreux PS de deuxième génération souffrent de leur hydrophobicité, qui rend dans un premier temps leur administration difficile. Par la suite, ces PS ont tendance à s'agréger dans la circulation sanguine, ce qui diminue leur efficacité PDT *in vivo* et conduit à une faible sélectivité tumorale. Ces limitations ont conduit à l'élaboration de PS de troisième génération.

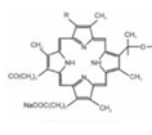
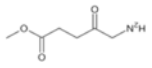
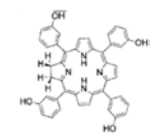
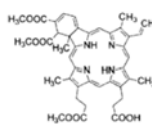
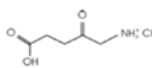
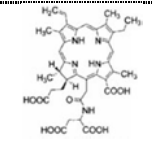
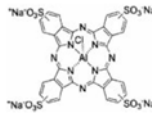
Les PSs de 3<sup>ème</sup> génération sont des PSs de 2<sup>ème</sup> génération modifiés pour favoriser leur accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux. Ces modifications apportées sont une addition de divers groupements chimiques (acides aminés, sucres, protéines, polymère, hydrates de carbone), un couplage à des anticorps spécifiques ou une inclusion (covalent ou non) dans des vecteurs de taille nanométrique, appelés nanoparticules (liposome, micelle, dendrimère,...) [36].

## 1.1.3.2. Les photosensibilisateurs approuvés en clinique

Les différents PS dont l'utilisation est cliniquement approuvée sont reportés dans le tableau ci-dessous (TAB. 1.1).

Chaque PS nécessite un protocole spécifique composé de doses de PS et de lumière variables, afin d'obtenir un effet anti-tumoral optimal.

TAB. 1.1 Liste des photosensibilisateurs actuellement utilisés en clinique (d'après [9]).

Nom commercial	Drogue	Entreprise	Approuvé	Application	Excipient (formulation)	$\lambda_{exc.}$ (nm)	Structure chimique
Photofrin®	Dérivé de l'hématoporphyrine	Axcan Pharm	Canada, 1993 Japan, 1994 USA, 1995	Cancer de la vessie, du poumon et de l'œsophage, Syndrome de l'œsophage de Barret	Injection de Dextrose ou d'une Solution de NaCl	630	 et ces dérivés
Metvixia®	Méthyl aminolevulinate	Photocure/ gladerma	USA, 2004 UE, 2001 Nouvelle Zélande, 2002 Australie, 2003	Kératose actinique, carcinome des cellules basales, cancer de la peau (non-mélanome) et de la tête et cou,	Crème en application topique	630	
Foscan®	Temoporfin/ mTHPC	Biolitec Pharma	UE, 2001	Cancer de la tête et du cou	Ethanol/propyl ene glycol	652	
Visudyne®	Verteporfin/dérivé monoacide de benzoporphyrin	Novartis	USA, 2000 Canada, 2000 UE, 2000 Japon, 2003	Dégénérescence maculaire lié à l'âge, myopathie pathologique, histoplasmose	Liposomale	690	
Levulan®	Acide aminolevulinique	DUSA Pharma	USA, 1999	Kératose actinique, dysplasie œsophagienne	Crème en application topique	417	
Laserphyrin®	Talaporfin/ mono-L-aspartyl chlorine e6	Meiji Seika Pharma	Japan, 2004	Cancer des poumons	Injection d'une solution saline	664	 et ces dérivés
Photosense®	Phthalocyanine d'aluminium sulfonaté	NIOPIK	Russie, 2001	Cancers diverse	Injection d'une solution de NaCl	675	

Abréviations : ALA, acide 5-aminolevulinic ; Ce6-PVP, Chlorine e6-polyvinylpyrrolidone ; HpD, hématoporphyrine dérivé; MACE, mono-(L)-aspartylchlorin-e6 ; m-THPC, m-tetrahydroxyphenylchlorin ; SnEt2, tin ethyl etiopurpurin

### 1.1.3.3. Biodistribution des photosensibilisateurs

A la suite de son injection intraveineuse le devenir du PS dépend de ses caractéristiques intrinsèques. Dans un premier temps, le PS va être distribué entre les différents constituants du sang. Cela implique la désagrégation ou la dissociation du PS à partir du système de vectorisation, sa fixation aux protéines plasmatiques et son association aux cellules sanguines. Ensuite, le PS va se lier aux parois vasculaires. Cette étape est gouvernée par les caractéristiques des vaisseaux sanguins qui sont différentes selon les organes. Le PS peut alors s'extravaser et diffuser au sein du milieu extracellulaire du tissu ou de l'organe considéré. A ce moment le PS peut être incorporé par les cellules tumorales. Cette interaction PS-cellule et la localisation subcellulaire du PS qui s'ensuit sont gouvernées par différents facteurs, incluant la balance hydrophobicité / hydrophilicité, la charge et l'asymétrie de la structure. Les PSs relativement hydrophiles, présentant des sites chargés ou polaires, sont trop polaires pour diffuser dans les membranes biologiques et sont internalisés par endocytose. Par contraste, les composés hydrophobes comportant peu ou pas de groupements polaires, peuvent diffuser à travers les membranes et vont se distribuer librement dans les membranes des différents organites [22]. Finalement, le PS sera éliminé *via* le drainage lymphatique et/ou par les organes de rétention et de clairance. Les études de pharmacocinétique recensées rapportent une variabilité temporelle de ces événements dépendante du type de PS utilisé. Additionné à cela, il semble que la structure du PS influence sa rétention tumorale et les voies d'élimination mises en jeu [37].

L'accumulation tissulaire des PSs dépend des propriétés de prolifération des tissus.

Au sein des tissus en prolifération, la catalyse du cholestérol est augmentée, et conduit à la surexpression des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (« *Low density lipoprotein* » LDL). Par conséquent, les PSs qui dans la circulation sanguine sont liés aux LDL peuvent s'accumuler de manière spécifique dans les tissus tumoraux, tissus en prolifération [38].

Le second paramètre tissulaire qui favorise l'accumulation tumorale des PSs est la diminution du pH dans le microenvironnement tumoral [39]. Ce pH légèrement acide, peut modifier les propriétés physico-chimiques des PSs et ainsi faciliter leur incorporation cellulaire [40]. En effet, le lien existant entre l'accumulation tumorale des PSs et leur structure, tout particulièrement leur caractère lipophile et la distribution des groupements polaires et hydrophobes autour du macrocycle, a précédemment été établi [41]. Dans le plasma, la répartition des PSs entre l'albumine et les LDL est dépendante du pH et joue un rôle dans la sélectivité et la rétention tumorale des PSs [22]. Il a d'ailleurs été suggéré qu'un environnement tumoral acide favoriserait la formation de complexe PS-LDL, propice à la sélectivité et à l'accumulation tumorale du PS.



### 1.1.4. La Chlorine e6

#### 1.1.4.1. Généralités

Les Chlorines sont une famille de photosensibilisateurs attractifs pour les applications thérapeutiques. Leur forte absorption dans le proche infrarouge, permet leur excitation dans une région spectrale où les tissus biologiques sont transparents (600 – 800 nm). De plus il a été démontré que les molécules possédant une structure type Chlorine sont capables de générer de l’oxygène singulet avec de hauts rendements quantiques [42]. Au sein de cette famille, on trouve notamment la meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC) dont l’utilisation clinique a été approuvée en Europe, sous le nom de Foscan<sup>®</sup>, pour le traitement des tumeurs de la tête et du cou. Un second PS de cette famille qui a été amplement étudié dans la littérature et qui sera utilisé au sein de notre étude est la Chlorine e6 (Ce6), un dérivé de la chlorophylle a présenté en FIG. 1.4.

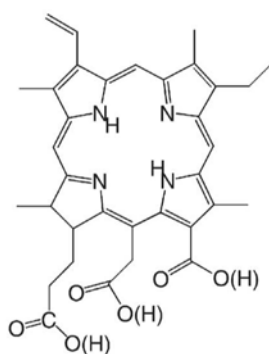


FIG. 1.4 Structure chimique de la Chlorine e6 [43]

Les propriétés photophysiques majeures de la Ce6 sont synthétisées dans le TAB. 1.2. Elle présente notamment une forte absorption dans la fenêtre thérapeutique, représentée par un fort coefficient d’extinction molaire à 663 nm. Son rendement quantique en oxygène singulet est comparable à celui de Foscan<sup>®</sup>, PS hautement phototoxique (§1.2.3 – TAB. 1.3). Comme présenté en FIG. 1.4, la Ce6 présente une structure proche d’une porphyrine mais avec un degré de saturation de son noyau tétrapyrrolique plus important. C’est une molécule asymétrique présentant trois groupements carboxyle ionisables (partie hydrophile) en un site du macrocycle (partie lipophile). La présence de ces groupements permet l’existence de différentes formes ioniques dépendante du pH.

TAB. 1.2 Propriétés photophysiques de la Chlorine e6 (dans l’éthanol) (d’après [44]).

Propriétés	Valeurs
Band Q : $\lambda_{\max}$ , nm	663
Coefficient d’extinction molaire, $M^{-1}cm^{-1}$	50 000*

Maximum de fluorescence, nm	668
Rendement quantique de fluorescence	0,16
Temps de vie de fluorescence, ns	4,4
Rendement quantique en oxygène singulet	0,63

---

\* Déterminé dans l'éthanol au laboratoire (663 nm)

La Chlorine e6 a démontré une activité intéressante au cours des premiers essais cliniques réalisés en Russie. Les dérivés des Chlorines présentent d'excellentes propriétés spectrales et photochimiques. Notamment la Radachlorin® (Rada-pharma International B.V, Pays-Bas), connue également en Europe sous le nom de Bremachlorine®, est un mélange de 3 dérivés de la chlorophylle (Chlorin e6 (80%), Purpurin 5 (15%) and Chlorin p6 (5%)) en solution aqueuse qui a été développé en Russie. Ce composé présente de nombreux avantages, en particulier une toxicité à l'obscurité négligeable accompagnée d'une excrétion rapide (48h) qui limitent l'effet indésirable de photosensibilité cutanée [45]. Le traitement Radachlorin®-PDT est approuvé en clinique en Russie et en Corée pour traiter les cancers de la peau [46]. De plus, l'utilisation de la Radachlorin® a permis d'obtenir des résultats prometteurs pour le traitement des tumeurs de l'utérus, gastrointestinales, de la tête et du cou, des poumons, de la vessie et du foie [47]–[54].

#### 1.1.4.2. Propriétés physicochimiques et leurs impacts sur le comportement en milieu biologique de la Chlorine e6

La neutralisation des charges des groupements carboxyles par une diminution du pH permet d'augmenter le caractère lipophile de la Ce6 [40], modifiant ainsi ses interactions avec les structures biologiques. Il a été suggéré lors d'une étude antérieure que l'albumine, la protéine la plus abondante dans le plasma humain, est le transporteur majeur de la Ce6. A pH 7.4 la Ce6 interagit ( $K_{albumine} = 1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) avec une poche hydrophobe de l'albumine *via* son macrocycle, tandis que ses groupements carboxyles stabilisent l'interaction. Cependant, lors d'une diminution du pH (de 8 à 6.5) les groupements carboxyles sont neutralisés, et le complexe Ce6-HSA est déstabilisé. Cette déstabilisation du complexe Albumine-Ce6 est concomitante à une augmentation de la liaison de la Ce6 aux LDL. La constante d'affinité ( $K_{LDL} = 5.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  à pH = 7.4) de la Ce6 au LDL est majoritairement gouvernée par son interaction avec les LDL au niveau des sites « protéiques » (région hydrophobique), tandis que sa complexation avec le compartiment lipidique est un processus minoritaire [43].

Au niveau cellulaire, la Ce6 est incorporée par diffusion passive selon deux étapes. Dans un premier temps, la molécule de Ce6 est incorporée dans la première couche de la bicouche lipidique. Son macrocycle se retrouve alors dans le cœur lipidique de la membrane et ses chaînes carboxyles sont orientées vers l'interface aqueuse. Puis la molécule, par un mécanisme de « flip-flop », est transférée dans la couche interne de la membrane lipidique. Après son incorporation, la Ce6 se localisera majoritairement au

niveau de la membrane plasmique et des vésicules intracellulaires. Cependant en présence de LDL, le complexe Ce6-LDL pourrait être internalisé *via* un mécanisme d'endocytose récepteur dépendant et se localisera essentiellement au niveau des lysosomes [40], [43].

*In vivo* l'incorporation de la Ce6 par les cellules néoplasiques pourrait être favorisée par deux facteurs : (1) un pH au sein de l'interstitium tumoral inférieur à celui retrouvé dans les tissus sains [55] ce qui favorise la complexation de la Ce6 aux LDL ; (2) la surexpression des récepteurs aux LDL par de nombreuses cellules cancéreuses permettant l'incorporation massive du complexe Ce6-LDL par endocytose [43]. Toutefois à la suite de son injection i.v., la Ce6 présente une faible accumulation tumorale (1 – 3 h post-injection) associée à une rapide élimination, qui limitent son efficacité PDT [56]–[58]. De plus, la Ce6 s'accumule dans la peau, et peut ainsi induire des effets secondaires comme une photosensibilité cutanée.

C'est pourquoi actuellement de nombreux travaux, exposés dans le §1.3.6, se concentrent sur l'intégration de la Ce6 au sein de molécules de transport qui permettront de favoriser son accumulation tumorale en améliorant ces propriétés pharmacocinétiques.

## 1.2 L'oxygène moléculaire singulet

### 1.2.1. Généralités

L'oxygène moléculaire est un élément majeur sur Terre. Il représente environ 30% de sa masse totale et 21 % de son atmosphère, et intervient dans de nombreuses réactions biologiques vitales telles que la respiration des organismes. Du fait de sa structure et de sa chimie spécifique représentée par sa configuration électronique particulière (FIG. 1.5), l'oxygène moléculaire est un important transporteur d'énergie. Il diffère de la plupart des autres molécules par la configuration électronique ouverte de son état fondamental qui permet la création d'états excités nommés oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ).

L'oxygène singulet est un membre de la classe des espèces réactives de l'oxygène (ERO), reconnu pour son rôle clé dans de nombreux domaines tels que la PDT [59]. C'est pourquoi, de nombreuses études se sont concentrées sur la compréhension de ses propriétés et sur la mise en place de techniques de détection *in vitro* et *in vivo*.

### 1.2.2. L'oxygène moléculaire singulet

#### 1.2.2.1. Structure électronique

L'état fondamental de l'oxygène moléculaire est un état triplet ( $^3\Sigma_g^-$ ;  $^3\text{O}_2$ ; multiplicité de spin  $M = 3$ ). A la suite d'un transfert d'énergie d'un chromophore vers l'état fondamental de l'oxygène moléculaire, deux formes excitées peuvent être formées.

Ces deux états excités métastables sont dits « singulet » ( $S$  ;  ${}^1O_2$  ;  $M = 1$ ) et sont respectivement notés  ${}^1\Delta_g$  et  ${}^1\Sigma_g^+$ .

Les configurations électroniques de ces trois oxygènes moléculaires ( ${}^1\Delta_g$ ,  ${}^1\Sigma_g^+$ ,  ${}^3\Sigma_g^-$ ) diffèrent uniquement par la structure de l'orbitale moléculaire anti-liante (Figure 1). En effet, le premier état excité ( ${}^1\Delta_g$ ) présente deux électrons sur la même orbitale moléculaire avec des spins appariés. La configuration des orbitales moléculaires s'écrit alors :  $0_2KK(2g)^2(2u)^2(3g)^2(1u)^4(1^+_g)(1^+_g)$ . La structure électronique du second état excité ( ${}^1\Sigma_g^+$ ) est identique à celle de l'état fondamental ( ${}^3\Sigma_g^-$ ), excepté que les deux derniers électrons présents chez  ${}^1\Sigma_g^+$  possèdent des spins appariés contrairement à l'état  ${}^3\Sigma_g^-$  [59].

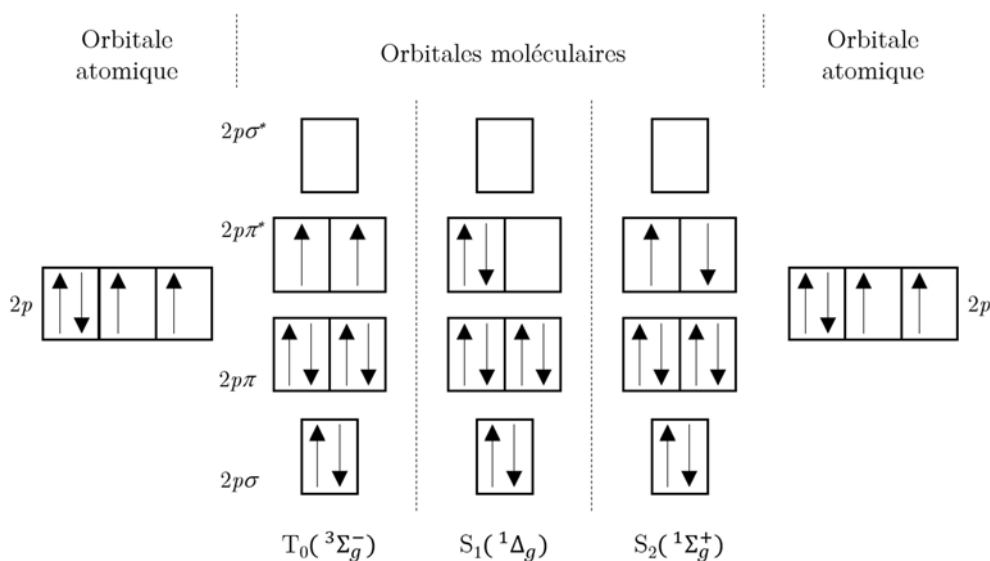


FIG. 1.5 Formation de l'orbitale moléculaire de l'oxygène moléculaire et de ses états excités [60].

Représentation de l'orbitale atomique d'un atome d'oxygène et des différentes conformations électroniques de l'orbitale moléculaire du dioxygène. Les différences entre les trois états électroniques de l'oxygène moléculaire sont mises en évidence au niveau de l'orbitale moléculaire anti-liante ( $2p\pi^*$ ) : la position et les spins des électrons.

### 1.2.2.2. Stabilité et relaxation

L'énergie potentielle des trois états, fondamental et excités, est représentée en Figure 2. Les états excités  ${}^1\Delta_g$  et  ${}^1\Sigma_g^+$  possèdent respectivement une énergie supérieure à l'état fondamental ( ${}^3\Sigma_g^-$ ) de  $95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $22.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et de  $158 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $31,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). La transition de l'état fondamental vers le premier état excité ( ${}^1\Delta_g \rightarrow {}^3\Sigma_g^-$ ) est strictement interdite par : les spins, la parité et la symétrie. De ce fait, une excitation par photon est peu efficace. Cependant, l'excitation est communément réalisée par transfert d'énergie à partir d'un PS en état triplet (voir diagramme de Jablonski, §1.1.2.1). Cet état excité  ${}^1\Delta_g$  possède un long temps de vie, de  $10^{-6} - 10^{-3} \mu\text{s}$  dans un solvant [61]. Par contre, le second état excité ( ${}^3\Sigma_g^-$ ) est une espèce très réactive qui

présente un court temps de vie, de sorte qu'il intervient peu ou pas dans la réactivité de la molécule d'oxygène.

Caractérisé par sa rapide et efficace formation et de son long temps de vie, le premier état excité de l'oxygène moléculaire ( $^1\Delta_g$ ), communément appelé « oxygène singulet moléculaire ( $^1O_2$ ) », est l'espèce majoritaire responsable des effets phototoxiques de la PDT.

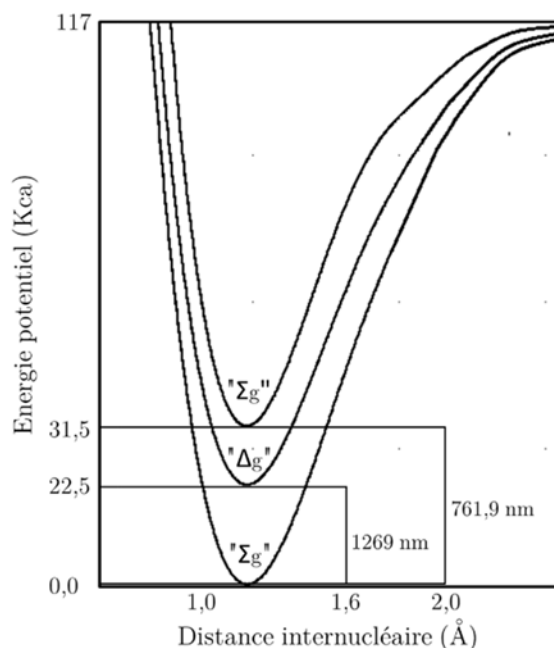


FIG. 1.6 Courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et des deux états excités de l'oxygène moléculaire [60].

Le retour au niveau fondamental du dioxygène correspond notamment à l'émission de photons d'énergie identique à la désexcitation.

La relaxation d'une molécule excitée vers son état fondamental peut se réaliser suivant trois processus : un transfert d'énergie à une molécule environnante (*Quenching* physique), une désexcitation sans radiation (*Quenching* par solvant, sans rotation interne...) ou par émission de luminescence. L'interaction de l'oxygène singulet avec ces substrats biologiques potentiels aboutit à une désexcitation par transfert d'énergie de l'état singulet et à une altération des fonctions cellulaires et tissulaires [62]. Cette grande variété de quencher présente en milieu biologique induit une diminution du temps de vie de l'oxygène singulet qui a été déterminé aux alentours de 170-330 ns [63]. Pour retourner à un état fondamental, l'oxygène singulet moléculaire peut oxyder un large panel de molécules, incluant l'ARN, les protéines, les lipides ou les stérols en interagissant avec leurs régions riches en électrons. La constante de vitesse de réaction de l'oxygène singulet avec les chaînes latérales des protéines est plus grande que celle de la plupart des autres molécules biologiques citées précédemment [64], [65]. De plus, les protéines sont présentes à de fortes concentrations comparées aux autres espèces dans les cellules. Ces deux

arguments peuvent expliquer que les protéines soient les principales cibles de l' $^1\text{O}_2$  [62]. L' $^1\text{O}_2$  ayant un temps de vie limité, sa diffusion est restreinte à une distance inférieure à 50 nm dans les compartiments cellulaires [66], [67]. C'est pourquoi le site et le rendement des dégâts engendrés par l' $^1\text{O}_2$  dépendent de la localisation cellulaire du PS lors du traitement PDT. Un dernier processus de désexcitation utilisé par l'oxygène singulet moléculaire est la luminescence. La luminescence est un processus radiatif qui consiste en l'émission de photons dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental de la molécule. Ainsi la FIG. 1.6 montre que la relaxation de l'oxygène singulet moléculaire  $^1\Delta_g$  correspond à l'émission de photons à 1269 nm qui pourra être utilisée pour détecter l' $^1\text{O}_2$  par spectroscopie.

### 1.2.3. Génération de l'oxygène singulet

De nombreuses sources d'oxygène singulet existent [68]. Dans cette partie nous allons nous concentrer sur la génération d'oxygène singulet à la suite d'une réaction de photosensibilisation. Cette réaction est une méthode simple et contrôlée de production d'oxygène singulet qui requiert uniquement la présence d'oxygène, de lumière à une longueur d'onde appropriée et d'un PS capable d'absorber et d'utiliser l'énergie pour exciter le dioxygène vers un état singulet. Comme décrit dans le §1.1.2.1, l'excitation du PS est généralement assurée par un transfert de photons ( $h\nu$ ) entre l'état non excité ( $S_0$ ) et un état singulet excité ( $S_n$ ). La relaxation de l'état  $S_n$  donne lieu à un état singulet ( $S_1$ ) du PS de plus faible énergie. A la suite d'un croisement intersystème, un état triplet ( $T_1$ ) instable du PS est généré (équation 1).



Avec :  $P$ , Photosensibilisateur ;  $S_0$ , état non excité ;  $S_1$ , premier état singulet ;  $T_1$ , premier état triplet ;  $k_{ISC}$ , constante de croisement intersystème ;  $k_{en}$ , constante de transfert d'énergie ;  ${}^3\text{O}_2$ , état triplet du dioxygène ; et  ${}^1\text{O}_2$ , dioxygène singulet.

L'état triplet possède un temps de vie plus long ( $\mu\text{s}$ ) que l'état  $S_1$  (ns), lui permettant de réagir suivant une des deux voies définies précédemment comme étant les mécanismes de type I ou II. Le mécanisme de type I implique une abstraction d'un atome d'hydrogène ou un transfert d'électron entre le PS excité et un substrat qui conduit à la formation de radicaux libres. Ces radicaux vont par la suite pouvoir interagir avec l'oxygène moléculaire environnant et créer des ERO tels que le radical superoxyde, le peroxyde d'oxygène... Lors de la réaction de type II, l'oxygène singulet est généré *via* un processus de transfert d'énergie lors d'une collision entre le PS excité et l'état triplet du dioxygène (équation 1 et 2).

Chaque molécule de PS peut généralement produire  $10^3$ - $10^5$  molécules de  $^1\text{O}_2$  avant d'être dégradée par photoblanchiment par  $^1\text{O}_2$  ou un autre processus (§1.1.2.1) [69]. L'aptitude des PSs à produire de  $^1\text{O}_2$  est déterminée par leur rendement quantique. Le rendement quantique en oxygène singulet ( $\Phi_\Delta$ ) dépend de deux processus compétiteurs de désexcitation : les processus radiatifs (équation 3) ou non radiatifs (équation 4).

$$P(T_1) \xrightarrow{k_r} P(S_0) + hv'' \quad (3)$$

$$P(T_1) \xrightarrow{k_{nr}} P(S_0) \quad (4)$$

Avec :  $k_r$ , constante des mécanismes radiatifs ;  $hv''$ , émission de fluorescence ; et  $k_{nr}$ , constante des mécanismes non radiatifs.

Comme présenté dans le TAB. 1.3, les PSs de deuxième génération tels que la m-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC) ou la Chlorine e6 (Ce6) possèdent un rendement quantique en oxygène singulet nettement supérieur à celui du Photofrin, PS de première génération initialement utilisé en clinique.

TAB. 1.3 Rendements quantiques d'oxygène singulet des principaux photosensibilisateurs habituellement utilisés en PDT, dans une solution de méthanol.

Photosensibilisateurs	$\Phi_\Delta$ (méthanol)
m-THPC	0,59 [70]
Chlorine e6 (Ce6)	0,63 [70]
Verteporfin	0,77 [71]
Photofrin II (PflI)	0,35 [71]

La génération d'oxygène singulet est un paramètre clé dans le développement de nouveaux PSs et conditionne leur efficacité photodynamique. C'est pourquoi la détection de l'oxygène singulet et la détermination de son temps de vie comme indicateur de son environnement proche, a été au centre de l'attention au cours de cette dernière décennie.

### 1.2.4. Détection de l'oxygène singulet

Différents paramètres rendent difficile la détection de l'oxygène singulet comme son faible temps de vie et la variété de quenchers et d'antioxydants naturels existant en milieu biologique capables de le capturer. Il est alors devenu essentiel de développer des méthodes de mesure capables de surpasser ces obstacles. Actuellement, les techniques mises en place reposent sur une détection indirecte, *via* l'utilisation de molécules fluorescences qui seront oxydées en présence d'oxygène singulet, ou sur une détection directe par mesure de sa luminescence [72], [73].

#### 1.2.4.1. Détection indirecte

La détection indirecte utilise des sondes moléculaires (absorbantes, fluorescentes, chimiluminescente, ou de Résonance Paramagnétique Electronique (EPR)) qui peuvent être utilisées en spectroscopie ou pour les sondes fluorescentes utilisées en imagerie de microscopie grâce à leur forte résolution spatiale [72], [74], [75].

La spectrophotométrie est l'option la plus couramment utilisée pour la détection des espèces réactives de l'oxygène. L'oxygène singulet sera piégé par la sonde et modifiera les propriétés d'absorption de celle-ci. Par la suite, la détection et la quantification seront basées sur des mesures d'absorbance. Le 9,10-diphenylanthracene (DPA) est la sonde spectrophotométrique la plus fréquemment utilisée [76]. Elle réagit spécifiquement avec l'oxygène singulet pour former un endopéroxyde stable, ce qui induit une réduction de l'absorbance à 355 nm proportionnelle à la production d'oxygène singulet par le système en question. Mais ces sondes présentent un désavantage intrinsèque dû à leur faible sensibilité qui repose sur une lecture d'absorbance. Pour pallier ce problème, des sondes fluorescentes sont utilisées. En présence d'oxygène singulet, les propriétés de fluorescence de la sonde sont modifiées (intensité de fluorescence, longueur d'onde, temps de vie de fluorescence,...). Elles sont plus sensibles, présentent une réponse rapide et offrent une haute résolution spatiale par imagerie de microscopie. Par exemple, le DPA a été conjugué avec un fluorophore (la fluorescéine) dans le but d'associer les caractéristiques réactives du DPA à des caractéristiques fluorescentes pour synthétiser le premier piège fluorescent : le DPAX (9-[2-(3-carboxy-9,10-diphenyl)anthryl]-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one) [76]. Le DPAX est peu fluorescent contrairement à son endoperoxide (DPAX-EP) qui possède une forte fluorescence caractérisée par un rendement quantique d'environ 0.5-0.7.

Une autre sonde fluorescente, le SOSG (« *singlet oxygen sensor green* »), fortement sélective pour l'oxygène singulet, produit sous son action un endopéroxyde SOSG (SOSG-EP) hautement fluorescent. Jusqu'à présent, l'oxygène singulet a été monitoré avec succès à l'aide de la sonde SOSG dans des études sur des systèmes biologiques variés, certaines portant sur la photoinactivation de bactéries et virus [77], la photodégradation du 5-methyltetrahydrofolate [78], la PDT *in vitro* [79]–[81], l'ingénierie plasmatisque [82] et sur des plantes [83]–[85]. De plus, une étude récente de H. Lin *et al.* a démontré que des mesures quantitatives de la production d'oxygène singulet pouvaient être réalisées en utilisant le SOSG [86].

Le même principe de détection indirecte par fluorescence a été utilisé pour mettre en place des systèmes nanoparticulaires basés sur la fluorescence retardée  $^1\text{O}_2$  sensibilisée (« *Singlet Oxygen-sensitized Delayed Fluorescence* », SODF) [87]. Pour ces études, les PSs sont incorporés au sein de nanomatériaux tels que du polystyrène ou de la gélatine. Comme présenté en FIG. 1.7, à la suite de la réaction photodynamique, l'oxygène singulet



produit va réagir avec l'état triplet ( $T_1$ ) du PS et induire son passage vers son état  $S_1$ . Puis  $S_1$  retournera à son état fondamental  $S_0$  par émission de SODF. Cette technique d'imagerie est non-invasive, possède une sensibilité élevée, mais dépend des nanomatériaux utilisés.

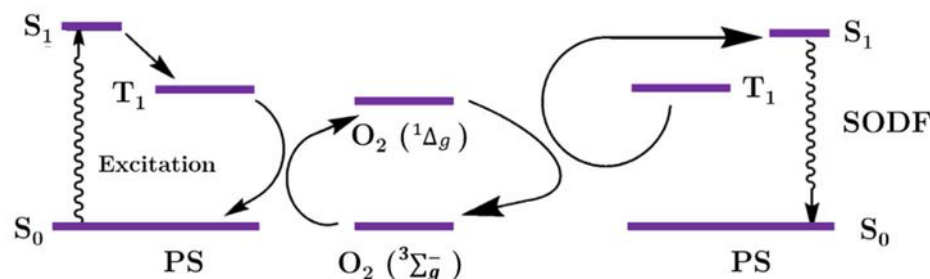


FIG. 1.7 Diagramme simplifié des niveaux d'énergie pour la production de la fluorescence retardée (SODF) (d'après [87]).

Cette réaction fait intervenir deux molécules photosensibilisatrices (PS) et une molécule d'oxygène singulet ( $O_2(^1\Delta_g)$ ). Intervention de l'état fondamental ( $S_0$ ), singulet ( $S_1$ ) et triplet ( $T_1$ ) du PS utilisé, et de l'état fondamental ( $^3\Sigma_g^-$ ) et singulet ( $^1\Delta_g$ ) de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ).

En parallèle, la chimiluminescence est devenue l'une des méthodes les plus sensibles de détection de l'oxygène singulet. Comparée aux techniques précédemment décrites, elle ne nécessite pas de lumière d'excitation et ainsi les interférences dues à la fluorescence intrinsèque de l'échantillon et la réflexion de la lumière sont éliminées et permettent une meilleure détection. Un grand nombre de sondes chimiluminescentes a été développé ces dernières années, incluant le 2-méthyl-6-phényl-3,7-dihydroimidazo[1,2-]pyran-3-one (CLA) et ses dérivés [88]–[90]. Ces composés émettent spontanément de la lumière en présence d'oxygène singulet, mais possèdent une faible sélectivité pour l'oxygène singulet du fait de leur réactivité avec d'autres ROS tels que l'anion superoxyde. Plus récemment, de nouvelles sondes composées d'un donneur d'électrons, le TTF (tetrathiafulvalenem), associé à un luminophore (l'anthracène), ont été étudiées et ont démontré une excellente sélectivité et sensibilité pour l'oxygène singulet [72]. En effet, l'anthracène est capable de réagir avec l'oxygène singulet pour former un endoperoxyde hautement luminescent tandis que le TTF permet de potentialiser cette réaction grâce à ses propriétés de donneurs d'électrons. Actuellement, les sondes chimiluminescentes se révèlent être les plus sélectives et sensibles comparées aux sondes spectrophotométriques et fluorescentes.

Les dernières sondes excitantes sont les sondes EPR. En présence d'oxygène singulet, la structure des sondes EPR est modifiée et permet ainsi leur détection. Un exemple de sonde EPR commercialement disponible est la 2,2,6,6-tetra-méthylpiperidine (TEMP). L'avantage majeur de cette technique est sa grande sensibilité et sélectivité, cependant elle nécessite l'utilisation d'un système de mesure de résonance magnétique nucléaire (RMN) [73].

Ces techniques de détection indirecte présentent chacune des avantages et des inconvénients qui sont recensés dans le TAB. 1.4. Cependant, elles présentent toutes une cytotoxicité potentielle due à l'utilisation de sonde moléculaire, consommant l'oxygène singulet produit, et sont toutes dépendantes du microenvironnement. En outre, il faut noter la faible spécificité de ces sondes qui sous l'action d'autres espèces réactives de l'oxygène peuvent être oxydées et produire des artéfacts.

#### 1.2.4.2. Détection directe

Comme le présente le TAB. 1.4, la détection spectrale de l'oxygène singulet présente de nombreux avantages comparés aux méthodes de détection indirecte, et peut aussi être utilisée en spectroscopie et en imagerie. En effet, cette méthode est non invasive et offre un résultat instantané et pratiquement dépourvu d'artéfact. L'oxygène singulet peut être observé par sa luminescence caractéristique à 1270 nm, qui correspond à sa relaxation ( $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ ) comme décrit en partie 1.2.b. En raison de son faible temps de vie, d'environ 3.3  $\mu\text{s}$  dans l'eau et 67  $\mu\text{s}$  dans l'eau deutérée ( $\text{D}_2\text{O}$ ) [91], la détection de la luminescence l'oxygène singulet a longtemps été impossible. C'est à la fin des années 1970, que cette détection par spectroscopie est devenue possible grâce au développement de détecteurs dans le proche infrarouge cryogénique Germanium-diode [92]. Cette méthode est devenue la technique de référence d'investigation des processus dans lesquels l'oxygène singulet est impliqué. L'intensité du signal de luminescence dépend de la quantité de molécules d'oxygène présentes [93]. Le Pr. B. Roder et son équipe ont démontré que dans un milieu biologique, il était possible de réaliser une détection résolue dans le temps de la production d' $^1\text{O}_2$  dans une suspension de fantômes optiques reproduisant des hématies [94], [95]. Cette détection résolue dans le temps procure des informations à la fois sur la cinétique de production et le déclin de l'oxygène singulet (Temps de vie de  $^1\text{O}_2$  ( $\tau_\Delta$ ) et de l'état triplet du PS ( $\tau_T$ )), et sur les interactions entre l'oxygène singulet et son environnement, notamment au sein des cellules [96]. Ainsi  $^1\text{O}_2$  produit par l'hématoporphyrine dérivé (HpD) et la Protoporphyrine IX (PpIX) a pu être monitoré au sein de liposomes [97], [98].

La microscopie a permis d'obtenir une résolution spatiale de la détection et ainsi acquérir des informations sur la localisation de la production d'oxygène singulet. Une résolution latérale de 2.5  $\mu\text{m}$ , proche de la limite de diffraction de l'oxygène singulet (1,5 - 2,0  $\mu\text{m}$ ), a été obtenue lors d'une étude de détection au niveau de l'interface entre deux solvants immiscibles [99], [100]. De nombreuses équipes ont concentré leur recherche sur l'évolution du système de détection. L'introduction d'un photomultiplicateur sensible dans le proche infra-rouge a notamment permis d'améliorer la sensibilité comparé au détecteur Germanium diode utilisé précédemment [101], [102]. En 2013, S. Hackbarth *et al.* ont réalisé avec précision (+/- 0.1  $\mu\text{s}$ ) des mesures de déclin de l'état triplet du PS et

de l' $^1\text{O}_2$  sur des cellules vivantes à l'aide d'une source d'excitation de type LED (« *light-emitting diode* »), permettant de protéger les cellules d'un effet PDT [103].

Malgré ces progrès considérables, cette technique souffre encore d'une sensibilité limitée et de la faible intensité d'émission à 1270 nm de l' $^1\text{O}_2$  qui est associée à un fort bruit de fond des milieux biologiques dans le proche infrarouge. Ces inconvénients limitent encore l'efficacité de cette technique, notamment pour de potentielles utilisations *in vivo*. M. Niedre *et al.* ont pour la première fois utilisé cette méthode *in vivo*. A la suite d'une injection (i.p.) d'une solution de phthalocyanine d'aluminium tetrasulphonaté ( $\text{AIS}_4\text{Pc}$  ; 50 mg/kg) à des rats Wistar, un faible signal à 1270 nm a été détecté avec un temps de vie de 0,03 - 0,18  $\mu\text{s}$  sur la peau et le foie [104]. Par la suite, un système d'imagerie a permis de cartographier la production d'oxygène singulet au niveau de la peau [105]. Afin de comprendre le comportement de l'oxygène singulet *in vivo*, l'équipe du Pr Roder a utilisé de petites vésicules unilamellaires (SUVs) comme système mimant un milieu hétérogène, pour mettre en évidence que sa localisation peut être déterminée par sa cinétique de luminescence [106]. En parallèle, des études se sont intéressées à la mesure directe de l'oxygène singulet à partir des vaisseaux sanguins tumoraux [107]. Elles ont permis par la suite de faire une corrélation entre la réponse tumorale au traitement et la luminescence mesurée à 1270 nm et d'indiquer que la luminescence de l'oxygène singulet fournit une technique valide de dosimétrie pour la PDT anti-tumorale [108].

TAB. 1.4 Avantages et limitations des principales méthodes de détection de l'oxygène singulet moléculaire d'après [73]

Méthode de détection		Avantages		Limitations		
Indirecte	Spectroscopie	Sonde spectrophotométrique (absorption)	Simplicité de détection et d'utilisation		Faible photostabilité Sensibilité limitée	
		Sonde fluorescente		Réponse rapide Bonne spécificité	Agis comme un PS lui-même	
		Sonde chimiluminescente	Simplicité de détection forte sensibilité	grand ratio : signal/bruit	Consommation de $^1\text{O}_2$ Potentiel cytotoxique des sondes Dépendant du microenvironnement	Faible solubilité aqueuse Non-spécifique Mesure retardée
		Sonde de Résonance Paramagnétique Electronique (EPR)	Grande sensibilité et sélectivité		Coût élevé Mise en place difficile	
	Imagerie	Sonde fluorescente		Simplicité de détection		Agis comme un PS lui-même
		Fluorescence retardée	Grande sensibilité	Non-invasif	Spécificité limitée à celle du système de délivrance	
Directe	Spectroscopie	Luminescence dans le proche infrarouge à 1270 nm	Non-invasif Temps réel	Procure des informations sur le temps de vie de $^1\text{O}_2$ et de $^3\text{PS}$	Faible intensité d'émission à 1270 nm Faible sensibilité et coût élevé	Faible rendement quantique des détecteur dans le proche infrarouge
	Imagerie			Distribution spatiale		Zone limitée

## 1.3 La vectorisation

### 1.3.1. Généralités

Lors de son administration dans l'organisme, un médicament va rencontrer de nombreux obstacles qui limitent ainsi son efficacité. Il devra traverser des barrières physiologiques telles que les parois vasculaires, la muqueuse intestinale ou les membranes cellulaires, et éviter sa métabolisation rapide par l'organisme. De plus, les agents anticancéreux actuels, du fait de leurs propriétés physicochimiques, présentent une sélectivité tumorale limitée et s'accumulent alors dans les tissus sains induisant des effets secondaires. Pour pallier ces difficultés, une nouvelle approche consiste à associer l'agent anticancéreux à des macromolécules appelées nanoparticules (NPs)[109]. NP est le terme utilisé pour définir une particule d'une taille comprise entre 1 et 1 000 nm, pouvant transporter des composés allant des petites molécules de faible poids moléculaire à des macromolécules tels que des gènes ou des protéines. Cette définition des NPs est uniquement basée sur la taille de ces objets et n'est donc pas limitative pour la composition de ces particules. Les NPs étudiées pour de futures applications en thérapie anticancéreuse présentent des structures et des propriétés variées. Elle incluent les liposomes, les dendrimères, les nanotubes de carbone, les micelles polymériques et les nanoparticules polymériques [110]. Comme recensé dans le TAB. 1.5, à ce jour, plusieurs NPs sont utilisées en clinique dans le traitement des cancers, notamment le Doxil<sup>®</sup>, une formulation liposomale pégylée de doxorubicine [111] et l'Abraxane<sup>®</sup>, une molécule de Paclitaxel liée à de l'albumine [112].

TAB. 1.5 Formulations à base de nanoparticules approuvées pour le traitement des tumeurs solides (D'après [113]).

Nanomédicaments	Indications
Doxil/Caelyx ( <i>formulation liposomale PEGylé de doxorubicine</i> )	Sarcome de Kaposi relié au VIH Cancer métastatique de l'ovaire Cancer métastatique du sein
DaunoXome ( <i>formulation liposomale de daunorubicine</i> )	Sarcome de Kaposi relié au VIH
Myocey ( <i>formulation liposomale de doxorubicine</i> )	Cancer métastatique du sein
Abraxane ( <i>paclitaxel couplé à l'albumine</i> )	Cancer métastatique du sein Adénocarcinome des canaux pancréatiques
Lipusu ( <i>formulation liposomale du paclitaxel</i> )	Cancer du sein du poumon non à petites cellules
Genexol-PM ( <i>formulation micellaire paclitaxel</i> )	Cancer métastatique du sein
MM-398 ( <i>formulation liposomale d'irinotecan</i> )	Adénocarcinome des canaux pancréatiques
PICN ( <i>injection de paclitaxel concentré pendant nanodispersion</i> )	Cancer métastatique du sein

### 1.3.2. Rationnel du développement de nanoparticules en cancérologie

De nombreux arguments existent en faveur du développement de NPs en cancérologie [109].

Premièrement, **les NPs permettent de pallier le manque de solubilité aqueuse et de stabilité chimique** de nombreux agents anticancéreux. En effet, la faible solubilité en milieu aqueux des molécules anticancéreuses limite leur développement et rend difficile leur administration. La Wortmaninn (un inhibiteur PI3k et un agent radiosensibilisant permettant de potentialiser la sensibilité des cellules tumorales aux rayonnements) est un exemple de composé dont le développement a été interrompu du fait de sa faible solubilité et de son instabilité chimique [114]. La vectorisation de la Wortmaninn par des NPs à base de lipides et de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) a permis à la fois d'augmenter sa solubilité de 4 mg/L à 20 g/L et d'amplifier *in vivo* sa stabilité. En outre, cette NP à base de Wortmaninn s'est révélée être un agent radiosensibilisant significativement plus efficace que les agents communément utilisés comme le cisplatine.

Deuxièmement, **les NPs protègent les composés anticancéreux de leur biodégradation ou de leur excrétion prématurée** (métabolisme hépatique et excrétion urinaire). Elles améliorent ainsi les profils de pharmacocinétique des composés vectorisés. La séquestration des principes actifs au sein de vecteur diminue leur accessibilité aux enzymes et limite ainsi leur clivage enzymatique, tel que le clivage des SiRNA par les RNAses contenues dans le plasma ou le clivage des protéines par les pepsines ou trypsines contenues dans l'estomac. Le Curcumin est un agent anticancéreux dont la stabilité et la biodisponibilité est réduite essentiellement par son oxydation en milieu biologique. Lors d'une étude récente, cette limitation a été palliée par l'encapsulation du Curcumin dans le cœur hydrophobe d'une NP. *In vitro* la vectorisation a permis de supprimer la dégradation par oxydation du composé dans des conditions mimant un environnement physiologique [115].

Troisièmement, **les nanotechnologies améliorent la biodistribution et le ciblage des agents anti-cancéreux**. Il faut noter que le comportement *in vivo* (biodistribution, ciblage tumoral) des molécules anticancéreuses est défini par leurs propriétés physico-chimiques (charge, taille, hydrosolubilité) qui seront modifiées et redéfinies lors de leur vectorisation modifiant ainsi leur distribution *in vivo* selon les propriétés des NPs utilisées. Cependant toutes les NPs ne possédant pas intrinsèquement des propriétés idéales, elles peuvent être synthétisées et chimiquement modifiées pour amplifier leur accumulation et leur spécificité tumorale. Les systèmes nanoparticulaires utilisent deux stratégies de ciblage, le ciblage passif et actif, qui seront décrits par la suite.

Quatrièmement, les NPs peuvent être conçues pour libérer leur contenu à la suite d'une stimulation extérieure, afin d'améliorer la spécificité du traitement. L'équipe de Bakowsky a utilisé une formulation liposomale thermosensible (thermoliposome) de doxorubicine (DOX) dans le but de diminuer les effets secondaires de la chimiothérapie [116]. Les thermoliposomes montrent *in vitro* sur une lignée cellulaire de mélanome à une température physiologique de 37°C, une toxicité inférieure à celle de la DOX libre. Une élévation de la température à 42.5°C, augmente la toxicité des thermoliposomes qui devient supérieure à celle de la DOX libre. Ces résultats encouragent le développement de nouvelles NPs thermosensibles. D'autres stimuli extérieurs, comme les variations de pH [115] ou l'application d'ultrasons (sonothérapie), peuvent être utilisés pour déclencher la libération des molécules anticancéreuses vectorisées, [109].

### 1.3.3. Objectifs de la vectorisation

Dans toutes les thérapies anticancéreuses, une balance existe entre les effets bénéfiques et délétères potentiels d'un traitement. L'efficacité d'un traitement est déterminée en fonction de l'éradication des tissus tumoraux et des dommages engendrés aux tissus sains. Mais comme la plupart des agents de chimiothérapie se distribuent de manière non-spécifique dans l'organisme cela conduit à une toxicité systémique associée à des effets secondaires graves. L'objectif premier de la nanovectorisation est donc d'accroître la spécificité des agents anticancéreux, afin de potentialiser leur accumulation tumorale tout en limitant leurs effets secondaires associés [117]. Les NPs sont utilisées pour cibler successivement, la vascularisation et l'interstitium tumoral, les membranes et les organites cellulaires. Le cheminement des NPs du site d'injection vers les tissus tumoraux cibles s'effectue selon différentes étapes. Dans un premier temps, les NPs sont transportées dans la circulation sanguine du point d'injection vers la tumeur. Une circulation suffisamment prolongée des nanomédicaments est essentielle pour assurer une accumulation tumorale optimale. Cependant dans la circulation sanguine, les NPs peuvent avoir une clairance prématurée en interagissant rapidement avec les protéines plasmatiques et le système immunitaire (processus d'opsonisation) pour être capturé par le système réticulo-endothélial (RES). A ce jour, un grand nombre de NPs, sont recouverts de groupement de furtivité comme les Polyéthylène(glycol) (PEG) pour empêcher leur reconnaissance par le RES. Dans un deuxième temps, les NPs sont extravasés de la vascularisation, diffusent dans l'interstitium tumoral, interagissent avec les membranes plasmiques et sont internalisées par les cellules. Par la suite, nous allons donc détailler tout d'abord les processus mis en œuvre par les NPs pour cibler les tissus tumoraux (ciblage passif et actif), puis les processus permettant leur internalisation cellulaire (mécanismes d'endocytose).

