



HAL
open science

Conception, élaboration et caractérisation photophysiques et biochimiques de molécules photoactivables pour la thérapie photodynamique

Marc Verhille

► To cite this version:

Marc Verhille. Conception, élaboration et caractérisation photophysiques et biochimiques de molécules photoactivables pour la thérapie photodynamique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0194 . tel-01749388

HAL Id: tel-01749388

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749388>

Submitted on 29 Mar 2018

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse

Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)

Ecole Doctorale RP2E n°410 : Science et Ingénierie, Ressources, Procédés, Produits et Environnement

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

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7568, CNRS

Pour l'obtention du titre de

Docteur

De l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Soutenue publiquement le 25 octobre 2012

par :

Marc Verhille

Conception, élaboration et caractérisations photophysique et biochimique de molécules photoactivables pour la Thérapie Photodynamique

Membres du jury :

Rapporteurs : **Mr Norbert Lange**

Professeur, Université de Genève

Mr Philippe Maillard

DR, Institut Curie, Paris

Examineurs : **Mr Xavier Allonas**

Professeur, LPIM, Mulhouse

Mr Olivier Tillement

Professeur, LPCML, Lyon

Mme Céline Frochot

DR CNRS, LRGP, Nancy

Directrice

Mr Régis Vanderesse

CR, LCPM, Nancy

Co-directeur

Invité :

Mme Muriel Barberi-Heyob

HdR, CAV, Vandoeuvre-les-Nancy

Mr Jean-Claude André

DR CNRS, LRGP, Nancy

« Ceux qui cherchent sous la surface des choses le font à leurs risques et périls »

Oscar Wilde, *Picture of Dorian Gray*

Remerciements

Merci !

Cette thèse, interdisciplinaire, a permis la rencontre d'un grand nombre de personnes. Cette étude a été réalisée au Laboratoire des Réactions et Génie de Procédés, au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, ainsi qu'au Centre Alexis Vautrin pour la partie biochimie. Ce projet a également fait intervenir d'autres partenaires, et il ne serait pas ce qu'il est sans ces rencontres, sans l'investissement de tous et sans ces discussions qui lui ont donné forme. Merci à tous.

Merci à Céline Frochot, ma directrice, pour son courage, sa présence, sa patience et sa confiance.

Merci à Régis Vanderesse, mon co-directeur, pour sa patience, sa générosité, sa présence et son savoir.

Ces quatre années m'ont apporté bien plus que pour le simple cadre de la thèse. Merci beaucoup.

Merci à Muriel Barberi-Heyob, pour son encadrement de la partie biochimique de cette thèse, ainsi que de la bonne humeur dans laquelle nous avons pu travailler.

J'adresse également mes remerciements à Norbert Lange, Philippe Maillard et Olivier Tillement pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et examinateur.

Je tiens également à remercier Xavier Allonas pour notre collaboration au sein de ce projet, pour son expertise et sa bienveillance. Merci aussi d'avoir accepté de faire parti des membres du jury.

Merci à Jean-Claude André pour ses précieux conseils et éclaircissements sur la photophysique, de sa compagnie, pertinente en toute circonstance, ainsi que d'avoir accepté de faire parti de ce jury.

Je tiens à remercier Philippe Arnoux pour son assistance au quotidien et de sa bonne humeur.

J'adresse également ma reconnaissance à Isabelle Chevalot et Catherine Humeau pour leur aide et leur sympathie pour ce projet de couplage enzymatique et au sein de l'équipe.

Merci à Mathilde Achard pour son aide au laboratoire pendant toutes ces années.

Je remercie également Cédric Paris et François Dupire pour leur assistance et leur connaissance en spectrométrie de masse.

Merci à Francis Barros pour son savoir et son aide en photophysique.

Un grand merci à toute l'équipe de la PDT team de Nancy, pour les congrès passés ensembles, les discussions qui en ont découlé et surtout pour tout le reste, faisant de cette petite équipe une petite famille dans laquelle je me suis senti bien. Merci donc à Pedro, Ludo, Denise, Leen, Hamanou, Marlène, Aymeric, Rima, Thierry, Gaëlle, Albert, Khalil... ainsi que tous ceux que ma mémoire aura oublié de mentionner sur cette page. J'espère que ce petit groupe restera aussi chaleureux et efficace qu'il l'a été.

Merci aussi à tous les gens que j'ai été amené à croiser tous les jours dans les différents laboratoires que j'ai fréquenté ; personnes qui font la beauté d'un quotidien. Au LRGP, au LCPM, au CAV, à l'ENSAIA... Merci à tous ces gens que je ne citerai pas mais que j'ai aimé côtoyer et qui m'ont aidé pendant ces quatre ans de thèse.

Merci à Aline et Aurélie, stagiaires au labo. Bon courage, Aurélie, pour la reprise du bébé...

Merci aussi et beaucoup à tous mes amis, hors labo, qui m'ont énormément aidé à d'autres niveaux que ceux de la thèse. Merci à tous ces gens qui m'ont apporté amour, soutien et bonheur. Merci les copains.

... et merci à Daniel Pennac d'avoir écrit cette pièce (*Merci !*), me permettant d'alléger ma conscience après tant de hiérarchisation dans les remerciements.

A ma mère

Résumé :

L'angiogenèse est une étape clef dans le processus de progression tumorale. Elle est caractérisée par une surexpression d'un grand nombre de métalloprotéinases matricielles (MMP). Parmi ces MMP, les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) sont connues pour jouer un rôle important dans l'angiogenèse tumorale et la croissance de nombreux cancers. Les "*Photodynamic Molecular Beacon*" (PMB) sont des constructions moléculaires qui peuvent être utilisées dans le traitement de cancers en associant un photosensibilisateur (PS) de type chlorine et un inhibiteur d'états excités, aussi appelé "*Quencher*", liés par un peptide substrat des gélatinases afin d'inhiber la toxicité du PS dans les cellules non ciblées, et de restaurer sa toxicité uniquement à proximité des gélatinases. Nous avons donc cherché à déterminer le couple PS/*quencher* permettant la meilleure inhibition de la production d'oxygène singulet, principale source de la toxicité du PS, puis avons synthétisé une famille de PMB ciblant les gélatinases. Différents peptides et bras