### 1.3.4. Voies de ciblage tumorales

#### 1.3.4.1. Le ciblage passif

Après leur administration systémique (injection intraveineuse (i.v.)), les NPs se distribuent dans l'organisme *via* la circulation sanguine. Le cheminement des NPs vers les tissus tumoraux cibles est à la fois déterminé par leurs propriétés physico-chimiques, comme la charge, l'hydrophobicité et la taille, et par des facteurs physiologiques de la tumeur incluant la vascularisation, le drainage lymphatique et la pression interstitielle.

Actuellement, la plupart des NPs utilisées en clinique dans les thérapies anticancéreuses sont des NPs dites de première génération qui utilisent le ciblage passif. L'objectif premier de la vectorisation en modifiant les propriétés physico-chimiques des agents anticancéreux est d'augmenter leur temps de circulation plasmatique pour potentialiser leur accumulation tumorale en exploitant les propriétés pathophysiologiques des tumeurs (FIG. 1.8). En effet, les tumeurs présentent une vascularisation tortueuse et perméable qui, contrairement à celle des tissus sains, permet l'extravasation des NPs de la circulation sanguine vers les tissus au travers de fenestrations (de 100 nm à 780 nm). Cette perméabilité vasculaire associée à un mauvais drainage lymphatique des tissus, qui empêche l'élimination des NPs extravasées, permet l'accumulation tumorale spécifique des NPs. L'ensemble de ces phénomènes est connu sous le nom effet EPR (pour « *enhanced permeability and retention effect* »).

L'exploitation de l'effet EPR est sans nul doute la stratégie la plus efficace pour améliorer l'accumulation tumorale des molécules anticancéreuses. Cette stratégie qui repose essentiellement sur les propriétés physiopathologiques des tumeurs, est considérée comme un ciblage passif des principes actifs [118]. Un exemple de NP utilisant le ciblage passif et ayant obtenu l'autorisation de la FDA (« *Food and Drug Administration* ») est la formulation lyosomale PEGylée de doxorubicine (Doxil®/Caelyx) utilisée pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein [111].

La capacité des NPs à diffuser au sein des tumeurs est un élément important qui influence l'efficacité de la vectorisation. Après leur extravasation, les NPs et les macromolécules doivent pénétrer et diffuser au sein du tissu tumoral afin d'atteindre un grand nombre de cellules. La pénétration de NPs de grande taille est sévèrement limitée par la forte densité cellulaire et la pression interstitielle élevée retrouvées au sein des tumeurs. Ce phénomène a été illustré par l'équipe de Bawendi [119]. En utilisant la microscopie intra-vitale, ils ont montré par co-injection (i.v.) de quantum dots de tailles différentes (12, 60 et 125 nm) que seules les particules d'une taille de 12 nm parvenaient à pénétrer en profondeur au sein de la tumeur. Les deux quantum dots de plus grande taille présentaient une localisation péri-vasculaire. Plus récemment dans la même optique, il a été démontré que les NPs de petite taille (< 50 nm) présentent à la suite de



leur extravasation une meilleure pénétration en profondeur dans les tissus que les NPs de tailles supérieures [120]. Ces résultats suggèrent que la taille des NPs influence non seulement leur extravasation à travers des fenestrations vasculaires mais aussi leur diffusion au sein du milieu interstitiel tumoral. Dans ce contexte, des NPs d'une taille allant de 2 à 10 nm comme les dendrimères ou les micelles, apparaissent comme des vecteurs prometteurs comparé au NPs de grandes tailles (~100 nm) tels que les liposomes ou les NPs à base d'albumine [121], [122]. En parallèle, de nombreuses études se sont concentrées sur la synthèse de NPs capables, suite à leur extravasation, de relarguer l'agent anticancéreux vectorisé dans l'espace péri-vasculaire sous l'action de différents stimuli (§1.3.2). Du fait de son faible poids moléculaire, l'agent anticancéreux libre peut diffuser en profondeur dans le tissu tumoral. Une seconde approche, visant à optimiser la pénétration et la distribution intra-tumorale des systèmes de transport, est le développement de NPs d'une taille de 100 nm composé d'un ensemble de NPs de 10 nm. Initialement, du fait de leur taille (100 nm), les NPs présentent un long temps de vie plasmatique et sont fortement extravasées à partir de la vascularisation tumorale. A la suite de leur extravasation, les NPs sont dégradées sous l'action de protéases (telles que les métalloprotéases), libérant ainsi de petites NPs de 10 nm de diamètre qui diffuseront en profondeur dans les tissus [123].

Bien que le ciblage passif ait permis le développement de nombreux nanomédicaments, il présente plusieurs limitations. Tout d'abord, on observe une hétérogénéité de l'effet EPR au sein des tumeurs. La vascularisation tumorale jouant un rôle majeur dans l'EPR, il est important de noter que la structure des vaisseaux ainsi que de la dimension des fenestrations varient en fonction du type et de la taille des tumeurs. Ces variations induisent la présence de zone avasculaire (hypoxique) qui limite la délivrance des NPs [124]. De plus, le ciblage passif, ne permet pas aux NPs de cibler les cellules dans l'espace interstitiel tumoral. Enfin, le ciblage passif ne limite pas l'accumulation des NPs au sein des tissus non tumoraux riche en système RES qui présentent une vascularisation fenestrée tels que le foie et la rate avec des pores allant de 50 à 150 nm de diamètre [109], [125].

#### 1.3.4.2. Le ciblage actif

Une des voies explorées en complément du ciblage passif est la synthèse de NPs fonctionnalisées pouvant cibler spécifiquement les cellules cancéreuses à la suite de leur extravasation vasculaire [109]. Comme le montre la FIG. 1.8, les NPs de deuxième génération présentent à leur surface des ligands spécifiques de récepteurs membranaires surexprimés ou spécifiquement exprimés par les cellules cancéreuses cibles. Ces NPs peuvent reconnaître et se fixer aux cellules par le biais d'une interaction spécifique ligand – récepteur intervenant entre les NPs et les cellules. Par la suite, les NPs sont internalisées *via* un mécanisme d'endocytose et le composé vectorisé est libéré soit à

proximité ou dans la cellule tumorale. Les agents de ciblage choisis doivent permettre la liaison des NPs aux cellules cancéreuses tout en limitant la reconnaissance des cellules saines. Un large panel de ligands a été décrit dans la littérature, en passant par des petites molécules comme l'acide folique ou des macromolécules telles que des peptides, des protéines, des anticorps ou des aptamères dont les récepteurs cibles sont surexprimés par les cellules tumorales [125]. La DOX a été vectorisée par des liposomes présentant à leur surface des peptides spécifiques des récepteurs au facteur épidermique de croissance (EGFR, « *epidermal growth factors receptor* ») [126]. *In vivo*, le greffage des peptides a permis une rapide accumulation tumorale des liposomes dès 1h après leur injection i.v, et a ainsi amélioré leur efficacité anti-tumorale.

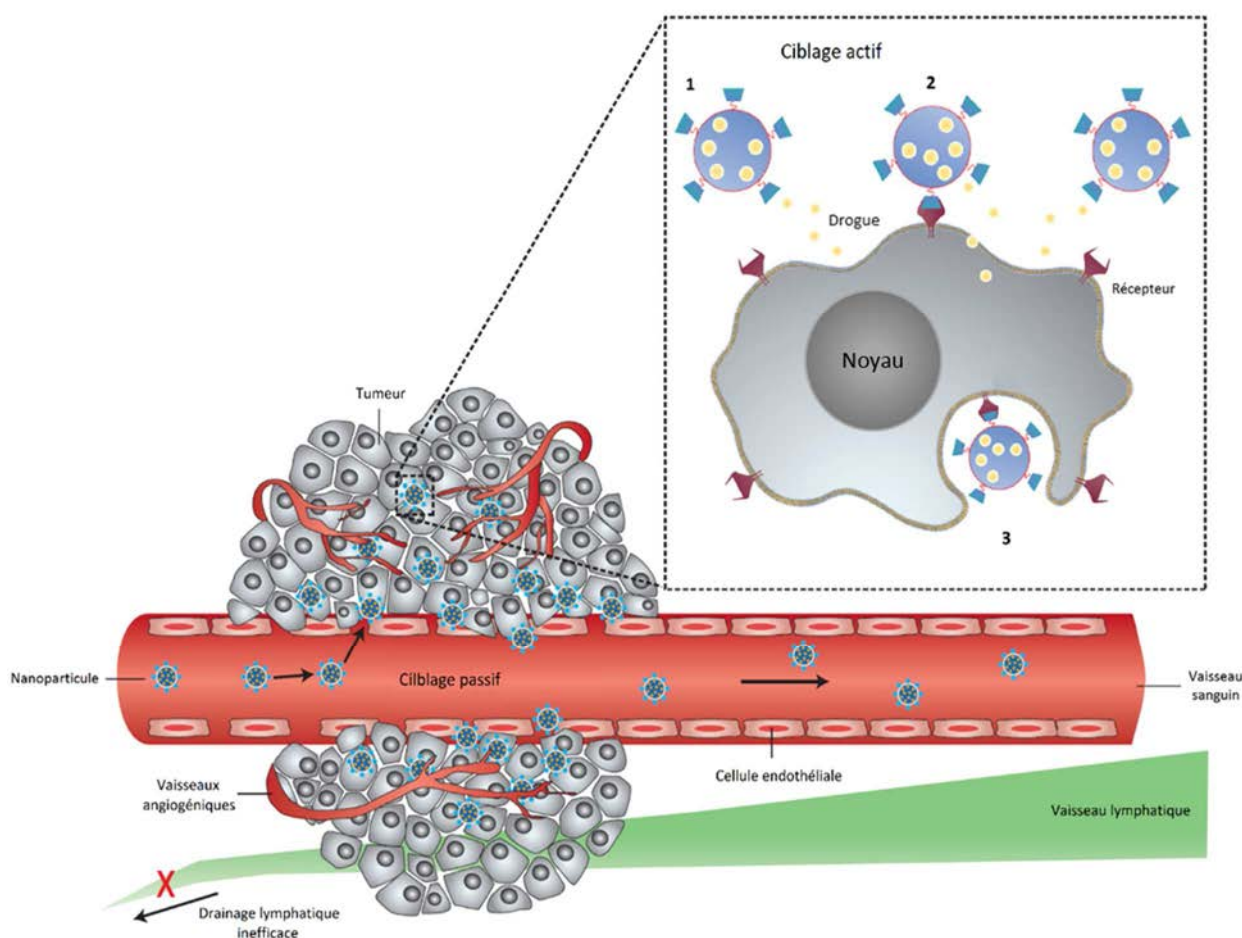


FIG. 1.8 Représentation schématique de l'utilisation du ciblage passif et actif par la vectorisation [125].

Le ciblage passif utilise la perméabilité augmentée de la vascularisation tumorale et le drainage lymphatique réduit (effet EPR) et permet l'accumulation des NPs au sein de la tumeur. Le ciblage cellulaire actif est possible par la fonctionnalisation de la surface des NPs par des molécules de reconnaissance spécifiques de protéines de surfaces surexprimées (ou spécifiquement exprimées) par les cellules tumorales. A la suite de leur extravasation, les NPs peuvent (1) relarguer leur contenu à proximité des cellules cibles, (2) s'absorber aux membranes cellulaires par la reconnaissance spécifique de récepteurs membranaires entraînant la libération du contenu ou (3) leur internalisation dans les cellules.

L'utilisation de ligands met en jeu une nouvelle balance. En effet, la présence de ces molécules de ciblage en surface des NPs favorise leur reconnaissance par le RES. Pour pallier ce problème, le nombre de ligand par NP doit être adapté pour permettre un ciblage efficace des cellules cancéreuses tout en limitant sa reconnaissance par le système RES [126]. En parallèle, la reconnaissance par le système RES peut être diminuée par le greffage de groupements de furtivité tels que les groupements PEG en surface des NPs. La PEGylation des NPs permet de créer une couronne hydrophile qui limite l'accès des cellules spécialisées, comme les macrophages aux NPs [117].

### 1.3.5. Incorporation cellulaire des nanoparticules

#### 1.3.5.1. Les différentes voies d'endocytose

Toutes les cellules utilisent les mécanismes d'endocytose pour communiquer entre elles ou avec l'environnement biologique. Ces processus énergie-dépendants permettent l'internalisation cellulaire de biomolécules comme les NPs [127].

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes d'incorporation des NPs. Contrairement aux petites molécules amphiphiles peu chargées qui sont incorporées par diffusion passive à travers les membranes plasmiques, les NPs sont internalisées par endocytose. L'endocytose inclut deux grands mécanismes : la phagocytose et la pinocytose [128] (FIG. 1.9). La phagocytose est un processus exclusivement utilisé par les cellules spécialisées, tels que les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles, pour internaliser des macromolécules d'une taille supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$  [127]. Tandis que la pinocytose est utilisée par l'ensemble des cellules et se subdivise en trois processus : la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante et l'endocytose calvéoline dépendante [129] (FIG. 1.9).

La macropinocytose aussi nommée endocytose par phase fluide (« *fluid-phase endocytosis* »), est un processus d'internalisation non-spécifique d'un ensemble de fluides et de particules en l'absence de liaison à la membrane plasmique. L'efficacité de ce processus est principalement contrôlée par la concentration des solutés dans le milieu extracellulaire. Il implique des extensions de la membrane plasmique qui vont renfermer une grande quantité de fluide extracellulaire au sein de larges vésicules (> 200 nm), appelées macropinosomes. La macropinocytose est le processus le moins détaillé dans la littérature contrairement aux autres voies d'endocytose.

Les processus d'endocytose clathrine ou calvéoline dépendants impliquent une internalisation des particules médiée par la reconnaissance de récepteurs membranaires. La plupart des cellules utilisent ces processus pour l'internalisation de nanomatériaux comme les virus ou les NPs [130], [131]. Lors de leur exposition à des solutions physiologiques, les NPs vont rapidement se complexer aux protéines plasmatiques qui

pourront interagir avec les membranes cellulaires, et engendrer l'internalisation des NPs *via* les voies d'endocytose clathrines ou calvéolines dépendantes.

L'endocytose médiée par les clathrines implique uniquement le recrutement des NPs à la surface des cellules par la reconnaissance spécifique de récepteurs membranaires. Durant ce processus d'internalisation, des puits recouverts de clathrines vont se former et englober les NPs liées aux récepteurs au sein de vésicules. Les vésicules (recouvertes de molécules de clathrine) bourgeonnent dans les cellules, se détachent et fusionnent avec des endosomes précoces qui migrent de la membrane plasmique vers les lysosomes. Les endosomes tardifs vont ensuite fusionner avec les lysosomes qui contiennent de nombreuses enzymes de dégradations. Le contenu des endosomes peut être recyclé *via* le cytosquelette à la surface de la cellule (récepteurs membranaires) ou relargué dans le cytosol. Les NPs qui ne peuvent pas échapper aux endosomes sont alors sujets à une dégradation au sein des lysosomes riches en enzymes [128]. En accord avec la littérature, l'internalisation de dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM) fonctionnalisés avec des ligands ciblant des intégrines, protéine surexprimée par de nombreuses cellules cancéreuses a été étudiée [132]. Cette étude a démontré, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies d'endocytose, que ces NPs dendrimériques étaient principalement incorporées *via* un mécanisme d'endocytose clathrine dépendant.

Parmi les autres mécanismes d'internalisation moins prédominant, l'endocytose médiée par les cavéoles est le mécanisme de transport clathrine indépendant le plus étudié. C'est un processus récepteur dépendant ou non caractérisé morphologiquement par de larges invaginations (50-80 nm) de la membrane plasmique. Ces structures cellulaires incluent des molécules de cholestérol, des sphingolipides, et une classe de protéines nommées les calvéolines, avec en particulier les calvéolines 1 (CAV-1) [133]. A la suite de cette voie d'endocytose, les NPs sont internalisées au sein de cavéosomes.

Le dernier type de mécanisme d'internalisation est l'endocytose clathrine et calvéoline indépendante [128]. Lors d'un processus d'endocytose récepteurs indépendants, on observe une absorption non spécifique des NPs en surface des cellules. En effet, les solutés et les NPs peuvent se fixer au niveau de sites non spécifiques présents sur la membrane plasmique grâce à des forces intermoléculaires, comme les interactions de nature hydrophobique ou les liaisons hydrogène. Cette absorption non spécifique intervient dans l'endocytose clathrine et calvéoline indépendante ainsi que dans l'endocytose calvéoline dépendante, en addition à l'absorption spécifique.

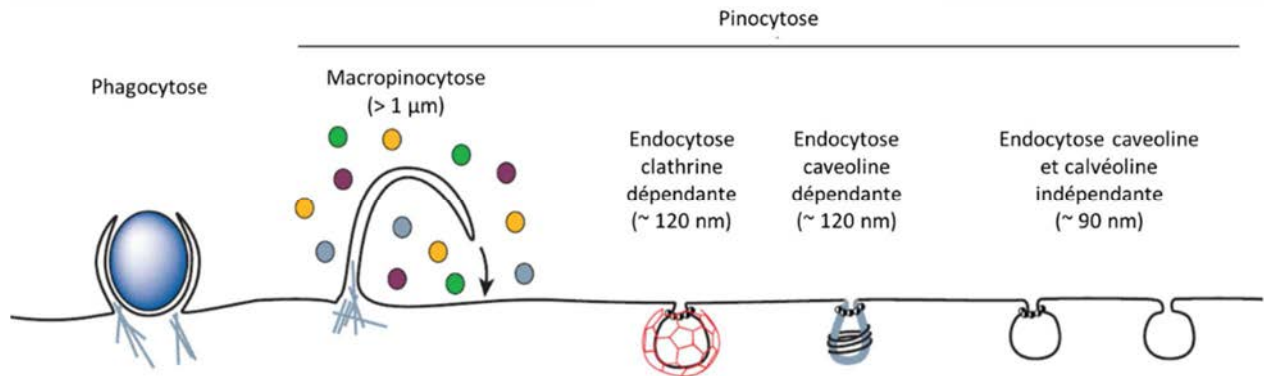


FIG. 1.9 Les mécanismes d'endocytose. [134]

Les voies d'endocytoses diffèrent en fonction de la taille des vésicules d'endocytose, la nature des protéines cargo (ligands, récepteurs, lipides) et des mécanismes de formation des vésicules.

### 1.3.5.2. Les méthodes d'études des voies d'internalisation des NPs

L'étude des voies d'incorporation des NPs permet d'analyser et de comprendre leur trafic intracellulaire. Différentes méthodes ont été décrites pour étudier les voies d'endocytose utilisées par les NPs. Elles sont basées sur l'inhibition spécifique des différentes voies d'endocytose afin de mettre en évidence leur intervention dans l'internalisation des NPs étudiées. En complément de ces techniques, l'étude de la localisation subcellulaire des NPs peut être réalisée.

Dans un premier temps, on trouve les inhibiteurs pharmacologiques. Cette approche est trop souvent basée sur l'hypothèse, souvent erronée, que ces inhibiteurs sont spécifiques d'un mécanisme d'endocytose donné [135]. Un exemple est la déplétion du cholestérol par le methyl- $\beta$ -cyclodextrine (m $\beta$ CD) ou la perturbation des fonctions cholestérols par addition de drogues fixant le cholestérol comme les filipines ou la nystatine. Ces techniques sont les plus répandues pour l'étude des mécanismes d'endocytose mis en jeu par les NPs. Cependant, même si le cholestérol est important dans les mécanismes d'endocytose médiée par les calvéolines, il est aussi requis dans les mécanismes calvéoline indépendants tels que la macropinocytose [128], [136], [137] ou l'endocytose clathrine dépendante [138]. Par conséquent, la déplétion du cholestérol ne permet pas de mettre clairement en évidence l'intervention d'un seul mécanisme d'endocytose. Par ailleurs, comme l'a démontré D. Vercauteren *et al.*, les inhibiteurs pharmacologiques utilisés à des concentrations optimales (concentration induisant une toxicité minime associée à une inhibition maximale) présentent une spécificité extrêmement variable en fonction du type cellulaire étudié [139].

Dans un deuxième temps, des lignées cellulaires déficientes d'une molécule nécessaire à une voie d'endocytose spécifique peuvent être produites par transfection de siRNA (« *small interferon RNA* »). Bien que l'expression de protéines mutées présente d'importants avantages comparés aux inhibiteurs pharmacologiques développés ci-dessus,

leur utilisation peut engendrer des effets secondaires et se révéler moins spécifique qu'espéré. Cette technique peut notamment engendrer un stress cellulaire [135]. De plus, il est important de noter que l'inhibition d'un facteur impliqué dans un mécanisme d'endocytose donné peut se traduire par la potentialisation d'une autre voie d'endocytose. Les résultats obtenus sont alors difficilement transposables sur une lignée cellulaire non transfectée, et la quantification de l'intervention réelle des différentes voies d'endocytose dans l'incorporation des NPs est difficile. En effet, l'inhibition de la voie clathrine dépendante à la suite de la mutation de la dynamine a été rapidement compensée par la mise en place des voies d'endocytose alternatives [140].

La dernière méthode qui est complémentaire aux deux techniques présentées précédemment, repose sur l'étude de la localisation intracellulaire des NPs à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques d'organites cellulaires. En effet, la localisation intracellulaire des NPs procure de précieux indices sur le mécanisme d'incorporation mis en jeu. Tout particulièrement, la localisation lysosomale est bien documentée comme étant en connexion directe avec une incorporation endocytose dépendante [117].

Comme il a été décrit dans cette partie, à ce jour différentes méthodes d'études des mécanismes d'incorporation existent. Cependant, leur utilisation nécessite la réalisation de nombreux contrôles afin de vérifier la spécificité et la toxicité de la méthode utilisée avant de valider et analyser les résultats obtenus.

### 1.3.6. Vectorisation de la Chlorine e6 en PDT

#### 1.3.6.1. Généralités

Comme il a été développé dans le §1.1.4, la Chlorine e6 (Ce6) est un PS utilisé en PDT anticancéreuse. Cependant, actuellement le manque de sélectivité tumorale, la toxicité associée et l'hydrophobicité des PSs (rendant difficile leur administration i.v.), limitent l'utilisation de ce traitement en clinique. La vectorisation des PSs permet de surmonter les limitations de la PDT, en augmentant leur sélectivité tumorale *via* l'effet EPR, en améliorant leur solubilité aqueuse grâce aux propriétés physicochimiques favorables des NPs, et en diminuant leur rapide biodégradation par protection des PSs au sein des NPs.

Les NPs communément utilisées en PDT sont composées de phospholipides et de cholestérol, de polymères, de silice, et de métaux [141]. La Ce6 a été amplement étudiée dans la littérature. Comme les exemples développés par la suite le démontreront, sa vectorisation a permis d'améliorer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité et la sélectivité d'un traitement PDT à base de Ce6. Nous allons détailler les différentes stratégies de vectorisation de la Ce6 qui utilisent soit un ciblage passif ou un ciblage actif. Et nous

nous concentrerons sur la mise en place de nouvelles NPs multifonctionnelles à base de Ce6.

### 1.3.6.2. Nanoparticules reposant sur le ciblage passif ou actif

#### - Ciblage passif

Le ciblage passif (§1.3.4.1), nécessite l'association du principe actif à un vecteur. En 1991, la Ce6 a été conjuguée de façon covalente à des microsphères de polystyrène par l'équipe de T. Hasan [142]. Ce conjugué a démontré *in vitro* sur une lignée cellulaire de carcinome de vessie, une incorporation cellulaire 20 fois supérieure à la Ce6 libre qui s'est traduit par une potentialisation de son effet phototoxique. En effet, à une concentration incubée fixe de 0,43  $\mu\text{M}$  de Ce6 et à une dose de lumière de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  à 659 nm, le conjugué induit une mortalité cellulaire de 90% alors que la Ce6 libre ne présente aucun effet toxique. Toutefois, en solution, la génération d'oxygène singulet par la Ce6, espèce cytotoxique majoritairement responsable de l'effet PDT, s'est révélée être diminuée à la suite de sa conjugaison (un ratio de neuf a été observé entre : Ce6 conjuguée/Ce6 non conjuguée). Par conséquent, l'augmentation de la photoactivité de la Ce6 à la suite de sa conjugaison aux microsphères de polystyrène est la conséquence d'une accumulation intracellulaire accrue.

Par la suite, la Ce6 a été vectorisée par des vecteurs tels que des liposomes [143], [144], des NPs à base d'albumine [121], des nanofeuilles de graphène [145], ou encore des polymères [56], [132], [146]–[148]. Parmi ces derniers, le polyvinylpyrrolidone (PVP) est une molécule synthétique, hydrosoluble, de faible toxicité, communément utilisée pour améliorer la dissolution de drogues. Le complexe PVP-Ce6 a augmenté *in vitro* l'incorporation cellulaire de la Ce6, et a démontré une meilleure sélectivité tumorale que la Ce6 libre sur des patients atteints d'angiosarcome [149], [150].

Plus récemment, la Ce6 a été couplée au pluronique F127<sup>®</sup> (poly(éthylène oxide)-block-poly(propylène oxide)-block-poly(éthylène oxide), PF127), un polymère ayant reçu l'accord de la FDA, qui est fréquemment utilisé comme adjuvant pharmaceutique [56]. Le PF127 est utilisé pour rendre soluble les PS et augmenter à la fois leur internalisation cellulaire et leur ciblage tumoral. Le complexe a démontré une production d'oxygène singulet augmentée de 5 fois comparé à la Ce6 libre. De plus *in vitro*, le PF127 a amplifié l'internalisation cellulaire de la Ce6 et a par conséquent potentialisé 3 fois son efficacité photodynamique. En parallèle, le P127 a favorisé l'internalisation tumorale et l'efficacité PDT de la Ce6 *in vivo*.

A la suite de ces études, de nombreuses équipes se sont concentrées sur la fonctionnalisation des NPs vectorisant la Ce6, pour permettre leur ciblage tumoral actif par reconnaissance moléculaire ou par attraction physique.

## - Ciblage actif

### *Ciblage par reconnaissance cellulaire*

L'objectif de la PDT est d'éradiquer sélectivement les cellules tumorales en induisant des dommages minimums aux cellules saines environnantes. Pour atteindre cet objectif, une incorporation sélective du PS dans les cellules cibles est un prérequis indispensable. Dans ce souci d'accumulation tumorale sélective de la Ce6, des études ont été conduites pour concevoir et développer des NPs de seconde génération dont le mécanisme d'action repose sur le ciblage actif (§1.3.4.2).

La Ce6 peut être directement conjuguée à une molécule d'adressage comme des aptamères, des anticorps et des peptides [151]–[153]. Un photoimmunoconjugué a été conçu en complexant la Ce6 à un anticorps monoclonal murin (mAb 17.1A) spécifique d'un antigène membranaire surexprimé dans les cancers colorectaux [152]. Cette étude a démontré que la complexation n'a pas altéré l'antigénicité du mAb 17.1A et a amplifié la phototoxicité de la Ce6. Plus récemment, S. Kruspe *et al.* ont étudié *in vitro* la conjugaison de la Ce6 à un aptamère d'ARN liant spécifiquement le récepteur à l'interleukin-6 humaine (IL-6R). Du fait de son internalisation prononcée dans les cellules présentatrices du récepteur à l'IL-6, l'aptamère a augmenté l'efficacité PDT de la Ce6, à des concentrations où la Ce6 libre ne présente pas de phototoxicité [151]. La spécificité du traitement utilisant le conjugué aptamère-Ce6 a été confirmée par l'absence de toxicité sur des cellules dépourvues d'IL-6R.

Les agents de ciblage peuvent être greffés non pas directement à la molécule photosensibilisatrice mais sur des NPs transportant la Ce6 comme des dendrimères [132], [154], [155] ou des nanofeuilles de graphène [90]. Récemment, la Ce6 a été greffée de manière covalente en périphérie de dendrimère PAMAM fonctionnalisé par des groupements de PEG et un peptide de ciblage [132] (§1.4.6.2). Cette construction a potentialisé l'effet photodynamique de la Ce6 en augmentant 16 fois son incorporation au sein des cellules présentatrices des protéines membranaires spécifiques du ciblage (intégrine  $\alpha_v \beta_3$ ) comparé aux cellules déficientes de cette protéine.

### *Ciblage par force physique*

Une nouvelle méthode de ciblage a récemment émergé. Elle consiste à amplifier l'accumulation tumorale des NPs grâce à une force physique comme un champ magnétique externe. Plusieurs équipes ont développé des NPs magnétiques vectorisant des molécules photosensibilisatrices pour une application en PDT ciblée par magnétisme [156], [157]. Récemment, l'équipe de Z. Liu a étudié une NP composée d'un nano-assemblage d'oxyde de fer fonctionnalisé avec de la Ce6 et des groupements PEG [57]. Cette NP a potentialisé, sur un modèle murin xenogreffé, l'accumulation tumorale de la Ce6 sous l'application extérieure d'un aimant au niveau de la tumeur. Ce tumorotropisme



a pu être mis en évidence par imagerie de fluorescence et de résonance magnétique (IRM), du fait de la multimodalité des NPs. Cette accumulation accrue a permis une amélioration de l'efficacité PDT de la Ce6 se traduisant par un retard de re-croissance tumorale d'une semaine suite au traitement.

### 1.3.6.3. Nanoparticules multimodales

Une avancé récente en nanotechnologie est l'introduction de NPs multimodales. Cette multimodalité peut s'appliquer soit dans une optique thérapeutique, en associant deux thérapies, ou dans une optique théranostique avec la mise en œuvre combinée d'un diagnostic médical et d'une thérapie.

#### - Approche thérapeutique

Différentes études utilisent des nanoplateformes pouvant éradiquer les tumeurs par l'action synergique de deux traitements de photothérapie : la PDT et la thérapie photothermale (PTT, « *photothermal therapy* »). La PTT repose sur l'excitation par radiation d'une molécule sensibilisante qui libère son énergie sous forme d'hyperthermie locale, contrairement à la PDT qui induit des dommages oxydatifs par le biais de la production d'espèces cytotoxiques de l'oxygène (ROS). Des nanoplateformes associant la Ce6 à des agents de PTT comme de l'oxyde de graphène [145], des nano-tiges d'or (« *Gold nanorop* ») [158], [159], des nanofeuilles de pladium (« *nanosheet Pd* ») [160] ou des polymères poly(dopamine) (PDA) [161], ont été synthétisés. Récemment, D. Zhang *et al.* ont conjugué la Ce6 à une nanosphère composée de PDA, bien connu pour son activité photothermique utilisée en thérapie anticancéreuse [161], [162], [163]. L'efficacité PDT de cette NP a été déterminée sur une lignée cellulaire de carcinome hépatique humain à la suite d'une irradiation à 670 nm. La vectorisation de la Ce6 par les nanosphères PDA, a potentialisé significativement son efficacité PDT en favorisant la production de ROS et son accumulation intracellulaire. De plus, à la suite d'une irradiation à 808 nm capable d'activer le PDA, la nanosphère PDA-Ce6 a présenté une excellente conversion photothermique. Pour conclure, cette nanosphère a présenté une faible toxicité à l'obscurité associée à une excellente phototoxicité avec une irradiation combinée à 670 et à 808 nm comparée à une irradiation simple (à 670 ou à 808 nm), *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin xenogreffé. L'ensemble de ces résultats récemment publiés présentent cette nanosphère PDA-Ce6 comme un agent thérapeutique de double modalité PDT et PTT prometteur pour de futures applications cliniques.

Le même principe a été employé pour des NPs utilisant le ciblage actif. J. Wang *et al* ont couplé l'extrémité 3' d'un aptamère (spécifique des cellules T lymphoblastiques leucémiques) à la Ce6. Puis le complexe aptamère-Ce6 a été couplé *via* l'extrémité 5' de l'aptamère à une nanotige d'or (agent de PTT) [158]. Cette NPs possède un mécanisme « ON / OFF » permettant de potentialiser la spécificité du traitement PDT. En absence

du ligand cible de l'aptamère, la NP est inactive (mode « OFF ») car la Ce6 fixée à l'aptamère est, du fait de sa proximité avec la nano-tige d'or, quenchée par celle-ci. Sous l'action du ligand, l'aptamère change de conformation et éloigne la Ce6 de la surface de la nanotige d'or, rétablissant ainsi sa fluorescence et son activité phototoxique. Ainsi, en présence du ligand, la NP est active (mode « ON »). Du fait de la fixation de multiples molécules de Ce6 en périphérie des nanotiges d'or à l'aide d'un aptamère, leur incorporation cellulaire et leur efficacité photodynamique ont été spécifiquement augmentées. De plus, l'absorption des radiations par les nanotiges d'or a permis la destruction des cellules *via* un effet photothermique. Par conséquent, ce conjugué multimodal, associant la PDT et la PTT, améliore l'activité anti-tumorale de la PDT ou de la PTT utilisées séparément.

### - Approche théranostique

Un PS idéal en théranostique doit présenter un fort rendement quantique d'oxygène singulet et de fluorescence pour permettre à la fois un traitement PDT et un diagnostic photodynamique (PDD, « *photodynamic diagnosis* »). Or, la plupart des PSs possèdent un faible rendement quantique de fluorescence, comparé aux agents fluorescents traditionnels (sondes fluorescentes, GFP...), qui limite leur utilisation simultanée en PDT et en PDD. Pour dépasser cette limitation, les PSs comme la Ce6 sont conjugués à différents nanomatériaux fluorescents. P. Huang *et al* ont conjugué la Ce6 à des NPs de silice (~ 68 nm) renfermant des nano-assemblages d'or, appelés « *nanocluster* » (AuNCs) d'une taille inférieure à 1 nm [58]. Les AuNCs, possédant une émission dans le rouge avec un rendement quantique aux alentours de 6%, se présentent comme de bons candidats pour l'imagerie de fluorescence et la vectorisation de composés thérapeutiques. Cette nano-construction est stable, soluble en milieu aqueux, non cytotoxique et biocompatible. De plus, sur un modèle murin xénogreffé, ces NPs ont présenté par imagerie de fluorescence une forte localisation tumorale, associée à une remarquable régression des tumeurs ( $p < 0.05$  comparé à la Ce6 libre), à la suite d'une irradiation. L'ensemble de ces propriétés placent cette NP comme un agent d'imagerie prometteur pour guider un traitement PDT, par exemple.

Au cours d'une seconde étude, la Ce6 a été conjuguée à des Carbon Dots (C-dots) [164]. Les C-dots possèdent certains avantages majeurs des quantum-dots (Q-dots), comme une grande photostabilité, une émission de fluorescence accordable et une large bande d'excitation. L'avantage supplémentaire des C-dots est l'absence de métaux reconnus comme étant toxiques. Ils sont par conséquent plus adaptés aux applications biomédicales. Dans cette étude, à la suite d'une irradiation à 430 nm, les C-dots émettent des photons aux alentours de 525 nm qui vont à leur tour exciter la Ce6 vectorisée [164]. Dans le PBS, les C-dots-Ce6 exposent une fluorescence 25 fois supérieure à la Ce6 libre. Cette augmentation est due à une amélioration de la solubilité de la Ce6 et au mécanisme de transfert d'énergie du C-dots à la Ce6, nommé transfert d'énergie par résonance de

type Förster (FRET, « *Förster resonance energy transfer* »). Cette construction permet de potentialiser la fluorescence de la Ce6, mais ne pallie pas le manque de pénétration au sein des tissus biologiques d'une irradiation à de faibles longueurs d'ondes (dans cette étude : 430 nm).

Récemment, des NPs de conversion ascendante de photons, appelées : « *upconversion* » nanoparticules (UCNP), ont été associées à des PSs. Les UCNP s'excitent à la suite d'une irradiation dans le proche infrarouge (correspondant à des photons de faible énergie) qui présente une meilleure pénétration dans les tissus que les longueurs d'ondes habituellement utilisées en PDT. A la suite d'une irradiation dans le proche infrarouge, les UCNPs vont émettre des photons de haute énergie (de plus faible longueur d'onde) qui vont exciter le PS couplé aux UCNPs. Deux études ont décrit la vectorisation de la Ce6 par des UCNPs [165], [166]. X. Wang *et al.* ont vectorisé *via* des UCNPs la Ce6 et un siRNA inhibant spécifiquement un oncogène [166]. Suite à une irradiation à 980 nm, les UCNPs émettent des photons, notamment à une longueur d'onde de 660 nm, qui permettent l'excitation de la Ce6 vectorisée. Consécutivement au FRET décrit des UCNPs vers la Ce6, l'oxygène singulet est produit. En parallèle, la luminescence résiduelle de la « *upconversion* » est utilisée pour le diagnostic par imagerie. Cette étude a démontré le potentiel des UCNPs pour les traitements multimodaux (ici l'association de la PDT et de la thérapie génique) guidés par imagerie de fluorescence.

#### 1.3.6.4. Conclusion

De nombreuses nanoconstructions à base de Ce6, utilisant soit le ciblage passif ou actif ont été développés et ont démontré un fort potentiel thérapeutique. Cependant, il faut noter que la vectorisation reposant sur le ciblage moléculaire est problématique du fait de l'hétérogénéité intrinsèque et de la diversification épitopique (nombreuses mutations) des tumeurs [167], [168]. Cette diversité rend difficile le développement d'anticorps spécifiques des différents ligands [168], [169]. Par conséquent, le ciblage passif apparaît comme étant la stratégie la plus universelle et efficace pour la conception de NPs vectorisant des agents anticancéreux.

## 1.4 Les dendrimères

### 1.4.1. Historique

Décrits pour la première fois en 1978 par l'équipe de Vögtle [170], les dendrimères sont une famille de macromolécules polymériques caractérisées par une architecture tridimensionnelle hautement ramifiée. Leur nom est dérivé du mot grec « dendron » qui signifie « arbre » en référence à leur organisation en arborescence. Ils sont constitués de séquences répétitives de monomères, appelées « unités de branchement », greffées sur un

cœur multifonctionnel. Leur rapide émergence dans les applications biologiques a été accompagnée d'une augmentation du nombre d'architectures dendritiques différentes (FIG. 1.11) conçues pour être solubles et biocompatibles.

Leurs rôles émergents dans les thérapies anticancéreuses et dans le diagnostic par imagerie, ont mis en évidence les multiples avantages de ces nanomatériaux qui seront décrits par la suite. Les dendrimères sont reconnus comme une nouvelle classe de vecteur de taille nanométrique [171].

### 1.4.2. Architecture et composition

Les dendrimères sont des **macromolécules globulaires monodisperses** issues d'une **synthèse reproductible** hautement contrôlée.

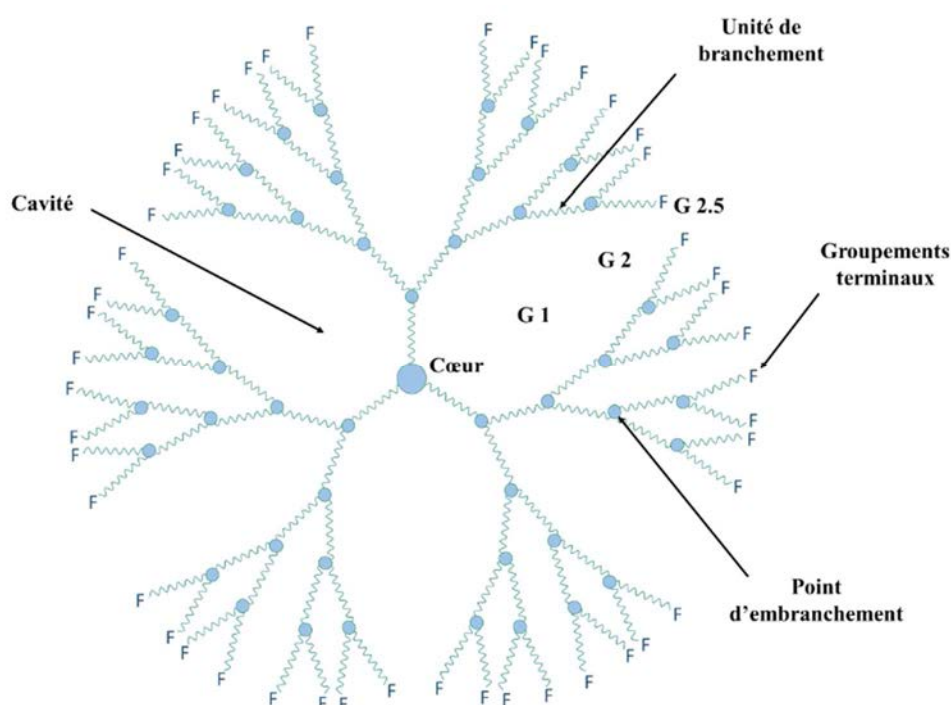


FIG. 1.10 Représentation schématique d'un dendrimère de génération 2.5 (G 2.5).

Comme présenté en FIG. 1. 10, la structure des dendrimères est composée de **trois parties distinctes** : (1) **un cœur multifonctionnel** central mentionné comme étant la « génération 0 » (G 0) ; (2) **des branches émanant du cœur appelé « dendron »** : elles sont constituées d'une répétition d'unités monomériques possédant au moins un point de jonction, organisées selon une géométrie radiale pour former une série de couches concentriques appelées « génération » G 1, G 2, G 3 etc. Cette région située sous la surface définit un microenvironnement composé de chambres dendritiques internes protégées de l'extérieur par la surface du dendrimère. Ces cavités sont particulièrement bien adaptées pour l'encapsulation de principes actifs. (3) **Une surface**

**plurivalente** qui est composée d'un grand nombre de groupements fonctionnels. Elles jouent un rôle clé dans les propriétés physico-chimiques du dendrimère et permettent le greffage potentiel de molécules actives [172]. Le nombre des groupements périphériques et la taille du dendrimère augmentent exponentiellement avec l'augmentation du nombre de générations.

Les dendrimères polyamidoamine (PAMAM) et les poly(propylèneimine) (aussi appelés PPI ou DAB) commercialement disponibles, sont les plus étudiés pour les applications biomédicales. Dans la littérature, une grande diversité de structures dendritiques sont disponibles comme les dendrimères poly(propylèneimine) (PPI), polyglycerol-co-succinic acide), poly(L-lysine), poly(glycérol), poly(2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique acide) et les dendrimères de mélanine, etc.... (FIG. 1.11 et 1.12).

L'ensemble de ces dendrimères constitue **une collection de macromolécules possédant des structures et des propriétés chimiques variées** (charge, taille...). Ces propriétés peuvent être manipulées pendant la synthèse du dendrimère par augmentation de la génération ou par modification des groupements périphériques [171].

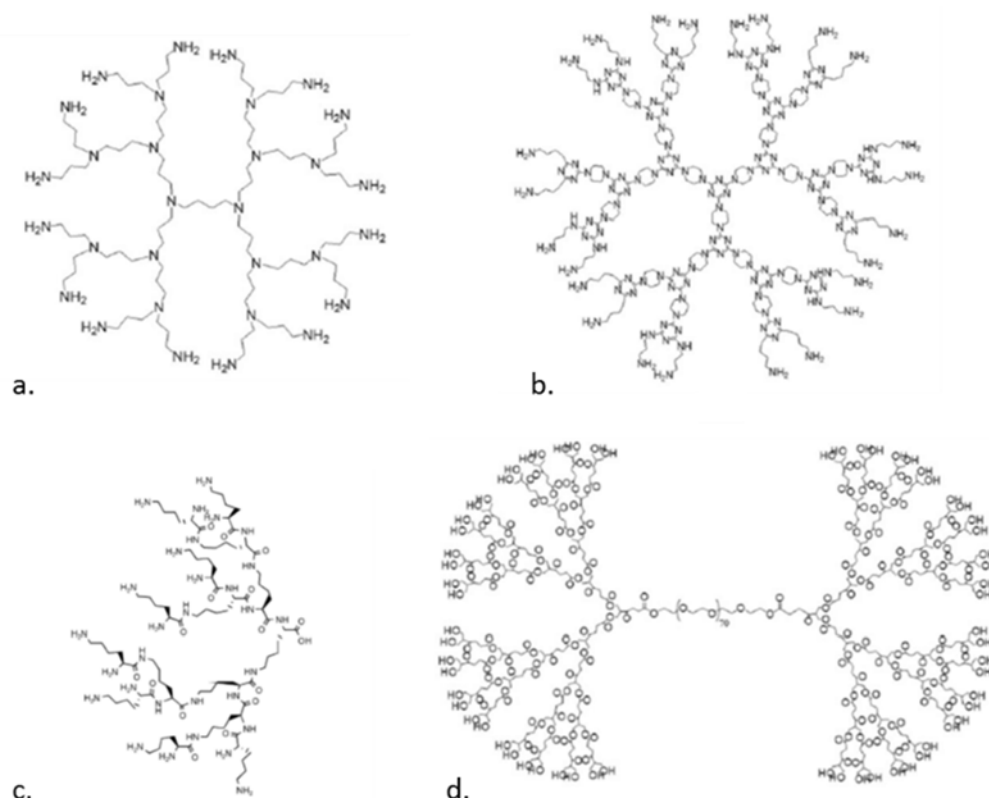


FIG. 1.11 Illustration de dendrimères possédant des structures et des compositions diverses, qui sont usuellement utilisés en thérapie anticancéreuse. [171], [173]

Représentation des dendrimères à base : de PPI (a), de mélanine (b), de poly(L-lysine) (c), de glycérol et d'acide succinique avec un cœur PEG (d).

Dans le cas des **dendrimères PAMAM**, la FIG. 1.12 présente la structure d'un dendrimère de génération 3 (G 3). Il est composé d'un cœur d'éthylène diamine et présente 32 groupements amines fonctionnalisables en périphérie. Les cycles réactionnels de synthèse des dendrimères PAMAM sont réalisés en deux étapes. On passe alors par **une demi-génération ( G 0.5 ; G 1.5 ; G 2.5 )** avec des groupements carboxyles terminaux (-COOH, négativement chargé) avant d'obtenir **une génération complète (G 1 ; G 2 ; G 3 ; ...)** avec des groupements amines terminaux (-NH<sub>2</sub>, positivement chargé) [173].

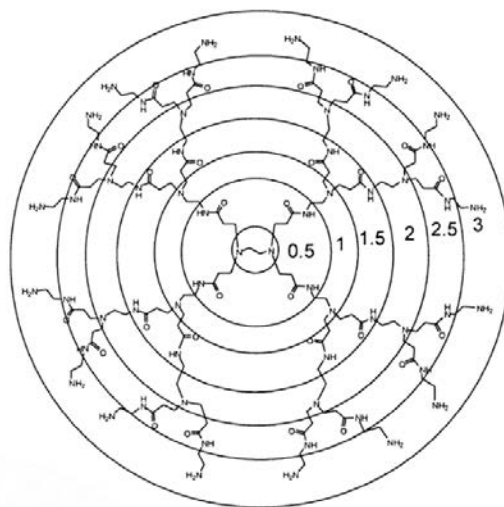


FIG. 1.12 Représentation schématique d'un dendrimère PAMAM de génération 3 (G 3). Les générations complètes (1, 2, et 3) et les demi-génération (0.5, 1.5 et 2.5) sont délimitées sur la structure par des cercles. [173]

Comme décrit précédemment, l'augmentation du nombre de générations des PAMAM de 1 à 10 se traduit par une augmentation du nombre de groupements périphériques fonctionnalisables (4 à 4096 groupements) et de la taille du dendrimère de 1.1 à 12.4 nm. Ces dimensions peuvent être comparées à celles des protéines (3 - 8 nm), des polymères linéaires conjugués à des drogues (5 - 20 nm) et à des virus (25 - 240 nm). Jusqu'à présent, de nombreux dendrimères PAMAM présentant en surface des groupements -NH<sub>2</sub>, -COOH et -OH ont été étudiés en vue d'applications biomédicales [174].

### 1.4.3. Méthodes de synthèse des dendrimères

La méthode de synthèse des dendrimères consiste en une répétition de séquences d'étape réactionnelle. Chaque répétition donne lieu à une génération supérieure. Les dendrimères sont habituellement synthétisés par deux approches dépendant du point de départ de la synthèse, à savoir divergente et convergente (FIG. 1.13). La stratégie

divergente, a été introduite par Tomalia et *al.* [175] et consiste en une croissance du dendrimère à partir du cœur central vers la périphérie. Tandis que la synthèse convergente, développée par Hawker et Fréchet, consiste en un processus inverse qui procède de la périphérie vers le cœur [176].

### 1.4.3.1. La méthode divergente

Cette approche a été décrite en 1996, par Tomalia *et al.* dans le cadre de la synthèse des dendrimères PAMAM [175]. La synthèse est réalisée couche par couche à partir du cœur multifonctionnel vers la périphérie. Le cœur va réagir avec un monomère *via* une ou deux réactions permettant d'aboutir à la création d'une nouvelle génération. Puis les nouveaux groupements périphériques de la molécule seront activés et réagiront avec un plus grand nombre de monomères (FIG. 1.13). D'autres dendrimères comme les PPI sont synthétisés avec cette approche.

### 1.4.3.2. La méthode convergente

L'approche convergente (FIG. 1.13) a été la première à être rapportée par Hawker et Fréchet [176]. Les dendrimères sont construits de la périphérie vers le cœur central. Dans un premier temps, les dendrons sont construits séparément et sont par la suite rattachés au cœur multifonctionnel. Avec cette méthode, le nombre de réactions secondaires est minimisé en limitant le nombre de sites de réaction disponibles. Ainsi, la synthèse aboutit à la production de dendrimères presque pure, contrairement à la méthode divergente.

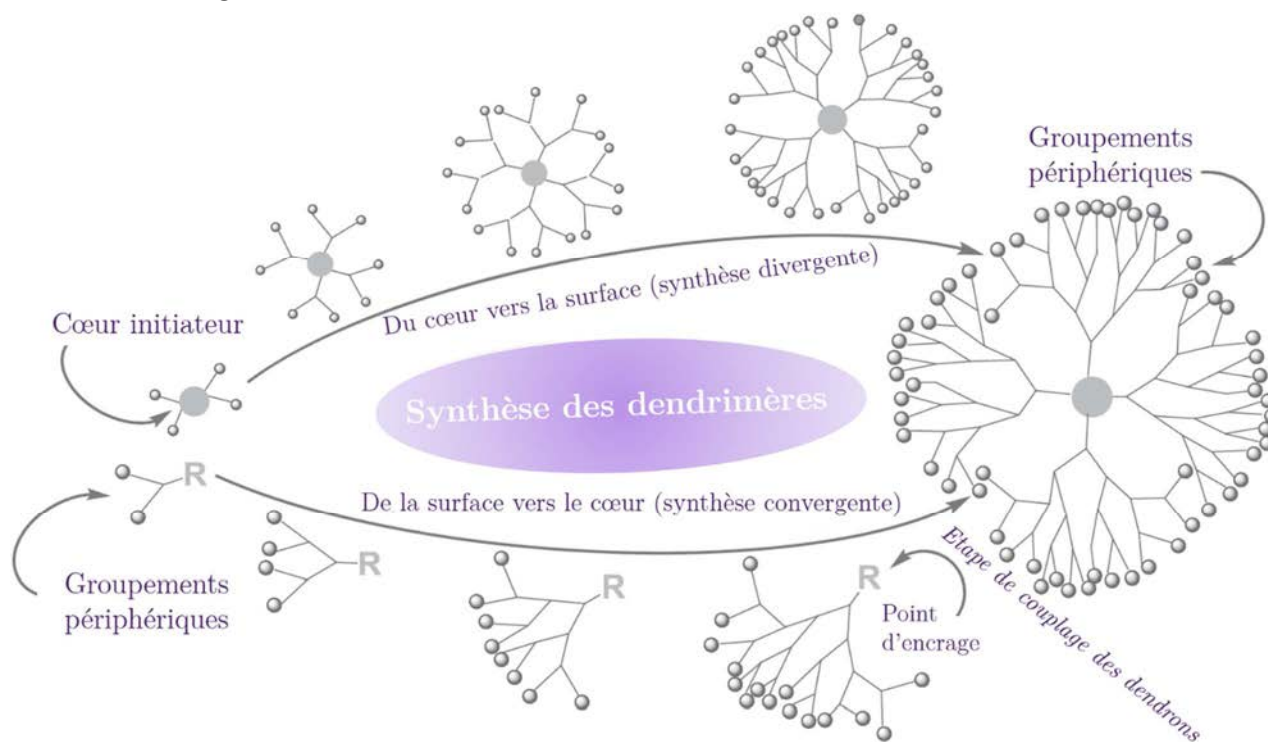


FIG. 1.13 Méthodes de synthèse des structures dendritiques, la voie divergente et la voie convergente (d'après [177]).

#### 1.4.4. Dendrimères : un excellent candidat pour des applications en biologie

En raison de leur monodispersité, leur surface périphérique multifonctionnelle et leur cavité interne, les dendrimères possèdent un grand nombre d'applications dans les domaines de la chimie, de la biologie et de la médecine. En effet, les dendrimères sont fonctionnalisables à façon et peuvent être adaptés à l'utilisation souhaitée. Pour être utilisés comme vecteur de molécules thérapeutiques *in vivo*, les dendrimères doivent répondre à plusieurs exigences biologiques d'une importance cruciale. Ils doivent être non toxiques, non immunogéniques, être capables de franchir des barrières biologiques comme les membranes cellulaires, être aptes à rester dans la circulation sanguine le temps nécessaire pour avoir l'effet clinique désiré et également être capables de cibler des structures spécifiques. De nombreuses études se sont intéressées à la relation existant entre la composition des dendrimères et leur comportement en milieu biologique : leur biocompatibilité et leur pharmacocinétique [171]. Dans cette partie, nous allons détailler les propriétés cytotoxiques des dendrimères *in vitro* et *in vivo* et leurs propriétés de pharmacocinétiques, deux paramètres clés du développement de nouvelles NPs.

##### 1.4.4.1. Propriétés biologiques des dendrimères *in vitro* : la cytotoxicité

Comme développé précédemment, les dendrimères peuvent présenter des structures et des propriétés variées, qui vont modifier leurs interactions avec le milieu biologique extérieur et par conséquent modifier leur toxicité. De nombreuses études ont examiné la cytotoxicité *in vitro* des dendrimères. Toutefois, la comparaison de ces études est difficile du fait de l'utilisation de différentes lignées cellulaires, différentes techniques de mesure, et une grande variété de temps et de concentration d'incubation des dendrimères [174]. Certaines tendances ont toutefois bien été documentées. **La biocompatibilité des dendrimères est déterminée par leurs propriétés intrinsèques** qui sont : **(1) la taille**, paramètre clé influençant la flexibilité de la structure des dendrimères, **(2) la nature, la densité et l'accessibilité des charges de surface** et **(3) la structure** (notamment la composition du cœur) [178].

Une étude menée par D. Fischer *et al.* en 2003 a comparé l'effet cytotoxique de quatre dendrimères de compositions différentes sur des fibroblastes murins [179]. Ils ont démontré que les dendrimères PAMAM (G 3) présentent une toxicité inférieure à celles des autres dendrimères testés incluant, les poly(éthylèneimine) (PEI), les poly(L-lysine) (PLL) et les diéthylaminoéthyl-dextran (DEAD-Dextran) classés comme PEI = PLL > DEAD-dextran > PAMAM (G 3). La littérature présente la taille et la charge de surface



comme étant les deux propriétés intrinsèques principales des dendrimères qui interviennent dans leur effet cytotoxique.

Des études antérieures ont démontré que d'une manière générale, la charge de surface est un point crucial qui influence la toxicité des NPs. Contrairement aux anioniques, les NPs cationiques vont fortement interagir, *via* des interactions électrostatiques, avec les membranes cellulaires qui sont chargées négativement. Elles vont les déstabiliser, et induire la lyse et la mort de la cellule. Il est nécessaire de rappeler que la charge des dendrimères est déterminée par la nature de leurs groupements de surface. Dans le cas des dendrimères PAMAM, les demi-génération (G 1.5, G 2.5...) sont chargées négativement par la présence en surface de groupements carboxyle. Par opposition, les générations complètes (G 1, G 2, G 3...) présentent des groupements amines terminaux chargés positivement. Sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome intestinal humain (Caco-2), Jevprasesphant *et al.* ont démontré que les dendrimères PAMAM cationiques induisent une toxicité plus importante que les anioniques [180]. De plus, cette toxicité engendrée a été, pour les deux types de dendrimère anionique/cationique, amplifiée avec l'augmentation de la taille (génération) des dendrimères. En effet, les dendrimères cationiques sont d'autant plus toxiques que leurs générations augmentent. Ils vont présenter un nombre grandissant de groupements périphériques positivement chargés, qui amplifiera leurs charges de surface et par conséquent potentialisera leurs interactions avec les membranes cellulaires. Une solution pour diminuer la toxicité des dendrimères cationiques est le masquage et la neutralisation des groupements périphériques. Pour cela, diverses méthodes décrites ci-après peuvent être appliquées.

L'utilisation de groupements de furtivité polyéthylène glycol (PEG) pour masquer les charges de surface des dendrimères, est une méthode couramment utilisée pour réduire la toxicité des dendrimères et augmenter leur biocompatibilité. Les PEG sont de petites molécules non toxiques, non-immunogéniques et qui possèdent des propriétés pharmacocinétiques favorables. La fonctionnalisation des dendrimères cationiques avec les PEG est susceptible de diminuer ou masquer les charges positives en surface du dendrimère. La couverture des groupements de surface par des groupes terminaux biocompatibles a été largement utilisée pour créer des dendrimères moins toxiques. Dans la même étude de Jevprasesphant *et al.*, la PEGylation des dendrimères PAMAM cationiques a diminué leur cytotoxicité, en réduisant de 7 fois la concentration en dendrimère qui induit 50% de mortalité cellulaire ( $IC_{50}$ )[180]. Une étude plus récente de Wang *et al.*, a évalué l'effet de la PEGylation sur la cytotoxicité des dendrimères PAMAM (G 5) en faisant varier le nombre et le poids moléculaire des groupements PEG greffés [181]. Une diminution spectaculaire de la cytotoxicité a été observée après la PEGylation des dendrimères PAMAM : l' $IC_{50}$  des dendrimères PEGylés a été jusqu'à 105 fois supérieure à celle des dendrimères non modifiés. Ils ont ainsi démontré que plus les dendrimères conjugués sont fonctionnalisés avec un grand nombre de molécules PEG de haut poids moléculaire, plus leur cytotoxicité est diminuée.

Une seconde méthode pour neutraliser les charges de surface responsables de la toxicité des dendrimères est la modification chimique de leurs groupements périphériques. En 2012, l'équipe de Bryszewska a amélioré la biocompatibilité des dendrimères PAMAM (G 4) en modifiant ces groupements amine terminaux en pyrrolydone [182]. Cette modification chimique s'est caractérisée par une absence d'hémolyse et une activité cytotoxique minime des dendrimères-pyrrolydone comparé aux non-modifiés. Un second exemple de modification chimique des groupements périphériques est l'acétylation. L'acétylation des groupements de surface conduit à neutraliser les charges et à augmenter l'hydrosolubilité des dendrimères, propriété essentielle pour les utilisations biomédicales [183], [184].

D'autre part, il est important de noter que la cytotoxicité *in vitro* des dendrimères n'est pas seulement régie par la charge de surface de ces derniers, mais elle est également génération dépendante. Le rôle associé de la taille et de la charge a été étudié avec des dendrimères PAMAM G 3, G 5 et G 7 neutres ou positivement chargés [185]. L'utilisation de dendrimères de génération élevée (G 7), toutes charges confondues, a conduit à la formation de pores dans la membrane plasmique. Les groupements périphériques des dendrimères de grandes tailles interagissent avec les lipides membranaires pour créer des vésicules lipidiques autour du dendrimère et laissent des pores dans la membrane plasmique. Les dendrimères de grandes générations se sont révélés être les plus toxiques [171].

Dans l'objectif de limiter la toxicité indésirable des NPs, les dendrimères de type PAMAM de génération moyenne et d'une charge anionique seront favorisés pour de futures études comme les G 4.5 ou les G 5.5.

#### 1.4.4.2. Evaluation des propriétés *in vivo*

##### - *Propriétés de pharmacocinétique*

Les propriétés de pharmacocinétique sont l'un des aspects les plus importants qui doivent être considérés pour la réussite des traitements à base de dendrimères. Comme la plupart des NPs, les dendrimères sont administrés par voie intraveineuse (i.v.), sous-cutanée (s.c.) et intrapéritonéale (i.p.). Etant dans un contexte de cancer des voies aéro-digestives supérieures (ORL), nous nous focaliserons sur le comportement des dendrimères à la suite de leur administration par i.v.. Dans ce cas, la distribution des dendrimères est définie par leurs interactions avec les voies potentielles d'élimination ainsi que leurs capacités d'extravasation et d'accumulation dans les différents organes. De nombreuses études *in vivo* démontrent que **la distribution des dendrimères dépend crucialement de leur taille et de leurs propriétés de surface** comme leur charge et leur caractère lipophile [186].

### *La charge de surface des dendrimères*

La charge de surface est un paramètre clé déterminant le profil d'interactions des dendrimères avec les membranes cellulaires et les protéines plasmatiques. Puis, à son tour c'est la nature des interactions dendrimère-membranes/protéines qui affecte la clairance plasmatique et la distribution des dendrimères, et dicte leur localisation finale.

Des études ont analysé l'effet de la charge de surface sur la biodistribution de dendrimères de taille identique. Les dendrimères anioniques, cationiques ou neutres ne suivront pas la même voie d'élimination. Nigavekar *et al.* ont comparé les profils d'excrétion des dendrimères PAMAM G 5 possédant une charge soit cationique ou neutre [187]. Comparés aux cationiques, les dendrimères neutres ont été approximativement deux fois plus excrétés par les urines et les fèces durant 7 jours après leur injection. Dans une autre étude, Malik *et al.* ont montré que les dendrimères PAMAM cationiques présentent une clairance sanguine rapide et une accumulation accrue dans le foie comparé aux anioniques testés [188]. Comme il l'a été précisé précédemment, la charge cationique des dendrimères leur confère un fort pouvoir d'interaction avec les membranes cellulaires qui conduit à leur incorporation cellulaire accrue. Par le biais de ces interactions, les dendrimères cationiques interagissent fortement avec les tissus comme le foie et induisent leur accumulation tissulaire qui réduit ainsi leur temps de circulation plasmatique.

Les dendrimères anioniques sont opsonisés par les protéines plasmatiques favorisant leur reconnaissance et leur capture par le système RES. Kaminskis *et al.* ont modifié la charge de surface de dendrimères cationiques G3 et G4 polylysine avec des groupements hautement anioniques d'acide sulphonique benzène (BS) et d'acide disulphonique benzène (BDS) [189]. Cette conjugaison a considérablement réduit leur clairance plasmatique. Le conjugué chargé négativement interagit avec les protéines plasmatiques, et induit une augmentation de la taille de la NP. Ainsi les NPs peuvent éviter la filtration rénale ( $> 25$  kDa) et présentent un temps de circulation plasmatique augmenté. Mais en contrepartie, cette augmentation du temps de circulation des dendrimères et leur complexation avec les protéines plasmatiques potentialisent leur capture par le système RES.

La clairance plasmatique rapide des dendrimères cationiques et anioniques limite leurs applications comme vecteurs médicamenteux, où une longue circulation plasmatique est requise.

Afin de pallier ce problème, la **neutralisation des charges de surface** des dendrimères apparaît comme une solution idéale. Le masquage des amines ou carboxyles de surface par des groupements neutres ou faiblement anioniques réduit les interactions des dendrimères avec les cellules et par conséquent augmente leur temps de circulation plasmatique.

### **La taille des dendrimères**

Néanmoins, d'autres facteurs que la charge sont à prendre en considération. L'impact de la taille sur le devenir *in vivo* des dendrimères a été rapporté par deux groupes [188], [190].

Les dendrimères de petite taille non chargés ou faiblement chargés négativement présentent un profil de distribution similaire. Comme l'étude de Kaminskas le démontre, les dendrimères polylysines recouverts par des groupements d'acide succinique faiblement chargés, injectés en i.v., présentent une clairance plasmatique rapide associée à une élimination urinaire [189]. De plus, il faut noter que les dendrimères de faible génération (G 5 ou G < 5, avec un rayon hydrodynamique < 3,5 nm) sont typiquement éliminés par voie rénale. Néanmoins, en addition de l'excrétion urinaire, des données suggèrent que l'excrétion par les fèces joue un rôle dans l'élimination de ces dendrimères de manière génération dépendante [191], [192].

L'augmentation de la taille des dendrimères non chargés permet d'échapper à la filtration rénale et d'augmenter leur temps de vie de circulation plasmatique. Au fur et à mesure que la génération du dendrimère augmente, son poids moléculaire et son rayon hydrodynamique augmente en parallèle. Cette augmentation restreint ainsi la filtration rénale (poids moléculaire > 25 kDa ou une taille > ~ 10 nm) des dendrimères et augmente leurs temps de circulation plasmatique, mais elle engendre aussi leur capture par les organes du RES. Finalement, plus la taille augmente, plus la clairance sanguine *via* le système RES est importante. Ce phénomène est bien illustré par l'étude de Kobayashi *et al.* qui a examiné la pharmacocinétique et le profil de biodistribution des dendrimères PAMAM couplé au gadolinium (Gd) de générations croissantes (G 6 - G 9) [190]. Dans cette étude, l'augmentation des générations au-dessus de G 7 conduit, 15 minutes post-injection, à une diminution de son exposition dans le sang et une augmentation de son accumulation dans le foie et la rate, tous deux étant des organes du système RES.

La stratégie de PEGylation de la surface des dendrimères, développée dans la partie précédente, a aussi un impact sur la taille de ces NPs. La fonctionnalisation avec les PEG permet d'augmenter le temps de circulation sanguine des dendrimères *via* différents mécanismes. Premièrement, la clairance rénale étant réduite une fois que la limite de filtration rénale est atteinte (+/- 25 kDa), la PEGylation en augmentant leur taille permet aux dendrimères d'échapper à l'excrétion urinaire. Deuxièmement, en masquant la surface de la particule *via* une barrière hydrophile, les PEG limitent l'opsonisation des dendrimères et leur absorption par le système RES. Troisièmement, comme développé précédemment, les PEG neutralisent les charges de surface. Et dernièrement, les PEG réduisent l'accessibilité des dendrimères aux enzymes, et limitent ainsi le taux de biodégradation *in vivo* des molécules thérapeutiques vectorisées [193].

En parallèle, il faut noter qu'une augmentation du temps de circulation accroît la durée de contact entre les dendrimères et les constituants sanguins. En cas de contact prolongé, une activation de la coagulation sanguine pourra être observée, et entraînera par la suite l'occlusion des vaisseaux sanguins par la formation de thrombus. Ainsi l'étude de l'hémocompatibilité des NPs se place comme un critère crucial dans leur caractérisation. Une étude réalisée sur des dendrimères PAMAM a démontré *in vitro* que les dendrimères cationiques induisent l'agrégation plaquettaire, contrairement aux anioniques ou aux non-chargés [194]. Ces résultats sont confortés par les études de Greish *et al.* qui reportent *in vivo*, une toxicité des dendrimères PAMAM cationiques *via* un effet pro-coagulant [195]. Cet effet n'a pas été observé avec les dendrimères anioniques.

Au vu des connaissances actuelles sur les interactions dendrimères - milieu biologique, évoquées précédemment, nous avons favorisé dans nos études l'utilisation des dendrimères non-chargés ou anioniques de taille moyenne (G 4 – 5).

#### - Toxicité et Immunogénicité

Si les dendrimères présentent généralement une toxicité *in vitro*, ils ne semblent pas être toxiques *in vivo*. Quelques études de toxicologie ont jusqu'à présent été rapportées [174], [178].

Dans un premier temps, Roberts *et al.* ont étudié la toxicité des dendrimères PAMAM de génération 3, 5 et 7, administrés à des souris à des doses de 2, 6, 10, et 45 mg/kg [196]. L'administration des dendrimères a été réalisée soit en une seule dose ou de façon répétée une fois par semaine durant 10 semaines. A la suite de l'injection, les animaux ont été monitorés sur une période de 7 jours ou 6 mois respectivement. Cette étude a suggéré que, même à de fortes doses, les dendrimères cationiques d'une génération  $G < 7$ , n'induisent pas d'effets délétères, sur le comportement et sur le poids des animaux. Cependant, ces résultats demandent à être confirmés par des études complémentaires.

Une autre étude menée par Malik *et al.* a démontré que l'injection journalière en i.p. de 95 mg/kg de dendrimères PAMAM anioniques (G 3.5) n'a conduit à aucune mortalité et à aucun changement de poids des souris [188]. D'autre part, Chen *et al.* ont mesuré la toxicité *in vivo* de dendrimères à base de mélamine PEGylés [197]. Suite à leur injection à de fortes doses par i.v. (1,28 g/kg) ou par i.p. (2,56 g/kg) à des souris, ces dendrimères n'ont pas entraîné de mortalité ou de toxicité. Cette absence de toxicité s'est traduite par des augmentations insignifiantes de certains paramètres biochimiques sanguins (urée sanguine et enzymes hépatiques), 24h ou 48h post-injection respectivement pour les injections i.v. ou i.p.. Il semblerait que la présence de groupements PEG à la surface des dendrimères joue un rôle primordial dans leur toxicité *in vivo*. En effet, il a été rapporté que des dendrimères à base de mélamine non PEGylés présentaient une toxicité aiguë et sub-chronique ayant entraîné une mortalité de 100 % des souris [198].

Une étude plus récente menée par Chauhan *et al.* a examiné les profils de toxicité des dendrimères PAMAM (G 4) présentant en périphérie des groupements –OH ou –NH<sub>2</sub> (4,75 – 19,0 mg/kg), à la suite de leur injection en i.p. sur un modèle murin [199]. Durant les 15 jours suivant l'injection, aucun changement significatif n'a été observé sur la consommation alimentaire, le poids des souris et des organes, le métabolisme des lipides et des protéines, et sur les paramètres hématologiques et histologiques. Ainsi aucune toxicité n'a été observée lors de cette étude. Généralement, il est admis que la toxicité des dendrimères PAMAM peut être classée selon la nature de leur groupement terminaux : PAMAM-OH < PAMAM-COOH < PAMAM-NH<sub>2</sub> [200], [201].

Enfin, une étude récente de la toxicité dermique des dendrimères PAMAM cationiques (G 2 et G 3) a été menée par l'équipe de Kasacka [202]. Lors d'une application topique de ces dendrimères sur un modèle de rat, des modifications cytomorphologiques et histologiques dose dépendante ont été détectées. Ces modifications peuvent conduire à des changements néoplasiques des cellules. A la suite de cette étude, il a été démontré que lors de leur application topique, les dendrimères cationiques induisent une toxicité cutanée. Ainsi leur application topique ne peut être envisagée qu'à de faibles doses.

L'ensemble des études menées jusqu'à présent démontrent que seuls les dendrimères cationiques, non-PEGylés de hautes générations présentent une toxicité, suite à une administration à de forte dose. Les dendrimères de génération moyenne anionique PPI et PAMAM ne présentent pas ou peu de toxicité.

Les utilisations cliniques des dendrimères à but thérapeutique exigent leur non-immunogénicité. Des études limitées et centrées sur les dendrimères PAMAM se sont intéressées à leurs effets immunogènes [196], [203], [191]. Roberts *et al.* ont démontré dans un premier temps, par immunoprécipitation et par un test de double diffusion d'Ouchterlony, que les dendrimères PAMAM aux extrémités amines ne présentaient pas d'effet immunogène pour les générations allant de G 3 à G 7 [196]. Toutefois, dans une autre étude, les dendrimères PAMAM amino-terminés ont montré quelques effets immunogènes qui pouvaient être réduits par le greffage de groupements PEG en périphérie [191]. Une étude plus récente utilisant des dendrimères PPI, a aussi clairement démontré par test Elisa, l'absence d'effet immunogène de ces dendrimères [204].

Malgré la faible immunogénicité évidente des dendrimères, il faut noter que la conjugaison de composés (molécules thérapeutiques, de ciblage...) en périphérie des dendrimères ou leurs modifications de surface peuvent déclencher des réactions immunogéniques.

### 1.4.5. Les dendrimères comme vecteur anticancéreux

L'application actuelle majeure des dendrimères est la vectorisation d'agents anticancéreux. Les dendrimères ont dans un premier temps été utilisés comme vecteur pour le ciblage passif puis pour le ciblage actif.

#### 1.4.5.1. Ciblage passif

##### - Encapsulation des composés

Les molécules anticancéreuses peuvent être encapsulées de manière non covalente dans les chambres internes du dendrimère. Cette encapsulation est permise grâce à l'existence d'interactions électrostatiques et hydrophobes entre les composés anticancéreux et les dendrimères. De nombreuses équipes ont utilisé cette construction notamment pour vectoriser des agents de chimiothérapie (TAB. 1.6). Un premier exemple est la vectorisation du cisplatine par des dendrimères PAMAM pour le traitement de mélanome B16F10 induit. Cette encapsulation a permis d'améliorer l'efficacité anti-tumorale du composé sous forme libre [205]. Un exemple plus récent est le dendrimère à base de glycerol et d'acide succinique. Ce dendrimère a été utilisé pour encapsuler une drogue anticancéreuse hydrophobe, le 10-hydroxycamptothecin (10HCPT) [206], [207]. Cette approche a non seulement augmenté 7 fois l'incorporation du 10HCPT par les cellules MCF-7 comparé au composé seul, mais elle a aussi permis d'augmenter sa rétention cellulaire basée sur des mesures d'efflux. Un dernier exemple est l'utilisation des dendrimères PAMAM pour encapsuler des molécules de curcumin [208]. En plus de potentialiser les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques du curcumin, l'encapsulation a augmenté de 200 fois sa solubilité aqueuse, facilitant ainsi son administration.

La complexation non covalente des drogues comporte des désavantages, notamment un relargage non contrôlé du composé encapsulé (TAB 1.6). Au contact du milieu biologique, les interactions entre le composé encapsulé et le dendrimère peuvent être insuffisantes pour conserver le composé dans les cavités internes du dendrimère. Les liaisons non-covalentes vont ainsi permettre la libération du composé encapsulé avant que la NP ait atteint sa cible biologique [178], [209]. Notamment, des nanoconstructions composées de dendrimère polyester *co*-polyether encapsulant du metotrexate (MTX), ont présenté un relargage de 60-80 % des molécules de MTX encapsulées après 6h d'incubation dans une solution saline [210].

##### - Conjugaison chimique des composés

Les composés anti-cancéreux peuvent être conjugués de manière covalente aux différents groupements de surface des dendrimères. La liaison covalente offre des avantages supplémentaires à l'encapsulation, qui sont illustrés dans la TAB 1.6. Cette structure (nombreux groupements de surface) permet la vectorisation d'une multitude

de drogues avec un relargage contrôlé dépendant de la liaison utilisée. Certaines liaisons seront clivées dans des conditions biologiques particulières, comme la présence d'enzyme ou d'un pH spécifique, et entraîneront la libération du composé vectorisé. Les liaisons communément utilisées pour relier les composés au dendrimère incluent les liaisons amine (non-clivable), ester (clivable) et des ponts S-S clivables.

La doxorubicine (DOX) a été conjuguée à des dendrimères polylysine PEGylés de génération G5 *via* une liaison hydrazone (clivage : pH dépendant) [211]. 10 % de la DOX est libérée après 3 jours d'incubation des NPs dans une solution saline à pH 7,4. Par contre 100 % de la DOX est libérée à pH 5 (pH lysosomale). *In vitro* le conjugué présente un effet cytotoxique comparable à la DOX libre, mais *in vivo* sur des rats porteur de tumeur, il présente un long temps de  $\frac{1}{2}$  vie associé à une meilleure accumulation tumorale avec un ratio tumeur/muscle de 8.

Dans une seconde étude, la molécule anticancéreuse de méthotrexane (MTX) a été conjuguée en périphérie des dendrimères PAMAM G5-NH<sub>2</sub> *via* une liaison amine [212]. A la suite de la confirmation de la formation de la liaison covalente entre le dendrimère et le MTX par des études UV et de résonance magnétique nucléaire (<sup>1</sup>H) (HNMR, « *(1)H nuclear magnetic resonance* »), il a été démontré que le nanoconjugué augmente significativement l'effet cytotoxique du MTX sur des cellules de sarcome utérin, comparé au MTX libre.

Comme illustré dans les exemples précédents et dans la TAB. 1.6, le greffage en périphérie du dendrimère permet la vectorisation de molécules variées. De plus, le relargage du composé vectorisé pourra être modifié et contrôlé en fonction de la liaison utilisée. Du fait de sa multivalence, cette construction présente de sérieux avantages pour la vectorisation d'agents anti-cancéreux [110].

#### 1.4.5.2. Ciblage actif

La vectorisation d'agents anticancéreux par des dendrimères utilisant le ciblage actif a d'ores et déjà donné des résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo*. Des molécules d'adressage telles que des anticorps, des aptamères ou des folates dont la cible est surexprimée dans de nombreux cancers, peuvent être conjuguées à la surface des dendrimères (FIG. 1.14). Ces fonctionnalisations permettent le ciblage actif des cellules cancéreuses au niveau de l'organisme et de la cellule (§1.3.4.2). Au niveau cellulaire, l'incorporation en grand nombre des dendrimères sera facilitée par l'intervention d'un mécanisme d'endocytose récepteur dépendant [213]. Un exemple récemment décrit est le greffage covalent en périphérie de dendrimère PAMAM du trastuzumab, un anticorps (Ac) anti HER-2 (« *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* », récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains surexprimés par les cellules cancéreuses)



[214]. Ce conjugué PAMAM-Ac a été utilisé comme vecteur d'un agent anticancéreux, le paclitaxel (PTX). Ces NPs ont démontré un ciblage efficace des cellules cancéreuses qui a permis de potentialiser l'effet du PTX. A la suite de cette étude, les dendrimères PAMAM couplés aux Ac anti HER-2 se positionnent comme un système potentiel de vectorisation d'agent de chimiothérapie ciblant les tumeurs sur-exprimant le récepteur HER-2.

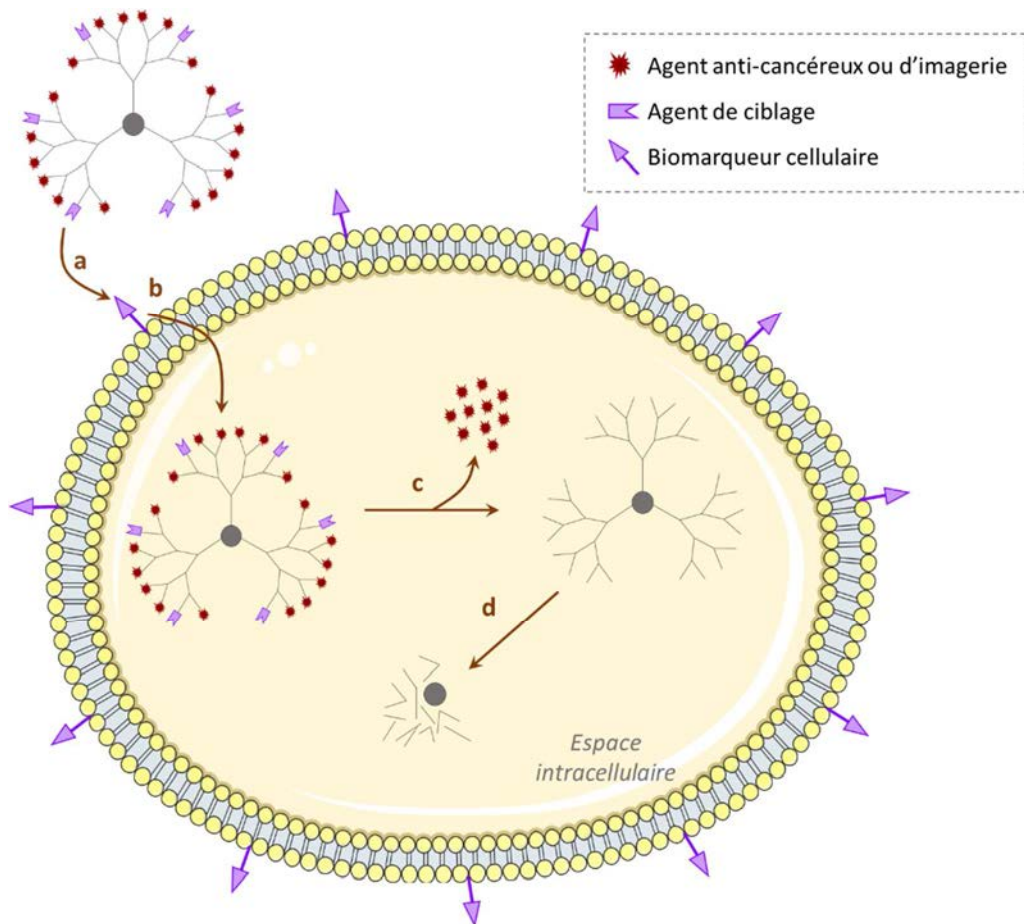


FIG. 1.14 Prérequis pour la vectorisation de molécules anti-cancéreuses basée sur des dendrimères (d'après [213]).

(a) Les dendrimères possèdent des groupements fonctionnalisables de surface qui peuvent être dirigés contre les cellules cancéreuses via le greffage de molécules de ciblage, incluant les folates ou des anticorps spécifiques d'antigènes associés aux tumeurs. (b) Ces dendrimères fonctionnalisés seront incorporés par les cellules *via* un mécanisme d'endocytose récepteur dépendant reposant sur la reconnaissance spécifique des molécules d'adressage conjuguées au dendrimère et des récepteurs membranaires. (c) Dans la cellule, la drogue peut être relarguée par le dendrimère. Lors de l'utilisation de liaisons covalentes, ce relargage est le résultat d'un clivage ou d'une désintégration simultanée du dendrimère. (d) Dégradation du dendrimère.

TAB. 1.6 Dendrimères vectorisant des agents de chimiothérapie : composition, avantages et désavantages d'après [209]

	Conjugaison non covalente		Conjugaison covalente	
	Dendrimères		Dendrimères	Liaisons
<b>Methotrexate (MTX)</b>				
	PAMAM		PAMAM	amide, ester
	Polyether-co-polyester		polylysine	amine, peptide
	melanine		PAMAM	ester
			polyglycerol	peptide
<b>avantages</b>	bonne efficacité d'encapsulation		bonne stabilité des NPs libération lente du MTX (Liaison clivable) amélioration de l'accumulation tumorale et de l'efficacité anticancéreuse	
<b>désavantages</b>	relargage rapide et non contrôlé, type : « burst » faible bénéfices thérapeutique et pharmacocinétique		libération de molécules de MTX-modifiées moins actives biodistribution en fonction des interactions MTX/récepteur	
<b>Doxorubicine (DOX)</b>				
	PAMAM		PAMAM	amide, hydrazone, ester,
	PPI			<i>cis</i> -aconitryl
			polylysine	hydrazone
			polyester	hydrazone
			Polyester-polyamide	hydrazone
			acide polyglutamic	hydrazone
			Polyglycerol	hydrazone
			Polylysine octasilsesquioxane	peptide
				espaceur disulfide
<b>avantages</b>	Augmentation : -de la solubilité aqueuse, de la $\frac{1}{2}$ vie de la DOX, de sa distribution tumorale et de sa biodisponibilité orale Relargage lent après le « burst »		Bonne stabilité du conjugué réduction de la toxicité systémique augmentation de l'accumulation tumorale de la DOX et de son efficacité thérapeutique	
<b>désavantages</b>	relargage rapide et non contrôlé, type : « burst » clairance plasmatique rapide		Vitesse de relargage avec certaines liaisons trop lente pour améliorer l'efficacité du traitement	
<b>Paclitaxel</b>				
	PAMAM / Polyglycerol / triazine		PAMAM	ester
			triazine	ester
<b>avantages</b>	augmentation de la solubilité aqueuse		augmentation de la solubilité aqueuse réduction de la toxicité systémique bonne activité antitumorale	
<b>désavantages</b>	-		pas d'augmentation de l'accumulation tumorale rapportée internalisation par le RES	
<b>5-Fluorouracile</b>				
	PAMAM			
<b>avantages</b>	augmentation de la $\frac{1}{2}$ vie et de sa distribution tumorale/ efficacité thérapeutique réduction de l'internalisation de la drogue dans les organes sensibles		pas déterminé	
<b>désavantages</b>	-			
<b>Camptothécines</b>				
	PAMAM		PAMAM	ester, peptide
	polyester		polylysine	amino acid
<b>avantages</b>	amélioration de la solubilité aqueuse potentiel pour le relargage acide contrôlé		bonne stabilité du complexe augmentation de l'accumulation tumorale et de l'efficacité thérapeutique	
<b>désavantages</b>	pas de bénéfices mis en évidence <i>in vivo</i> solubilisation de la drogue dépend de l'ionisation des drogues et des fonctionnalités des dendrimères		-	

### 1.4.6. Les dendrimères en PDT : Etat de l'art

Une forte concentration locale de PS sélectivement accumulés dans les cellules cibles étant un prérequis pour assurer l'efficacité d'un traitement PDT, des systèmes de vectorisation ont été développés pour améliorer l'accumulation tumorale des PSs. Parmi les NPs étudiées, les dendrimères ont fait l'objet d'une attention particulière due à leur architecture originale qui consiste en des chambres internes et en un grand nombre de groupements périphériques qui permettent l'encapsulation et le greffage de nombreux PSs. De plus, au vu de leurs propriétés physicochimiques, les dendrimères apparaissent comme d'excellents candidats pour vectoriser des PSs. En effet, il a été rapporté dans la littérature que **les dendrimères permettent de pallier deux inconvénients majeurs de la PDT** qui sont : (1) **l'hydrophobicité d'un grand nombre de PS** rendant leur administration compliquée et douloureuse, (2) ainsi que **l'accumulation non spécifique et limitée des PSs dans les tissus néoplasiques**. Actuellement, quatre constructions dendrimériques ont été rapportées dans le domaine de la PDT (FIG. 1.15). Chacune de ces conformations présente des avantages et des inconvénients associés. [215]

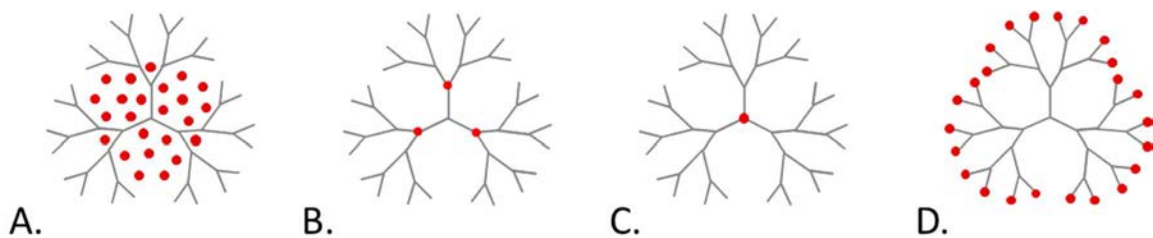


FIG. 1.15 Principales stratégies de vectorisation basées sur des constructions dendrimériques utilisées en PDT (d'après [215]).

Le PS peut être encapsulé dans les cavités internes (A), intégré au niveau des points de jonction (B) ou du cœur (C), et lié de manière covalente aux groupements périphériques du dendrimère (D).

#### 1.4.6.1. L'encapsulation du photosensibilisateur

Les molécules de PS peuvent être encapsulées au sein des cavités internes du dendrimère *via* des liaisons non covalentes, comme des liaisons électrostatiques et hydrophobes. Kojima *et al.* ont synthétisé deux dendrimères PEGylés, un PEG-PAMAM de génération 4 (G4) et un PEG-PPI de génération 5 (G5) [216]. Deux PSs différents ont été utilisés dans cette étude : le rose Bengal (RB) et la protoporphyrine IX (PpIX). Jusqu'à 188 et 177 molécules de RB ainsi que 20 et 30 molécules de PpIX peuvent respectivement être chargées par dendrimère PEG-PAMAM et PEG-PPI. Les PSs sont encapsulés *via* la mise en place d'interactions électrostatiques entre leurs groupements carboxyles et les groupements amines tertiaires internes des dendrimères. Il faut noter que l'hydrophobicité des dendrimères influence l'encapsulation des PSs. En effet, les

dendrimères les plus hydrophobes PEG-PPI peuvent encapsuler un plus grand nombre de molécules de PpIX que les dendrimères PEG-PAMAM hydrophiles. De plus, le RB étant hydrophile, il est relargué plus rapidement des dendrimères PEGylés que la PpIX. La formation des complexes dendrimère-RB inhibe la production d'oxygène singulet du RB, contrairement à la formation des complexes dendrimère-PpIX où l'activité phototoxique de la PpIX est maintenue. En effet, la meilleure efficacité phototoxique a été obtenue lors de l'encapsulation de 10 molécules de PpIX par dendrimères. L'encapsulation de plus de 10 molécules de PpIX provoque son auto-quenching. Au niveau sub-cellulaire, le complexe dendrimère-PpIX présente une localisation mitochondriale et induit la mort de cellule par apoptose. Par conséquent, cette étude présente les dendrimères PEGylés comme des vecteurs prometteurs pour la PDT.

Plus récemment, une nano plateforme à base de dendrimère PPI et de Phthalocyanine (Pc) (FIG. 1.16) s'est révélée être un agent de théranostique prometteur pour le suivi par imagerie de fluorescence de la délivrance des NPs photoactivables associé à un traitement PDT anti-tumoral [217]. La Phthalocyanine a été modifiée par le greffage d'un groupement hydrophobique permettant ainsi d'améliorer et d'augmenter son encapsulation au sein du dendrimère PPI. De plus, afin d'améliorer la biocompatibilité et la spécificité de la nano plateforme, des groupements PEG ainsi que des peptides de ciblage ont été greffés en périphérie du dendrimère. La plateforme est activée à la suite d'une irradiation dans le proche infra-rouge (NIR) pour réaliser l'imagerie ou induire un effet PDT. La biodistribution des NPs a pu être suivie par imagerie sur la base de la fluorescence de la Phthalocyanine encapsulée. En parallèle, d'un point de vue thérapeutique, les nanoplateformes présentent, sur une lignée cellulaire de cancer ovarien (A2780/AD), un effet phototoxique significatif ( $IC_{50} = 0.9 \mu\text{/ml}$ ) associé à une faible cytotoxicité à l'obscurité [217]. Par la suite, Taratula *et al.* ont chimiquement conjugué les dendrimères-Pc à des nanofeuilles de graphène, qui est un agent de thérapie photothermique (PTT) [218]. Contrairement aux PSs, le graphène absorbe la lumière et la transforme en chaleur qui sera transmise à l'environnement intracellulaire et générera une hyperthermie locale toxique. Dans cette étude, l'association de la PDT à la PTT conduit à une augmentation de la destruction des cellules A2780/AD se traduisant par 90% - 95% de mortalité cellulaire photoinduite, suite à l'incubation de faibles doses de PS ( $\sim 2 \mu\text{g/ml}$ ) et de graphène ( $\sim 3,5 \mu\text{g/ml}$ ). Dans la même optique de photothérapie (association PDT-PTT), la Naphthalocyanine a été encapsulée au sein de dendrimères PPI (G 5) PEGylés [219]. Les études *in vitro* et *in vivo* ont permis de confirmer que la photothérapie médiée par ces NPs a détruit efficacement les cellules A2780/AD. D'une façon remarquable, ce traitement a permis une complète éradication tumorale accompagnée d'aucune re-croissance, sur un modèle de souris porteuses de tumeur (A2780/AD).

Ces exemples démontrent l'efficacité de l'encapsulation en PDT. Toutefois, comme il a été développé précédemment, l'absence de liaison covalente peut induire un relargage non-contrôlé du composé encapsulé et altérer ainsi l'efficacité et la sélectivité du traitement.

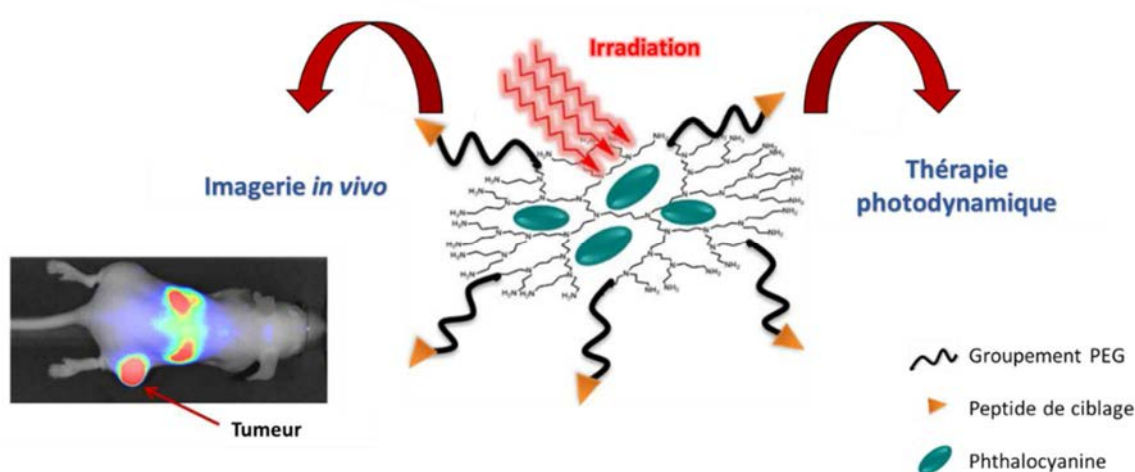


FIG. 1.16 Représentation schématique d'une nanoplateforme de théranostique à base de dendrimère PPI encapsulant de la Phthalocyanine et fonctionnalisé avec des groupements de furtivité (PEG) et des peptides de ciblage (d'après [217]).

L'imagerie de fluorescence a été réalisée après injection (i.v.) de la nanoplateforme sur des souris xénogreffées avec des cellules de carcinome ovarien.

#### 1.4.6.2. Le greffage covalent du photosensibilisateur

Contrairement à l'encapsulation développée précédemment, le greffage covalent du PS au dendrimère assure une vectorisation stable dans le temps. Le PS peut être greffé dans trois régions différentes du dendrimère ; au niveau du cœur, des points de jonctions ou de la surface dendritique (FIG. 1.15-B, C et D). En contrepartie, ces constructions présentent des inconvénients. Notamment, le couplage peut affecter les propriétés photophysiques du PS, qui sont des propriétés indispensables à la réussite du traitement.

#### *Les dendrimères à cœur de photosensibilisateur*

Lors d'un greffage au niveau du cœur ou des points de jonction, la synthèse du dendrimère va s'arranger autour du PS. Dans ces deux conformations, le greffage permet de vectoriser un faible nombre de PS, tout en les protégeant des agressions extérieures [215]. En PDT, aucun dendrimère contenant un PS greffé au niveau des points de jonctions n'a été recensé à ce jour.

Les travaux de l'équipe de Kataoka ont largement étudié les constructions dendritiques à cœur de PS. Dans un premier temps, ils ont basé leurs études sur des

dendrimères de troisième génération (G 3) à cœur de Zn-porphyrine (DPZn) présentés en FIG. 1.17-A [220]. Deux constructions (+)DPZn et (-)DPZn présentant respectivement 32 groupements périphériques positifs ou négatifs ont été testées. Chacune de ces conformations présente la même efficacité en termes de production d'oxygène singulet, espèce cytotoxique majoritairement produite lors d'un traitement PDT. Cependant, la photoactivité des (+)DPZn est 230 fois supérieure à celle des (-)DPZn. En effet, les charges positives favorisent l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires et augmentent ainsi leur internalisation par les cellules. L'avantage majeur de ces formulations est leur faible toxicité observée à l'obscurité. Ces dendrimères au cœur de porphyrine sont prometteurs. Du fait de leur taille, ils ont *in vivo* une accumulation préférentielle dans les cellules tumorales *via* l'effet EPR. La limite de cette formulation est la vectorisation d'un faible nombre de molécules de PS par dendrimère.

Pour potentialiser la vectorisation et la sélectivité *in vivo* des dendrimères à cœur de Phtalocyanine, l'équipe de Kataoka a encapsulé ses dendrimères au sein de micelles (FIG. 1.17-B) [221], [222]. Les micelles augmentent la taille hydrodynamique des dendrimères pour favoriser l'effet EPR et grâce à l'utilisation de PEG limitent leur reconnaissance par le système RES. Des groupements PEG négatifs ou positifs ont respectivement été complexés avec les (+)DPZn ou des dendrimères analogues aux précédents mais présentant des groupements périphériques amine chargés négativement, pour former des complexes micellaires polyioniques sphériques (PIC), appelés PIC(+) et PIC(-) respectivement. Les résultats obtenus *in vitro* ont démontré que les PIC ont présenté une incorporation cellulaire augmentée, comparé aux dendrimères seuls, accompagnée d'une efficacité photodynamique renforcée et d'une toxicité à l'obscurité réduite due à la biocompatibilité des chaînes PEG conjuguées. De plus, le système PIC, possédant une taille aux alentours de 100 nm, bénéficie *in vivo* de l'effet EPR et a démontré une forte stabilité en solution essentielle pour leur administration intraveineuse [223]. Notamment, les PIC(+) ont démontré une accumulation sélective au niveau des lésions néovasculaires ophtalmiques [224].

Par la suite, Kataoka *et al.* ont évalué l'efficacité PDT des micelles PIC(-) en faisant varier la génération de dendrimères (-)DPZn [225]. Les PIC(-) étudiées ont respectivement été synthétisées en utilisant trois générations différentes : G 1, G 2, et G 3, possédant respectivement 8, 16 et 32 groupements terminaux. Dans un premier temps, chaque micelle a démontré une forte stabilité lors de dilutions et une très faible concentration critique d'association (dendrimère-PEG), qui sont tous deux des critères importants pour assurer une longue durée de circulation sanguine. Par la suite, il a été démontré que l'efficacité PDT est dépendante de la génération de dendrimère utilisée. Les dendrimères de plus grande génération (G 3) se sont montrés les plus efficaces. La diminution du nombre de générations est associée à une diminution de la production d'oxygène singulet et du temps de vie de fluorescence du PS. Ce phénomène est

probablement dû à la proximité des porphyrines qui sont intégrées dans des structures dendritiques plus ouvertes qui permettent des phénomènes d'auto-quenching.

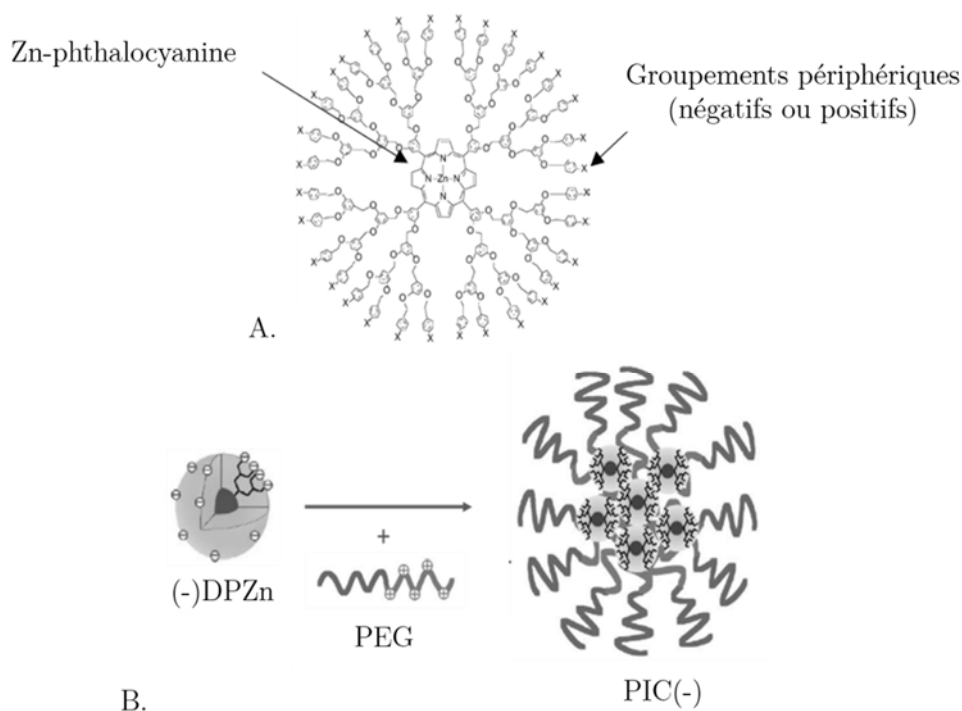


FIG. 1.17 Structure des dendrimères à base de Zn-phthalocyanine (A) et représentation schématique d'un complexe micellaire polyionique sphérique PIC(-) (B) [220], [226].

Les dendrimères de troisième génération à base de Zn-phthalocyanine comportent 32 groupements périphériques (X) positifs ou négatifs ((-)DPZn ou (+)DPZn). Un complexe micellaire polyionique sphérique PIC(-) est composé par l'assemblage des dendrimères (-)DPZn et des groupements PEG positivement chargés.

Dans une étude plus récente, l'équipe de Kataoka a appliqué ces nanoconstructions à l'internalisation photochimique (« *photochemical internalization* », PCI) en combinant les PIC avec un agent chimiotoxique, la doxorubicine (DOX) [227]. La PCI est une extension de la PDT. C'est une approche innovante permettant le relargage de molécules dans un site cellulaire spécifique. Le mécanisme de la PCI repose sur la dégradation des endosomes/lysosomes par la photoactivation des PSs localisés dans les membranes de ces organiques. Lu *et al.* ont étudié *in vitro* et *in vivo* l'activité anti-tumorale des micelles PIC à base de dendrimer-Zn-porphyrine combinés à un traitement de DOX sur une lignée cellulaire MCF-7 résistante à la DOX [227]. Les expériences *in vitro* ont démontré que les PIC étaient incorporés dans les cellules *via* un mécanisme énergie dépendant d'endocytose et se retrouvaient par conséquent dans les lysosomes et les endosomes. De plus, l'utilisation de PIC a permis de faciliter l'accumulation de la DOX dans le noyau. Les études *in vivo* sur des souris xénotreffées avec des cellules MCF-7 ont montré que le co-traitement DOX - PCI a permis de surpasser la résistance à la DOX, et ainsi de potentialiser son efficacité anti-tumorale.

En parallèle, l'équipe de Kataoka a remplacé la Zn-porphyrine par de la phthalocyanine (Pc) au cœur des dendrimères (DPc) [224]. La Pc possède de meilleures propriétés photophysiques que la porphyrine précédemment utilisée. Elle présente notamment une absorption dans des longueurs d'onde permettant une meilleure pénétration dans les tissus. L'encapsulation de ces DPc au sein de PIC a amélioré *in vitro* leur activité PDT sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome de poumon [226]. Les PIC initialement présentes dans les endosomes et les lysosomes sont transloqués dans le cytoplasme durant l'irradiation et induisent des photodommages au niveau de la mitochondrie, organe clé de la survie cellulaire. Durant des expériences *in vivo* utilisant ces PIC sur des souris porteuses de tumeur d'adénocarcinome de pharynx, les NPs ont présenté une activité PDT supérieure à celle du Photofrin<sup>®</sup>. Ces résultats ont été accompagnés d'une absence d'effet phototoxique au niveau de la peau. De plus, il a été montré dans une étude complémentaire, que l'inclusion des DPc au sein des PIC limite le photoblanchiment de la Pc induit par les interactions des DPc avec les protéines du sérum [228]. En effet, l'incorporation dans les PIC limite le transfert d'électrons/protons des DPc aux protéines du sérum. Puis ils ont démontré par la suite que l'efficacité PDT de ces composés pouvait être améliorée par l'addition de liaisons disulfure dans le noyau micellaire. Cette addition a limité d'autant plus le photoblanchiment de la Pc.

Récemment, selon le même principe de construction (FIG. 1.15-C), une molécule de Pc a été encerclée par une coquille de carbohydrate composée de seize unités de galactose formant une structure dendritique [229]. Cette NP a été définie comme étant un nouveau PS de troisième génération dans le contexte du cancer de la vessie. Les unités de galactose vont se lier spécifiquement aux galectines et aux GLUT-1 (transporteurs de glucose), qui sont des protéines de surface surexprimées dans les cellules cancéreuses. Dans ce contexte, les dendrimères à base de galactose ont amélioré l'efficacité PDT de la Pc en augmentant son incorporation cellulaire *via* leurs interactions avec les protéines GLUT 1 et galectine-1, sur deux lignées cellulaires cancéreuses de vessie sur-exprimant respectivement une des protéines de surface. Ces résultats présentent les macromolécules galactodendritiques comme des vecteurs prometteurs pour le traitement PDT du cancer de la vessie.

### ***Fonctionnalisation du dendrimère en périphérie***

La dernière construction dendrimérique présentée en FIG. 1.15-D est basée sur le greffage covalent en périphérie du PS. Elle permet la vectorisation d'un grand nombre de PS par dendrimère. Ce concept a été dans un premier temps appliqué à l'acide 5-aminolevulinique (ALA), précurseur naturel de la protoporphyrine IX (PpIX). En effet, l'ALA possède une incorporation cellulaire limitée du fait de sa nature hydrophile. Dans ce contexte, Battah *et al.* ont préparé un dendrimère conjugué à 18 molécules d'ALA (18m-ALA) *via* une liaison ester clivable dans la cellule, dont la structure est présentée en FIG. 1.18. Le clivage de la liaison ester permet de libérer progressivement au sein de la cellule, de l'ALA qui sera par la suite transformé par le métabolisme cellulaire en



PpIX. La vectorisation permet une production intracellulaire accrue de PpIX qui s'accompagne d'un effet PDT prononcé après irradiation *in vitro* et *in vivo* [230]–[232]. Une étude complémentaire menée au sein du laboratoire a démontré l'intérêt de l'utilisation des dendrimères à base d'ALA dans le diagnostic par fluorescence des lésions cancéreuse de la vessie [233]. Ces dendrimères ont été utilisés sur un modèle orthotopique de cancer de la vessie chez le rat. L'utilisation des dendrimères a permis une meilleure spécificité tumorale de la fluorescence accompagnée d'une pénétration plus profonde dans la tumeur comparée à l'ALA sous forme libre. Les dendrimères à base d'ALA se sont présentés comme des agents potentiels dans le diagnostic du cancer de la vessie.

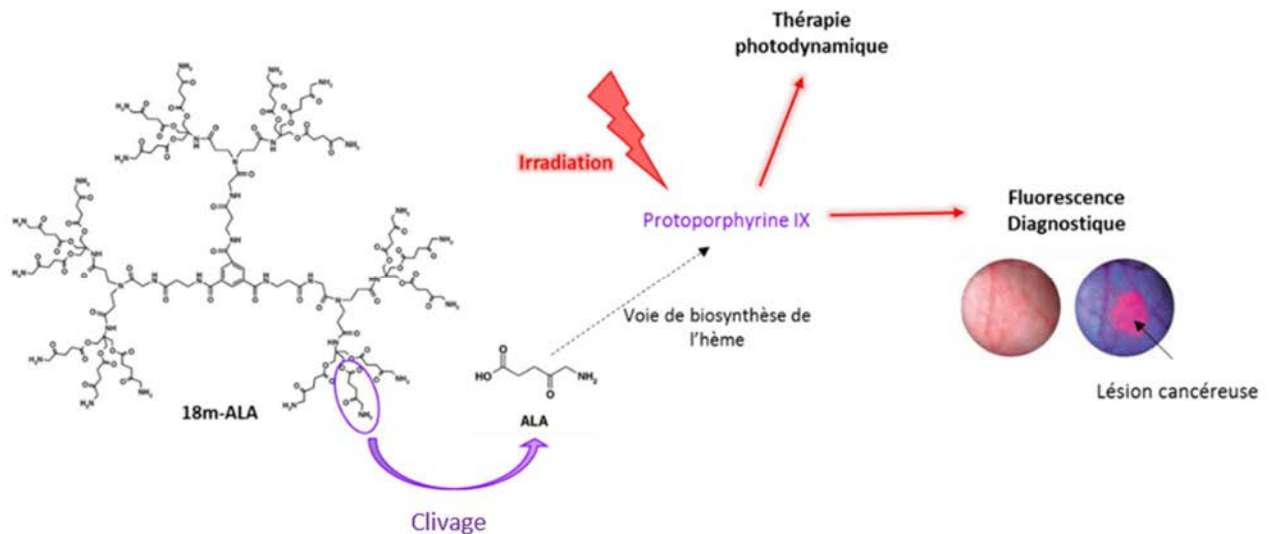


FIG. 1.18 Structure chimique des dendrimères 18m-ALA et représentation schématisée simplifiée du mode d'action de l'acide 5-aminolevulinique (ALA) après son incorporation cellulaire. (d'après [232])

Une deuxième étude menée par l'équipe de X. Ming utilise la construction D présentée en FIG. 1.15 [132]. Ils ont greffé de manière covalente un agent photosensibilisant, la Chlorine e6 (Ce6), et un peptide de ciblage en périphérie d'un dendrimère PAMAM de génération 7 (G 7). Cette construction a démontré en milieu aqueux une production d'oxygène singulet et une fluorescence plus importante que la Ce6 libre. *In vitro* la NP, *via* la reconnaissance spécifique des récepteurs membranaires, a augmenté 16 fois l'accumulation de la Ce6 et a présenté un fort pouvoir phototoxique élevé. De plus du fait de leur petite taille ces NPs ont démontré une diffusion en profondeur au sein de sphéroïde (modèle 3D de tumeur *in vitro*) accompagnée d'une efficacité photodynamique accrue, comparé au composé non vectorisé. Ces résultats présentent ces NPs à base de dendrimère comme un outil efficace pour un traitement PDT ciblé des tumeurs solides.

Une dernière étude utilisant la construction D (FIG. 1.15) a été menée par Hackbarth *et al.* [63], [64]. Ils ont greffé de façon covalente un nombre moyen de 12-13 molécules de

Phéophorbide-a (Pheo-a) en périphérie d'un dendrimère de polypropylèneimine (PPI) de troisième génération (G 3). Il a résulté de la conjugaison, une altération du spectre d'absorption de la Pheo-a dû à des mécanismes de transfert d'énergie. Ces altérations se sont traduites par une réduction dramatique de la production d'oxygène singulet par la Pheo-a après sa complexation au dendrimère, caractérisée par une diminution de 10 fois de son rendement quantique en oxygène singulet. Cette dernière étude a mis en évidence le risque de déstabilisation de l'activité PDT du PS encouru lors de sa liaison covalente au dendrimère. En effet la multiplication du nombre de PS lié en surface du dendrimère peut aboutir à des altérations de leurs propriétés photophysiques. Malgré ce risque si l'on trouve le ratio idéal de PS conjugué par dendrimère, il serait possible de vectoriser un grand nombre de PS tout en protégeant leurs propriétés photophysiques intrinsèques. Dans ces conditions, cette construction à base de dendrimère reste la plus intéressante pour pallier les deux désavantages majeurs de la PDT exposés précédemment.

# 2

## Objectifs du travail

Comme présenté dans le chapitre précédent, la vectorisation repose sur la conjugaison d'une molécule de thérapeutique ou de diagnostic, à une particule de quelques à plusieurs centaines de nanomètres appelée nanoparticule. Actuellement diverses nanoparticules sont utilisées en cliniques et ont permis de potentialiser l'efficacité et de limiter les effets secondaires des traitements anticancéreux, en favorisant l'accumulation des agents thérapeutiques sur le site tumoral grâce à la physiopathologie des tissus tumoraux.

Parmi les nanoparticules existantes, les dendrimères se présentent, du fait de leur taille et de leur structure particulière, comme des vecteurs prometteurs. En effet, ces macromolécules globulaires possèdent de nombreux groupements périphériques fonctionnalisables et des cavités internes, qui permettent respectivement la conjugaison covalente ou non de nombreuses molécules.

La thérapie photodynamique (PDT), est un traitement anticancéreux qui présente une efficacité antitumorale limitée et de sérieux effets secondaires dus au manque de sélectivité tumorale des molécules actives : les photosensibilisateurs. L'utilisation de nanoparticules pour véhiculer les photosensibilisateurs permet à la fois de pallier leur hydrophobicité pour faciliter leur administration, et de modifier leur biodistribution pour augmenter leur accumulation tumorale, et ainsi palier aux limitations de la PDT.

Dans le domaine de la PDT, les photosensibilisateurs ont d'ores et déjà été vectorisés par des dendrimères, soit par encapsulation dans leurs cavités internes qui induit néanmoins un relargage non contrôlé du composé, ou par conjugaison covalente d'une seule molécule au niveau du cœur du dendrimère ou de nombreuses molécules en périphérie du dendrimère. L'objectif étant d'obtenir une concentration de photosensibilisateur tumoral élevée, le greffage covalent d'un grand nombre de molécules photosensibilisatrices en périphérie des dendrimères a été choisi pour cette étude. Néanmoins, il a été rapporté que les propriétés photophysiques du PS pouvaient être altérées à la suite d'un greffage covalent. De plus, cette construction nécessite un grand

nombre de photosensibilisateurs greffés en surface du dendrimère. La proximité des molécules photosensibilisatrices qui en résulte, peut induire des interactions entre molécules qui vont dès lors s'autoquencher et inhiber leur effet photodynamique [234].

Dans ces travaux, les dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM) de générations moyennes (G4.5 ou G5) ont été choisis comme vecteur pour leur faible toxicité associée. Ils ont été fonctionnalisés en périphérie, *via* une liaison covalente, avec environ 32 molécules de Chlorine e6, qui est un photosensibilisateur aux propriétés photophysiques favorables.

Ainsi l'objectif principal de cette thèse est de **concevoir, synthétiser et caractériser une nouvelle nanoparticule photoactivable composée d'un dendrimère fonctionnalisé en surface avec un grand nombre de photosensibilisateurs, afin de potentialiser son efficacité photodynamique.**

### ***Organisation des chapitres suivants :***

Le premier chapitre des résultats est consacré à l'optimisation de la composition des nanoparticules. Pour cela, la synthèse et la caractérisation photophysique sont présentées pour les trois constructions testées. Ces nanoparticules diffèrent par la génération de dendrimère utilisée et la présence de groupement de furtivité à leur surface. Cette étude nous a permis de choisir la composition optimale de la nanoparticule pour la suite de l'étude *in vitro* et *in vivo*.

Le deuxième chapitre des résultats développe l'étude publiée dans une revue internationale. Ces travaux qui regroupent l'ensemble de l'étude *in vitro* des nanoparticules choisies, comprend notamment l'étude de leur efficacité photodynamique, de leurs mécanismes d'internalisation cellulaire et de leurs localisations subcellulaires. Dans une seconde partie nous exposons l'étude du tumortropisme des nanoparticules comparées à la Ce6 libre réalisée par imagerie de fluorescence sur petit animal. Puis nous mettons en évidence les limites des nanoparticules synthétisées.

Le troisième chapitre des résultats concerne la synthèse, la caractérisation et l'étude préliminaire de nouvelles nanoparticules photoactivables qui permettent un relargage contrôlé de la Ce6.

Pour chacun de ces chapitres, le contexte et les objectifs de l'étude, les matériels et méthodes utilisés, et enfin, les résultats obtenus, seront présentés.

# 3

## Optimisation de la composition des nanoparticules photoactivables à base de dendrimère

### 3.1 Introduction

Comme exposé dans l'état de l'art, l'ensemble de notre étude est basée sur la vectorisation d'un photosensibilisateur (PS) dans l'optique d'optimiser son efficacité PDT. Dans un premier temps, trois nanoconstructions photoactivables à base de dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM) de génération 4.5 ou 5 (G 4.5 et G 5) ont été synthétisés en collaboration avec le Pr. Schneider (LRGP, UL). Du fait de ces propriétés photophysiques avantageuses, la Chlorine e6 (Ce6) a été choisie comme photosensibilisateur (PS) pour cette étude (§1.1.4). Elle a été greffée de façon covalente *via* une liaison amide sur 25 % des groupements périphériques des dendrimère G4.5 ou G5, de manière à vectoriser 32 molécules de Ce6 par nanoparticule (NP). Du fait de la présence de groupements carboxyle en périphérie des dendrimères G4.5, la conjugaison de la Ce6 en périphérie a nécessité l'utilisation d'un bras espaceur comportant deux extrémités amine. Puis dans l'optique d'accroître la solubilité de l'édifice PS-dendrimère en milieu aqueux et de minimiser *in vivo* leur reconnaissance par le RES, des groupements de furtivité (méthyl-polyéthylène glycol (me-PEG)), ont été greffés en périphérie du dendrimère G4.5 (G4.5-Ce6-PEG).

Du fait de leur taille et de leur composition, les dendrimères PAMAM choisis pour cette étude font partie des moins toxiques (§1.4.4). Il faut rappeler cependant que les dendrimères PAMAM de demi-génération (G4.5) présentent à leur surface des groupements carboxyles anioniques et sont reconnus comme possédant une toxicité inférieure aux générations complètes (G5). Ces derniers présentent une charge de surface

positive due à leurs groupements amine terminaux [180]. En effet, dû à des forces de répulsion, les charges anioniques limitent l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires négativement chargées.

La caractérisation photophysique de ces trois composés a été réalisée sous la direction du Pr B. Röder au sein du laboratoire de Photophysique de l'Université de Humboldt (Berlin). Cette analyse couplée à une étude préliminaire du comportement des NPs *in vitro*, a permis d'optimiser de la composition de la NP pour évaluer par la suite *in vitro* son efficacité PDT ainsi que son mécanisme d'action.

## 3.2 Matériels et méthodes

### 3.2.1.1. Synthèse des nanoparticules

Les NPs sont synthétisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Schneider du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Université de Lorraine, Nancy). Comme décrit précédemment elles se composent de dendrimère PAMAM de génération 4.5 ou 5 possédant respectivement à leur surface 128 groupements carboxyle ou amine (Sigma Aldrich, France). 32 molécules de Ce6 (LivChem GmbH, Allemagne) ont été greffées de façon covalente par dendrimère *via* les protocoles décrits ci-dessous.

#### *Couplage de la Ce6 au dendrimère PAMAM G5*

La Ce6 est complexée aux dendrimères PAMAM G5 *via* une liaison amine entre un groupement carboxyle de la Ce6 et les groupements amines tertiaire du dendrimère (FIG. 3.1). Sous argon, la Ce6 (26,4 mg, 4,44 10<sup>-5</sup> mole), le DCC (9,16 mg, 1 eq/à Ce6) et le DMAP (1,08 mg, 0.2 eq/Ce6) sont solubilisés dans 15 mL de dichlorométhane et 2 mL de DMF anhydres, 30 min sous agitation à température ambiante. En parallèle, les dendrimères G5 (50 mg, 1,7346 10<sup>-6</sup> mole) et le diisopropyléthylamine (28 mg, 1,2 eq) sont solubilisés dans 2 mL de dichlorométhane anhydre. Puis, sous agitation à température ambiante, l'ensemble est ajouté à la solution Ce6/DMAP/DCC durant 15 h. Le milieu réactionnel est successivement lavé à l'eau et à l'eau salée, séché et concentré sous pression réduite. Le produit obtenu est alors solubilisé dans l'eau puis dialysé contre de l'eau pendant 72 h avec changement de l'eau toutes les 24 h.

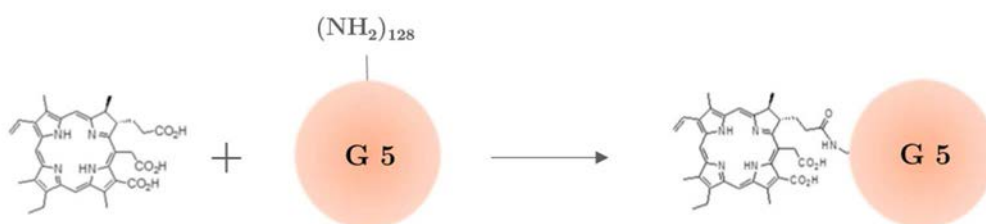


FIG. 3.1 Synthèse des nanoparticules G5-Ce6.

### ***Synthèse des nanoparticules à base de dendrimère PAMAM G4.5***

Le greffage de la Ce6 en périphérie des dendrimères PAMAM G4.5 est réalisé *via* un bras espaceur, portant deux extrémités amines, entre un groupement carboxyle de la Ce6 et un groupement carboxyle terminal du dendrimère. L'ensemble est assemblé grâce à l'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) qui permet de réaliser des liaisons amide entre un groupement carboxylique et une amine primaire. Les détails du protocole de greffage de la Ce6 et de la conjugaison des groupements de furtivités (polyéthylenglycol (PEG)) sont décrits en détail dans le chapitre 4 (Publication E. Bastien *et al.*, 2015).

### **3.2.2. Caractérisation**

#### ***Rendement quantique de Fluorescence***

Les spectres de fluorescence de la Ce6 libre ou vectorisée sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55 (Perkin Elmer). Toutes les mesures sont effectuées dans l'éthanol à une concentration de 0,5 µg/ml de Ce6, qui correspond à une densité optique de 0,1 à la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc.} = 410$  nm). L'équation (1) utilisée pour déterminer les rendements quantiques de fluorescence est :

$$\Phi_{fluoi} = \Phi_{fluost} \times \left( \frac{S_i}{S_{st}} \right) \left( \frac{n_i^2}{n_{st}^2} \right) \quad (1)$$

Avec :

$\Phi_{fluost}$  : Rendement quantique de fluorescence de l'échantillon de référence (ici la Ce6  $\Phi_{fluost} = 0,16$  ; [236])

$\Phi_{fluoi}$  : Rendement quantique de fluorescence de l'échantillon i

$S_i$  et  $S_{st}$  : Intégral des spectres de fluorescence de l'échantillon i et standard

$n_i$  et  $n_{st}$  : Indice de réfraction des solvants de l'échantillon i et standard

#### ***Evaluation de la génération de l'oxygène singulet***

Dans cette étude, l'ensemble des mesures de production d'oxygène singulet ont été réalisés sous la direction du Pr B. Röder au sein du laboratoire de Photophysique de l'Université de Humboldt (Berlin).

La cinétique de la luminescence de l'oxygène singulet est évaluée dans l'éthanol à l'aide d'un compteur multi photon corrélé dans le temps qui utilise un détecteur NIR PMT H10330-45 de Hamamatsu. L'installation est identique au système de détection de la luminescence de l'oxygène singulet TCMPC1270 (SHB Analytics, Allemagne). Les profils d'intensité d'excitation, la forme temporelle et le spectre de l'excitation pulsée utilisant une LED aux alentours de 400 nm sont décrits par Harckbarth *et al.* [103]. La

densité optique des échantillons et de la référence est ajustée à 0.1 à une longueur d'onde de 400 nm, correspondant à une concentration en Ce6 de 0,5 µg/ml. L'échantillon de référence utilisé est la 5,10,15,20-tetrakis(N-méthyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TMPyP). Le TMPyP possède un rendement quantique ( $\Phi_{\Delta}$ ) de 0,60 +/- 0,05 dans l'éthanol. L'équation (2) utilisée pour déterminer les rendements quantiques d'oxygène singulet est :

$$\Phi_{sample} = \left( \frac{I_{sample}}{I_{ref}} \right) \times \Phi_{ref} \quad (2)$$

Avec :

$\Phi_{ref}$  : Rendement quantique d'oxygène singulet de l'échantillon de référence

$\Phi_{sample}$  : Rendement quantique d'oxygène singulet de l'échantillon testé

$I_{sample}$  et  $I_{ref}$  : L'amplitude mesurée du signal de luminescence à 1270 nm de l'échantillon testé et de référence, respectivement

### 3.2.3. Etudes *in vitro*

La lignée cellulaire squameuse de carcinome de pharynx humaine (FaDu) ATTC® HTB-42™ (American Type Culture collection) est cultivée dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C, dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO Invitrogen, France) supplémenté avec 9% de sérum de veau foetal (SVF) (PAN TM BIOTECH GmbH, Amérique du Sud), 1% de pénicilline-streptomycine (GIBCO Invitrogen, France) et 1% de L-glutamine (GIBCO Invitrogen, France).

#### *Génération d'oxygène singulet in vitro*

Les cellules FaDu sontensemencées dans des boites de cultures de 25 cm<sup>2</sup> à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules/ml. 48h après, les cellules sont lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, GIBCO Invitrogen, France) et incubées 24 h dans du RPMI supplémenté avec 2 % de SVF et contenant chaque composé à une concentration de 0.5 µg/ml de Ce6. Les cellules sont lavées et incubées avec de la Trypsine-EDTA pour obtenir une suspension cellulaire à partir d'une culture cellulaire en monocouche. Les cellules sont ainsi re-suspendues dans du PBS à une concentration de 1 million de cellules/ml. Puis les mesures de la luminescence de l'oxygène singulet photoproduit sont immédiatement réalisées à l'aide du même appareillage que décrit dans le §3.2.2.

#### **Efficacité photodynamique**

Les cellules FaDu sontensemencées dans des plaques de 96 puits à une concentration de  $1.5 \times 10^4$  cellules/ml. 48h après, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées durant 0,5 h, 3 h, 5 h, et 24 h dans du RPMI supplémenté avec 2 % de SVF et contenant chaque composé à une concentration de 0,5 µg/ml de Ce6. Après deux lavages consécutifs,



les cellules sont incubées avec du milieu de culture (PS-free) puis irradiée à 652 nm à l'aide d'une diode laser (CeramOptec GmbH, Allemagne) avec une fluence de 2,5 J.cm<sup>2</sup> et une irradiance de 10mW.cm<sup>2</sup>. La survie cellulaire est évaluée 24 h après l'irradiation par test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5- diphényltétrazolium bromide). Les cellules sont incubées 2 h à 37°C avec du milieu de culture contenant 0,5 mg/ml de MTT (Sigma-aldrich, USA). Suite à l'action des déshydrogénases mitochondriales, le MTT est réduit en cristaux de formazan. Une solution d'isopropanol-HCL (0,04N) est ajoutée dans chaque puits et la plaque est soumise à une agitation permettant la dissolution des cristaux. L'absorbance à 540 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque Multiskan Ascent (Labsystems, USA) et est proportionnelle à la survie cellulaire. Les résultats sont présentés en pourcentage de survie cellulaire normalisé par rapport au groupe contrôle (photosensibilisateur, sans irradiation). Pour déterminer la cytotoxicité à l'obscurité des composés, le même protocole est appliqué sans irradiation. Les résultats sont présentés avec les écarts standards à la moyenne de trois expériences indépendantes.

### *Incorporation cellulaire*

Les cellules FaDu sontensemencées dans des plaques de 24 puits à une concentration de  $3 \times 10^4$  cellules/ml. 48h après, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées 0,5 h, 3 h, 5 h, et 24 h dans du RPMI supplémenté avec 2 % de SVF et contenant chaque composé à une concentration de 0,5 µg/ml de Ce6. Après trois lavages consécutifs avec du PBS, une solution d'extraction (le Solvable<sup>TM</sup>, PerkinElmer, USA) est ajouté durant 2h à 50°C afin de lyser les cellules et de solubiliser le PS. L'incorporation cellulaire de la Ce6 est déterminée par mesure de fluorescence (spectrofluorimètre LS55 - Perkin Elmer,  $\lambda_{exc.} = 410$  nm,  $\lambda_{em.} = 665$  nm) à partir de courbes étalon établies entre la fluorescence de chaque échantillons dans le Solvable<sup>TM</sup> en fonction de leur concentration. Les résultats sont présentés avec les écarts standards à la moyenne de trois expériences indépendantes.

## **3.3 Résultats et discussion**

Comme le présente le TAB. 3.1, le greffage covalent de la Ce6 en périphérie des dendrimères s'est traduit par un léger décalage vers le rouge ( $\sim 2$  nm) de la dernière bande Q du spectre d'absorption de 662 vers 664-665 nm. Cet effet a déjà été observé après le greffage d'autre PS sur des NPs [234]. Ce phénomène est décrit comme étant le résultat d'une modification locale de l'indice de réfraction du PS [226]. Ces faibles modifications spectrales indiquent que le greffage en périphérie des dendrimères PAMAM, n'engendre pas d'agrégation générale ou de modification de la structure du PS.

TAB. 3.1 Propriétés photophysiques des conjugués à base de Ce6 dans l'éthanol.

Composés	$\lambda_{\max}$ (nm) (Q-absorption)	$\lambda_{\max}$ (nm) (Fluorescence)	$\Phi_{\text{FL}}$ +/- 0,05	$\tau_{\text{T}}$ ( $\mu\text{s}$ ) +/- 0,1	$\tau_{\Delta}$ ( $\mu\text{s}$ ) +/- 0,2	$\Phi_{\Delta}$ +/- 0,05
Ce6	662,5	669	0,16	19,5	14,4	0,55
G5-Ce6	664	668	0,10	20,3	13,9	0,42
G4.5-Ce6	665	670,5	0,11	24,2	13,2	0,26
G4.5-Ce6-PEG	664,5	671,5	0,09	26,2	13,1	0,31

$\lambda_{\max}$  : Longueur d'onde maximale d'absorption et de fluorescence ( $\lambda_{\text{exc.}}$  : 410 nm) au niveau de la dernière bande Q du spectre visible dans l'éthanol.

$\Phi_{\text{FL}}$  : Rendement quantique de Fluorescence

$\tau_{\text{T}}$  : Temps de vie de l'état triplet de la Ce6.

$\tau_{\Delta}$  : Temps de vie de l'oxygène singulet.

$\Phi_{\Delta}$  : Rendement quantique de l'oxygène singulet.

Dans l'éthanol les caractéristiques des spectres de fluorescence, représentées ici dans le TAB. 3.1 par la longueur d'onde d'émission de fluorescence maximum au niveau de la dernière bande Q, sont identiques pour les différentes formulations de Ce6. Cependant, le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_{\text{FL}}$ ) de la Ce6 a diminué de 37 % après sa conjugaison aux dendrimères G5 ou G4.5+/-PEG. Cette diminution pourra être pénalisante pour de possibles applications de diagnostic.

La production d'oxygène singulet, l'espèce cytotoxique majoritairement responsable de l'efficacité PDT, est un des paramètres les plus importants à prendre en compte dans l'optimisation de la NP. La détermination du rendement quantique d'oxygène singulet ( $\Phi_{\Delta}$ ) fait intervenir deux paramètres : le temps de vie de l'état triplet du PS ( $\tau_{\text{T}}$ ) et le temps de vie de l'oxygène singulet ( $\tau_{\Delta}$ ). L'ensemble des paramètres mesurés dans l'éthanol sous la direction du Pr. Röder sont recensés dans le TAB. 3.1.

Le  $\Phi_{\Delta}$  de la Ce6 est réduit à la suite de sa conjugaison au dendrimère. Cette diminution est hétérogène et varie en fonction du type de NP testée. Les NPs à base de dendrimère G4.5 présentent une réduction plus importante ( $\Phi_{\Delta} = 0,26$ ) que les G5 ( $\Phi_{\Delta} = 0,42$ ) comparé à la Ce6 ( $\Phi_{\Delta} = 0,55$ ). L'ajout de groupement PEG en périphérie des dendrimères G4.5 tend à rétablir le rendement quantique d'oxygène singulet de la Ce6 ( $\Phi_{\Delta} = 0,31$ ).

Le temps de vie de l'oxygène singulet photoproduit ( $\tau_{\Delta}$ ) est légèrement diminué à la suite du greffage de la Ce6 aux dendrimères. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs de  $\tau_{\Delta}$  retrouvées dans la littérature aux alentours de 12  $\mu\text{s}$  dans l'éthanol [237]. Le temps de vie de l'état triplet ( $\tau_{\text{T}}$ ) de la Ce6 est augmenté à la suite de sa fixation aux dendrimères. Cette augmentation après la conjugaison de la Ce6 au dendrimère, peut

être attribuée à une réduction du quenching de l'état triplet de la Ce6 par l'oxygène moléculaire. En effet, les dendrimères peuvent réduire l'accessibilité de la Ce6 au molécule d'oxygène, comme il l'a été observé par l'équipe de Isakau lors de la complexation de la Ce6 au polymère PVP [238].

A la suite de cette caractérisation, il apparaît que le greffage de la Ce6 en périphérie des dendrimères, tous types confondus (à base de G4.5 ou G5), modifie ces propriétés photophysiques. Cependant ces altérations sont minimales comparées à celles rapportées lors de la synthèse de NP photoactivable composée d'un dendrimère DAB (diaminobutane poly-propylène-imine) fonctionnalisé avec 12-13 molécules de Pheophorbide-a (Pheo-a)[234]. A la suite de la conjugaison de la Pheo a au dendrimère son rendement quantique en oxygène singulet a été dramatiquement diminué de 10 fois comparé à la Pheo-a libre. Il a été déterminé que cette diminution est la conséquence de la présence d'interactions, principalement des transferts d'énergie par résonance de type Förster, entre différentes molécules de Pheo-a en surface du dendrimère.

L'ensemble des mesures a été réalisé en solution alcoolique (éthanol) et ne reflète pas la réalité d'un environnement biologique. En effet, la présence de nombreux quenchers en milieu biologique réduits considérablement le temps de vie de l'oxygène singulet et de l'état triplet du PS [63]. A la suite de la détermination des constantes de vitesse de quenching de l'oxygène singulet, les protéines telles que les caroténoïdes, se sont montrées comme étant de puissants quenchers de l'oxygène singulet [239]–[241]. *In vitro*, le faible temps de vie de l'oxygène singulet limite sa diffusion et restreint les dommages photoinduits à la localisation intracellulaire du PS.

La caractérisation en solution nous permet de contrôler l'intégrité de la Ce6 qui a été conjuguée aux dendrimères suite à la synthèse. Mais n'étant pas représentatif d'un environnement biologique, des études *in vitro* sont nécessaires pour classer les NPs en fonction de leur efficacité PDT. Ces études nous permettront de choisir la composition optimale des NPs étudiées dans la suite du travail.

La génération d'oxygène singulet a été analysée *in vitro* sur une lignée cellulaire de carcinome de pharynx humaine (FaDu), à la suite d'une incubation avec les différents composés durant 24 h à une concentration non cytotoxique (TAB. 3.2.).

TAB. 3.2 Production d'oxygène singulet *in vitro*.

Composé	$\tau_T$ ( $\mu\text{s}$ ) $\pm 0,2 \mu\text{s}$	$\tau_\Delta$ ( $\mu\text{s}$ ) $\pm 0,2 \mu\text{s}$
Ce6	4,3	ND
G5-Ce6	3,7	ND
G4.5-Ce6	4,2	0,6
G4.5-Ce6-PEG	4,2	0,6

*Incubation 24 h des cellules FaDu avec les trois conformations : Ce6, G5-Ce6, G4.5-Ce6 et G4.5-Ce6-PEG à une concentration de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .*

$\tau_T$  : Temps de vie de l'état triplet de la Ce6

$\tau_\Delta$  : Temps de vie de l'oxygène singulet

ND : Non Détectable

Dans les cellules, le temps de vie de l'état triplet de la Ce6 est semblable pour les différentes conformations, libre et conjuguée aux dendrimères, avec une valeur moyenne de 4,1  $\mu\text{s}$ . Ce temps de vie de l'état triplet de la Ce6 est cinq fois inférieur à celui mesuré dans l'éthanol ( $\tau_T = 19,5 \mu\text{s}$ ). En effet, comme nous pouvions anticiper ce résultat. *In vitro* la probabilité que l'état triplet du PS réagisse avec un substrat biologique est considérablement augmentée et induit par conséquence une diminution de son temps de vie. Cette diminution aura pour effet de restreindre l'efficacité du PS.

*In vitro* dans ces conditions expérimentales, le signal de luminescence de l'oxygène singulet photoproduit par la Ce6 libre ou par le conjugué G5-Ce6 est faible et ne permet pas de déterminer son temps de vie. A l'opposé l'oxygène singulet photoproduit par les G4.5-Ce6 $\pm$ -PEG *in vitro* présente un temps de vie de 0,6  $\mu\text{s}$ . Ce résultat est en accord avec la littérature, où un temps de vie de l'oxygène singulet a été mesuré dans les cellules aux alentours de 0,4  $\pm$  0,2  $\mu\text{s}$  [96].

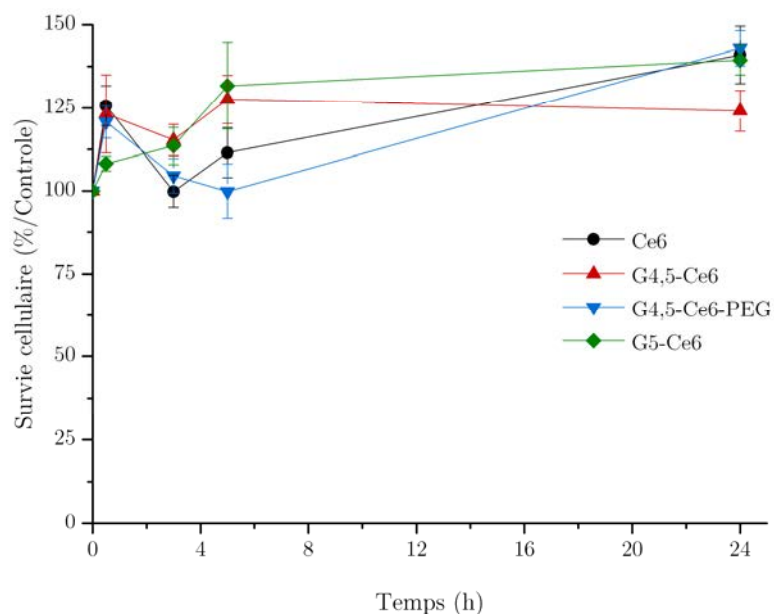


FIG. 3.2 Cytotoxicité à l'obscurité de la Ce6 libre (rond noir) et conjuguée aux dendrimères G4.5 sans PEG (G4.5-Ce6 ; triangle rouge), aux dendrimères G4.5 PEGylés (G4.5-Ce6-PEG ; triangle-inversé bleu), et aux dendrimère G5 (G5-Ce6 ; losange vert). Les cellules FaDu sont incubées le PS durant 0,5 h, 3 h, 5 h et 24 h à une concentration en Ce6 de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

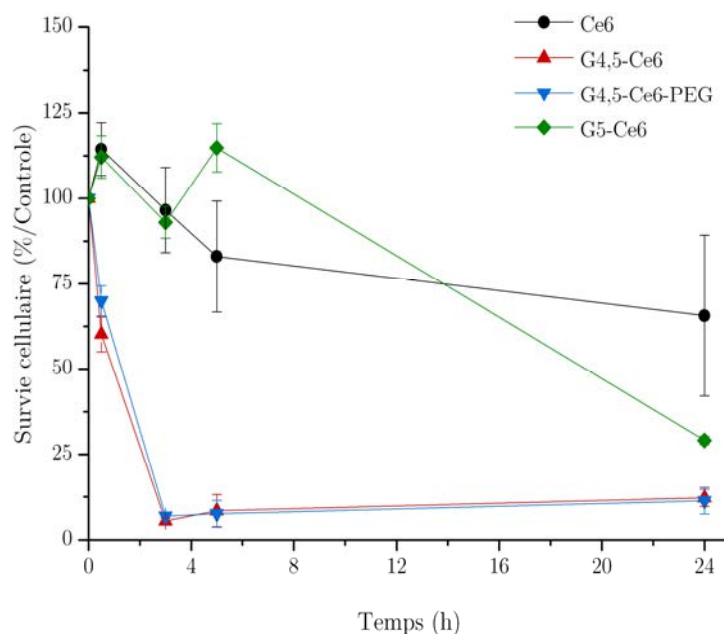


FIG. 3.3 Efficacité photodynamique de la Ce6 libre (rond noir) et conjuguée aux dendrimères G4.5 sans PEG (G4.5-Ce6 ; triangle rouge), aux dendrimères G4.5 PEGylés (G4.5-Ce6-PEG ; triangle-inversé bleu), et aux dendrimère G5 (G5-Ce6 ; losange vert). Les cellules FaDu sont incubées le PS durant 0,5 h, 3 h, 5 h et 24 h à une concentration en Ce6 de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Irradiation : 2,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  à 652 nm.

La survie des cellules FaDu a été évaluée par test MTT, en fonction du temps d'incubation des PS. Aucune cytotoxicité à l'obscurité des différentes constructions photoactivables n'a été observée dans ces conditions expérimentales (FIG. 3.2). Néanmoins comme présenté en FIG. 3.3, à la suite d'une irradiation, les NPs G4.5-Ce6+/-PEG démontrent un remarquable pouvoir phototoxique. En effet, les G4.5-Ce6+/-PEG induisent une mortalité cellulaire de 100 % dès 3 h d'incubation, tandis que la Ce6 libre n'induit que 35 % de mort cellulaire après 24 h d'incubation avec la même concentration d'incubation. Fait intéressant, les G5-Ce6 présentent une activité PDT inférieure à celle des G4.5-Ce6+/-PEG. Comme la Ce6 libre, les G5-Ce6 n'induisent aucune phototoxicité à des temps courts d'incubation (0,5 – 3 h). Néanmoins, ces résultats mettent en évidence les limites de la détection de l'oxygène singulet *in vitro* par mesure directe de la luminescence à 1260 nm, présentée précédemment. L'effet PDT est principalement dû aux dommages oxydatifs causés par l'oxygène singulet photoproduit. Or à la suite de 24 h d'incubation et d'une irradiation, les G5-Ce6 induisent une mortalité de 75 % dans des conditions expérimentales qui n'ont pas permis la détection de l'oxygène singulet (TAB. 3.2).

Globalement la vectorisation potentialise l'efficacité PDT de la Ce6. De plus, les G4.5-Ce6+/- PEG sont plus actifs que les G5-Ce6.

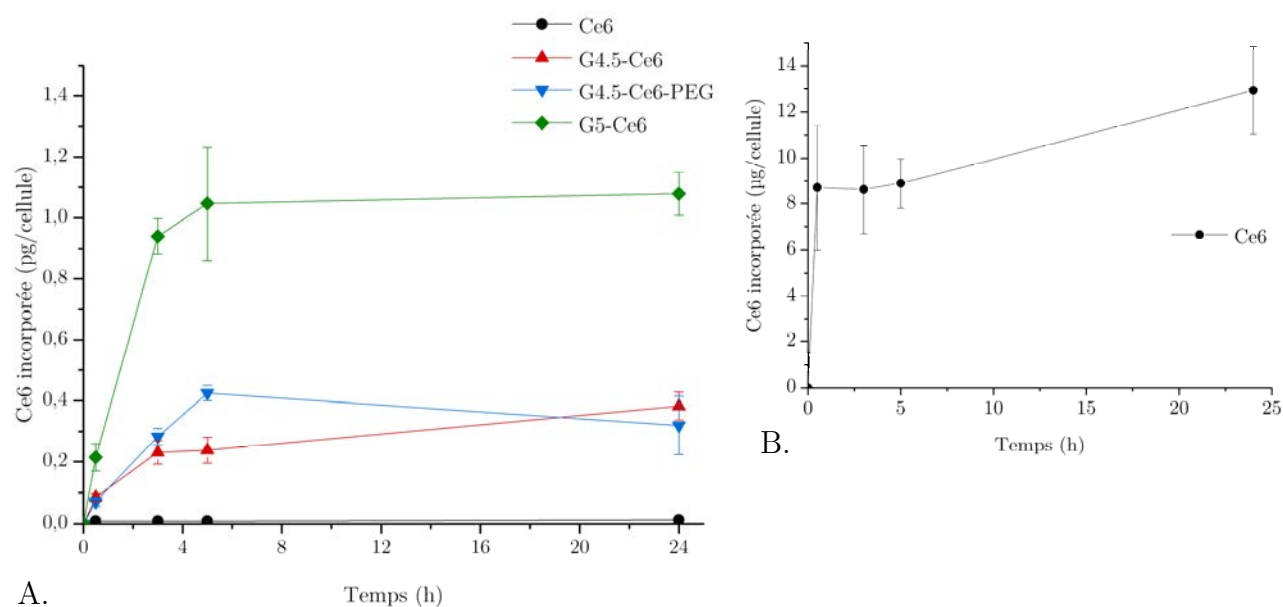


FIG. 3.4 Cinétique d'incorporation cellulaire des différents composés.

Les cellules FaDu sont incubées durant 0,5 h, 3 h, 5 h et 24 h avec la Ce6 libre (rond noir, FIG. A. et B.) ou conjuguée aux dendrimères G4.5 sans PEG (G4.5-Ce6 ; triangle rouge), aux dendrimères G4.5 PEGylés (G4.5-Ce6-PEG ; triangle-inversé bleu), et aux dendrimère G5 (G5-Ce6 ; losange vert), à une concentration en Ce6 de 0,5 µg/ml.

La conjugaison de la Ce6 en surface des dendrimères a significativement augmenté son incorporation cellulaire, comparé au PS libre (FIG. 3.4). Entre 0,5 h et 5 h d'incubation des NPs, leur internalisation cellulaire est dépendante du temps d'incubation. A partir de 5 h on observe un plateau dans l'incorporation des NPs, qui est certainement associé à la saturation du mécanisme d'incorporation mis en jeu par les NPs. Les dendrimères de génération moyenne (G4 - 5), au vu de leur taille, sont internalisés *via* un mécanisme d'endocytose qui est saturable [242]. Comme le démontre la cinétique d'incorporation cellulaire, à cette concentration d'incubation (0,5 µg/ml) la Ce6 libre est très faiblement internalisée par les cellules comparée au NPs (FIG. 3.4 A. et B.).

Les profils d'accumulation intracellulaire de la Ce6 sont différents en fonction de la composition des NPs utilisées et mettent en évidence l'importance de la nature des groupements terminaux des dendrimères. A la suite de 24 h d'incubation, les G5-Ce6 présentent une incorporation cellulaire trois fois supérieure à celle des G4.5-Ce6+/-PEG. En effet, il est connu que les groupements cationiques périphériques des G5-Ce6 favorisent l'interaction des NPs avec les membranes cellulaires chargées négativement contrairement aux groupements terminaux anioniques des G4.5-Ce6+/-PEG [180].

La cinétique d'incorporation (FIG. 3.4) explique le faible signal de luminescence de l'oxygène singulet mesuré *in vitro* avec la Ce6 libre (TAB. 3.2) ainsi que sa phototoxicité limitée (FIG. 3.3). En effet, la concentration intracellulaire en Ce6 étant faible, la quantité d'oxygène singulet produit à la suite de l'irradiation est limitée, restreignant ainsi les effets phototoxiques de la Ce6.

La cinétique d'incorporation démontre que les G5-Ce6 sont trois fois plus internalisés que les G4.5-Ce6+/-PEG (FIG. 3.4). Mais, les G5-Ce6 présentent *in vitro* un effet PDT limité comparé aux G4.5-Ce6+/-PEG (FIG. 3.3). Une concentration intracellulaire en PS élevée est déterminante dans l'efficacité du traitement PDT. Cependant l'effet de la PDT dépend essentiellement de la capacité du PS à produire de l'oxygène singulet, l'espèce cytotoxique majoritairement responsable des réactions phototoxiques. La meilleure production d'oxygène singulet observée des G4.5-Ce6+/-PEG comparés aux G5-Ce6 (TAB. 3.2), explique en partie leur efficacité PDT élevée, avec la photoinduction de 90% de mortalité cellulaire dès 3 h d'incubation avec les G4.5-Ce6+/-PEG.

Des études ont démontré que dans un milieu biologique, les polyamines (composés organiques possédant deux ou plusieurs fonctions amine) à des concentrations élevées, piègent et neutralisent les espèces réactives de l'oxygène [243]. Il a été montré par technique de spectroscopie EPR, que la génération d'oxygène singulet photoproduit par le rose bengal a été inhibée par des polyamines. Etant donné que les polyamines sont des molécules chargées positivement, la génération d'oxygène singulet peut être réduite par la mise en place d'interactions ioniques entre les polyamines et le rose Bengal (porteur

de 2 charges négatives) qui vont désactiver le PS. De plus, les groupements amines sont connus pour quencher l'oxygène singulet [64]. Ainsi dans notre étude, les 128 amines primaires présentes en périphérie du G5 peuvent, interagir avec les molécules de Ce6 conjuguées qui possèdent 2 groupements positifs libres (-COOH), et quencher l'oxygène singulet photoproduit par la Ce6. La production d'oxygène singulet par les G5-Ce6 est alors diminuée ce qui limite leur efficacité photodynamique.

### **3.4 Conclusion**

La caractérisation préliminaire des différentes conformations testées, nous a permis de conforter notre choix pour les nanoparticules à base de dendrimères G4.5. En effet, malgré de bonnes propriétés photophysiques en solution, les G5-Ce6 ont présenté une activité photodynamique *in vitro* limitée accompagnée d'une génération d'oxygène singulet indétectable dans la cellule comparés aux G4.5-Ce6+/-PEG.

Pour la suite de l'étude, deux conformations seront étudiées : les G4.5-Ce6 dépourvus ou fonctionnalisés avec des groupements de furtivité (PEG).



## Caractérisation photobiologique des nanoparticules G4.5-Ce6+/-PEG

### 4.1. Potentialisation de l'efficacité photodynamique de la Chlorine e6 *via* sa conjugaison aux dendrimères PAMAM

La première partie des résultats est un article accepté en 2015 portant sur l'étude *in vitro* de l'efficacité PDT et du mécanisme d'internalisation cellulaire des nanoparticules à base de dendrimère PAMAM.

#### 4.1.1. Résumé

Les nanoparticules photoactivables à base de dendrimère PAMAM de génération 4.5 (G4.5), présélectionnées dans le chapitre 3 pour leurs propriétés photophysiques favorables, ont été étudiées *in vitro* sur une lignée cellulaire squameuse de carcinome de pharynx (FaDu). Comme développé antérieurement, il est intéressant de synthétiser des nanovéhicules dans le cadre de la thérapie photodynamique. Ainsi la Chlorine e6 (Ce6), un photosensibilisateur, a été conjuguée de façon covalente en périphérie des dendrimères PAMAM pour former les NPs G4.5-Ce6. Cette construction nous a permis de vectoriser 32 molécules de Ce6 par nanoparticule. Pour permettre l'étude *in vivo* de ces NPs, des groupements de furtivité poly(éthylèneglycol) (PEG) ont été conjugués en périphérie des G4.5-Ce6, et seront nommées comme étant les G4.5-Ce6-PEG.

La génération d'oxygène singulet et l'émission de fluorescence de la Ce6 ont modérément été affectées par son greffage covalent aux dendrimères. L'étude *in vitro* a démontré, que comparé à la Ce6 libre, les NPs G4.5-Ce6+/-PEG présentent une efficacité

photodynamique bien supérieure qui est attribuable à une meilleure internalisation par les cellules tumorales.

La localisation subcellulaire et la voie d'internalisation empruntée par les différents composés (Ce6, G4.5-Ce6+/-PEG) ont respectivement été analysées par microscopie confocale de fluorescence et par inhibitions pharmacologiques spécifiques des voies d'incorporation. En accord avec la littérature, l'étude a démontré que la Ce6 pénètre dans les cellules par diffusion passive. En opposition les G4.5-Ce6-PEG sont internalisées par un mécanisme d'endocytose caveoline dépendant, tandis que les G4.5-Ce6 sont sujet à la voie d'endocytose clathrine dépendant. Les localisations intracellulaires des NPs dendrimériques à base de Ce6, PEGylées ou non, sont similaires suggérant que leur comportement dans les cellules est semblable.

En conclusion, nous avons démontré que les NPs G4.5-Ce6 PEGylées peuvent être furtive et efficace pour améliorer le traitement photodynamique de la Ce6 sur un modèle préclinique tumoral. Leurs propriétés doivent être étudiées *in vivo*, afin d'évaluer leur tumorotropisme et leur efficacité photodynamique.

#### **4.1.2. Publication**

## **Covalently loaded Chlorin e6 on PAMAM dendrimers for enhanced photodynamic effect**

*Estelle Bastien, Raphael Schneider, Steffen Hackbarth, Dominique Dumas, Jordan Jasniewski, Beate Roeder, Lina Bezdetsnaya and Henri-Pierre Lassalle*

*Accepted, 05/10/2015, "Photochemical and Photobiological Sciences"*



Cite this: DOI: 10.1039/c5pp00274e

## PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects†

Estelle Bastien,<sup>a,b,c</sup> Raphaël Schneider,<sup>d</sup> Steffen Hackbarth,<sup>e</sup> Dominique Dumas,<sup>f</sup> Jordane Jasniewski,<sup>g</sup> Beate Röder,<sup>e</sup> Lina Bezdetsnaya<sup>a,b,c</sup> and Henri-Pierre Lassalle<sup>\*a,b,c</sup>

There is currently great interest in the development of efficient and specific carrier delivery platforms for systemic photodynamic therapy. Therefore, we aimed to develop covalent conjugates between the photosensitizer chlorin e6 (Ce6) and PAMAM G4.5 dendrimers. Singlet oxygen generation (SOG) efficiency and fluorescence emission were moderately affected by the covalent binding of the Ce6 to the dendrimer. Compared to free Ce6, PAMAM anchored Ce6 displays a much higher photodynamic effect, which is ascribable to better internalization in a tumor cell model. Intracellular fate and internalization pathway of our different compounds were investigated using specific inhibition conditions and confocal fluorescence microscopy. Free Ce6 was shown to enter the cells by a simple diffusion mechanism, while G4.5-Ce6-PEG internalization was dependent on the caveolae pathway, whereas G4.5-Ce6 was subjected to the clathrin-mediated endocytosis pathway. Subcellular localization of PAMAM anchored Ce6, PEGylated or not, was very similar suggesting that the nanoparticles behave similarly in the cells. As a conclusion, we have demonstrated that PEGylated G4.5 PAMAM-Ce6 dendrimers may offer effective biocompatible nanoparticles for improved photodynamic treatment in a preclinical tumor model.

Received 16th July 2015,  
Accepted 5th October 2015  
DOI: 10.1039/c5pp00274e

www.rsc.org/pps

## Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally-invasive photochemical-based approach that uses a combination of a light-activated drug (photosensitizer, PS) and the light of a specific wavelength to damage the target tumor tissue by generating reactive oxygen species.<sup>1</sup> Among them, molecular oxygen in its first excited electronic state, so called singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), is commonly agreed to be the cytotoxic key agent in photo-

dynamic action. PDT has a clinical reality since several photosensitizers have obtained approval for the treatment of localized and light-accessible tumors.

For safe and effective therapy with limited side effects, a PS should reach targeted cells at a certain concentration threshold together with a low accumulation in healthy cells. However, to achieve this goal, two major problems are often encountered. Firstly, most PS molecules are hydrophobic and aggregate easily in aqueous media, resulting in reduced singlet oxygen generation<sup>1</sup> and difficulties with intravenous delivery.<sup>2</sup> Secondly, PSs generally display a low or moderate selectivity to cancer cells, thus requiring high PS concentrations in clinical protocols, yielding serious adverse effects. To overcome these drawbacks, the use of vectors for PS tumor targeting was suggested, providing an improvement in PS solubility, protecting from PS deactivation reactions and favoring tumor targeting through the enhanced permeability and retention (EPR) effect. EPR is inherent to many solid tumors due to leaky vasculature and poor lymphatic drainage.<sup>3</sup> Currently basic research in PDT focuses mainly on the development of carrier systems for targeting tumor tissue.<sup>4</sup> With this aim, biocompatible nanocarriers for PS delivery such as lipid-based nanoparticles (NP),<sup>5,6</sup> polymer-based NPs,<sup>7,8</sup> micelles<sup>9,10</sup> or silica-based NPs,<sup>11</sup> have been designed. Dendrimers have been proposed as building blocks for PDT drug delivery systems already in 2001.<sup>12</sup> Dendrimers are regular hyperbranched macro-

<sup>a</sup>Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Campus Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

E-mail: h.lassalle@nancy.unicancer.fr

<sup>b</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, France

<sup>c</sup>Research Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, Avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>d</sup>Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS, 1 rue Grandville, BP 20451, 54001 Nancy Cedex, France

<sup>e</sup>Institut für Physik, Humboldt, Universität zu Berlin, Newtonstrasse, Berlin, Germany

<sup>f</sup>Université de Lorraine, Plateforme IBISA d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire de Nancy, IMOPA7365, FR3209 BMCT, Centre National de la Recherche Scientifique, Vandœuvre-lès-Nancy, France

<sup>g</sup>Université de Lorraine, Laboratoire d'ingénierie des biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, Vandœuvre-lès-Nancy, France

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5pp00274e

molecules of a few nanometers in size (2–10 nm) with many functional groups at their surface which allow anchoring therapeutic molecules such as photosensitizers, stealth elements (polyethylene glycol), or targeting moieties on their surface, while controlling the size and lipophilicity of the carrier. Given their low cytotoxicity and their water solubility many types of poly(amido amine) (PAMAM) dendrimers appear as a very attractive class of biocompatible nanovectors for drug targeting in cells and tissues.<sup>13–15</sup>

So far, three different assemblies of dendrimer-based carrier systems have been reported in the field of PDT. The first uses a porphyrin or phthalocyanine as the starting core with a dendron grafted on each pyrrole unit. The Kataoka group reported good photodynamic efficacy of these NPs excitable in the far red, making them eligible for *in vivo* applications.<sup>16,17</sup> The second construction consists of photosensitizers like protoporphyrin IX (PpIX) encapsulated in the dendrimer, which can be progressively released into the medium.<sup>18</sup> The last class of structures is based on the covalent binding of PS on the periphery groups of dendrimers. As we recently demonstrated that PpIX prodrug, ALA (5-aminolaevulinic acid) can be attached to dendrimers *via* a cleavable ester bond, resulting in a higher synthesis rate and better tumor selectivity of PpIX *in vivo* compared with free ALA.<sup>19</sup> Hackbarth *et al.*<sup>12</sup> achieved an average loading of 12–13 molecules of pheophorbide a (Pheo) to one diaminobutane (DAB) dendrimer molecule with 16 available binding sites. However, singlet oxygen generation of covalently linked dye molecules was dramatically reduced compared with free Pheo, mostly due to trap formation (excitonic interaction of at least two neighboring chromophores) combined with Förster-energy transfer between different Pheo molecules at the surface of highly loaded dendrimers. Strong quenching effects were also reported for high loaded peryleneimide–terrylenediimide polyphenyl dendrimers.<sup>12,20</sup>

The present paper evaluates the therapeutic *in vitro* efficiency of the photoactive NP consisting of the PS chlorin e6 (Ce6) covalently bound to a biocompatible PAMAM G4.5 dendrimer. To avoid strong quenching effects, only 25% of the carboxylic acid groups present at the dendrimer surface were modified with the PS. Herein, we describe the photophysical properties, subcellular localization and internalization pathway of Ce6-grafted dendrimers (G4.5-Ce6). Changes observed in cellular uptake and phototoxicity upon PEGylation of the NPs were also evaluated.

## Experimental

### Materials and general procedure

Starbust polyamidoamine (PAMAM) dendrimer generation 4.5 (5 wt% in methanol, containing 128 surface carboxylate groups, MW 26 228 g mol<sup>-1</sup>), benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP), poly(ethylene glycol) methyl ether (MW 2000 g mol<sup>-1</sup>), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP),

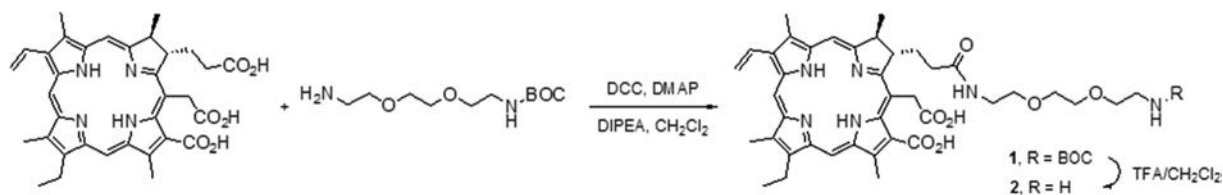
*N*-hydroxysuccinimide (NHS), diisopropylethylamine (DIPEA), 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine), trifluoroacetic acid (TFA), chlorpromazine, genistein, 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA), DMSO, MeOH and dichloromethane were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Chlorin e6 (Ce6) was purchased from Livchem (Frankfurt, Germany). RPMI 1640 medium, L-glutamine, foetal bovine serum, penicillin–streptomycin and phosphate-buffered saline (PBS) were supplied by GibcoBRL (Merelbeke, Belgium). Ultrapure water was used through all the experiments. All starting materials and organic solvents were directly used without further purification. *N*-Boc-protected 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) was prepared according to Trester-Zedlitz.<sup>21</sup>

### Synthesis of chlorin e6 – PAMAM dendrimer nanoparticles.

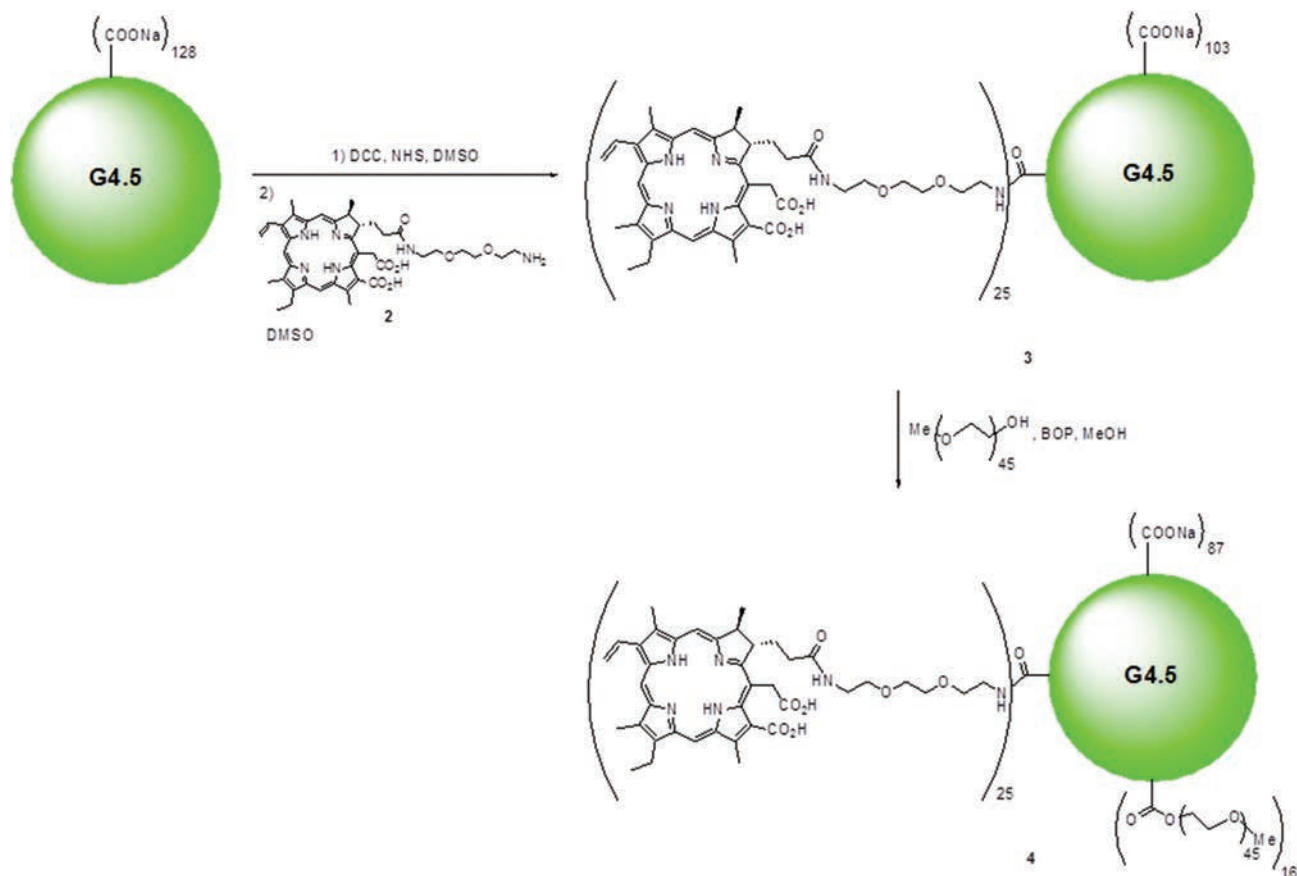
**Coupling of Ce6 with *N*-Boc-protected 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine).** Under an argon atmosphere in the dark, Ce6 (100 mg, 1.677 × 10<sup>-4</sup> mol) was dissolved in 58 mL of anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. DCC (34.6 mg, 1.677 × 10<sup>-4</sup> mol) and DMAP (4 mg, 3.27 × 10<sup>-5</sup> mol) were added to the Ce6 solution and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. Separately, *N*-Boc-protected 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (50 mg, 2.012 × 10<sup>-4</sup> mol) and DIPEA (26 mg, 2.012 × 10<sup>-4</sup> mol) were dissolved in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. This solution was added to the activated Ce6 and the mixture was stirred at room temperature for 10 h. The progress of the reaction was monitored by thin layer chromatography using MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 : 90) as the eluent. The precipitant dicyclohexylurea was removed by filtration through a glass filter. The reaction mixture was then poured into a separation funnel, washed with water (25 mL) and saturated brine (25 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent evaporated under reduced pressure. Compound 1 (Scheme 1) was isolated in 82% yield after column chromatography on silica gel using MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 : 90) as the eluent.

**Deprotection of the BOC group. Synthesis of compound 2.** In the dark under an argon atmosphere, compound 1 (100 mg, 1.187 × 10<sup>-4</sup> mol) was treated with TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 1, 7 mL) at room temperature. After being stirred for 2 h, TFA and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were evaporated. The residue was taken up in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) and stirred with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After filtration, the organic layer was concentrated under reduced pressure and compound 2 was obtained in 96% yield. Chlorin 2 (Scheme 1) was used without further purification for the next step.

**Anchorage of 2 at the surface of G4.5 PAMAM dendrimer.** The anchorage of 2 at the surface of the G4.5 PAMAM dendrimer (Scheme 2) was conducted according to a synthetic procedure described by Hargus *et al.* with slight modifications.<sup>22</sup> Briefly, methanol was first evaporated *in vacuo* from the commercial G4.5 PAMAM dendrimer solution. The obtained oil (235 mg, 8.95 × 10<sup>-6</sup> mol) was solubilized in anhydrous DMSO (10 mL). DCC (118.2 mg, 5.73 × 10<sup>-4</sup> mol) and NHS (98.91 mg, 8.585 × 10<sup>-4</sup> mol) were then added to activate surface carboxylate functions and the solution was stirred for 15 h at room temperature under an argon atmosphere. Chlorin 2 (0.187 mg, 2.57 × 10<sup>-4</sup> mol) in 10 mL DMSO was then added and the mixture was stirred for 24 h. The precipitant dicyclohexylurea



Scheme 1 Synthetic route for the preparation of diamino PEG-functionalized chlorin 2.



Scheme 2 Synthetic route to multifunctional PAMAM dendritic NPs 3 and 4.

was removed by filtration through a glass filter. The reaction medium was then diluted with water (50 mL) and dialyzed using a dialysis bag (molecular weight of 6–8000 Da cut off) against ultrapure water for 72 h, the water being changed every 24 h, to remove low MW contaminants and unreacted 2. The solution was finally lyophilized to provide pure 3 in 91% yield. Attachment of 2 to the dendrimer provided exclusively compound 3, requiring only dialysis for the workup, thus facilitating scale up (Scheme 2).

#### Surface PEGylation of 3

Finally, in order to increase the blood circulation times and the accumulation in tumor tissue, poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG<sub>2000</sub>-OMe, MW 2000) was used to cover *ca.* 8% of

the carboxylic groups on the surface of the periphery of dendrimer 3 (Scheme 2).

Surface PEGylation of 3 was achieved by formation of ester bonds between surface carboxylate groups of the dendrimer and poly(ethylene glycol) methyl ether (MW 2000, mPEG<sub>2000</sub>-OMe) using BOP as a coupling agent and methanol as a solvent.<sup>23</sup> Under argon and in the dark, compound 3 (0.180 g,  $4.08 \times 10^{-6}$  mol) and BOP (0.086 g,  $1.95 \times 10^{-4}$  mol) were dissolved in 20 mL anhydrous methanol. mPEG<sub>2000</sub>-OMe (0.130 g,  $6.537 \times 10^{-5}$  mol) was then added and the mixture was stirred for 3 days at room temperature. Methanol was next evaporated *in vacuo*. The residue was solubilized in water (30 mL) and dialyzed using a dialysis bag (molecular weight 6–8000 cut off) against ultrapure water for 48 h, the water being changed every

24 h, to remove low MW contaminants and unreacted mPEG<sub>2000</sub>-OMe without significant lowering of the yield of the PEGylated dendrimer. The solution was finally lyophilized to provide compound 4.

### Characterization

The Ce6 concentration of G4.5-Ce6 ( $\pm$ PEG) solution was determined by UV/Vis spectroscopy (Lambda 35 UV/Vis spectrofluorimeter LS55 Perkin-Elmer). Free Ce6 was dissolved in ethanol at different concentrations to generate a standard curve and calculate the molar extinction coefficient at 665 nm. The amount of the Ce6 content in PAMAM G4.5 solution was calculated assuming the same extinction coefficient as for Ce6 in solution. Fluorescence spectra of free Ce6 and G4.5-Ce6 ( $\pm$ PEG) were recorded using an LS55 fluorescence spectrometer (Perkin-Elmer). All measurements were done in ethanol at the dye concentration of 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; at this dye concentration the optical density did not exceed 0.1 at  $\lambda_{\text{exc}} = 410$  nm. The hydrodynamic diameter and the zeta potential of G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG NP were determined using a Malvern Zetasizer Nano ZS (173°, 532 nm, 25 °C). The samples were prepared at a concentration of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in MilliQ water and filtered at 0.1  $\mu\text{m}$ . The hydrodynamic diameter is reported as the volume-weighted average of twelve measurements.

For zeta potentials a voltage of 100 V was applied at 25 °C. The samples were loaded into pre-rinsed folded capillary cells; at least three independent measurements were made.

### Evaluation of the singlet oxygen generation (SOG)

Singlet oxygen luminescence kinetics have been recorded using time correlated multi photon counting employing the NIR PMT H10330-45 from Hamamatsu as a detector. The setup is identical to the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> luminescence detection system TCMPC1270 of SHB Analytics, Germany. The excitation intensity profile, temporal shape and spectrum of the pulsed LED excitation around 400 nm are described by Hackbarth *et al.*<sup>24</sup> The optical density of the samples and reference is adjusted to 0.1 at 400 nm. Singlet oxygen quantum yield of the reference substance (5,10,15,20-tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine, TMPyP) was previously measured to be 0.70  $\pm$  0.05 in ethanol. This value is consistent with the value reported earlier by Wilkinson *et al.*<sup>25</sup>

### Cell culture

Human pharynx squamous cell carcinoma (FaDu) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® HTB-43™). FaDu cells were grown in humidified incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 1% L-glutamine.

### In vitro photocytotoxicity assessed by clonogenic assay

Cells were seeded into 6-wells plates at a concentration of 9  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well. Following incubation for 48 h, the cells were washed with PBS and incubated for 24 h in RPMI supplemented with 2% FBS and containing each compound at

varying concentrations. Stock solution of Ce6 was prepared in DMSO so that the concentration of solvent never exceeded 0.1% in the medium. G4.5-Ce6 ( $\pm$ PEG) was prepared in water. After two consecutive washings with PBS, fresh medium was added and cells were irradiated at 652 nm with a Ceralas PDT diode laser (CeramOptec GmbH, Bonn, Germany) at a fluence of 2.5 J cm<sup>-2</sup> with a fluence rate of 10 mW cm<sup>-2</sup>. The cell viability was then evaluated by a clonogenic assay. The cells were washed and incubated with trypsin-EDTA to prepare single-cell suspensions from monolayer cultures. Viable cells were then seeded in a 6-well plate at a concentration of 500 cells per well. Ten days later, the culture medium was removed and cells were washed and incubated 5 min at room temperature successively with 70% ethanol and 1% crystal violet solution. Then the colonies were washed and counted. Results are given as the percentage of surviving cells normalized to those obtained from the control groups (drug, no light). To determine the dark toxicity of the compounds, well plates were prepared in the same manner as described above without irradiation.

### Cellular uptake assay

FaDu cells (3  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well) were seeded in 24-well plates, 48 h later the cells were washed with PBS and incubated for 24 h in RPMI supplemented with 2% FBS and containing each compound under investigation at varying concentrations. After three consecutive washings with PBS, Solvable™ (Perkin-Elmer) was added for 2 h at 50 °C for solubilizing cells. The cellular uptake of Ce6 was determined from fluorescence calibration curves constructed by plotting the peak height of Ce6 standard solutions in Solvable™. The calibration was linear within this range. Error bars are the standard deviation for three independent experiments.

### Internalization pathway inhibition studies

FaDu cells (3  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well) were seeded in 24-well plates, and incubated for 48 h prior to the addition of NPs. Then, the cells were pre-incubated in RPMI 2% FBS for 30 min with either 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  chlorpromazine (inhibitor of clathrin-dependent endocytosis), 400  $\mu\text{M}$  genistein (inhibitor of caveolae-dependent endocytosis) or 100  $\mu\text{M}$  EIPA (inhibitor of macropinocytosis). The impact of low temperature was studied by pre-incubating cells at 4 °C for 30 min prior to exposure to the compounds. After this pre-incubation, G4.5-Ce6 ( $\pm$ PEG) (final concentration 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added and incubated for 60 min, either in the presence of the inhibitors or at 4 °C. Ce6 uptake was measured as previously described. Results are given as the percentage of uptake normalized to those obtained from control groups (without inhibitors or at 37 °C).

### Subcellular localization of NP with or without PEG

FaDu cells (1  $\times$  10<sup>4</sup> cells per ml) were plated into four well chambers Slideflask (Nunc, Roskilde, Denmark), incubated in the dark at 37 °C with 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of free Ce6 or NP-Ce6 ( $\pm$ PEG) during 24 h, then rinsed and incubated with organelle specific fluorescent probes. The ER was labelled with DiOC<sub>6</sub> dye, applied for 1 min at a final concentration of 2.5 mg ml<sup>-1</sup>. To

identify the Golgi apparatus, the cells were labelled with  $5 \times 10^6$  M of NBD-C<sub>6</sub> ceramide for 30 min at 4 °C, then rinsed with cold PBS solution and re-incubated in the RPMI 9% FBS at 37 °C for the next 30 min. The staining of mitochondria and lysosome was performed by cell incubation with  $2 \times 10^{-7}$  M of MitoTracker® Green or  $7.5 \times 10^{-8}$  M of LysoTracker® Green for 30 min at 37 °C. Before observation, the cells were washed with PBS to remove dyes. Double-stained cells were observed with a confocal laser-scanning microscope (Leica SP5 X AOBLS LCSM; Leica microsystem, Wetzlar, Germany). A white light laser (SuperK, extreme supercontinuum lasers, NKT Photonics) was used to excite organelle specific fluorescent probes and Ce6 at appropriate wavelengths. Fluorescence emission of Ce6 (peak 665 nm) was collected from 645 to 690 nm on one channel (red), and fluorescence from organelle specific labelling was collected from 505 to 550 nm on a second channel (green), with the pinhole locked at 600  $\mu$ m. A water immersion objective ( $\times 63$ ) was used to capture each image of  $1024 \times 1024$  pixels. No visible photobleaching was observed during image acquisition. Colocalization was quantified with the Pearson's correlation coefficient (PCC). The absolute PCC values of 1–0.7 indicate a relatively strong correlation, 0.69–0.36 indicate a moderate correlation, 0.35–0.2 indicate a weak correlation, and <0.2 indicates the absence of a correlation.<sup>26,27</sup> The square of the PCC value represents the percentage of Ce6 fluorescence signal arising from the fluorescence of the organelle marker.<sup>26</sup>

### Fluorescence-lifetime imaging

The cell images were observed with a CLSM (FluoView™ FV1000, Olympus) with FLIM-extension (Pico Quant, Berlin). Fluorophores were excited with a nanosecond pulse laser at  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm. FaDu cells were incubated 24 h with G4.5-Ce6 ( $\pm$ PEG) or free Ce6. After two consecutive washings with PBS, fresh medium was added and cells were analyzed by using the FLIM equipment before and after irradiation (white light 10 mW cm<sup>-2</sup>; 5 min).

### Statistical analysis

Statistical significance among two conditions was assessed using the nonparametric Mann–Whitney test. *P*-value was considered at the 5% level of significance to deduce inference of the significance of the data.

## Results and discussion

### Physical and photophysical characterization

The hydrodynamic diameter determined by DLS (Table 1) is 6.3 nm for G4.5-Ce6 and 12 nm for G4.5-Ce6-PEG (PDI of 0.23 and 0.33, respectively). The surface charge exhibits a negative zeta potential of  $-17.7$  mV and  $-8.9$  mV for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG, respectively, due to the presence of the carboxylate functions at neutral pH.

Absorption and fluorescence spectra of free Ce6, G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG are shown in Fig. 1. The covalent binding between Ce6 and the dendrimer results in slight changes in the absorption spectra. A small bathochromic shift of the lowest Q-band (2 nm) together with a moderate increase of the bandwidth of all the absorption bands are observed for the G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG compared to free Ce6 (Table 1, Fig. 1A). Similar effects were previously observed for comparable nanohybrids<sup>12</sup> and have been attributed to local changes of the refractive index due to the vicinity of the PS to each other.<sup>28</sup> This also indicates that the attached Ce6 molecules interact partly, without general aggregation or structural modification when Ce6 was loaded with amide bonds on the PAMAM G4.5 dendrimers.

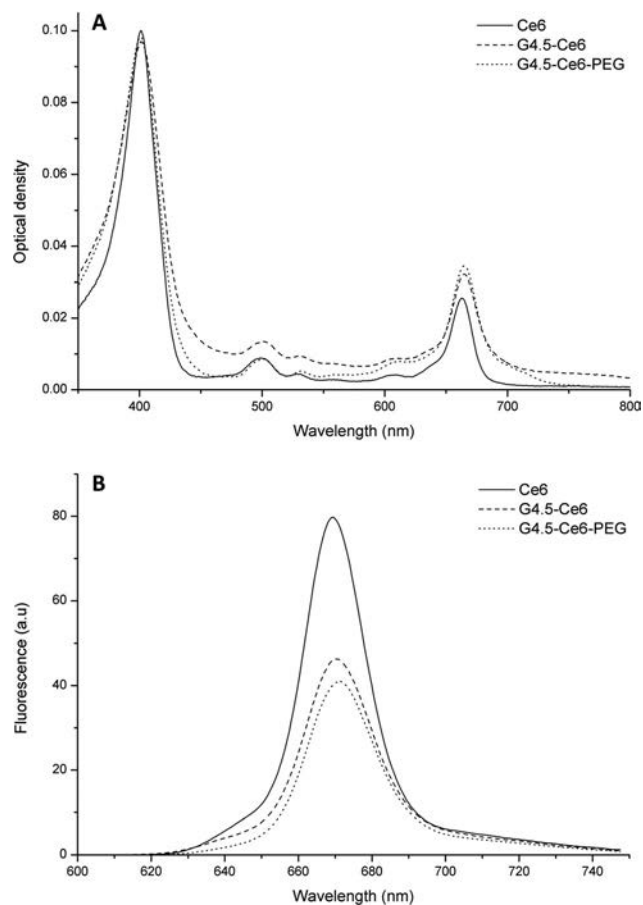
The fluorescence spectra of the NPs are very similar to Ce6 in ethanol solution (Fig. 1B), but the fluorescence quantum yield  $\Phi_{\text{F}}$  is reduced after covalent binding (0.11 and 0.09 for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG, respectively) compared to free Ce6 (0.16)<sup>29</sup> (Table 1). The singlet oxygen quantum yield  $\Phi_{\Delta}$  is reduced to 0.31 and 0.26, for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG, respectively compared to free Ce6 (0.55). The statistical loading of Ce6 on the dendrimer results in different PS–PS distances. Few of them are close enough for an excitonic interaction, resulting in non-radiative deactivation of the excited singlet state. However, the majority of Ce6 molecules at the same dendrimer are obviously sufficiently isolated to avoid Förster transfer towards this PS pair. Therefore the probability of quenching is much lower compared to the dendrimer constructs reported in Hackbarth *et al.*<sup>12</sup> The Förster radius of Ce6 can be calculated as 23 Å, while the average distance between PSs at one dendrimer is 22 Å, when computed from the measured diameter of our G4.5-Ce6 dendrimer (6.3 nm, Table 1) and the average number of Ce6 molecules linked on the dendrimer.<sup>32</sup> Due to the strong dependency of the distance

**Table 1** Photophysical properties

Photosensitizer system	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) (Q-absorption)	$\lambda_{\text{max}}$ (nm) (fluorescence)	$\Phi_{\text{FL}}$ ( $\pm 0.05$ ) (fluorescence)	$\Phi_{\Delta}$ ( $\pm 0.02$ ) (singlet oxygen)	Hydrodynamic diameter (nm)/PDI	Zeta potential (mV)
Ce6	662.5	669	0.16	0.55	N.A.	N.A.
G4.5-Ce6	665	670.5	0.11	0.26	6.3/0.23	$-17.7$
G4.5-Ce6-PEG	664.5	671.5	0.09	0.31	12/0.33	$-8.9$

$\lambda_{\text{max}}$ : maximal wavelength of absorption and fluorescence (excitation wavelength: 410 nm) in the last Q-band of the visible spectrum in ethanol.  $\Phi_{\Delta}$ : singlet oxygen quantum yield.  $\Phi_{\text{FL}}$ : fluorescence quantum yield. Since the fluorescence quantum yield and singlet oxygen quantum yield are determined by comparison with a known reference, the error is mainly caused by the error of the reference, and thus it has the same percentage for all samples.



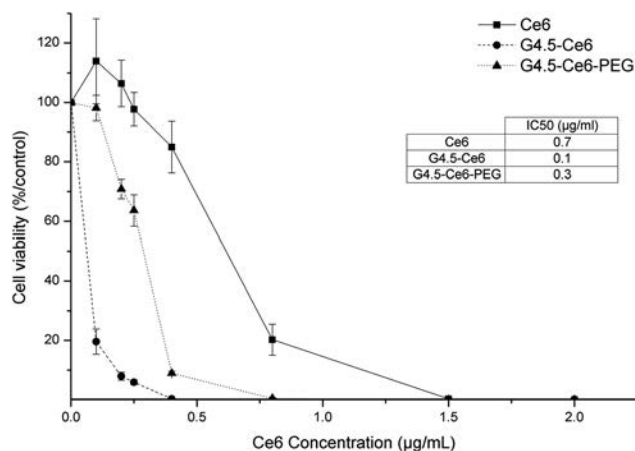


**Fig. 1** Absorption (A) and fluorescence emission (B) spectra of Ce6 (solid line), G4.5-Ce6 (dashed line) and G4.5-Ce6-PEG (dot line) in ethanol. Ce6 concentration adapted to reach an OD of 0.1 in the Soret band.

between molecules on the FRET (factor of  $10^6$ ), variation in the distance of only 20% causes the molecule to behave like a monomer in solution or undergo nearly exclusively FRET resulting in quenching. Quenching of around 40%–50% (Table 1) appears to be reasonable in this context.

### Photodynamic activity and cellular uptake

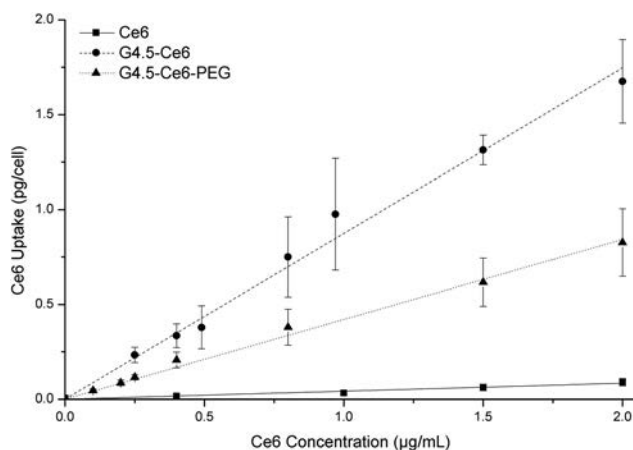
The viability of FaDu cells was evaluated by using the clonogenic assay as a function of PS concentration. No dark cytotoxicity was observed after treatment with Ce6, G4.5-Ce6 or G4.5-Ce6-PEG in the range of the tested concentrations (Fig. S1†). However, when irradiated, both dendrimer based NPs showed a remarkable and concentration dependent phototoxicity (Fig. 2). The  $IC_{50}$  values, defined as the concentration of PS at which 50% of tumor cells survive after photoirradiation, are displayed in the inset of Fig. 2. The  $IC_{50}$  of free Ce6 after 24 h incubation and irradiation ( $2.5 \text{ J cm}^{-2}$ ) is  $0.7 \mu\text{g ml}^{-1}$  (Fig. 2). This value is consistent with other studies using Ce6 under similar irradiation conditions.<sup>30,31</sup> The  $IC_{50}$  of G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG dendrimers were respectively 3 and 7 times lower ( $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  and  $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Fig. 2). The same order of



**Fig. 2** *In vitro* antitumor activity of free Ce6 (square), G4.5-Ce6 (round) and G4.5-Ce6-PEG (triangle) after photoirradiation ( $2.5 \text{ J cm}^{-2}$ ). FaDu cells were treated 24 h with various concentrations of free Ce6 or vectorized with G4.5 dendrimers ( $\pm$ PEG).  $IC_{50}$ : concentration of the PS inducing 50% of cell death.

$IC_{50}$  was reported earlier for aryl ether dendrimer Zn-porphyrin complexes under similar experimental conditions.<sup>32</sup>

Ce6 cellular uptake was significantly enhanced once anchored at the surface of the dendrimer compared to free PS (Fig. 3). Independent of the incubation concentration, the mean uptake (slope of the uptake fitting line) is increased by a factor of 10 for G4.5-Ce6-PEG and a factor of 22 for G4.5-Ce6 compared to free Ce6. The G4.5-Ce6 demonstrated two-fold higher intracellular accumulation compared to G4.5-Ce6-PEG (Fig. 3). These results are consistent with several reports demonstrating that the presence of PEG chains negatively affect the uptake of the nanoparticles *in vitro*.<sup>33,34</sup> Besides avoiding aggregation and preventing an opsonization during blood circulation, the PEG layer decreases the interactions



**Fig. 3** Cellular uptake of free Ce6 (square), G4.5-Ce6 (round) and G4.5-Ce6-PEG (triangle) incubated with FaDu cells during 24 h as a function of the PS concentration.

between the grafted chains and cell membrane leading to reduced cellular uptake,<sup>33</sup> a phenomenon known as the “PEG dilemma”.<sup>35</sup> The enhanced uptake of G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG (Fig. 3) could be responsible for better photocytotoxicity of dendrimer-based compounds (Fig. 2). However if the phototoxicity is recalculated in terms of equivalent intracellular Ce6 concentration, it appears that the phototoxicity of NPs is 3 times less efficient compared to free Ce6. A major part of this difference can be explained by the lower singlet oxygen quantum yield of the PAMAM G4.5-modified Ce6 (Table 1). Moreover, subcellular localization could be of importance too.

### Subcellular localization

The effect of vectorization on the subcellular distribution of Ce6 was investigated by CLSM with specific organelle fluorescent probes. Co-staining of FaDu cells with LysoTracker shows that Ce6 once associated with dendrimers was strongly localized in the lysosomes, with a Pearson's correlation coefficient  $>0.7$  (Fig. 4 and 5). In contrast, free Ce6 was not found in the lysosomes (PCC  $< 0.35$ ) but distributed elsewhere in the cell. Co-staining of Ce6-based compound mitochondria, Golgi apparatus and the ER was performed with Mitotracker, NBD and DioC6 respectively (Fig. 5 and S2†). All compounds had fairly the same localization pattern in these organelles, except

G4.5-Ce6 which is strongly confined to the Golgi apparatus while G4.5-Ce6-PEG and Ce6 were localized moderately in this organelle. As compared to ER or mitochondria, which are key organelles in the apoptotic cell death pathway, the PS localization in lysosomes is less favorable in terms of photocytotoxicity.<sup>36,37</sup> Thus, the next challenge could be the release of Ce6 from the dendrimer-based NP, paving the way to a further improvement of photoefficiency.

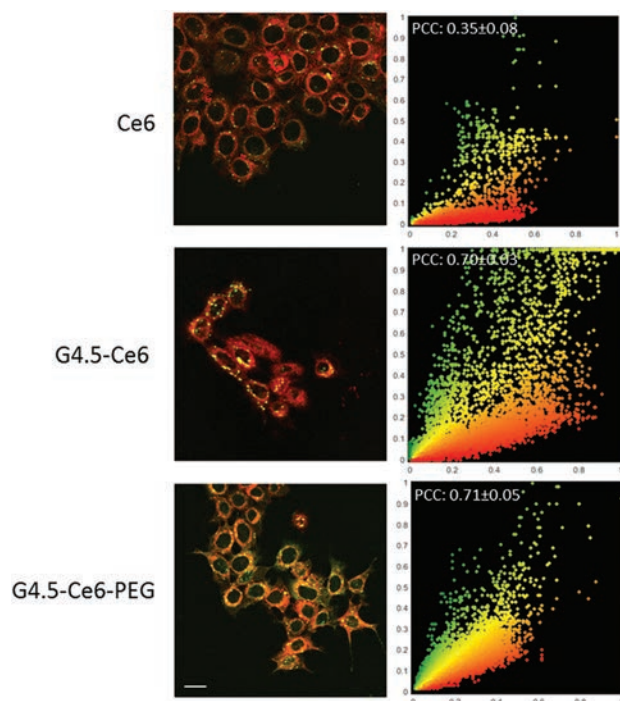
### Internalization pathway and intracellular fate of the nanoconstructs

Fig. 6 displays an uptake inhibition carried out by incubation of NPs with cells under different conditions. At 4 °C, the internalization of Ce6 was unaffected, whereas the uptake of the two Ce6-dendrimers was lowered to 45% and 18% for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG, respectively. As energy-dependent cellular processes are inhibited at low temperature, we state that the free Ce6 internalization occurs *via* passive diffusion through the plasma membrane, as has already been demonstrated in many studies.<sup>38–41</sup> Contrarily, the dendrimer NPs mainly enter the cells *via* an active transport process. The fluorescence signal of Ce6 dendrimers observable at 4 °C could be attributed to diffusion or physical adhesion on the plasma membrane. This hypothesis is strengthened by the weaker internalization of PEGylated compared to non-PEGylated Ce6-dendrimers, most probably due to the well-known anti-fouling properties of the PEG layer.<sup>42</sup>

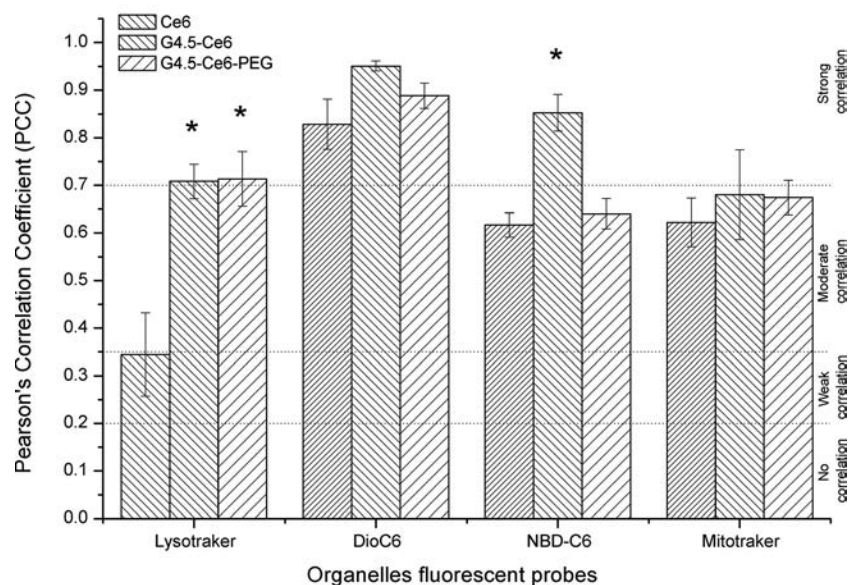
We further assessed the energy dependent internalization pathways as micropinocytosis, clathrin and caveolae uptake, using EIPA, chlorpromazine and genistein respectively (Fig. 6). We did not observe any uptake inhibition of Ce6-dendrimers after EIPA treatment. Therefore, the macropinocytosis is not a major cell uptake mechanism for the Ce6-dendrimers NP as recently claimed by Yuan *et al.*<sup>43</sup> Clathrin-mediated endocytosis (CME) pathway is inherent solely to G4.5-Ce6, while PEGylated dendrimers were indifferent to chlorpromazine-mediated inhibition ( $p > 0.05$ ). As reported by Shcharbin *et al.* with identical PAMAM dendrimers,<sup>44</sup> serum components will be adsorbed at the surface of the G4.5-Ce6 to form a so called biomolecular corona,<sup>45</sup> providing the receptor–ligand recognition, necessary for CME.

On the other hand, the presence of the PEG layer leads to a strong decrease of serum protein adsorption as demonstrated elsewhere,<sup>46,47</sup> and as such G4.5-Ce6-PEG dendrimers are insensitive to the CME inhibition agent. Caveolae pathway endocytosis was assessed with genistein-mediated inhibition of Ce6 cellular uptake. Among both tested dendrimers, only uptake of the negatively charged G4.5-Ce6-PEG was mediated by the caveolae receptor-independent endocytosis pathway. Consistent with our study, it has been reported that negatively charged COOH terminated PAMAM G3.5 dendrimers were endocytosed *via* the caveolae pathway.<sup>48</sup>

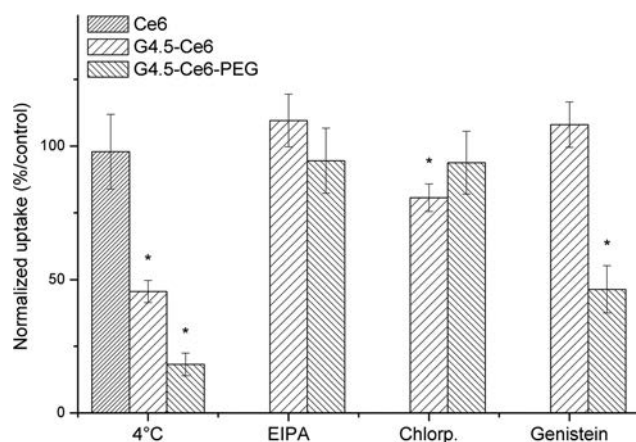
Considering that G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG display similar subcellular distribution patterns in the studied organelles, except that for the Golgi apparatus (Fig. 5), these results indicate that although the internalization mechanisms and



**Fig. 4** CLSM images of lysosomal localization of Ce6, G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG in FaDu cells. Left column displays confocal overlay images. These micrographs are representative of those obtained from three independent experiments. Right column shows the mean Pearson's correlation diagram. Red color corresponds to Ce6 and green color corresponds to LysoTracker® Green. Bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 5** Pearson's correlation coefficient (PCC) values quantifying the co-localization of the organelle fluorescent marker and free Ce6, G4.5-Ce6 or G4.5-Ce6-PEG in FaDu cells 24 h after incubation. PCC values of 1–0.7 indicate a relatively strong correlation, 0.69–0.36 indicate a moderate correlation, 0.35–0.2 indicate a weak correlation, and <0.2 indicates the absence of a correlation<sup>26,27</sup> (\* $p < 0.05$  versus the free Ce6 group).



**Fig. 6** Effect of various endocytosis inhibitors on cellular uptake of the PSs. FaDu cells were pre-incubated for 30 min at 4 °C without the endocytosis inhibitors or at 37 °C with inhibitors. After pre-incubation, PSs (final concentration  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added and incubated for 60 min, either in the presence of the inhibitors or at 4 °C (\* $p < 0.05$  versus the untreated control group).

uptake of Ce6-dendrimers were different, the presence of PEG had little impact on the intra-cellular fate of the corresponding dendrimer. Moreover, despite the different incorporation mechanisms between Ce6 and Ce6-dendrimer, we observed a linear uptake in the function of PS concentration (Fig. 2). Considering the endocytosis NP-mediated pathway, compared to diffusion transport for free Ce6, we expected the saturation of dendrimers uptake. In all probability, the plateau could not be reached in the range of the tested concentrations

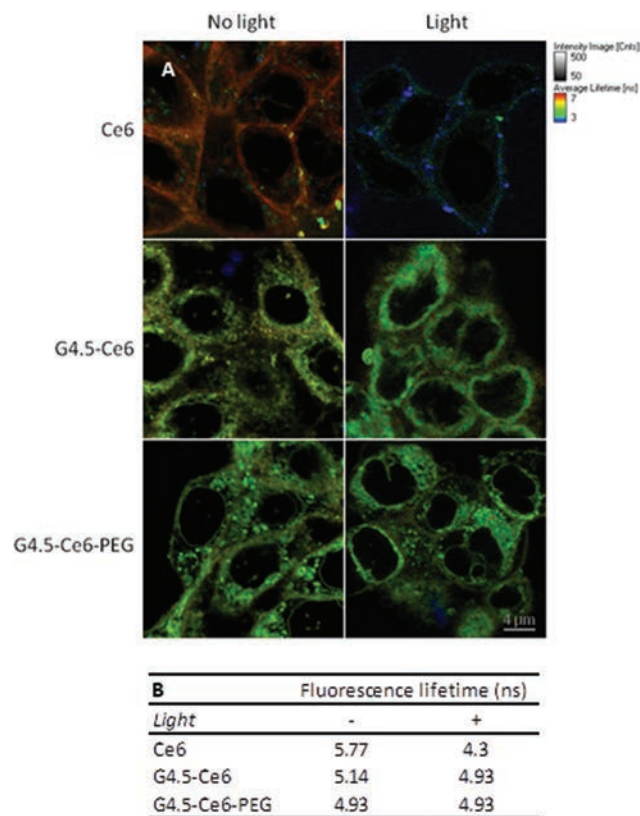
( $0\text{--}2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), while for higher concentrations a saturation of the uptake will definitely take place. Similar observations were reported earlier for gold nanoparticles.<sup>49</sup>

Besides that, we have been interested in the Ce6 and Ce6-dendrimers uptake measured as a function of incubation time (see figure below). We could observe the plateau in NPs uptake but not for free Ce6. This shows that the incorporation of our NPs can be saturated.

Classically, molecules that are internalized by the clathrin pathway are known to be subjected to lysosomal degradation<sup>50</sup> as opposed to the caveolae route which can avoid degradation.<sup>51</sup> However it has been shown in epithelial derived tumor cells that the caveolae and clathrin-mediated endocytosis pathways are connected and ends up in lysosomes.<sup>52</sup> Since FaDu cells belong to this category, it seems consistent that a certain proportion of the G4.5-Ce6-PEG is located in lysosomes.

### Fluorescence lifetime imaging

Fluorescence lifetime imaging data are presented in Fig. 7. FaDu cells were incubated for 24 h with either free Ce6 or G4.5-Ce6 NPs. FLIM is a valuable technique to study the fluorophore properties in their microenvironment, such as photobleaching,<sup>53</sup> aggregation state<sup>54</sup> as well as their release from a NP.<sup>55</sup> Fluorescence lifetimes ( $\tau$ ) were measured before and after cell irradiation with a light dose of  $3 \text{ J cm}^{-2}$ . Before irradiation,  $\tau$  values measured for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG were 5.1 ns and 4.9 ns, respectively, whereas it was significantly longer for free Ce6 (5.8 ns). After irradiation, the lifetimes of G4.5-Ce6 NPs remain unchanged, while  $\tau$  drops to 4.3 ns for free Ce6. Upon light irradiation, we observed a decrease of the fluorescence intensity for free Ce6, accompanied by a



**Fig. 7** Representation of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). FaDu cells were treated with 3  $\mu\text{M}$  of free Ce6, G4.5-Ce6 or G4.5-Ce6-PEG. After 24 h, the cells were observed under a fluorescence-lifetime imaging microscope before and after irradiation (A). Average fluorescence lifetimes for each PSs were determined (B).

shortening of  $\tau$  (Fig. 7). These changes for free Ce6, may be due to bleaching, relocalization or interaction with the local environment. However, no significant fluorescence lifetime changes were observed for G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG, pointing out that Ce6 is not released from the dendrimer following irradiation.

## Conclusion

PAMAM-Ce6 conjugates show a much higher photodynamic effect due to considerable internalization in the tumor cell model compared to free Ce6. Free Ce6 was shown to enter the cells by a simple diffusion mechanism, while G4.5-Ce6 and G4.5-Ce6-PEG internalization was dependent of active endocytosis pathway. However, the nanoparticles behave similarly in the cells since their subcellular localization was comparable. As a result, PEGylated G4.5 PAMAM-Ce6 dendrimers may offer an effective furtive biocompatible nanoparticle for photodynamic treatment in a preclinical tumor model. However, the reduced singlet oxygen quantum yield and pronounced localization in lysosomes indicate that great improvement of the photoefficiency of such nanoparticles is possible, if a release

of the PS from the dendrimers after cellular uptake can be realized.

## Acknowledgements

This work was supported by the “Institut de Cancérologie de Lorraine” Research Funds, French “Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)”, PHC Procope program (grant no. 31083XG) and “Région Lorraine”. The authors are grateful to Vairis Caune for the treatment of CLSM images.

## References

- 1 N. Kuznetsova, N. Gretsova, V. Derkacheva, O. Kaliya and E. Lukyanets, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2003, **7**, 147–154.
- 2 T. Trindade, P. O'Brien and N. Pickett, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 3843–3858.
- 3 V. Torchilin, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 131–135.
- 4 N. Jux and B. Röder, in *Handbook of Porphyrin Science*, ed. K. Kadish, K. Smith and R. Guilard, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2010, vol. 4, pp. 327–401.
- 5 H. P. Lassalle, D. Dumas, S. Grafe, M. A. D'Hallewin, F. Guillemain and L. Bezdetnaya, *J. Controlled Release*, 2009, **134**, 118–124.
- 6 A. S. Derycke and P. A. de Witte, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2004, **56**, 17–30.
- 7 A. Preuss, S. Hackbarth, M. Wacker, T. Knobloch, K. Langer and B. Roder, *J. Controlled Release*, 2010, **148**, e117–e118.
- 8 S. Battah, S. Balaratnam, A. Casas, S. O'Neill, C. Edwards, A. Batlle, P. Dobbin and A. J. MacRobert, *Mol. Cancer Ther.*, 2007, **6**, 876–885.
- 9 C. V. Synatschke, T. Nomoto, H. Cabral, M. Fortsch, K. Toh, Y. Matsumoto, K. Miyazaki, A. Hanisch, F. H. Schacher, A. Kishimura, N. Nishiyama, A. H. Muller and K. Kataoka, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1161–1172.
- 10 M. Guo, H. Mao, Y. Li, A. Zhu, H. He, H. Yang, Y. Wang, X. Tian, C. Ge, Q. Peng, X. Wang, X. Yang, X. Chen, G. Liu and H. Chen, *Biomaterials*, 2014, **35**, 4656–4666.
- 11 M. Gary-Bobo, O. Hocine, D. Brevet, M. Maynadier, L. Raehm, S. Richeter, V. Charasson, B. Looock, A. Morere, P. Maillard, M. Garcia and J. O. Durand, *Int. J. Pharm.*, 2012, **423**, 509–515.
- 12 S. Hackbarth, V. Horneffer, A. Wiehe, F. Hillenkamp and B. Röder, *Chem. Phys.*, 2001, **269**, 339–346.
- 13 C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. Frechet and F. C. Szoka, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 1517–1526.
- 14 L. M. Kaminskas, B. J. Boyd and C. J. Porter, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 1063–1084.
- 15 E. R. Gillies and J. M. Frechet, *Drug Discovery Today*, 2005, **10**, 35–43.
- 16 N. Nishiyama, H. R. Stapert, G. D. Zhang, D. Takasu, D. L. Jiang, T. Nagano, T. Aida and K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 58–66.

- 17 N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P. S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W. D. Jang, M. Kikuchi and K. Kataoka, *J. Controlled Release*, 2009, **133**, 245–251.
- 18 C. Kojima, Y. Toi, A. Harada and K. Kono, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 663–670.
- 19 A. Francois, S. Battah, A. J. MacRobert, L. Bezdetnaya, F. Guillemain and M. A. D'Hallewin, *BJU Int.*, 2012, **110**, E1155–E1162.
- 20 E. Yeow, K. Ghiggino, J. Reek, M. Crossley, A. Bosman, A. Schenning and E. Meijer, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 2596–2606.
- 21 M. Trester-Zedlitz, K. Kamada, S. K. Burley, D. Fenyo, B. T. Chait and T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2416–2425.
- 22 J. A. Hargus, F. R. Fronczek, M. G. Vicente and K. M. Smith, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 1006–1015.
- 23 D. M. Sweet, R. B. Kolhatkar, A. Ray, P. Swaan and H. Ghandehari, *J. Controlled Release*, 2009, **138**, 78–85.
- 24 S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preuss and B. Röder, *Laser Phys. Lett.*, 2013, **10**, 125702.
- 25 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, **22**, 113–262.
- 26 R. G. Malgady and D. B. Krebs, *Phys. Ther.*, 1986, **66**, 110–120.
- 27 R. Taylor, *J. Diagn. Med. Sonogr.*, 1990, **6**, 35–39.
- 28 J. Megow, M. I. Rohr, M. Schmidt am Busch, T. Renger, R. Mitric, S. Kirstein, J. P. Rabe and V. May, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 6741–6747.
- 29 A. Kay, R. Humphry-Baker and M. Grätzel, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 952–959.
- 30 P. Li, G. Zhou, X. Zhu, G. Li, P. Yan, L. Shen, Q. Xu and M. R. Hamblin, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2012, **9**, 76–82.
- 31 H. Park and K. Na, *Biomaterials*, 2013, **34**, 6992–7000.
- 32 G. D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D. L. Jiang, H. Koyama, T. Aida and K. Kataoka, *J. Controlled Release*, 2003, **93**, 141–150.
- 33 E. C. Cho, Q. Zhang and Y. Xia, *Nat. Nanotechnol.*, 2011, **6**, 385–391.
- 34 Y. Li, M. Kroger and W. K. Liu, *Biomaterials*, 2014, **35**, 8467–8478.
- 35 H. Hatakeyama, H. Akita and H. Harashima, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**, 152–160.
- 36 D. Kessel and Y. Luo, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1998, **42**, 89–95.
- 37 M. H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morliere, R. Santus and F. Guillemain, *Br. J. Cancer*, 2003, **88**, 146–152.
- 38 H. Mojzisoava, S. Bonneau, C. Vever-Bizet and D. Brault, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**, 2748–2756.
- 39 U. Schmidt-Erfurth, H. Diddens, R. Birngruber and T. Hasan, *Br. J. Cancer*, 1997, **75**, 54–61.
- 40 N. S. Soukos, M. R. Hamblin and T. Hasan, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **65**, 723–729.
- 41 J. D. Spikes, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1990, **6**, 259–274.
- 42 K. Feldman, G. Hahner, N. Spencer, P. Harder and M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 10134–10141.
- 43 A. Yuan, B. Yang, J. Wu, Y. Hu and X. Ming, *Acta Biomater.*, 2015, **21**, 63–73.
- 44 D. Shcharbin, J. Mazurb, M. Szwedzka, M. Wasiak, B. Palecz, M. Przybyszewska, M. Zaborski and M. Bryszewska, *Colloids Surf., B*, 2007, **58**, 286–289.
- 45 M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall and K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 14265–14270.
- 46 J. L. Perry, K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear and J. M. DeSimone, *Nano Lett.*, 2012, **12**, 5304–5310.
- 47 C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili and W. C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **134**, 2139–2147.
- 48 O. P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan and R. M. Kannan, *Biomaterials*, 2008, **29**, 3469–3476.
- 49 J. D. Trono, K. Mizuno, N. Yusa, T. Matsukawa, K. Yokoyama and M. Uesaka, *J. Radiat. Res.*, 2011, **52**, 103–109.
- 50 F. R. Maxfield and T. E. McGraw, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2004, **5**, 121–132.
- 51 R. G. Parton and K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007, **8**, 185–194.
- 52 G. Sahay, J. O. Kim, A. V. Kabanov and T. K. Bronich, *Biomaterials*, 2010, **31**, 923–933.
- 53 M. Kress, T. Meier, R. Steiner, F. Dolp, R. Erdmann, U. Ortmann and A. Ruck, *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**, 26–32.
- 54 H. P. Lassalle, M. Wagner, L. Bezdetnaya, F. Guillemain and H. Schneckenburger, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2008, **92**, 47–53.
- 55 Y. Li, H. T. Duong, S. Laurent, A. MacMillan, R. M. Whan, L. V. Elst, R. N. Muller, J. Hu, A. Lowe, C. Boyer and T. P. Davis, *Adv. Healthcare Mater.*, 2015, **4**, 148–156.

## 4.2 Etude du tumorotropisme des G4.5-Ce6+/-PEG par imagerie de fluorescence

### 4.2.1. Introduction

A la suite de l'étude *in vitro* des propriétés photobiologiques des NPs composées de dendrimère PAMAM de génération 4.5 fonctionnalisé avec la Chlorine e6 (G4.5-Ce6) ou avec la Chlorine e6 et des groupements PolyEthylène(Glycol) (G4.5-Ce6+/-PEG), le tumorotropisme des G4.5-Ce6-PEG a été analysé. Seule les NPs G4.5-Ce6-PEG ont été testées *in vivo* du fait de la présence des groupements de furtivités (PEG) qui limitent la reconnaissance des NPs par le système réticuloendothélial (RES) et augmentent leur temps de vie dans la circulation plasmatique [117].

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris immunodéficientes « *nude* » xénotreffées avec une lignée cellulaire squameuse de carcinome de pharynx humaine (FaDu). La biodistribution des G4.5-Ce6-PEG a été suivie par imagerie de fluorescence à la suite de leur injection i.v..

### 4.2.2. Matériels et méthodes

#### 4.2.2.1. Matériels

Les NPs G4.5-Ce6-PEG sont synthétisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Schneider du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Université de Lorraine, Nancy). Elles se composent de dendrimère PAMAM de génération 4.5 (Sigma Aldrich, France). 32 molécules de Ce6 (LivChem GmbH) ont été greffées de façon covalente par dendrimère. Les détails du protocole de greffage de la Ce6 et de la conjugaison des groupements de furtivités (polyethyleneglycol (PEG)) sont décrits en détail dans le §4.1 (Publication E. Bastien *et al.*, 2015).

#### 4.2.2.2. Spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence de la Ce6 libre et des G4.5-Ce6-PEG sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55 (Perkin Elmer, USA). Toutes les mesures sont effectuées dans du milieu de culture RPMI supplémenté avec 9 % de sérum de veau fœtaux (SVF), à une concentration de 0,5 µg/ml de Ce6.

### 4.2.2.3. Etude du tumorotropisme des nanoparticules

#### *Animaux et condition d'expérimentation*

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des souris « *nude* » femelles âgées de 6 semaines de 18 - 20 g (fournisseur Janvier®, St Berthevin, France). Les animaux sont maintenus en animalerie sous conditions standards (température ambiante 22 - 23°C, cycle lumière/obscurité de 12h) avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les expérimentations débutent à la suite d'une période d'acclimatation de deux semaines. Toutes les procédures d'expérimentation animale sont réalisées en accord avec la directive européen 2010/63/UE, selon les recommandations du Comité National de Réflexion d'Ethique sur l'Expérimentation (décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals »).

#### *Etude d'imagerie de fluorescence*

Les cellules FaDu ( $3 \times 10^6$ ) sont injectées en sous-cutanée entre les deux omoplates des souris. Quand les tumeurs xénogreffées atteignent une taille de 100 – 150 mm<sup>3</sup>, 100 µl d'une solution saline contenant soit la Ce6 libre ou les G4.5-Ce6-PEG ([Ce6] = 2,5 mg/kg) est injectée en i.v. dans la veine caudale (n = 5 par condition). Le suivi de la distribution des PSs par fluorescence a été réalisé à différents temps post-injection (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 et 48 h) à l'aide d'un système d'imagerie de fluorescence du petit animal (FluorVivoTM 300, INDEC BioSystems). Irradiation LED ( $\lambda_{exc.} = \sim 570 - 610$  nm ;  $\lambda_{em.} = 630 - 690$  nm). Les souris sont maintenues sous anesthésie gazeuse à 3 - 5 % d'isoflurane (Abbott, France), pour la greffe et les prises d'image.

Après soustraction du bruit de fond aux images, un code couleur, allant du vert au blanc, est appliqué en fonction des intensités de fluorescence détectées (faible à forte respectivement). Un résultat représentatif est présenté.

### 4.2.3. Résultats et Discussion

Après l'injection i.v. de la Ce6 libre ou des G4.5-Ce6-PEG dans la veine caudale, leur distribution au cours du temps a été monitorée *in vivo* par un système d'imagerie de fluorescence (FIG. 4.1 et 4.2, respectivement).

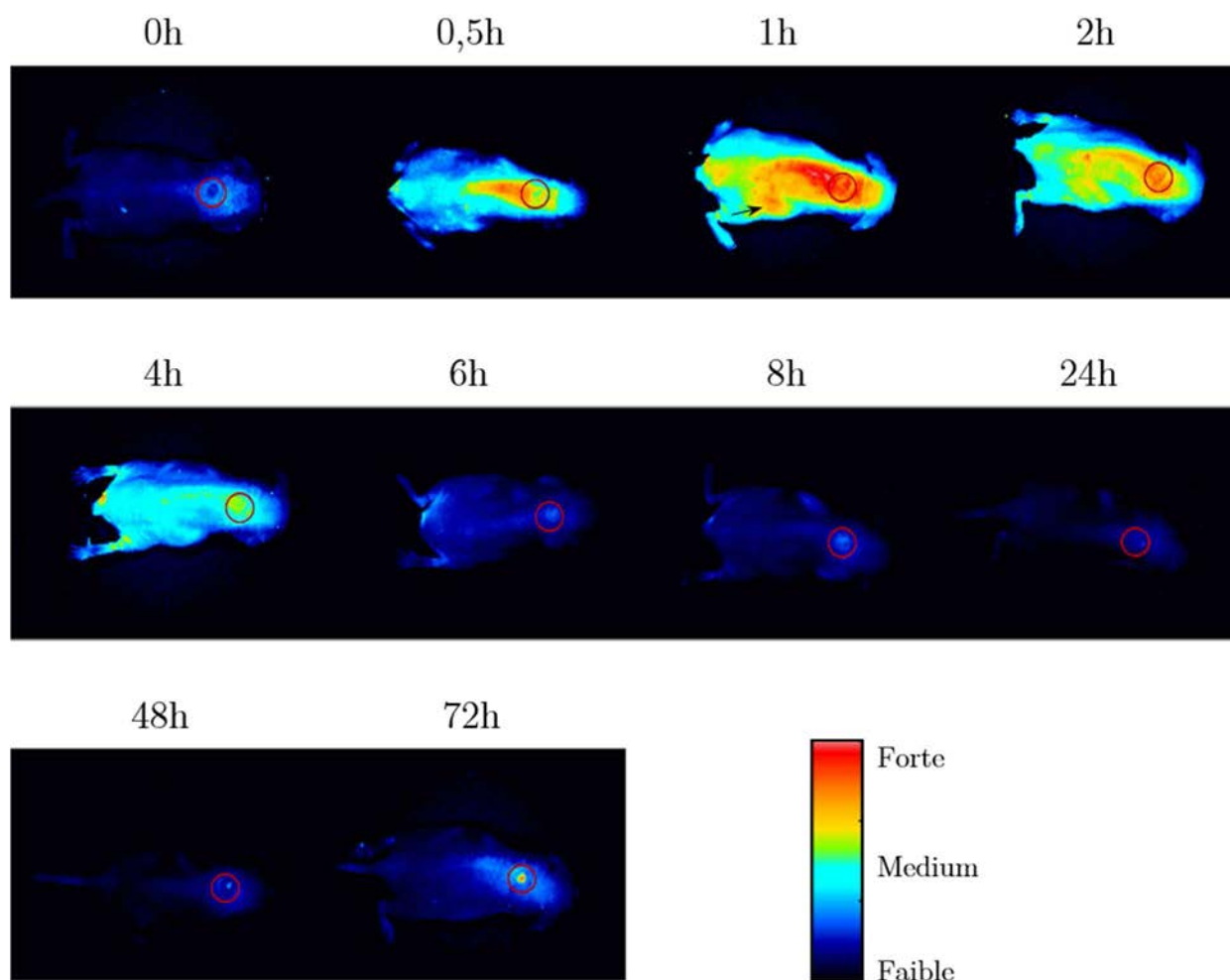


FIG. 4.1 Imagerie de fluorescence de souris « *nude* » xéno greffée avec des cellules FaDu, injectée en i.v. avec une solution de Chlorine e6 (2,5 mg/kg).

Le cercle rouge et la flèche noire indique respectivement l'emplacement de la tumeur et du foie (n = 5).

Dès 1 h après l'injection intraveineuse de la Ce6 libre, un fort signal de fluorescence est détecté dans le foie (indiqué par une flèche noire), puis ce signal est maintenu dans l'ensemble du corps jusqu'à 4 h post injection (FIG. 4.1). La Ce6 libre ne présente qu'une faible accumulation tumorale préférentielle (représenté par un cercle rouge) comparée à l'ensemble du corps à 4 h post injection.

Ces résultats sont en accords avec la littérature qui ont démontré de la même façon une accumulation rapide dans les tissus hépatiques et une spécificité limitée pour les tissus tumoraux de la Ce6 libre suite à son injection i.v. [56].



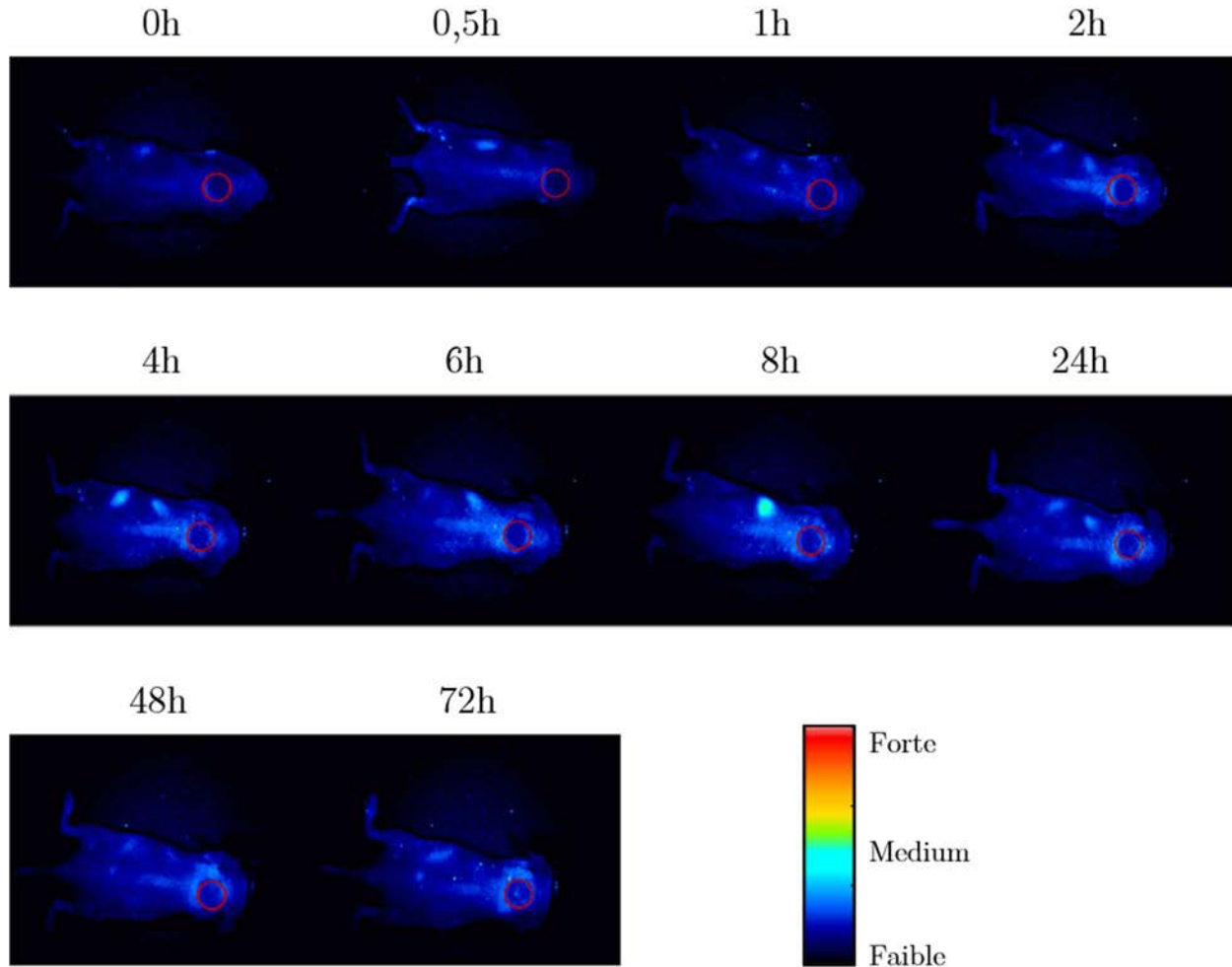


FIG. 4.2 Imagerie de fluorescence de souris « *nude* » xénotreffée avec des cellules FaDu, injectée avec une solution de G4.5-Ce6-PEG (Ce6 = 2,5 mg/kg). Le cercle rouge indique l'emplacement de la tumeur (n = 5).

Le suivi par fluorescence de la biodistribution des G4.5-Ce6-PEG s'est avéré être impossible (FIG. 4.2). En effet, à la suite de l'injection de la G4.5-Ce6-PEG seul un très faible signal de fluorescence a été détecté au niveau du foie à partir de 4 h jusqu'à 8 h post injection. Le foie étant un organe d'accumulation préférentielle des NPs, la forte concentration hépatique des G4.5-Ce6-PEG explique le signal observé par imagerie de fluorescence (FIG. 4.2). L'absence de fluorescence *in vivo* des G4.5-Ce6-PEG peut être expliquée par leur faible intensité fluorescence dans un environnement biologique, comme le présente les spectres de fluorescence réalisés dans du milieu de culture supplémenté avec 9 % de sérum de veau fœtaux (FIG. 4.3). En effet, le greffage de la Ce6 en périphérie des dendrimères G4.5 se traduit par une diminution d'environ 13 fois de son intensité de fluorescence dans le RPMI 9 % SVF. Par ailleurs, une faible fluorescence *in vivo* laisse généralement présager une efficacité PDT limitée de ces NPs.

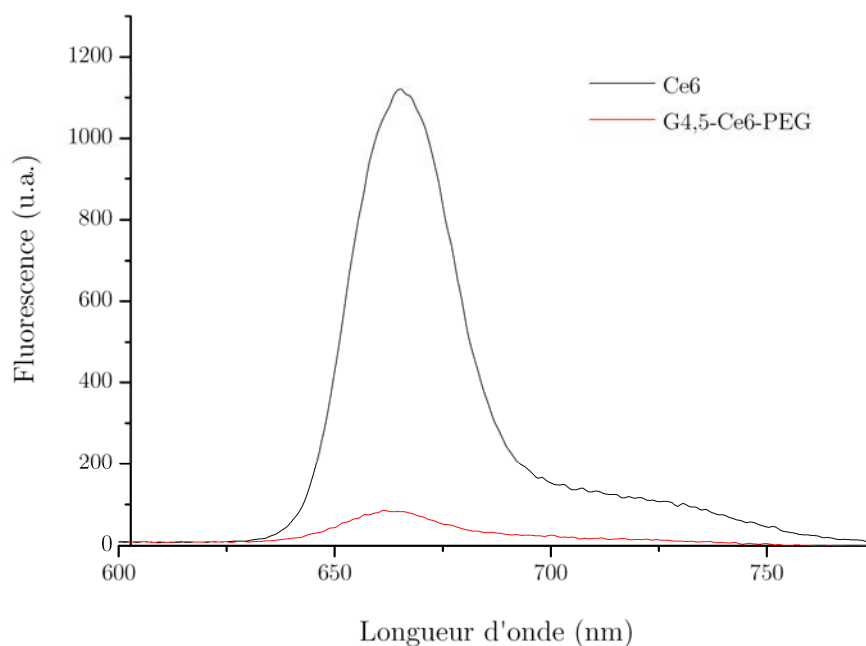


FIG. 4.3 Spectres de fluorescence de la Ce6 (noir) et des G4.5-Ce6-PEG (rouge) dans du milieu de culture RPMI supplémenté avec 9 % de sérum de veau foetaux.

### 4.3 Conclusion

Les dendrimères PAMAM de génération 4.5 se sont présentés *in vitro* comme de bons vecteurs de la Ce6, en potentialisant son internalisation cellulaire *via* un mécanisme d'endocytose. Cette accumulation intracellulaire accrue des NPs a permis d'accroître l'efficacité PDT de la Ce6. Néanmoins, l'efficacité des NPs par molécule de Ce6 internalisé est limitée, par sa localisation lysosomal et par son faible rendement quantique en oxygène singulet.

De plus, l'étude *in vivo* des G4.5-Ce6-PEG par imagerie de fluorescence c'est révélée impossible du faite de leur faible potentiel fluorescent en milieu biologique. Une seconde étude de biodistribution par exérèse des organes, extraction chimique et quantification par spectrofluorimétrie des NPs est envisageable. Néanmoins, le suivie d'un traitement PDT par fluorescence sera impossible avec les G4.5-Ce6-PEG. De plus un faible rendement quantique de fluorescence en milieu biologique laisse présager un faible rendement quantique d'oxygène singulet et ainsi un effet PDT limité des G4.5-Ce6-PEG.

Pour pallier ces problèmes, des nouvelles NPs permettant un relargage contrôlé de la Ce6 ont été synthétisées par le Pr. Scheinder. Elles se composent d'un dendrimère PAMAM fonctionalisé *via* une liaison ester avec la Ce6. Lorsque la Ce6 est liée en périphérie du dendrimère, la NP serait inactive et devrait présenter un faible rendement quantique d'oxygène singulet en milieu biologique. Par la suite en présence d'estérase, le

lien ester reliant la Ce6 aux dendrimères sera clivé libérant ainsi la Ce6. La Ce6 libre retrouvera ses propriétés photophysiques initiales avec notamment un rendement quantique d'oxygène singulet restauré.

La composition, la caractérisation ainsi que l'étude préliminaire des nouvelles NPs sont recensées dans le chapitre suivant.

# 5

## Nanoparticules clivables à base de dendrimère PAMAM et de Chlorine e6

### 5.1 Introduction

A ce jour, les nanoparticules (NP) à libération contrôlée ont suscité l'intérêt de nombreuses équipes. La libération peut être le résultat de stimuli extérieurs comme le pH ou la température, mais peut aussi résulter d'un clivage enzymatique du lien reliant le principe actif au vecteur. Le greffage des molécules actives en périphérie des dendrimères peut être réalisé avec des liaisons bioclivables, comme des liens ester clivables par des estérases [244] ou des peptides qui sont spécifiquement reconnu par des enzymes surexprimées dans les cancers comme les métalloprotéases matricielles (MMP)[245]. Récemment, le paclitaxel (PTX) a été conjugué à des dendrimères PAMAM de génération 4 *via* un lien peptidique clivable par les Cathepsin B, enzyme lysosomale surexprimées dans les cancers du sein [246]. Les dendrimères-PTX ont démontré sur un modèle de souris xenogreffé une réduction tumorale remarquable comparé à la PTX libre. Les souris traitées avec les dendrimères-PTX présentent un volume tumoral 48% et 34% inférieur aux souris traitées par la PTX libre, 2 et 3 semaines suivant le traitement respectivement. Cette conformation a permis de potentialiser l'efficacité de la PTX tout en ciblant son action due à la présence de Cathepsin B dans les tissus tumoraux.

En PDT, des dendrimères composés de 18 molécules de 5-acide aminolévulinique (ALA) couplés par des liens ester au dendrimère ont été synthétisés [230]. L'ALA est une prodrogue qui va induire, *via* la voie de l'hème, la synthèse intracellulaire d'un photosensibilisateur : la protoporphyrine IX (PpIX). Grâce au clivage des liaisons ester, une fois dans la cellule, les molécules d'ALA sont libérées et génèrent la PpIX [233]. Des études ont montré une production plus efficace et continue de PpIX avec les dendrimères comparé à l'ALA après leur administration intra-péritonéale chez des rongeurs ou après leur administration topique [231], [232] et systémique chez des souris xenogreffées [247].

Les NPs (G4.5-Ce6+/-PEG) composées de dendrimère PAMAM fonctionnalisé avec la Ce6 *via* un lien amide ont démontré, dans le chapitre 4, des faibles rendements quantiques de fluorescence et d'oxygène singulet qui limitent leur utilisation en imagerie de fluorescence sur petit animal, et leur efficacité PDT. Pour pallier ces limitations, l'utilisation d'une liaison clivable reliant la Ce6 au dendrimère semble être une solution intéressante. Le clivage de la Ce6 permettrait de relarguer la Ce6 qui sous forme libre retrouverait ses propriétés photophysiques initiales et son efficacité PDT.

Dans la présente étude des dendrimères de Génération 5 présentant 128 groupements alcool en périphéries, ont été fonctionnalisés avec la Ce6 *via* des liaisons esters. Leur caractérisation a notamment mis en évidence en solution que la production d'oxygène singulet (espèce cytotoxique majoritairement responsable de l'effet PDT) de la Ce6 était inhibée par son greffage au dendrimère puis restaurée après son clivage. Cette étude préliminaire a montré la potentialité de ces NPs pour de futures études d'efficacité PDT *in vitro* et *in vivo*.

## 5.2 Matériels et méthodes

### 5.2.1. Synthèse des nanoparticules clivables

Les NPs sont synthétisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Schneider du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, Université de Lorraine, Nancy). Comme décrit précédemment elles se composent de dendrimère PAMAM de génération 5 à cœur éthylène diamine possédant 128 groupements alcool en surface (Sigma Aldrich, France). 32 molécules de Ce6 (LivChem GmbH, Allemagne) ont été greffées de façon covalente par dendrimère *via* une liaison ester. La Ce6 (32,9 mg,  $5,52 \cdot 10^{-5}$  mole), du dicyclohexylcarbodiimide (11,39 mg,  $5,52 \cdot 10^{-5}$  mole) et du N-hydroxysuccinimide (6,35 mg,  $5,52 \cdot 10^{-5}$  mole) sont dissous dans 10 ml de DMSO anhydre et le mélange est agité à température ambiante pendant 6 h sous atmosphère d'argon. Puis les dendrimères solubilisés dans une solution de 2 ml de DMSO sont ajoutée au mélange sous agitation à température ambiante durant 48 h sous argon. 10 ml d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est ensuite dialysé 72 h contre de l'eau.

### 5.2.2. Caractérisation

#### *Rendement quantique de Fluorescence*

Les spectres de fluorescence et d'absorption de la Ce6 libre ou vectorisée sont réalisés à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55 et d'un spectrophotomètre Lambda 35 (Perkin Elmer, USA), respectivement. Toutes les mesures sont effectuées dans l'éthanol à une concentration de 0,5 µg/ml de Ce6, qui correspond à une densité optique de 0,1 à la

longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc.} = 410$  nm). L'équation (1) utilisée pour déterminer les rendements quantiques de fluorescence est :

$$\Phi_{fluoi} = \Phi_{fluost} \times \left( \frac{S_i}{S_{st}} \right) \left( \frac{n_i^2}{n_{st}^2} \right) \quad (1)$$

Avec :

$\Phi_{fluost}$  : Rendement quantique de fluorescence de l'échantillon de référence (ici la Ce6  $\Phi_{FL} = 0,16$  ; [236])

$\Phi_{fluoi}$  : Rendement quantique de fluorescence de l'échantillon i

$S_i$  et  $S_{st}$  : Intégral des spectres de fluorescence de l'échantillon i et standard

$n_i$  et  $n_{st}$  : Indice de réfraction des solvants de l'échantillon i et standard

### 5.2.3. Clivage de la Chlorine e6 par augmentation du pH

Les NPs clivables sont au préalable solubilisées dans l'eau. Dans un premier temps une solution de NaOH est ajoutée afin d'augmenter le pH à 11, pour permettre le clivage des liaisons esters et le relargage de la Ce6. Puis le pH est rétabli à 7 par addition d'une solution de HCl. La solution est ensuite filtrée à 10 KDa à l'aide d'un filtre Ultracel® - 10K (Millipore, Germany).

Des spectres d'absorbance sont réalisés avant la filtration puis sur le filtrat et sur le surnageant obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda 35 (Perkin Elmer, USA).

En parallèle, les mesures de génération d'oxygène singulet sont réalisées avant le clivage, après l'ajout de NaOH (pH = 11) et à la suite de l'ajout de HCl (pH = 7). La cinétique de la luminescence de l'oxygène singulet est évaluée à l'aide d'un compteur multi photon corrélé dans le temps qui utilise un détecteur NIR PMT H10330-45 de Hamamatsu. L'installation est identique au système de détection de la luminescence de l'oxygène singulet TCMPC1270 (SHB Analytics, Allemagne). Les profils d'intensité d'excitation, la forme temporelle et le spectre de l'excitation pulsée utilisant une LED aux alentours de 400 nm sont décrits par Harckbarth *et al.* [103].

### 5.2.4. Etude du tumorotropisme des nanoparticules

#### *Animaux et condition d'expérimentation*

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des souris « *nude* » femelles âgées de 6 semaines de 18 - 20 g (fournisseur Janvier®, St Berthevin, France). Les animaux sont maintenus en animalerie sous conditions standards (température ambiante 22-23°C, cycle lumière/obscurité de 12h) avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les expérimentations débutent, à la suite d'une période d'acclimatation de deux semaines. Toutes les procédures d'expérimentation animale sont réalisées en accord avec la directive

européen 2010/63/UE, selon les recommandations du Comité National de Réflexion d’Éthique sur l’Expérimentation (décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals »).

### *Etude d’imagerie de fluorescence*

Les cellules d’adénocarcinome colorectale HT29 ( $3 \times 10^6$ ) sont injectées en sous-cutanée sur le flanc droit des souris. Quand les tumeurs xéno greffées atteignent une taille de 100 – 150 mm<sup>3</sup>, 100 µl d’une solution saline des NPs clivables ([Ce6] = 2,5 mg/kg) est injectée en i.v. dans la veine caudale (n = 2). Le suivi de la distribution des PSs par fluorescence a été réalisé à différents temps post-injection (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, et 24 h) à l’aide d’un système d’imagerie de fluorescence du petit animal (FluorVivoTM 300, INDEC BioSystems). Irradiation LED ( $\lambda_{\text{exc.}} = \sim 570 - 610 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{em.}} = 630 - 690 \text{ nm}$ ). Les souris sont maintenues sous anesthésie gazeuse à 3 - 5 % d’isoflurane (Abbott, France), pour la greffe et les prises d’image. Après soustraction du bruit de fond aux images, un code couleur, allant du vert au blanc, est appliqué en fonction des intensités de fluorescence détectées (faible à forte respectivement). Un résultat représentatif est présenté.

## 5.3 Résultats et discussion

### *Caractérisation photophysique*

Les spectres d’absorption et de fluorescence de la Ce6 et des NPs dans l’éthanol sont présentés en FIG. 5.1. Le greffage covalent de la Ce6 aux dendrimères se traduit par de légers changements du spectre d’absorption comprenant un faible déplacement vers la droite des bandes Q. Les spectres de fluorescence de la Ce6 libre ou liée aux dendrimère réalisés dans l’éthanol sont similaires. A partir de ces mesures, les rendements quantiques de fluorescence des deux formulations ont été calculés. A la suite de son greffage la Ce6 présente un rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_{\text{FL}} = 0,15$ ) réduit de 10 % comparé à la Ce6 libre ( $\Phi_{\text{FL}} = 0,16$ ). Contrairement, aux NPs G4.5-Ce6+/-PEG les NPs clivables ne présentent pas de forte diminution du rendement quantique de fluorescence comparé à la Ce6. Ces résultats laissent présager leur possible utilisation en imagerie de fluorescence *in vivo* contrairement aux résultats présentés dans le chapitre précédent avec les G4.5-Ce6+/-PEG (§4.2).

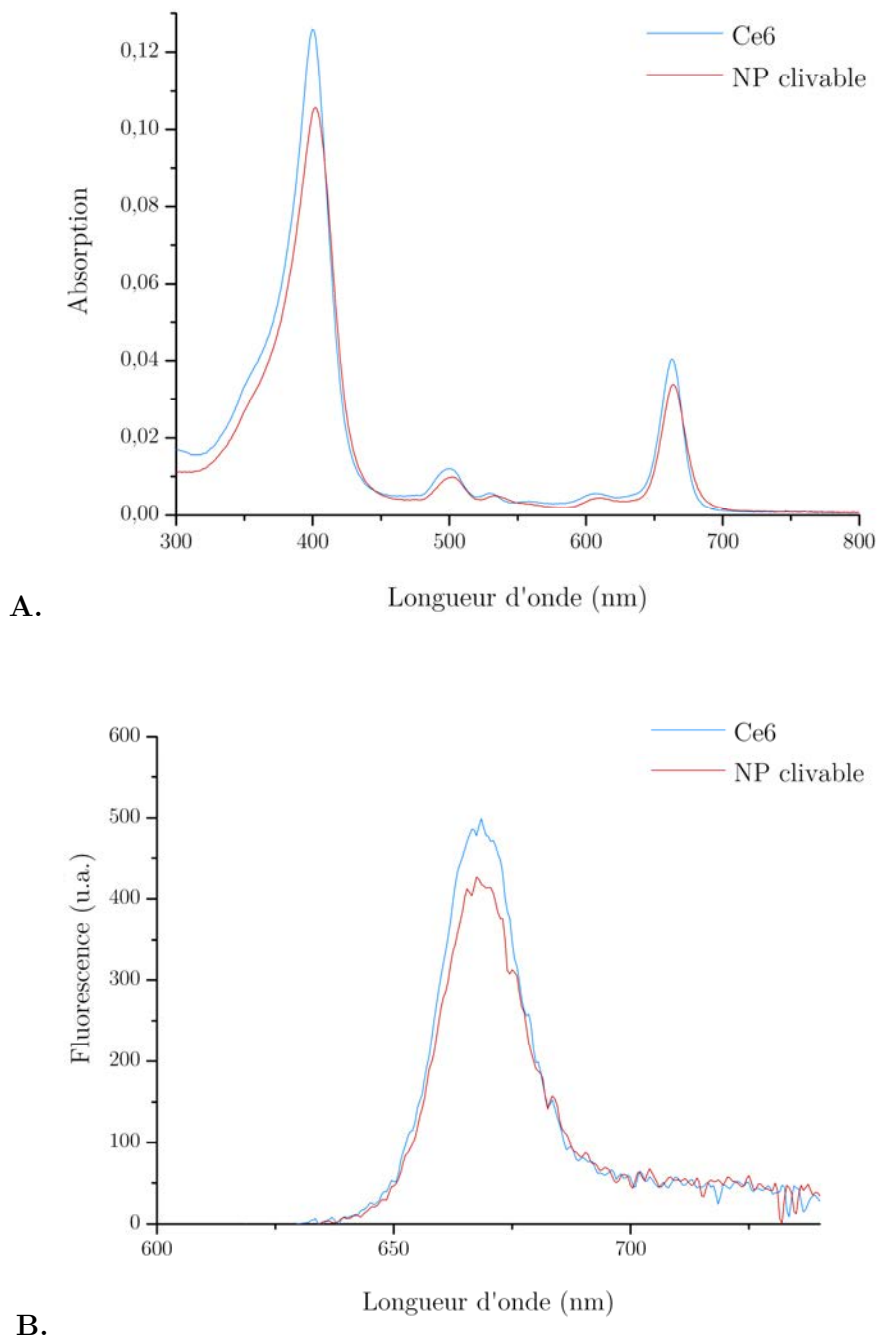


FIG. 5.1 Spectres d'absorption (A) et spectres de fluorescence (B) des nanoparticules clivables (rouge) et de la Chlorine e6 (bleu) dans l'éthanol.

### *Clivage de la Ce6*

Comme le démontre la FIG. 5.2, l'alcalinisation du pH peut être utilisée pour cliver la liaison ester qui relie la Ce6 aux dendrimères. Les NPs préalablement solubilisées dans l'eau ont été soumises à une augmentation du pH à 11 par l'addition d'une solution de



NaOH. Par la suite, après neutralisation, la solution des NPs est filtrée à 10 KDa afin de séparer des NPs la Ce6 clivée qui se retrouvera dans le filtrat.

Les spectres d'absorbance présentés en FIG. 5.2, ont été réalisés avant et à la suite de la filtration à partir du filtrat et du surnageant obtenu. Le spectre d'absorbance des NPs clivables, réalisé suite à l'alcalinisation et à la neutralisation du pH de la solution, présente deux maximums au niveau du dernier pic d'absorption à 638 nm et à 670 nm (spectre jaune). A la suite de la filtration de la solution de NPs, les spectres d'absorption du surnageant et du filtrat présente respectivement une dernière bande Q avec un maximum à 670 nm et à 638 nm. Le filtre utilisé ne laissant passer que les molécules d'une taille supérieure à 10 KDa, les dendrimères d'une taille d'environ 29 KDa sont retenus dans le surnageant et la Ce6 clivée (596,68 Da) se retrouve dans le filtrat. Dans ces conditions, le pic observé à 638 nm avec la solution non-filtrée et le filtrat (spectres orange et violet respectivement) correspond à la Ce6 relarguée des NPs suite au clivage de la liaison ester par le pH 11. Cependant, il faut prendre en considération que l'alcalinisation du pH ne clive pas la totalité des liaisons ester présentes. En effet un grand nombre de Ce6 conjugué aux dendrimères se retrouve séquestré dans le surnageant à la suite de la filtration et présente au niveau de leur spectre d'absorption une dernière bande Q avec un maximum à 670 nm (spectre bleu).

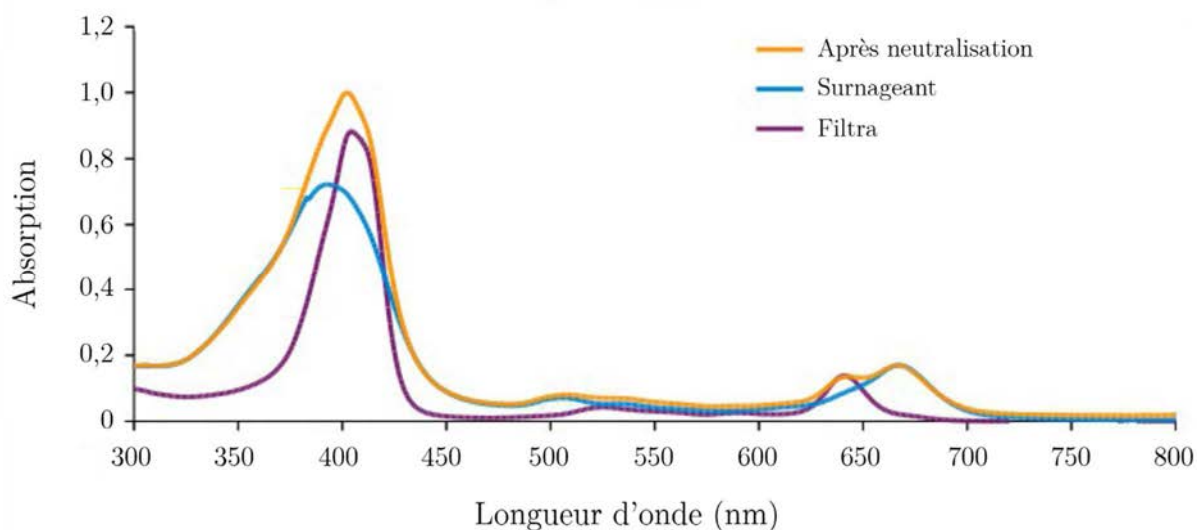


FIG. 5.2 Spectres d'absorptions des NPs après alcalinisation et neutralisation du pH dans l'eau (jaune), et à la suite de leur filtration à 10KDa sur le surnageant (bleu) et sur le filtrat (violet).

Les NPs clivables sont solubilisées dans l'eau puis le pH est augmenté à 11 par ajout de NaOH et neutralisé (pH = 7) par addition de HCl. Un spectre d'absorption est réalisé sur la solution de NPs à pH 7. Puis la solution est filtrée 10 KDa, et les spectres d'absorption sont réalisés sur le filtrat et sur le surnageant.

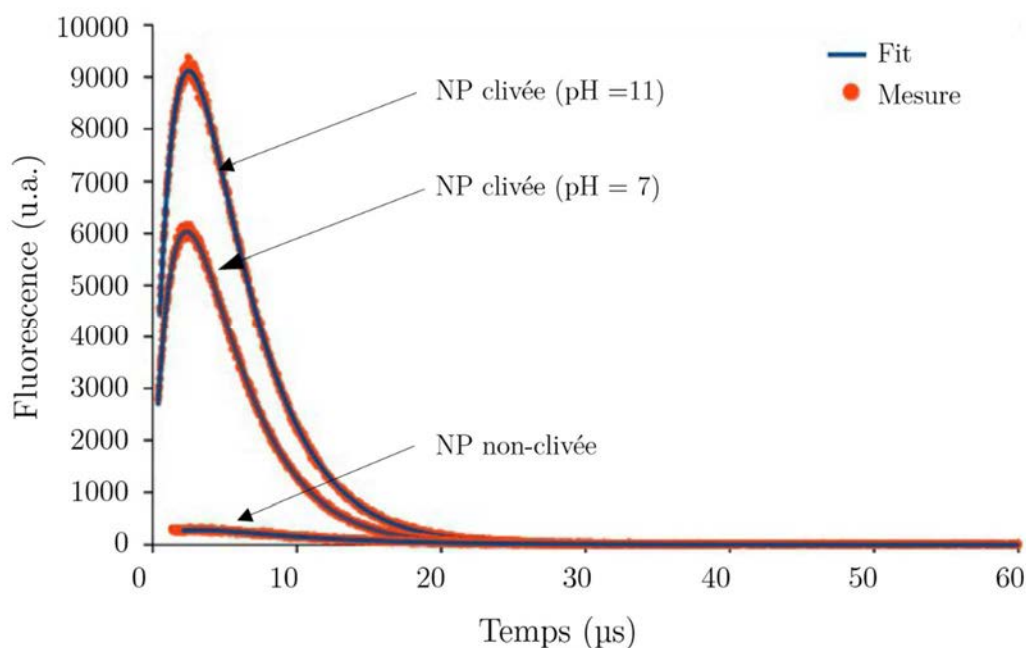


FIG. 5.3 Production d'oxygène singulet par les nanoparticules clivables, avant clivage et à la suite du clivage dans une solution aqueuse à pH basique ( $\text{pH} = 11$ ) ou neutre ( $\text{pH} = 7$ ).

Les NPs clivables sont solubilisées dans l'eau puis le pH est augmenté à 11 par ajout de NaOH et neutralisé ( $\text{pH} = 7$ ) par addition de HCl. Les mesures sont réalisées à chaque étape, par détection directe de la luminescence de l'oxygène singulet à 1260 nm.

La production d'oxygène singulet par les NPs a été déterminée en solution dans l'eau, après l'alcalinisation du pH à 11 et après sa neutralisation ( $\text{pH} = 7$ ). Comme le présente la FIG. 5.3, les NPs présentent, avant l'alcalinisation du pH, une faible production d'oxygène singulet, qui est fortement inférieure à celle mesurée à pH 11 ou 7 (à la suite du clivage).

Cette augmentation du signal observée après l'alcalinisation et la neutralisation du pH, peut être la conséquence de différents phénomènes. Le plus probable est le clivage de la liaison ester reliant la Ce6 au dendrimère, qui engendre le relargage de la Ce6. Ainsi libre elle retrouvera ses propriétés photophysiques initiales dont un rendement quantique d'oxygène singulet élevé. Cependant ce résultat est qualitatif et non quantitatif, du fait de l'intervention d'autres phénomènes.

En effet, les groupements  $-\text{COOH}$  de la Ce6 sont protonés à de faible pH. L'alcalinisation du pH peut engendrer une déprotonation de ses groupements qui conduira à une modification de ces propriétés chimiques et photophysiques. Ainsi les interactions entre la Ce6 et l'oxygène moléculaire peuvent être modifiée, influençant par conséquent l'amplitude du signal de la luminescence de l'oxygène singulet mesuré.

De plus, l'ajout de base et d'acide dans la solution aqueuse contenant les NPs, induit une augmentation des sels présents qui par conséquent potentialisera la solubilité de la Ce6 dans l'eau. La Ce6 étant plus soluble, ses interactions avec l'oxygène moléculaire

dissout dans le solvant peuvent être favorisées, et ainsi la production d'oxygène singulet pourrait être potentialisée.

Ces mesures préliminaires de l'impact du clivage de la liaison ester sur la production d'oxygène singulet de la Ce6 nécessitent de nombreux contrôles avec la Ce6 libre dans les mêmes conditions expérimentales testées (pH, acide, base). Néanmoins, ces résultats nous suggèrent qualitativement que la production d'oxygène singulet des NPs est fortement potentialisée par le clivage de la liaison ester qui relie la Ce6 au dendrimère. L'oxygène singulet étant l'acteur majeur de l'efficacité PDT, le relargage de la Ce6 à partir des NPs laisse présager un effet PDT augmenté.

TAB. 5.1 Temps de vie de l'état triplet des nanoparticules clivables et le temps de vie de l'oxygène singulet dans les différentes solutions (eau, pH = 11 et pH = 7).

	$\tau_T$ ( $\mu\text{s}$ )	$\tau_\Delta$ ( $\mu\text{s}$ )
	+/- 0,1	+/- 0,2
<b>NP Non-clivée</b>	7,3	2,4
<b>NP Clivée (pH = 11)</b>	1,8	3,8
<b>NP Clivée (pH = 7)</b>	1,8	3,5

A partir des mesure de production d'oxygène singulet par détection de la luminescence à 1260 nm, deux paramètres, indicateurs de l'état de la Ce6 et de son environnement, peuvent être déterminés : le temps de vie de l'état triplet de la Ce6 ( $\tau_T$ ) et le temps de vie de l'oxygène singulet ( $\tau_\Delta$ ). Ces temps de vie sont recensés en TAB. 5.1.

A la suite du clivage de la liaison ester, le temps de vie de l'état triplet de la Ce6 est diminué de 7,3 à 1,8  $\mu\text{s}$  (TAB. 5.1). Cette diminution de 4 fois du temps de vie peut être attribuée à une plus grande accessibilité de la Ce6 libre à l'oxygène moléculaire dissout dans le solvant. Ainsi, un long temps de vie de l'état triplet du PS, indiquerait une faible disponibilité de l'oxygènes moléculaire à proximité du PS. Dans cette configuration, il est raisonnable de penser que l'oxygène ne peut pas accéder aussi rapidement à la Ce6 liée en périphérie du dendrimère qu'à la Ce6 libre. En périphérie du dendrimère, la concentration locale en Ce6 est élevée (~32 molécules de Ce6/dendrimère) et peut limiter le nombre de molécules d'oxygène disponible par molécule de Ce6. A la suite du clivage, la Ce6 se retrouve libre dans le solvant et devrait ainsi être plus accessible aux quenchers dissout dans le solvant. La Ce6 libre dans son état triplet sera quencher plus rapidement et son temps de vie de l'état triplet sera par conséquent diminué. Une étude a démontré que l'inclusion de porphyrines au sein de cyclodextrine, augmentait considérablement le temps de vie de leur état triplet [248]. En effet, l'inclusion dans la cavité interne des cyclodextrines procure une protection des porphyrines contre leur quenching par collision avec les molécules du solvant. Ainsi dans cette étude les changements de temps de vie de l'état triplet du PS à la suite de leur conjugaison aux cyclodextrines ont été attribués

aux modifications d'interactions entre les molécules du solvant et la porphyrine libre ou complexée aux cyclodextrines.

Le temps de vie de l'oxygène singulet dans l'eau est habituellement de  $3,7 \pm 0,1 \mu\text{s}$  [103]. Par conséquent, les temps de vie de l'oxygène singulet mesurés dans l'eau doivent toujours se situer aux alentours de cette valeur, comme c'est le cas pour les mesures post clivage des NPs à pH 11 et 7 avec des temps de vie respectifs de 3,8 et 3,5  $\mu\text{s}$  (TAB. 5.1). Par contre, l'amplitude du signal de luminescence mesuré avant le clivage des NPs étant faible, elle remet en cause la fiabilité du temps de vie mesuré à 2,4  $\mu\text{s}$ .

Pour finir on observe que la neutralisation du pH à 7 après le clivage (pH = 11) n'influence pas les temps de vie de l'état triplet ou de l'oxygène singulet.

### *Etude préliminaire in vivo des nanoparticules clivables*

La caractérisation des NPs ayant démontrée la potentialité de l'utilisation d'une liaison ester clivable entre la Ce6 et les dendrimères. Le tumorotropisme des NPs clivables a été testé *in vivo* sur un modèle de souris « *nude* » porteuse de tumeur HT29, par imagerie de fluorescence. Cette étude préliminaire est présentée en FIG. 5.4. Suite à leur injection i.v. les NPs clivables s'accumulent rapidement dans les tissus tumoraux, délimités par un cercle violet, dès 30 min post-injection. Cette localisation tumorale des NPs clivables est supérieure au reste du corps à partir de 4 h et persiste jusqu'à 24 h post-injection.

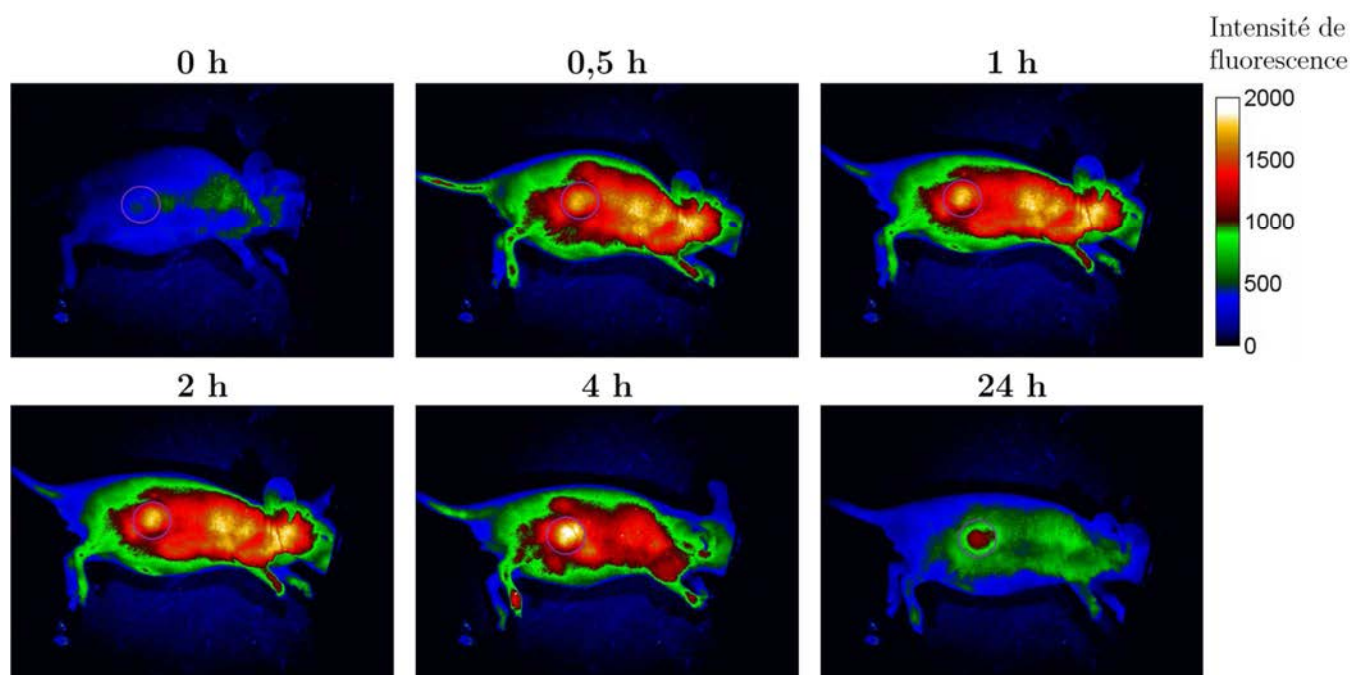


FIG. 5.4 Imagerie de fluorescence de souris « *nude* » porteuses de tumeur HT29 injectée en i.v. avec une solution de nanoparticules clivables ( $[\text{Ce6}] = 2,5 \text{ mg/kg}$ ).

Le cercle violet indique l'emplacement de la tumeur. (n = 2)

Comparativement aux résultats obtenus avec la Ce6, présentés dans le (§4.2), qui démontrent une localisation tumorale maximale à 1h post-injection associée à une élimination rapide, les NPs clivables présentent une accumulation tumorale accrue qui persiste dans le temps. Cependant ces résultats sont qualitatifs et nécessitent des expériences complémentaires pour confirmer ces résultats. Nottament les essais seront réalisés sur le même model murin que dans l'étude précédente, des souris « *nude* » porteuses de tumeurs FaDu.

## 5.4 Conclusion

Les résultats prometteurs obtenus dans ce chapitre, nous permettent d'envisager la suite de l'étude avec l'utilisation en solution d'estérase de foie bovine pour cliver les liaisons esters. *In vitro* et *in vivo*, la conjugaison de la Ce6 en périphérie des dendrimères *via* une liaison ester clivable permettrait d'obtenir une NP qui en absence d'enzyme produit peu d'oxygène singulet comparé à la Ce6 libre. Puis sous l'action d'estérases la liaison ester sera clivée, la Ce6 sera libérée et la production d'oxygène singulet sera potentialisée.

En parallèle, en démontrant un fort rendement quantique de fluorescence, ces NPs ont pallié les limites observées *in vivo* avec les G4.5-Ce6+/-PEG en imagerie de fluorescence, tout en potentialisent la localisation tumorale de la Ce6.

L'ensemble des résultats recensés présente les NPs clivables composés de dendrimère PAMAM fonctionnalisé avec de la Ce6 *via* des liaisons ester comme des vecteurs prometteurs. Des études supplémentaires sont nécessaire pour dans un premier temps, mettre en évidence le clivage *in vitro* des liaisons ester et par la suite tester leur activité photodynamique *in vitro* puis *in vivo* sur un modèle murin préclinique.

## Discussion générale

Les dendrimères sont des macromolécules polymériques qui se caractérisent par une structure tridimensionnelle hautement ramifiée. Ils ont été étudiés durant ces dernières années comme système de transport de nombreuses molécules [171], [249] pour, potentialiser leur efficacité thérapeutique en diminuant les doses utilisées, réduire leur toxicité, améliorer leur profil de pharmacocinétique et cibler les tissus pathologiques. Du fait de leurs caractéristiques : une petite taille (2 - 10 nm de diamètre), une hydro-solubilité, une structure spécifique comprenant des cavités internes et de nombreux groupements périphériques fonctionnalisables, les dendrimères sont de vecteurs prometteurs pour des composés photosensibilisants. La vectorisation des photosensibilisateurs par greffage covalent et par encapsulation permet leur monomérisation, leur solubilisation, et potentialise leur activité photosensibilisatrice. Un avantage supplémentaire des systèmes de vectorisation est la possibilité de cibler passivement des tissus tumoraux grâce à l'effet EPR. Dans ce contexte, de nouvelles formulations photoactivables à base de dendrimère ont été développées pour favoriser l'efficacité des traitements PDT. Quatre constructions, présentant chacune des avantages et des inconvénients, ont été recensées dans la littérature [215]. Néanmoins, une construction permettant le greffage covalent d'un grand nombre de PS en périphérie des dendrimères a retenu notre attention. Elle pourrait permettre d'obtenir une concentration tumorale élevée en PS, nécessaire pour un traitement photodynamique. De plus, l'utilisation de liaisons covalentes évite le relargage non contrôlé des PS observé lors de leur complexation non-covalente à des NPs tels que des liposomes [250].

Les dendrimères Poly(amidoamine) (PAMAM) se présentent actuellement comme la classe de dendrimères qui est la moins toxique, non-immunogène, la plus étudiée pour des applications biomédicales et commercialement disponible [179], [251]. Leur synthèse est une répétition de séquence d'étapes réactionnelles qui donne lieu à une génération de dendrimère supérieure (G1 - 2 - 3 - 4...) dont chacune présente une taille et un nombre de groupements amine périphériques croissants. Chaque séquence de synthèse des dendrimères PAMAM se compose de 2 étapes réactionnelles qui peuvent être interrompues pour donner naissance à des demi-génération (G1.5 - 2.5 - ...) présentant en surface des groupements carboxyle. Les groupements de surface, amine et carboxyle, procurent respectivement une charge de surface positive et négative aux dendrimères de génération complète et de demi-génération. Ainsi, les générations complètes, de par leurs

interactions avec les membranes cellulaires chargées négativement, présentent une toxicité supérieure aux demi-génération [180].

Pour cette étude, nous avons synthétisé deux constructions à base de dendrimères PAMAM de génération 4.5 ou 5 respectivement fonctionnalisés avec 32 molécules de Chlorine e6 (Ce6) conjuguées *via* une liaison covalente de type amide (G4.5-Ce6 et G5-Ce6). La Ce6 est un photosensibilisateur choisi pour ses propriétés photophysiques favorables [44] et sa structure moléculaire comportant 3 groupements COOH qui facilite son greffage covalent à de nombreux vecteurs. La caractérisation des NPs en solution a permis de déterminer que le greffage covalent de la Ce6 n'a pas dramatiquement altéré ses propriétés photophysiques essentielles à la PDT (rendement quantique en oxygène singulet), comparé à d'autres études où le greffage de la Pheo-a à des dendrimères PPI a diminué de 10 fois le  $\Phi_{\Delta}$  [234]. En effet, il est fréquent que la complexation de PSs à des NPs diminue le rendement quantique d'oxygène singulet due à un quenching des PSs qui conduit par la suite à une diminution de leur efficacité PDT [225], [234].

Par la suite, sur une lignée cellulaire squameuse de carcinome de pharynx humaine (FaDu), l'utilisation de faible concentration de dendrimère n'a pas mis en évidence une cytotoxicité accrue des dendrimères G5 ou G4.5. La vectorisation de la Ce6 par les dendrimères a globalement potentialisé son efficacité PDT en augmentant son internalisation cellulaire. Néanmoins, les G5-Ce6 ont présenté une efficacité PDT moindre comparé au G4.5-Ce6, qui s'est caractérisée par une production intracellulaire d'oxygène singulet limitée. Les polyamines en milieu biologique sont des quenchers de l'oxygène singulet et, du fait de leur charge positive, peuvent réduire la production d'oxygène singulet des PSs chargés négativement par la mise en place d'interactions ioniques [64], [237].

Pour de futures études *in vivo*, des groupements de furtivité Poly(éthylèneglycol) (PEG) ont été conjugués en périphérie des G4.5-Ce6, afin d'augmenter leur temps de vie dans la circulation sanguine en limitant leur reconnaissance par le RES [193]. Ainsi la suite de l'étude sur les FaDu a été réalisée avec les G4.5-Ce6 +/-PEG. La concentration en Ce6 induisant 50% de mortalité cellulaire ( $IC_{50}$ ), des G4.5-Ce6 et des G4.5-Ce6-PEG a été respectivement 3 et 7 fois inférieure à celle de la Ce6 libre. Le même ordre d' $IC_{50}$  a été observé auparavant avec des dendrimères aryl ether à cœur de Zn-porphyrine dans les mêmes conditions expérimentales [221]. L'explication la plus pertinente est que les dendrimères PAMAM favorisent l'internalisation cellulaire de la Ce6. La concentration intracellulaire en Ce6 est plus importante avec l'utilisation des deux constructions dendrimériques comparé à la Ce6 libre. Indépendamment des concentrations incubées, l'incorporation de la Ce6 est globalement augmentée d'un facteur de 10 avec les G4.5-Ce6 et de 22 avec les G4.5-Ce6-PEG. La différence d'internalisation de 2 fois observée entre les G4.5-Ce6 et les G4.5-Ce6-PEG, est le résultat de la présence des PEG chargés

négativement qui limite les interactions entre les NPs et les membranes cellulaires aboutissant à une réduction de leur incorporation [252]. Ce phénomène est connu sous le nom de « PEG dilemma » [253].

Les études à 4°C, température inhibant l'ensemble des mécanismes actifs d'internalisation, ont démontré que les G4.5-Ce6+/-PEG sont incorporés *via* un mécanisme d'endocytose, contrairement à la Ce6 libre qui traverse par diffusion passive les membranes plasmiques [43], [254]–[256]. A la suite d'inhibitions spécifiques des différentes voies d'endocytose, l'intervention de la voie d'endocytose clathrine dépendante (CME pour « *clathrin-mediated endocytosis* ») dans l'internalisation des G4.5-Ce6 a été mise en évidence. Shcharbin *et al.* ont démontré que les composants du sérum s'absorbent en surface de dendrimères PAMAM identiques au nôtre, et forment des complexes qui procurent la reconnaissance récepteur-ligand nécessaire au CME [257]. D'autre part, comme il a souvent été démontré que la présence de PEG en surface des NPs limite l'absorption des protéines du sérum [258], [259], et explique pourquoi l'internalisation des G4.5-Ce6-PEG n'est pas altérée par l'inhibition de CME. Dû à leur charge négative, les G4.5-Ce6-PEG sont internalisés par la voie d'endocytose médiée par les calvéolines, un mécanisme récepteur indépendant. En accord avec nos résultats, il a été rapporté que les dendrimères PAMAM G3.5 chargés négativement sont endocytés par la voie dépendante des calvéolines [260]. Il a été démontré, sur des cellules tumorales épithéliales comme les FaDu, que les molécules internalisées par les voies d'endocytose clathrine et calvéoline dépendantes s'accumulent dans les lysosomes [261]. Ainsi les G4.5-Ce6+/-PEG ont démontré une localisation lysosomale prononcée contrairement à la Ce6 libre qui est internalisée par diffusion passive.

Pour obtenir une efficacité PDT optimale des NPs, la Ce6 doit être relarguée des dendrimères et s'échapper des lysosomes pour se redistribuer dans les organites plus propices à induire la mort cellulaire [262]. Cependant, *in vitro* à la suite d'une incubation et d'une irradiation, les mesures d'imagerie de temps de vie de fluorescence (FLIM pour « *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* ») ont démontré que les G4.5-Ce6+/-PEG ne permettent pas le relargage de la Ce6. Cette séquestration lysosomale associée à un rendement quantique d'oxygène singulet limité des G4.5-Ce6+/-PEG, peut expliquer l'efficacité PDT 3 fois inférieure des NPs comparé à la Ce6 libre. Pour des concentrations intracellulaires identiques, l'oxygène singulet, qui est l'espèce cytotoxique majoritairement responsable de l'efficacité PDT, présente un temps de vie compris entre 10-330 ns dans un milieu biologique [63]. Ce court temps de vie limite la diffusion de l'oxygène singulet à une distance de 10 à 55 nm dans la cellule [66], [263], qui réduit les effets phototoxiques à la localisation immédiate du PS [264]. C'est la raison pour laquelle une localisation lysosomale semble être moins favorable en terme de phototoxicité qu'une localisation dans le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie [262].



Néanmoins, les G4.5-Ce6+/-PEG présentant une localisation lysosomale préférentielle pourrait, combiné à un agent de chimiothérapie, être appliqués à l'internalisation photochimique (« *photochemical internalization* », PCI). La PCI repose sur la dégradation, par photoactivation des PS, des endosomes et des lysosomes qui contiennent à la fois les PSs et l'agent thérapeutique. L'agent thérapeutique sera ainsi libéré dans l'espace intracellulaire et son action sera accrue. Notamment, en 2011 des micelles composées de dendrimères à cœur de Zn-phthalocyanine à forte localisation lysosomale ont permis, *via* la PCI, de surpasser la résistance à la doxorubicine et de potentialiser son efficacité antitumorale [227]. Durant l'irradiation, les micelles sont transloquées des lysosomes vers le cytoplasme et permettent ainsi à la DOX co-localisée avec elles d'être libérées dans le cytoplasme et de se relocaliser dans le noyau, qui est son site d'action.

*In vivo*, les G4.5-Ce6-PEG présentant une faible fluorescence en milieu biologique comparée à la Ce6, rendent impossible le suivi de leur distribution par imagerie de fluorescence. Dans notre étude, l'imagerie *in vivo* n'est pas représentative de l'accumulation tumorale des NPs. En effet des techniques d'extraction chimique sont nécessaires pour quantifier leur biodistribution. Cependant une faible fluorescence des NPs laisse généralement présager une efficacité photodynamique limitée. Ainsi l'optimisation des G4.5-Ce6-PEG semble être indispensable. Le relargage de la Ce6 des NPs permettrait de rétablir la fluorescence de la Ce6 et par conséquent permettre leur utilisation en imagerie *in vivo*.

Dans ce contexte, notre stratégie pour potentialiser l'efficacité PDT des NPs dendrimériques a été de concevoir et de synthétiser des NPs clivables. Ainsi, la Ce6 a été conjuguée *via* une liaison ester aux dendrimères PAMAM G5 qui présentent en surface des groupements alcool. Les liaisons ester étant sensible au pH, il est possible de mimer l'action des estérases en clivant les liaisons ester par alcalinisation du milieu.

La production d'oxygène singulet par les NPs a été monitorée en solution, en présence d'un pH neutre ou basique qui respectivement n'affecte pas ou clive la liaison ester. Les NPs ont démontré dans un premier temps une faible production d'oxygène singulet, qui à la suite du clivage de la liaison ester, a été restaurée. Ainsi, *in vitro* en présence d'estérase, la liaison ester reliant la Ce6 au dendrimère sera clivée et engendrera le relargage de la Ce6 qui retrouvera ses propriétés photophysiques de base. Les dendrimères étant principalement incorporés par endocytose se retrouvent séquestrés dans les lysosomes qui contiennent une concentration élevée d'estérase. Ainsi, les liaisons esters pourront être clivées et la Ce6 sera relarguée des dendrimères [265]. La Ce6 libre, pourra par la suite se relocaliser dans le cytoplasme et dans les membranes cellulaires dont les membranes des organites clés de la mort cellulaire tels que la mitochondrie [40], [43], [142], [148], [266]. En favorisant une relocalisation sub-cellulaire et un rétablissement des

propriétés photophysiques de la Ce6, les NPs clivables devraient palier les limitations observées *in vitro* avec les G4.5-Ce6+/-PEG.

Contrairement au G4.5-Ce6+/-PEG testé antérieurement, les NPs clivables présentent un rendement quantique de fluorescence identique à celui de la Ce6 libre, qui permet le suivi de leur biodistribution par imagerie de fluorescence. L'étude préliminaire de biodistribution des NPs clivables par imagerie de fluorescence sur un modèle murin porteur de tumeur HT29, a démontré le potentiel de ciblage tumoral des NPs.

L'ensemble des résultats accumulés dans cette étude présente les NPs à base de dendrimère PAMAM comme des vecteurs de choix pour la PDT. Néanmoins, leur efficacité anticancéreuse nécessite d'être testée *in vitro* et *in vivo*.

## Conclusions et perspectives

Pour conclure, les nanoparticules (G4.5-Ce6+/-PEG) à base de dendrimère PAMAM fonctionnalisé avec la Chlorine e6 (Ce6) présentent :

- des caractéristiques photophysiques favorables avec des rendements quantiques d'oxygène singulet et de fluorescence de la Ce6 modérément affectés par sa conjugaison covalente en périphérie du dendrimère,
- *in vitro* une efficacité photodynamique bien supérieure à la Ce6 libre,
- une internalisation cellulaire supérieure à la Ce6 *via* un mécanisme actif d'endocytose,
- à la suite de leur incorporation, une localisation lysosomale préférentielle, moins propice à induire la mort cellulaire qu'une localisation dans d'autres organites,

→ *La localisation lysosomale préférentielle des NPs associée à une réduction de la production d'oxygène singulet limite leur efficacité photodynamique.*

Ainsi, la suite de l'étude a permis la caractérisation préliminaire de NPs qui permettent le relargage contrôlé de la Ce6 sous l'action d'estérases. Elle a démontré :

- un rétablissement de la production d'oxygène singulet de la Ce6 suite à son relargage en solution,
- une accumulation tumorale préférentielle,

→ *Cette nouvelle conformation de NP présente des propriétés photobiologiques avantageuses qui pourraient surpasser les limitations observées avec les G4.5-Ce6+/-PEG.*

Les nanoparticules à base de dendrimère PAMAM sont des candidats prometteurs pour vectoriser la Chlorine e6 lors d'un traitement photodynamique.

## ***Perspectives***

Les perspectives majeures de ce travail sont (1) de caractériser en détails les propriétés photochimiques des nouvelles NP clivables, (2) d'étudier *in vitro* leur comportement en milieu biologique, (3) de tester *in vivo* leur stabilité et (4) d'analyser leur spécificité tumorale et leur efficacité photodynamique.

La caractérisation photochimique est l'étape prédéterminante essentielle à toute étude de NP. Ainsi, la production d'oxygène singulet doit être testée en solution en présence d'estérase qui seront capables de cliver la liaison ester reliant la Ce6 au dendrimère. La composition de la NP devra être optimisée afin de d'obtenir un clivage optimal des liaisons ester. En effet, l'efficacité du relargage dépend de l'accessibilité des enzymes aux sites de clivages et du nombre de molécules de Ce6 greffées en périphérie des dendrimères. Ces deux paramètres seront optimisés.

L'activité photodynamique, leur mécanisme d'internalisation et leurs localisations sub-cellulaires seront déterminés. Du fait de leur taille, les NPs seront, comme les G4.5-Ce6+/-PEG, internalisées par endocytose et auront une localisation lysosomale préférentielle. Les lysosomes renfermant une grande quantité d'estérase, les liaisons ester reliant la Ce6 au dendrimère seront clivées. Ainsi libre, la Ce6 pourra s'échapper des lysosomes pour se relocaliser dans les autres organites cellulaires. Une étude portant sur des dendrimères PAMAM conjugués *via* une liaison clivable à la doxorubicine (DOX), a démontré que ces NPs ont permis de potentialiser l'internalisation de la DOX et ont permis son relargage des lysosomes dans les cellules cancéreuses [267].

Les liaisons ester sont clivables par les esterases qui sont présentes dans le plasma sanguin [268]. Ainsi, la détermination de la stabilité des NPs dans le plasma est d'autant plus importante que la Ce6 peut y être relarguée. La stabilité des NPs est dépendante du type de liaisons ester utilisées [269] et conditionnera la suite de l'étude. Ces NPs présentant un fort rendement quantique de fluorescence, leur biodistribution sera suivie par imagerie de fluorescence pour déterminer les paramètres (Temps drogue-lumière) essentiels au traitement PDT qui suivra.

Les dendrimères fonctionnalisés avec la Ce6 présentent de nombreux groupements de surface et des cavités internes libres. Ainsi un agent de diagnostic peut être complexé aux NPs pour synthétiser une nanoplateforme de « théranostique » fonctionnelle pour le diagnostic et le traitement antitumoral.

# Production scientifique

## Revue Internationale avec comité de lecture

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Steffen Hackbarth, Dominique Dumas, Jordan Jasniewski, Beate Roeder, Lina Bezdetnaya and Henri-Pierre Lassalle. “Covalently loaded Chlorin e6 on PAMAM dendrimers for enhanced photodynamic effect”. *Photochemical and Photobiological Sciences*, accepted 05/10/2015.

## Communications Internationales avec comité de lecture et actes

### Communication orale

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Lina Bezdetnaya, Beate Röder, Steffen Hackbarth, Annegret Preuß, Jordane Jasniewski, Vadzim Reshetov, Henri-Pierre Lassalle. “*In vitro* photophysical and photobiological properties of Ce6-based dendrimer nanoparticles”. *Congress of European Society of Photobiology (ESP)*, Sep. 2013, Liège, Belgium. pp.CDROM, 2013.

### Communication affichée

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Lina Bezdetnaya, Beate Röder, Steffen Hackbarth, Annegret Preuß, Jordane Jasniewski, Henri-Pierre Lassalle. “*In vitro* photophysical and photobiological properties of Ce6-based dendrimer nanoparticles”. *Congress of French Society for Nanomedicine (SFNano)*, 2014, Nancy, France.

## Communications Nationales

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Lina Bezdetnaya, Beate Röder, Steffen Hackbarth, Annegret Preuß, Jordane Jasniewski, Henri-Pierre Lassalle. “*In vitro* photophysical and photobiological properties of Chlorin e6-based dendrimer nanoparticles”. *Journée DocSciLor 2013*, Pont à Mouson, France.

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Lina Bezdetnaya, Beate Röder, Steffen Hackbarth, Annegret Preuß, Jordane Jasniewski, Henri-Pierre Lassalle. “Caractérisation photobiologique *in vitro* d’une nouvelle nanoparticule photoactivable” *9<sup>ème</sup> journée de la recherche biomédicale*, 2014, Faculté de Médecine de Nancy, France.

**2<sup>ème</sup> prix des communications écrites en recherche expérimentale**

**Estelle Bastien**, Raphael Schneider, Lina Bezdetnaya, Beate Röder, Steffen Hackbarth, Annegret Preuß, Jordane Jasniewski, Henri-Pierre Lassalle. “*In vitro* photophysical and photobiological properties of Ce6-based dendrimer nanoparticles”. *Journée de l'école doctorale BioSE, 2015, Nancy, France.*

### **Communications présentées par des collaborateurs :**

Igor Yankovsky, **Estelle Bastien**, Vladimir Zorin, Lina Bezdetnaya. “Use of cyclodextrins to improve antitumor activity of mTHPC in human colon carcinoma HT-29 cells”. *Congress of European Society of Photobiology (ESP), Aug. 2015, Aveiro, Portugal.*

Igor Yankovsky, **Estelle Bastien**, Aurélie François, Vladimir Zorin, Lina Bezdetnaya. “Evaluation of photodynamic activity of chlorin-type photosensitizer with  $\beta$ -cyclodextrins nanovectors”. *Journée de l'école doctorale BioSE, 2014, Nancy, France*

**E. Bastien**, V. Reshetov, R. Schneider, A. François, L. Bezdetnaya, H.P. Lassalle. “Évaluation de l'efficacité thérapeutique *in vitro* d'une nanoparticule dendrimérique photoactivable”. *CNRS GDR 3049 PHOTOMED, 2012, Toulouse, France.*

# Bibliographie

- [1] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic therapy," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, no. 12, pp. 889–905, 1998.
- [2] R. Lipson and E. Baldes, "The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative," *Arch. Dermatol.*, vol. 82, no. 4, pp. 508–516, 1960.
- [3] R. Lipson, E. Baldes, and A. Olsen, "Further Evaluation of the Use of Hematoporphyrin Derivative as a New Aid for the Endoscopic Detection of Malignant Disease," *Dis. Chest*, vol. 46, no. 6, pp. 676–679, 1964.
- [4] T. Dougherty, J. Kaufman, A. Goldfarb, K. Weishaupt, D. Boyle, and A. Mittleman, "Photoradiation Therapy for Treatment of Malignant-Tumors," *Cancer Res.*, vol. 38, no. 8, pp. 2628–2635, 1978.
- [5] T. J. Dougherty, "An update on photodynamic therapy applications," *J. Clin. Laser Med. Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–7, Feb. 2002.
- [6] T. Dai, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy for localized infections-State of the art," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 6, no. 3–4, pp. 170–188, Dec. 2009.
- [7] A. Master, M. Livingston, and A. S. Gupta, "Photodynamic Nanomedicine in the Treatment of Solid Tumors: Perspectives and Challenges," *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 168, no. 1, pp. 88–102, May 2013.
- [8] C. Hopper, C. Niziol, and M. Sidhu, "The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK," *Oral Oncol.*, vol. 40, no. 4, pp. 372–382, avril 2004.
- [9] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic therapy of cancer: An update," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, Jul. 2011.
- [10] W. M. Sharman, C. M. Allen, and J. E. van Lier, "Role of activated oxygen species in photodynamic therapy," in *Singlet Oxygen, Uv-a, and Ozone*, vol. 319, L. Packer and H. Sies, Eds. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2000, pp. 376–400.
- [11] B. Halliwell, "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)," *Free Radic. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 261–272, Oct. 1999.
- [12] J. E. van Lier and J. D. Spikes, "The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines.," *Ciba Found. Symp.*, vol. 146, pp. 17–26; discussion 26–32, 1989.
- [13] N. L. Oleinick, R. L. Morris, and T. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2002.
- [14] D. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, May 2003.
- [15] R. D. Almeida, B. J. Manadas, A. P. Carvalho, and C. B. Duarte, "Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1704, no. 2, pp. 59–86, Sep. 2004.

- [16] S. Marchal, L. Bezdetnaya, and F. Guillemin, "Modality of cell death induced by Foscan-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29," *Biochem. Biokhimii*, vol. 69, no. 1, pp. 45–49, Jan. 2004.
- [17] S. Marchal, A. Fadloun, E. Maugain, M.-A. D'Hallewin, F. Guillemin, and L. Bezdetnaya, "Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan® photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 69, no. 8, pp. 1167–1176, avril 2005.
- [18] A. C. E. Moor, "Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 57, no. 1, pp. 1–13, août 2000.
- [19] Q. Peng, J. Moan, and J. M. Nesland, "Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy," *Ultrastruct. Pathol.*, vol. 20, no. 2, pp. 109–129, 1996.
- [20] J. Usuda, S. Chiu, E. S. Murphy, M. Lam, A.-L. Nieminen, and N. L. Oleinick, "Domain-dependent Photodamage to Bcl-2 a membrane anchorage region is needed to form the target of phtalocyanine photosensitization," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 3, pp. 2021–2029, Jan. 2003.
- [21] S. Marchal, A. François, D. Dumas, F. Guillemin, and L. Bezdetnaya, "Relationship between subcellular localisation of Foscan® and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells," *Br. J. Cancer*, vol. 96, no. 6, pp. 944–951, Mar. 2007.
- [22] S. Bonneau and C. Vever-Bizet, "Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 18, no. 9, pp. 1011–1025, Sep. 2008.
- [23] D. Kessel, R. Luguay, and M. G. H. Vicente, "Localization and Photodynamic Efficacy of Two Cationic Porphyrins Varying in Charge Distribution," *Photochem. Photobiol.*, vol. 78, no. 5, pp. 431–435, Nov. 2003.
- [24] M. Dewaele, H. Maes, and P. Agostinis, "ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy," *Autophagy*, vol. 6, no. 7, pp. 838–854, Oct. 2010.
- [25] J. J. Reiners, P. Agostinis, K. Berg, N. L. Oleinick, and D. H. Kessel, "Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy," *Autophagy*, vol. 6, no. 1, pp. 7–18, Jan. 2010.
- [26] W. M. Star, H. P. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. Versteeg, K. A. Franken, and H. S. Reinhold, "Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 2532–2540, 1986.
- [27] P. Mroz, A. Szokalska, M. X. Wu, and M. R. Hamblin, "Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response," *Plos One*, vol. 5, no. 12, p. e15194, Dec. 2010.
- [28] A. P. Castano, P. Mroz, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 535–545, Jul. 2006.
- [29] C. M. Brackett and S. O. Gollnick, "Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, no. 5, p. 649, 2011.
- [30] K. Pizova, K. Tomankova, A. Daskova, S. Binder, R. Bajgar, and H. Kolarova, "Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity," *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.*, vol. 156, no. 2, pp. 93–102, Jun. 2012.
- [31] L. Milla Sanabria, M. E. Rodríguez, I. S. Cogno, N. B. Rumie Vittar, M. F. Pansa, M. J. Lamberti, and V. A. Rivarola, "Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1835, no. 1, pp. 36–45, Jan. 2013.
- [32] M. Korbelik and I. Cecic, "Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy," *Cancer Lett.*, vol. 137, no. 1, pp. 91–98, Mar. 1999.



- [33] P. C. Kousis, B. W. Henderson, P. G. Maier, and S. O. Gollnick, "Photodynamic Therapy Enhancement of Antitumor Immunity Is Regulated by Neutrophils," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 21, pp. 10501–10510, Nov. 2007.
- [34] M. Korbelik, G. Kroszl, J. Kroszl, and G. J. Dougherty, "The Role of Host Lymphoid Populations in the Response of Mouse EMT6 Tumor to Photodynamic Therapy," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 24, pp. 5647–5652, Dec. 1996.
- [35] B. C. Wilson and M. S. Patterson, "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy," *Phys. Med. Biol.*, vol. 53, no. 9, pp. R61–R109, May 2008.
- [36] Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allémann, "State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 66, no. 2, pp. 89–106, Mar. 2002.
- [37] W.-S. Chan, J. F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell, and I. R. Hart, "Effect of Sulfonation on the Cell and Tissue Distribution of the Photosensitizer Aluminum Phthalocyanine," *Cancer Res.*, vol. 50, no. 15, pp. 4533–4538, Aug. 1990.
- [38] S. Bonneau, P. Morlière, and D. Brault, "Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, no. 7, pp. 1443–1452, Oct. 2004.
- [39] I. Tannock and D. Rotin, "Acid Ph in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation," *Cancer Res.*, vol. 49, no. 16, pp. 4373–4384, Aug. 1989.
- [40] B. Cunderlíková, L. Gangeskar, and J. Moan, "Acid–base properties of chlorin e 6: relation to cellular uptake," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 53, no. 1, pp. 81–90, 1999.
- [41] R. W. Boyle and D. Dolphin, "Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers\*," *Photochem. Photobiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 469–485, Sep. 1996.
- [42] A. A. Krasnovsky, "Photoluminescence of Singlet Oxygen in Pigment Solutions," *Photochem. Photobiol.*, vol. 29, no. 1, pp. 29–36, Jan. 1979.
- [43] H. Mojzisoava, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, and D. Brault, "Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1768, no. 11, pp. 2748–2756, Nov. 2007.
- [44] E. Zenkevich, E. Sagun, V. Knyuksho, A. Shulga, A. Mironov, O. Efremova, R. Bonnett, S. P. Songca, and M. Kassem, "Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 33, no. 2, pp. 171–180, avril 1996.
- [45] F. Vargas, Y. Díaz, V. Yartsev, A. Marcano, and A. Lappa, "Photophysical Properties of Novel PDT Photosensitizer Radachlorin in Different Media," *Ciencia*, vol. 12, no. 1, 2004.
- [46] E. V. Kochneva, E. V. Filonenko, E. G. Vakulovskaya, E. G. Scherbakova, O. V. Seliverstov, N. A. Markichev, and A. V. Reshetnikov, "Photosensitizer Radachlorin®: Skin cancer PDT phase II clinical trials," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 7, no. 4, pp. 258–267, décembre 2010.
- [47] E. V. Filonenko, V. V. Sokolov, V. I. Chissov, E. A. Lukyanets, and G. N. Vorozhtsov, "Photodynamic therapy of early esophageal cancer," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 5, no. 3, pp. 187–190, Sep. 2008.
- [48] S. Douillard, D. Olivier, and T. Patrice, "In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 405–413, Mar. 2009.
- [49] S. Douillard, I. Lhommeau, D. Olivier, and T. Patrice, "In vitro evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 98, no. 2, pp. 128–137, février 2010.
- [50] H. Hwang, R. Biswas, P.-S. Chung, and J.-C. Ahn, "Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 128, pp. 70–77, Nov. 2013.

- [51] S.-M. Bae, Y.-W. Kim, J.-M. Lee, S.-E. Namkoong, S.-J. Han, J.-K. Kim, C.-H. Lee, H.-J. Chun, H.-S. Jin, and W.-S. Ahn, "Photodynamic Effects of Radachlorin® on Cervical Cancer Cells," *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.*, vol. 36, no. 6, pp. 389–394, Dec. 2004.
- [52] W. Ji, J. Yoo, E. K. Bae, J. H. Lee, and C.-M. Choi, "The effect of Radachlorin® PDT in advanced NSCLC: A pilot study," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 120–126, mai 2013.
- [53] J. Y. Lee, R. R. Diaz, K. S. Cho, M. S. Lim, J. S. Chung, W. T. Kim, W. S. Ham, and Y. D. Choi, "Efficacy and Safety of Photodynamic Therapy for Recurrent, High Grade Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Refractory or Intolerant to Bacille Calmette-Guérin Immunotherapy," *J. Urol.*, vol. 190, no. 4, pp. 1192–1199, Oct. 2013.
- [54] H. Mirzaei, G. E. Djavid, M. Hadizadeh, M. Jahanshahi-Moghadam, and P. Hajian, "The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 142, pp. 86–91, Jan. 2015.
- [55] L. E. Gerweck and K. Seetharaman, "Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 6, pp. 1194–1198, Mar. 1996.
- [56] H. Park and K. Na, "Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy," *Biomaterials*, vol. 34, no. 28, pp. 6992–7000, Sep. 2013.
- [57] Z. Li, C. Wang, L. Cheng, H. Gong, S. Yin, Q. Gong, Y. Li, and Z. Liu, "PEG-functionalized iron oxide nanoclusters loaded with chlorin e6 for targeted, NIR light induced, photodynamic therapy," *Biomaterials*, vol. 34, no. 36, pp. 9160–9170, Dec. 2013.
- [58] P. Huang, J. Lin, S. Wang, Z. Zhou, Z. Li, Z. Wang, C. Zhang, X. Yue, G. Niu, M. Yang, D. Cui, and X. Chen, "Photosensitizer-conjugated silica-coated gold nanoclusters for fluorescence imaging-guided photodynamic therapy," *Biomaterials*, vol. 34, no. 19, pp. 4643–4654, Jun. 2013.
- [59] C. Schweitzer and R. Schmidt, "Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen," *Chem. Rev.*, vol. 103, no. 5, pp. 1685–1757, May 2003.
- [60] G. Herzberg, *Molecular Spectra and Molecular Structure. Volume I: Spectra of Diatomic Molecules. Second Edition*, Hardcover., vol. 1. 1950.
- [61] P. B. Merkel and D. R. Kearns, "Direct measurement of the lifetime of  $1\Delta$  oxygen in solution," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 12, no. 1, pp. 120–122, décembre 1971.
- [62] M. J. Davies, "Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 305, no. 3, pp. 761–770, Jun. 2003.
- [63] A. Baker and J. R. Kanofsky, "Quenching of Singlet Oxygen by Biomolecules from L1210 Leukemia Cells," *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, no. 4, pp. 523–528, avril 1992.
- [64] F. Wilkinson, W. Helman, and A. Ross, "Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular-Oxygen in Solution - an Expanded and Revised Compilation," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 24, no. 2, pp. 663–1021, Apr. 1995.
- [65] M. Monroe and K. Abrams, "Chain-Reaction Wheel - an Approach to Free-Radical Reactions," *J. Chem. Educ.*, vol. 62, no. 6, pp. 467–467, 1985.
- [66] J. Moan, "On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 6, no. 3, pp. 343–344, juillet 1990.
- [67] J. Moan and K. Berg, "The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen," *Photochem. Photobiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 549–553, avril 1991.
- [68] I. Kruk, *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Springer, 2013.
- [69] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 233, pp. 351–371, Nov. 2002.
- [70] H. Mojzisoava, S. Bonneau, P. Maillard, K. Berg, and D. Brault, "Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, no. 6, pp. 778–787, 2009.

- [71] P. Nowak-Sliwinska, A. Karocki, M. Elas, A. Pawlak, G. Stochel, and K. Urbanska, "Verteoporphin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 349, no. 2, pp. 549–555, Oct. 2006.
- [72] H. Wu, Q. Song, G. Ran, X. Lu, and B. Xu, "Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods," *Trac-Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 1, pp. 133–141, Jan. 2011.
- [73] B. Li, H. Lin, D. Chen, B. C. Wilson, and Y. Gu, "Singlet Oxygen Detection During Photosensitization," *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 6, no. 1, p. 1330002, Jan. 2013.
- [74] X. Chen, X. Tian, I. Shin, and J. Yoon, "Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 9, pp. 4783–4804, 2011.
- [75] K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, and T. Nagano, "Rational design of fluorescein-based fluorescence probes, mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 11, pp. 2530–2536, Mar. 2001.
- [76] N. Umezawa, K. Tanaka, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, and T. Nagano, "Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 38, no. 19, pp. 2899–2901, Oct. 1999.
- [77] E. M. Hotze, A. R. Badireddy, S. Chellam, and M. R. Wiesner, "Mechanisms of Bacteriophage Inactivation via Singlet Oxygen Generation in UV Illuminated Fullerol Suspensions," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 17, pp. 6639–6645, Sep. 2009.
- [78] T. T. T. Tam, A. Juzeniene, A. H. Steindal, V. Iani, and J. Moan, "Photodegradation of 5-methyltetrahydrofolate in the presence of Uroporphyrin," *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 201–204, Mar. 2009.
- [79] Y. Shen, H. Y. Lin, Z. F. Huang, D. F. Chen, B. H. Li, and S. S. Xie, "Indirect imaging of singlet oxygen generation from a single cell," *Laser Phys. Lett.*, vol. 8, no. 3, pp. 232–238, Mar. 2011.
- [80] M. Price, J. J. Reiners, A. M. Santiago, and D. Kessel, "Monitoring Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Formation with Fluorescent Probes During Photodynamic Therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1177–1181, Oct. 2009.
- [81] F. Yan, Y. Zhang, K. S. Kim, H.-K. Yuan, and T. Vo-Dinh, "Cellular Uptake and Photodynamic Activity of Protein Nanocages Containing Methylene Blue Photosensitizing Drug," *Photochem. Photobiol.*, vol. 86, no. 3, pp. 662–666, Jun. 2010.
- [82] Y. Zhang, K. Aslan, M. J. R. Previte, and C. D. Geddes, "Plasmonic engineering of singlet oxygen generation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 6, pp. 1798–1802, Feb. 2008.
- [83] C. Flors, M. J. Fryer, J. Waring, B. Reeder, U. Bechtold, P. M. Mullineaux, S. Nonell, M. T. Wilson, and N. R. Baker, "Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green (R)," *J. Exp. Bot.*, vol. 57, no. 8, pp. 1725–1734, 2006.
- [84] E. Hideg, "A comparative study of fluorescent singlet oxygen probes in plant leaves," *Cent. Eur. J. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 273–284, Sep. 2008.
- [85] X. Ragàs, L. P. Cooper, J. H. White, S. Nonell, and C. Flors, "Quantification of photosensitized singlet oxygen production by a fluorescent protein," *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, vol. 12, no. 1, pp. 161–165, Jan. 2011.
- [86] H. Lin, Y. Shen, D. Chen, L. Lin, B. C. Wilson, B. Li, and S. Xie, "Feasibility Study on Quantitative Measurements of Singlet Oxygen Generation Using Singlet Oxygen Sensor Green," *J. Fluoresc.*, vol. 23, no. 1, pp. 41–47, Jan. 2013.
- [87] J. Mosinger, K. Lang, J. Hostomský, J. Franc, J. Sýkora, M. Hof, and P. Kubát, "Singlet Oxygen Imaging in Polymeric Nanofibers by Delayed Fluorescence," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 48, pp. 15773–15779, Dec. 2010.
- [88] Y. He, D. Xing, G. Yan, and K. ichi Ueda, "FCLA chemiluminescence from sonodynamic action in vitro and in vivo," *Cancer Lett.*, vol. 182, no. 2, pp. 141–145, Aug. 2002.
- [89] N. Yasuta, N. Takenaka, and T. Takemura, "Mechanism of photosensitized chemiluminescence of 2-methyl-6-phenylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one (CLA) in aqueous solution," pp. 451–452, 1999.

- [90] D. Zhu, D. Xing, Y. Wei, X. Li, and B. Gao, "Evaluation of the degree of medical radiation damage with a highly sensitive chemiluminescence method," *Lumin. J. Biol. Chem. Lumin.*, vol. 19, no. 5, pp. 278–282, Oct. 2004.
- [91] J. Baier, T. Fuss, C. Pöllmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landthaler, and W. Bäuml, "Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 87, no. 3, pp. 163–173, Jun. 2007.
- [92] A. A. Krasnovskii, "[Photosensitized luminescence of singlet oxygen in solution]," *Biofizika*, vol. 21, no. 4, pp. 748–749, Aug. 1976.
- [93] E. Furui, N. Akai, A. Ida, A. Kawai, and K. Shibuya, "Observation of collision-induced near-IR emission of singlet oxygen O<sub>2</sub> a<sub>1</sub>Δ<sub>g</sub> generated by visible light excitation of gaseous O<sub>2</sub> dimol," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 471, no. 1–3, pp. 45–49, Mar. 2009.
- [94] S. Oelckers, M. Sczapan, T. Hanke, and B. Roder, "Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghost suspensions," *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 219–223, Jul. 1997.
- [95] S. Oelckers, T. Ziegler, I. Michler, and B. Roder, "Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red-cell ghost suspensions: concerning a signal component that can be attributed to O-1(2) luminescence from the inside of a native membrane," *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, vol. 53, no. 1–3, pp. 121–127, Dec. 1999.
- [96] S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preuss, and B. Roeder, "New insights to primary photodynamic effects - Singlet oxygen kinetics in living cells," *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.*, vol. 98, no. 3, pp. 173–179, Mar. 2010.
- [97] A. Molnar, R. Dedic, A. Svoboda, and J. Hala, "Singlet oxygen production by lipophilic photosensitizers in liposomes studies by time and spectral resolved phosphorescence," *J. Mol. Struct.*, vol. 834, pp. 488–491, May 2007.
- [98] A. Molnar, R. Dedic, A. Svoboda, and J. Hala, "Spectroscopic study of singlet oxygen photogeneration by lipophilic photosensitiser in liposomes," *J. Lumin.*, vol. 128, no. 5–6, pp. 783–785, Jun. 2008.
- [99] L. M. Andersen, Z. Gao, P. R. Ogilby, L. Poulsen, and I. Zebger, "A singlet oxygen image with 2.5 μm resolution," *J. Phys. Chem. A*, vol. 106, no. 37, pp. 8488–8490, Sep. 2002.
- [100] I. Zebger, L. Poulsen, Z. Gao, L. K. Andersen, and P. R. Ogilby, "Singlet oxygen images of heterogeneous samples: Examining the effect of singlet oxygen diffusion across the interfacial boundary in phase-separated liquids and polymers," *Langmuir*, vol. 19, no. 21, pp. 8927–8933, Oct. 2003.
- [101] J. Schlothauer, S. Hackbarth, and B. Roeder, "A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination," *Laser Phys. Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 216–221, Mar. 2009.
- [102] S. Okazaki, T. Tomo, and M. Mimuro, "Direct measurement of singlet oxygen produced by four chlorin-ringed chlorophyll species in acetone solution," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 485, no. 1–3, pp. 202–206, Jan. 2010.
- [103] S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preuss, and B. Roeder, "Highly sensitive time resolved singlet oxygen luminescence detection using LEDs as the excitation source," *Laser Phys. Lett.*, vol. 10, no. 12, p. 125702, Dec. 2013.
- [104] M. Niedre, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, "Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo," *Photochem. Photobiol.*, vol. 75, no. 4, pp. 382–391, Apr. 2002.
- [105] J. C. Schlothauer, J. Falckenhayn, T. Perna, S. Hackbarth, and B. Roeder, "Luminescence investigation of photosensitizer distribution in skin: correlation of singlet oxygen kinetics with the microarchitecture of the epidermis," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 11, p. 115001, Nov. 2013.

- [106] S. Hackbarth and B. Roeder, "Singlet oxygen luminescence kinetics in a heterogeneous environment - identification of the photosensitizer localization in small unilamellar vesicles," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 329–334, 2015.
- [107] L. Lin, H. Lin, D. Chen, L. Chen, M. Wang, S. Xie, Y. Gu, B. C. Wilson, and B. Li, "Direct imaging of singlet oxygen luminescence generated in blood vessels during photodynamic therapy," *Biophotonics Photonic Solut. Better Health Care Iv*, vol. 9129, p. 912920, 2014.
- [108] B. C. Wilson, M. S. Patterson, B. Li, and M. T. Jarvi, "Correlation of in vivo tumor response and singlet oxygen luminescence detection in mTHPC-mediated photodynamic therapy," *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 8, no. 1, p. 1540006, Jan. 2015.
- [109] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, and J. Huwyler, "Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications," *J. Controlled Release*, vol. 200, pp. 138–157, Feb. 2015.
- [110] E. Pérez-Herrero and A. Fernández-Medarde, "Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 93, pp. 52–79, Jun. 2015.
- [111] R. Solomon and A. A. Gabizon, "Clinical Pharmacology of Liposomal Anthracyclines: Focus on Pegylated Liposomal Doxorubicin," *Clin. Lymphoma Myeloma*, vol. 8, no. 1, pp. 21–32, février 2008.
- [112] A. N. Fader and P. G. Rose, "Abraxane for the Treatment of Gynecologic Cancer Patients With Severe Hypersensitivity Reactions to Paclitaxel," *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 19, no. 7, pp. 1281–1283, Oct. 2009.
- [113] T. Stylianopoulos and R. K. Jain, "Design considerations for nanotherapeutics in oncology," *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, Aug. 2015.
- [114] S. Karve, M. E. Werner, R. Sukumar, N. D. Cummings, J. A. Copp, E. C. Wang, C. Li, M. Sethi, R. C. Chen, M. E. Pacold, and A. Z. Wang, "Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 21, pp. 8230–8235, May 2012.
- [115] S. Thangavel, T. Yoshitomi, M. K. Sakharkar, and Y. Nagasaki, "Redox nanoparticles inhibit curcumin oxidative degradation and enhance its therapeutic effect on prostate cancer," *J. Controlled Release*, vol. 209, pp. 110–119, Jul. 2015.
- [116] I. Levacheva, O. Samsonova, E. Tazina, M. Beck-Broichsitter, S. Levachev, B. Strehlow, M. Baryshnikova, N. Oborotova, A. Baryshnikov, and U. Bakowsky, "Optimized thermosensitive liposomes for selective doxorubicin delivery: Formulation development, quality analysis and bioactivity proof," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 121, pp. 248–256, 2014.
- [117] Y. Li, J. Wang, M. G. Wientjes, and J. L.-S. Au, "Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 1, pp. 29–39, 2012.
- [118] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, and G. Storm, "Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress," *J. Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 175–187, Jul. 2012.
- [119] Z. Popovic, W. Liu, V. P. Chauhan, J. Lee, C. Wong, A. B. Greytak, N. Insin, D. G. Nocera, D. Fukumura, R. K. Jain, and M. G. Bawendi, "A Nanoparticle Size Series for In Vivo Fluorescence Imaging," *Angew. Chem.-Int. Ed.*, vol. 49, no. 46, pp. 8649–8652, 2010.
- [120] J.-H. Kim, H.-J. Yoon, J. Sim, S.-Y. Ju, and W.-D. Jang, "The effects of dendrimer size and central metal ions on photosensitizing properties of dendrimer porphyrins," *J. Drug Target.*, vol. 22, no. 7, pp. 610–618, Aug. 2014.
- [121] H. Jeong, M. Huh, S. J. Lee, H. Koo, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and K. Kim, "Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy," *Theranostics*, vol. 1, p. 230, 2011.
- [122] P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, T. Goslinski, J. Mielcarek, K. Konopka, and N. Düzgüneş, "Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers," *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 15–16, pp. 776–784, Aug. 2013.

- [123] C. Wong, T. Stylianopoulos, J. Cui, J. Martin, V. P. Chauhan, W. Jiang, Z. Popovic, R. K. Jain, M. G. Bawendi, and D. Fukumura, "Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 6, pp. 2426–2431, Feb. 2011.
- [124] U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. M. Sevick-Muraca, W. Zamboni, O. C. Farokhzad, S. T. Barry, A. Gabizon, P. Grodzinski, and D. C. Blakey, "Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 8, pp. 2412–2417, Apr. 2013.
- [125] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, Dec. 2007.
- [126] H. Tang, X. Chen, M. Rui, W. Sun, J. Chen, J. Peng, and Y. Xu, "Effects of Surface Displayed Targeting Ligand GE11 on Liposome Distribution and Extravasation in Tumor," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 10, pp. 3242–3250, Oct. 2014.
- [127] N. Oh and J.-H. Park, "Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells," *Int. J. Nanomedicine*, p. 51, May 2014.
- [128] G. J. Doherty and H. T. McMahon, "Mechanisms of Endocytosis," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, no. 1, pp. 857–902, Jun. 2009.
- [129] I. Canton and G. Battaglia, "Endocytosis at the nanoscale," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2718–2739, Apr. 2012.
- [130] Z. Wang, C. Tiruppathi, R. D. Minshall, and A. B. Malik, "Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells," *Acs Nano*, vol. 3, no. 12, pp. 4110–4116, Dec. 2009.
- [131] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, and A. Helenius, "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 473–483, May 2001.
- [132] A. Yuan, B. Yang, J. Wu, Y. Hu, and X. Ming, "Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy," *Acta Biomater.*, vol. 21, pp. 63–73, Jul. 2015.
- [133] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, "Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing 'preassembled signaling complexes' at the plasma membrane," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5419–5422, 1998.
- [134] S. D. Conner and S. L. Schmid, "Regulated portals of entry into the cell," *Nature*, vol. 422, no. 6927, pp. 37–44, 2003.
- [135] T.-G. Iversen, T. Skotland, and K. Sandvig, "Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies," *Nano Today*, vol. 6, no. 2, pp. 176–185, Apr. 2011.
- [136] K. Sandvig, M. L. Torgersen, H. A. Raa, and B. Van Deurs, "Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 129, no. 3, pp. 267–276, Mar. 2008.
- [137] S. Grimmer, B. van Deurs, and K. Sandvig, "Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 14, pp. 2953–2962, Jul. 2002.
- [138] S. K. Rodal, G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, and K. Sandvig, "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles," *Mol. Biol. Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 961–974, Apr. 1999.
- [139] D. Vercauteren, R. E. Vandenbroucke, A. T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S. C. De Smedt, N. N. Sanders, and K. Braeckmans, "The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls," *Mol. Ther.*, vol. 18, no. 3, pp. 561–569, Mar. 2010.
- [140] H. Damke, T. Baba, A. Vanderbliek, and S. Schmid, "Clathrin-Independent Pinocytosis Is Induced in Cells Overexpressing a Temperature-Sensitive Mutant of Dynamin," *J. Cell Biol.*, vol. 131, no. 1, pp. 69–80, Oct. 1995.

- [141] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.-L. Viriot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, pp. 612–621, Nov. 2008.
- [142] R. Bachor, C. R. Shea, R. Gillies, and T. Hasan, "Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, no. 4, pp. 1580–1584, 1991.
- [143] G. Shim, S. Lee, Y. B. Kim, C.-W. Kim, and Y.-K. Oh, "Enhanced tumor localization and retention of chlorin e6 in cationic nanolipoplexes potentiate the tumor ablation effects of photodynamic therapy," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 36, p. 365101, Sep. 2011.
- [144] A. Yuan, X. Tang, X. Qiu, K. Jiang, J. Wu, and Y. Hu, "Activatable photodynamic destruction of cancer cells by NIR dye/photosensitizer loaded liposomes," *Chem Commun*, vol. 51, no. 16, pp. 3340–3342, 2015.
- [145] B. Tian, C. Wang, S. Zhang, L. Feng, and Z. Liu, "Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide," *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7000–7009, Sep. 2011.
- [146] S. Y. Park, H. J. Baik, Y. T. Oh, K. T. Oh, Y. S. Youn, and E. S. Lee, "A Smart Polysaccharide/Drug Conjugate for Photodynamic Therapy," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 7, pp. 1644–1647, février 2011.
- [147] T. M. Zhiyentayev, U. T. Boltaev, A. B. Solov'eva, N. A. Aksenova, N. N. Glagolev, A. V. Chernjak, and N. S. Melik-Nubarov, "Complexes of Chlorin e6 with Pluronic and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture," *Photochem. Photobiol.*, Oct. 2013.
- [148] S. Kimani, G. Ghosh, A. Ghogare, B. Rudtshteyn, D. Bartusik, T. Hasan, and A. Greer, "Synthesis and Characterization of Mono-, Di-, and Tri-Polyethylene Glycol Chlorin e6 Conjugates for the Photokilling of Human Ovarian Cancer Cells," *J. Org. Chem.*, vol. 77, no. 23, Dec. 2012.
- [149] W. Chin, P. Heng, P. Thong, R. Bhuvanewari, W. Hirt, S. Kuenzel, K. Soo, and M. Olivo, "Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 3, pp. 1083–1093, Aug. 2008.
- [150] W. W. L. Chin, T. Praveen, P. W. S. Heng, and M. Olivo, "Effect of polyvinylpyrrolidone on the interaction of chlorin e6 with plasma proteins and its subcellular localization," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 76, no. 2, pp. 245–252, Oct. 2010.
- [151] S. Kruspe, C. Meyer, and U. Hahn, "Chlorin e6 Conjugated Interleukin-6 Receptor Aptamers Selectively Kill Target Cells Upon Irradiation," *Mol. Ther. Acids*, vol. 3, no. 1, p. e143, Jan. 2014.
- [152] M. Del Governatore, M. R. Hamblin, E. E. Piccinini, G. Ugolini, and T. Hasan, "Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged Dougherty chlorine6immunoconjugates," *Br. J. Cancer*, vol. 82, no. 1, p. 56, 2000.
- [153] S. K. Bisland, D. Singh, and J. Gariépy, "Potentiation of Chlorin e6 Photodynamic Activity in Vitro with Peptide-Based Intracellular Vehicles," *Bioconjug. Chem.*, vol. 10, no. 6, pp. 982–992, Nov. 1999.
- [154] L. Huang, T. Zhiyentayev, Y. Xuan, D. Azhibek, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, "Photodynamic inactivation of bacteria using polyethylenimine-chlorin(e6) conjugates: Effect of polymer molecular weight, substitution ratio of chlorin(e6) and pH," *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, no. 4, pp. 313–323, Apr. 2011.
- [155] P. Huang, C. Xu, J. Lin, C. Wang, X. Wang, C. Zhang, X. Zhou, S. Guo, and D. Cui, "Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy," *Theranostics*, vol. 1, p. 240, 2011.
- [156] Y. Sun, Z. Chen, X. Yang, P. Huang, X. Zhou, and X. Du, "Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 13, p. 135102, Apr. 2009.

- [157] P. Huang, Z. Li, J. Lin, D. Yang, G. Gao, C. Xu, L. Bao, C. Zhang, K. Wang, H. Song, H. Hu, and D. Cui, "Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy," *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3447–3458, mai 2011.
- [158] J. Wang, G. Zhu, M. You, E. Song, M. I. Shukoor, K. Zhang, M. B. Altman, Y. Chen, Z. Zhu, C. Z. Huang, and W. Tan, "Assembly of Aptamer Switch Probes and Photosensitizer on Gold Nanorods for Targeted Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy," *ACS Nano*, vol. 6, no. 6, pp. 5070–5077, Jun. 2012.
- [159] J.-Y. Kim, W. I. Choi, M. Kim, and G. Tae, "Tumor-targeting nanogel that can function independently for both photodynamic and photothermal therapy and its synergy from the procedure of PDT followed by PTT," *J. Controlled Release*, vol. 171, no. 2, pp. 113–121, Oct. 2013.
- [160] Z. Zhao, S. Shi, Y. Huang, S. Tang, and X. Chen, "Simultaneous Photodynamic and Photothermal Therapy Using Photosensitizer-Functionalized Pd Nanosheets by Single Continuous Wave Laser," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 11, pp. 8878–8885, Jun. 2014.
- [161] D. Zhang, M. Wu, Y. Zeng, L. Wu, Q. Wang, X. Han, X. Liu, and J. Liu, "Chlorin e6 Conjugated Poly(dopamine) Nanospheres as PDT/PTT Dual-Modal Therapeutic Agents for Enhanced Cancer Therapy," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 15, pp. 8176–8187, Apr. 2015.
- [162] L.-S. Lin, Z.-X. Cong, J.-B. Cao, K.-M. Ke, Q.-L. Peng, J. Gao, H.-H. Yang, G. Liu, and X. Chen, "Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Polydopamine Core-Shell Nanocomposites for Intracellular mRNA Detection and Imaging-Guided Photothermal Therapy," *Acs Nano*, vol. 8, no. 4, pp. 3876–3883, Apr. 2014.
- [163] M. Wu, D. Zhang, Y. Zeng, L. Wu, X. Liu, and J. Liu, "Nanocluster of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (dopamine) for magnetic field-targeting, highly sensitive MRI and photothermal cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 26, no. 11, p. 115102, Mar. 2015.
- [164] P. Huang, J. Lin, X. Wang, Z. Wang, C. Zhang, M. He, K. Wang, F. Chen, Z. Li, G. Shen, D. Cui, and X. Chen, "Light-Triggered Theranostics Based on Photosensitizer-Conjugated Carbon Dots for Simultaneous Enhanced-Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 37, pp. 5104–5110, Sep. 2012.
- [165] Y. I. Park, H. M. Kim, J. H. Kim, K. C. Moon, B. Yoo, K. T. Lee, N. Lee, Y. Choi, W. Park, D. Ling, K. Na, W. K. Moon, S. H. Choi, H. S. Park, S.-Y. Yoon, Y. D. Suh, S. H. Lee, and T. Hyeon, "Theranostic Probe Based on Lanthanide-Doped Nanoparticles for Simultaneous In Vivo Dual-Modal Imaging and Photodynamic Therapy," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 42, pp. 5755–5761, Nov. 2012.
- [166] X. Wang, K. Liu, G. Yang, L. Cheng, L. He, Y. Liu, Y. Li, L. Guo, and Z. Liu, "Near-infrared light triggered photodynamic therapy in combination with gene therapy using upconversion nanoparticles for effective cancer cell killing," *Nanoscale*, vol. 6, no. 15, p. 9198, Jun. 2014.
- [167] C. Greenman, P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Bresseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y.-E. Chiew, A. deFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M.-H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal, and M. R. Stratton, "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes," *Nature*, vol. 446, no. 7132, pp. 153–158, Mar. 2007.
- [168] T. Sjoebloom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B.



- H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and V. E. Velculescu, "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers," *Science*, vol. 314, no. 5797, pp. 268–274, Oct. 2006.
- [169] L. D. Wood, D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. V. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. K. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos, P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and B. Vogelstein, "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers," *Science*, vol. 318, no. 5853, pp. 1108–1113, Nov. 2007.
- [170] E. Buhleier, W. Wehner, and F. Vogtle, "Cascade-Chain-Like and Nonskid-Chain-Like Syntheses of Molecular Cavity Topologies," *Synth.-Stuttg.*, no. 2, pp. 155–158, 1978.
- [171] J. Wolinsky and M. Grinstaff, "Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 9, pp. 1037–1055, Jun. 2008.
- [172] A. Caminade, R. Laurent, and J. Majoral, "Characterization of dendrimers," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 15, pp. 2130–2146, Dec. 2005.
- [173] U. Boas and P. M. H. Heegaard, "Dendrimers in drug research," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 33, no. 1, p. 43, 2004.
- [174] R. Duncan and L. Izzo, "Dendrimer biocompatibility and toxicity," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 15, pp. 2215–2237, Dec. 2005.
- [175] D. A. Tomalia, "Starburst dendrimers — Nanoscopic supermolecules according to dendritic rules and principles," *Macromol. Symp.*, vol. 101, no. 1, pp. 243–255, Jan. 1996.
- [176] C. Hawker and J. Frechet, "Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture - a New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 21, pp. 7638–7647, Oct. 1990.
- [177] K. J. Narendra and K. T. Rakesh, "Dendrimers for enhanced drug solubilization," in *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*, Advances in pharmaceutical technology., Chichester, West Sussex: Wiley, 2013, p. 37.
- [178] L. Wu, M. Ficker, J. B. Christensen, P. N. Trohopoulos, and S. M. Moghimi, "Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges," *Bioconjug. Chem.*, p. 150213085013008, Feb. 2015.
- [179] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel, "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis," *Biomaterials*, vol. 24, no. 7, pp. 1121–1131, Mar. 2003.
- [180] R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. McKeown, and A. D'Emanuele, "The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers," *Int. J. Pharm.*, vol. 252, no. 1–2, pp. 263–266, Feb. 2003.
- [181] W. Wang, W. Xiong, J. Wan, X. Sun, H. Xu, and X. Yang, "The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 10, p. 105103, Mar. 2009.
- [182] M. Ciolkowski, J. F. Petersen, M. Ficker, A. Janaszewska, J. B. Christensen, B. Klajnert, and M. Bryszewska, "Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility," *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 8, no. 6, pp. 815–817, Aug. 2012.
- [183] I. J. Majoros, T. P. Thomas, C. B. Mehta, and J. R. Baker, "Poly(amidoamine) Dendrimer-Based Multifunctional Engineered Nanodevice for Cancer Therapy," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 19, pp. 5892–5899, Sep. 2005.

- [184] I. J. Majoros, A. Myc, T. Thomas, C. B. Mehta, and J. R. Baker, "PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 2, pp. 572–579, Feb. 2006.
- [185] A. Mecke, I. J. Majoros, A. K. Patri, J. R. Baker, M. M. B. Holl, and B. G. Orr, "Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: The roles of size and chemical functional group," *Langmuir*, vol. 21, no. 23, pp. 10348–10354, Nov. 2005.
- [186] L. M. Kaminskas, B. J. Boyd, and C. J. Porter, "Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties," *Nanomed.*, vol. 6, no. 6, pp. 1063–1084, Aug. 2011.
- [187] S. S. Nigavekar, L. Y. Sung, M. Llanes, A. El-Jawahri, T. S. Lawrence, C. W. Becker, L. Balogh, and M. K. Khan, "3H Dendrimer Nanoparticle Organ/Tumor Distribution," *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 476–483, Mar. 2004.
- [188] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, and R. Duncan, "Dendrimers:: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo," *J. Controlled Release*, vol. 65, no. 1, pp. 133–148, 2000.
- [189] L. M. Kaminskas, B. J. Boyd, P. Karellas, S. A. Henderson, M. P. Giannis, G. Y. Krippner, and C. J. H. Porter, "Impact of surface derivatization of poly-L-lysine dendrimers with anionic arylsulfonate or succinate groups on intravenous pharmacokinetics and disposition," *Mol. Pharm.*, vol. 4, no. 6, pp. 949–961, Dec. 2007.
- [190] H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, A. Hiraga, J. Konishi, K. Togashi, and M. W. Brechbiel, "Micro-MR angiography of normal and intratumoral vessels in mice using dedicated intravascular MR contrast agents with high generation of polyamidoamine dendrimer core: Reference to pharmacokinetic properties of dendrimer-based MR contrast agents," *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 14, no. 6, pp. 705–713, Dec. 2001.
- [191] H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, A. Hiraga, T. Ishimori, J. Konishi, K. Togashi, and M. W. Brechbiel, "Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents," *Magn. Reson. Med.*, vol. 46, no. 4, pp. 781–788, 2001.
- [192] J. Lim, Y. Guo, C. L. Rostollan, J. Stanfield, J.-T. Hsieh, X. Sun, and E. E. Simanek, "The Role of the Size and Number of Polyethylene Glycol Chains in the Biodistribution and Tumor Localization of Triazine Dendrimers," *Mol. Pharm.*, vol. 5, no. 4, pp. 540–547, Aug. 2008.
- [193] J. M. Harris and R. B. Chess, "Effect of pegylation on pharmaceuticals," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 3, pp. 214–221, Mar. 2003.
- [194] M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, J. Simak, J. B. Hall, J. Semberova, S. H. De Paoli Lacerda, and S. E. McNeil, "Nanoparticle Size and Surface Charge Determine Effects of PAMAM Dendrimers on Human Platelets *in Vitro*," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 382–393, Mar. 2012.
- [195] K. Greish, G. Thiagarajan, H. Herd, R. Price, H. Bauer, D. Hubbard, A. Burckle, S. Sadekar, T. Yu, A. Anwar, A. Ray, and H. Ghandehari, "Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 6, no. 7, pp. 713–723, Nov. 2012.
- [196] J. C. Roberts, M. K. Bhargat, R. T. Zera, and others, "Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 53–65, 1996.
- [197] H.-T. Chen, M. F. Neerman, A. R. Parrish, and E. E. Simanek, "Cytotoxicity, Hemolysis, and Acute in Vivo Toxicity of Dendrimers Based on Melamine, Candidate Vehicles for Drug Delivery," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 32, pp. 10044–10048, Aug. 2004.
- [198] M. F. Neerman, W. Zhang, A. R. Parrish, and E. E. Simanek, "In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 281, no. 1–2, pp. 129–132, Aug. 2004.

- [199] A. S. Chauhan, N. K. Jain, and P. V. Diwan, "Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimers in mice," *Proc. R. Soc. -Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 466, no. 2117, pp. 1535–1550, May 2010.
- [200] J. B. Pryor, B. J. Harper, and S. L. Harper, "Comparative toxicological assessment of PAMAM and thiophosphoryl dendrimers using embryonic zebrafish," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 1947–1956, 2014.
- [201] T. C. King Heiden, E. Dengler, W. J. Kao, W. Heideman, and R. E. Peterson, "Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 225, no. 1, pp. 70–79, Nov. 2007.
- [202] K. Winnicka, M. Wroblewska, K. Sosnowska, H. Car, and I. Kasacka, "Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers&rsquo; dermal toxicity in the rat skin model," *Drug Des. Devel. Ther.*, p. 1367, Mar. 2015.
- [203] P. Rajanathanan, G. S. Attard, N. A. Sheikh, and W. J. W. Morrow, "Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses," *Vaccine*, vol. 17, no. 7, pp. 715–730, 1999.
- [204] H. B. Agashe, T. Dutta, M. Garg, and N. K. Jain, "Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly(propylene imine) dendrimer," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no. 11, pp. 1491–1498, Nov. 2006.
- [205] N. Malik, E. G. Evagorou, and R. Duncan, "Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy," *Anticancer. Drugs*, vol. 10, no. 8, pp. 767–776, Sep. 1999.
- [206] M. T. Morgan, M. A. Carnahan, C. E. Immoos, A. A. Ribeiro, S. Finkelstein, S. J. Lee, and M. W. Grinstaff, "Dendritic molecular capsules for hydrophobic compounds," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 50, pp. 15485–15489, Dec. 2003.
- [207] M. T. Morgan, Y. Nakanishi, D. J. Kroll, A. P. Griset, M. A. Carnahan, M. Wathier, N. H. Oberlies, G. Manikumar, M. C. Wani, and M. W. Grinstaff, "Dendrimer-encapsulated camptothecins: Increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 24, pp. 11913–11921, Dec. 2006.
- [208] L. Wang, X. Xu, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhu, J. Shi, Y. Sun, and Q. Huang, "Encapsulation of curcumin within poly(amidoamine) dendrimers for delivery to cancer cells," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 2137–2144, Sep. 2013.
- [209] L. M. Kaminskas, V. M. McLeod, C. J. H. Porter, and B. J. Boyd, "Association of Chemotherapeutic Drugs with Dendrimer Nanocarriers: An Assessment of the Merits of Covalent Conjugation Compared to Noncovalent Encapsulation," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 355–373, Mar. 2012.
- [210] R. S. Dhanikula and P. Hildgen, "Influence of molecular architecture of polyether-co-polyester dendrimers on the encapsulation and release of methotrexate," *Biomaterials*, vol. 28, no. 20, pp. 3140–3152, Jul. 2007.
- [211] L. M. Kaminskas, B. D. Kelly, V. M. McLeod, G. Sberna, D. J. Owen, B. J. Boyd, and C. J. H. Porter, "Characterisation and tumour targeting of PEGylated polylysine dendrimers bearing doxorubicin via a pH labile linker," *J. Controlled Release*, vol. 152, no. 2, pp. 241–248, Jun. 2011.
- [212] S. Khatri, N. G. Das, and S. K. Das, "Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of MES-SA uterine cancer cells," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 297–302, 2014.
- [213] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, and R. Pashaei-Asl, "Dendrimers: synthesis, applications, and properties," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2014.
- [214] P. Ma, X.-M. Zhang, L. Ni, J.-M. Li, F.-P. Zhang, Z. Wang, S.-N. Lian, and K.-X. Sun, "Targeted delivery of polyamidoamine-paclitaxel conjugate functionalized with anti-human epidermal growth factor receptor 2 trastuzumab," *Int. J. Nanomedicine*, p. 2173, Mar. 2015.

- [215] B. Klajnert, M. Rozanek, and M. Bryszewska, "Dendrimers in photodynamic therapy," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 29, pp. 4903–4912, 2012.
- [216] C. Kojima, Y. Toi, A. Harada, and K. Kono, "Preparation of Poly(ethylene glycol)-Attached Dendrimers Encapsulating Photosensitizers for Application to Photodynamic Therapy," *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, no. 3, pp. 663–670, May 2007.
- [217] O. Taratula, C. Schumann, M. A. Naleway, A. J. Pang, K. J. Chon, and O. Taratula, "A Multifunctional Theranostic Platform Based on Phthalocyanine-Loaded Dendrimer for Image-Guided Drug Delivery and Photodynamic Therapy," *Mol. Pharm.*, p. 130910152412007, Sep. 2013.
- [218] O. Taratula, O. Taratula, M. Patel, C. Schumann, M. Naleway, H. He, and A. Pang, "Phthalocyanine-loaded graphene nanoplatfor&nbsp;imaging-guided combinatorial phototherapy," *Int. J. Nanomedicine*, p. 2347, Mar. 2015.
- [219] O. Taratula, C. Schumann, T. Duong, K. L. Taylor, and O. Taratula, "Dendrimer-encapsulated naphthalocyanine as a single agent-based theranostic nanoplatfor near-infrared fluorescence imaging and combinatorial anticancer phototherapy," *Nanoscale*, vol. 7, no. 9, pp. 3888–3902, 2015.
- [220] N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D. Takasu, D.-L. Jiang, T. Nagano, T. Aida, and K. Kataoka, "Light-Harvesting Ionic Dendrimer Porphyrins as New Photosensitizers for Photodynamic Therapy," *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, no. 1, pp. 58–66, Jan. 2003.
- [221] G. Zhang, "Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer," *J. Controlled Release*, vol. 93, no. 2, pp. 141–150, Dec. 2003.
- [222] H. R. Stapert, N. Nishiyama, D. L. Jiang, T. Aida, and K. Kataoka, "Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer zinc porphyrins," *Langmuir*, vol. 16, no. 21, pp. 8182–8188, Oct. 2000.
- [223] W. D. Jang, N. Nishiyama, G. D. Zhang, A. Harada, D. L. Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, and K. Kataoka, "Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with polyethylene glycol to enhance intracellular photodynamic efficacy," *Angew. Chem.-Int. Ed.*, vol. 44, no. 3, pp. 419–423, 2005.
- [224] W.-D. Jang, N. Nishiyama, and K. Kataoka, "Supramolecular assembly of photofunctional dendrimers for biomedical nano-devices," *Supramol. Chem.*, vol. 19, no. 4–5, pp. 309–314, 2007.
- [225] Y. Li, W.-D. Jang, N. Nishiyama, A. Kishimura, S. Kawauchi, Y. Morimoto, S. Miake, T. Yamashita, M. Kikuchi, T. Aida, and K. Kataoka, "Dendrimer generation effects on photodynamic efficacy of dendrimer porphyrins and dendrimer-loaded supramolecular nanocarriers," *Chem. Mater.*, vol. 19, no. 23, pp. 5557–5562, Nov. 2007.
- [226] N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, and K. Kataoka, "Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine," *J. Controlled Release*, vol. 133, no. 3, pp. 245–251, Feb. 2009.
- [227] H.-L. Lu, W.-J. Syu, N. Nishiyama, K. Kataoka, and P.-S. Lai, "Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo," *J. Controlled Release*, vol. 155, no. 3, pp. 458–464, Nov. 2011.
- [228] S. Herlambang, M. Kumagai, T. Nomoto, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, and K. Kataoka, "Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy," *J. Controlled Release*, vol. 155, no. 3, pp. 449–457, Nov. 2011.
- [229] P. M. R. Pereira, S. Silva, J. A. S. Cavaleiro, C. A. F. Ribeiro, J. P. C. Tomé, and R. Fernandes, "Galactodendritic Phthalocyanine Targets Carbohydrate-Binding Proteins Enhancing Photodynamic Therapy," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e95529, Apr. 2014.

- [230] S. H. Battah, C. E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A. J. MacRobert, and C. Edwards, "Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy," *Bioconjug. Chem.*, vol. 12, no. 6, pp. 980–988, Dec. 2001.
- [231] S. Battah, S. Balaratnam, A. Casas, S. O'Neill, C. Edwards, A. Battle, P. Dobbin, and A. J. MacRobert, "Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 3, pp. 876–885, Mar. 2007.
- [232] A. Casas, S. Battah, G. Di Venosa, P. Dobbin, L. Rodriguez, H. Fukuda, A. Battle, and A. J. MacRobert, "Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy," *J. Controlled Release*, vol. 135, no. 2, pp. 136–143, Apr. 2009.
- [233] A. François, S. Battah, A. J. MacRobert, L. Bezdetnaya, F. Guillemain, and M.-A. D'Hallewin, "Fluorescence diagnosis of bladder cancer: a novel in vivo approach using 5-aminolevulinic acid (ALA) dendrimers," *BJU Int.*, vol. 110, no. 11 Pt C, pp. E1155–1162, Dec. 2012.
- [234] S. Hackbarth, V. Horneffer, A. Wiehe, F. Hillenkamp, and B. Röder, "Photophysical properties of pheophorbide-a-substituted diamino-butane poly-propylene-imine dendrimer," *Chem. Phys.*, vol. 269, no. 1, pp. 339–346, 2001.
- [235] S. Hackbarth, E. A. Ermilov, and B. Röder, "Interaction of Pheophorbide a molecules covalently linked to DAB dendrimers," *Opt. Commun.*, vol. 248, no. 1–3, pp. 295–306, Apr. 2005.
- [236] A. Kay, R. Humphry-Baker, and M. Graetzel, "Artificial photosynthesis. 2. Investigations on the mechanism of photosensitization of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> solar cells by chlorophyll derivatives," *J. Phys. Chem.*, vol. 98, no. 3, pp. 952–959, 1994.
- [237] K. I. Salokhiddinov, I. M. Byteva, and G. P. Gurinovich, "Lifetime of singlet oxygen in various solvents," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 34, no. 5, pp. 561–564, May 1981.
- [238] H. A. Isakau, M. V. Parkhats, V. N. Knyukshto, B. M. Dzhagarov, E. P. Petrov, and P. T. Petrov, "Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer–polymer interaction in vitro," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 92, no. 3, pp. 165–174, Sep. 2008.
- [239] I. B. C. Matheson, R. D. Etheridge, N. R. Kratoch, and J. Lee, "The Quenching of Singlet Oxygen by Amino Acids and Proteins," *Photochem. Photobiol.*, vol. 21, no. 3, pp. 165–171, Mar. 1975.
- [240] J. Moan, E. O. Pettersen, and T. Christensen, "The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin," *Br. J. Cancer*, vol. 39, no. 4, pp. 398–407, Apr. 1979.
- [241] J. Terao, Y. Minami, and N. Bando, "Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 48, no. 1, pp. 57–62, 2010.
- [242] P. Rees, "Uptake and Toxicology of Nanoparticles," in *Frontiers of Nanoscience*, vol. 5, Elsevier, 2013, pp. 123–138.
- [243] K. C. Das and H. P. Misra, "Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 262, no. 1–2, pp. 127–133, 2004.
- [244] H. Yang and S. T. Lopina, "Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 14, no. 10, pp. 1043–1056, Jan. 2003.
- [245] L. M. Kaminskis, B. D. Kelly, V. M. McLeod, G. Sberna, B. J. Boyd, D. J. Owen, and C. J. H. Porter, "Capping Methotrexate  $\alpha$ -Carboxyl Groups Enhances Systemic Exposure and Retains the Cytotoxicity of Drug Conjugated PEGylated Polylysine Dendrimers," *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 2, pp. 338–349, Apr. 2011.
- [246] A. Satsangi, S. S. Roy, R. K. Satsangi, R. K. Vadlamudi, and J. L. Ong, "Design of a Paclitaxel Prodrug Conjugate for Active Targeting of an Enzyme Upregulated in Breast Cancer Cells," *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 6, pp. 1906–1918, Jun. 2014.

- [247] G. M. Di Venosa, A. G. Casas, S. Battah, P. Dobbin, H. Fukuda, A. J. MacRobert, and A. Batlle, "Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, no. 1, pp. 82–91, Jan. 2006.
- [248] K. Lang, J. Mosinger, and D. M. Wagnerová, "Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 248, no. 3–4, pp. 321–350, février 2004.
- [249] A. Parat, C. Bordeianu, H. Dib, A. Garofalo, A. Walter, S. Bégin-Colin, and D. Felder-Flesch, "Dendrimer–nanoparticle conjugates in nanomedicine," *Nanomed.*, vol. 10, no. 6, pp. 977–992, Mar. 2015.
- [250] V. Reshetov, H.-P. Lassalle, A. François, D. Dumas, S. Hupont, S. Gräfe, V. Filipe, W. Jiskoot, F. Guillemin, V. Zorin, and L. Bezdetnaya, "Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo," *Int. J. Nanomedicine*, p. 3817, Oct. 2013.
- [251] S. Svenson and D. Tomalia, "Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 15, pp. 2106–2129, Dec. 2005.
- [252] E. C. Cho, Q. Zhang, and Y. Xia, "The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 6, pp. 385–391, juin 2011.
- [253] H. Hatakeyama, H. Akita, and H. Harashima, "A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 152–160, Mar. 2011.
- [254] U. Schmidt-Erfurth, H. Diddens, R. Birngruber, and T. Hasan, "Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates," *Br. J. Cancer*, vol. 75, no. 1, pp. 54–61, 1997.
- [255] N. S. Soukos, M. R. Hamblin, and T. Hasan, "The Effect of Charge on Cellular Uptake and Phototoxicity of Polylysine Chlorine6Conjugates," *Photochem. Photobiol.*, vol. 65, no. 4, pp. 723–729, avril 1997.
- [256] J. D. Spikes, "New trends in photobiology," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 6, no. 3, pp. 259–274, juillet 1990.
- [257] D. Shcharbin, J. Mazur, M. Szwedzka, M. Wasiak, B. Palecz, M. Przybyszewska, M. Zaborski, and M. Bryszewska, "Interaction between PAMAM 4.5 dendrimer, cadmium and bovine serum albumin: a study using equilibrium dialysis, isothermal titration calorimetry, zeta-potential and fluorescence," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 58, no. 2, pp. 286–289, Aug. 2007.
- [258] J. L. Perry, K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear, and J. M. DeSimone, "PEGylated PRINT Nanoparticles: The Impact of PEG Density on Protein Binding, Macrophage Association, Biodistribution, and Pharmacokinetics," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 10, pp. 5304–5310, Oct. 2012.
- [259] C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, and W. C. W. Chan, "Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 4, pp. 2139–2147, Feb. 2012.
- [260] O. P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan, and R. M. Kannan, "The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers," *Biomaterials*, vol. 29, no. 24–25, pp. 3469–3476, Sep. 2008.
- [261] G. Sahay, J. O. Kim, A. V. Kabanov, and T. K. Bronich, "The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents," *Biomaterials*, vol. 31, no. 5, pp. 923–933, Feb. 2010.
- [262] M.-H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morlière, R. Santus, and F. Guillemin, "Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells," *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 1, pp. 146–152, Jan. 2003.

- 
- [263] J. S. Dysart and M. S. Patterson, "Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro," *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, no. 11, pp. 2597–2616, Jun. 2005.
- [264] J. Moan, K. Berg, E. Kvam, A. Western, Z. Malik, A. Rück, and H. Schneckenburger, "Intracellular localization of photosensitizers," *Ciba Found. Symp.*, vol. 146, pp. 95–107; discussion 107–111, 1989.
- [265] S. J. Holt, "Some Observations on the Occurrence and Nature of Esterases in Lysosomes," in *Ciba Foundation Symposium - Anterior Pituitary Secretion (Book I of Colloquia on Endocrinology)*, A. V. S. de R. M. S. D. I. C. A.R.C.S and rgrate P. C. M.A, Eds. John Wiley & Sons, Ltd, 1963, pp. 114–125.
- [266] W. Luo, R.-S. Liu, J.-G. Zhu, Y.-C. Li, and H.-C. Liu, "Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line," *Oncol. Lett.*, Nov. 2014.
- [267] S. Zhu, M. Hong, L. Zhang, G. Tang, Y. Jiang, and Y. Pei, "PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: in vitro evaluation and in vivo tumor accumulation," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 161–174, Jan. 2010.
- [268] H. Xu, Y. Deng, D. Chen, W. Hong, Y. Lu, and X. Dong, "Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives," *J. Controlled Release*, vol. 130, no. 3, pp. 238–245, Sep. 2008.
- [269] M. Najlah, S. Freeman, D. Attwood, and A. D'Emanuele, "In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 336, no. 1, pp. 183–190, May 2007.

## Résumé

La thérapie photodynamique (PDT) est une modalité de traitement des cancers prometteuse, mettant en jeu une action combinée de l'oxygène moléculaire, de la lumière et d'un photosensibilisateur (PS). Néanmoins, les PSs utilisés souffrent d'une faible solubilité dans les milieux aqueux ainsi que d'un tumorotropisme limité qui sont des barrières à la réussite du traitement. Ainsi, actuellement, une attention particulière est portée au développement de nanoparticules (NPs) capables de pallier les défauts des PSs.

Notre travail a consisté à étudier des dendrimères poly(amidoamine) (PAMAM), macromolécules polymériques tridimensionnelles, conjugués *via* une liaison covalente au PS, la Chlorine e6 (Ce6). Cette construction nous a permis de vectoriser 32 molécules de Ce6 par dendrimère. La production d'oxygène singulet et l'émission de fluorescence ont été modérément affectées par le greffage covalent de la Ce6 aux NPs. *In vitro*, les dendrimères PAMAM ont permis d'accroître l'efficacité PDT de la Ce6 en potentialisant son internalisation cellulaire *via* un mécanisme actif d'endocytose. Néanmoins, l'efficacité PDT des NPs est limitée par la concentration locale élevée en Ce6 en périphérie des dendrimères qui réduit son rendement quantique en oxygène singulet moléculaire, espèce cytotoxique. Une libération de la Ce6 permettrait ainsi de potentialiser l'efficacité PDT des NPs en restaurant notamment les propriétés photophysiques de la Ce6.

La suite de ce travail a été de concevoir une NP capable de libérer la Ce6 sous l'action d'estérasés retrouvées dans les cellules. Leur caractérisation a permis de démontrer en solution que les propriétés photophysiques de la Ce6 étaient rétablies à la suite de son relargage des NPs. Cette dernière construction clivable est prometteuse pour de futures applications en PDT.

**Mots-clés :** Thérapie photodynamique, Chlorine e6, dendrimère PAMAM, passive targeting, oxygène singulet

## Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a modality of cancer treatment, involving a combined action of molecular oxygen, light and photosensitizers (PS). However, the PSs suffer from a low solubility in aqueous media and limited tumor accumulation, diminishing the treatment success. Presently, particular attention is paid to the development of dendrimer-based nanoparticles (NP) that are able to overcome the shortcomings of the PSs.

The present study investigates the poly(amidoamine) dendrimer (PAMAM), a tridimensional polymeric macromolecule, covalently functionalized with the PS Chlorin e6 (Ce6). The singlet oxygen generation efficiency and fluorescence emission were moderately affected by the covalent binding of the Ce6 to the dendrimer. This construction allows the vectorization of 32 Ce6 molecules per dendrimer. *In vitro*, PAMAM dendrimers improve the PDT efficiency of Ce6 by promoting their cellular internalization *via* an active endocytosis mechanism. However, the PDT efficiency of NPs is limited by the high local concentration of Ce6 at the periphery of dendrimers decreasing production of singlet oxygen. Ce6 release could restore Ce6 photophysical properties and as such improve the PDT efficiency of NP.

Thus, the next step of this work was to design a cleavable NP able to release the Ce6 under esterase activity. In solution the NP characterization demonstrated that the photophysical properties of Ce6 were recovered after their release from the NP. This cleavable construction displays promising perspectives for future PDT applications.

**Keywords:** Photodynamic therapy, Chlorin e6, dendrimer PAMAM, passive targeting, singlet oxygen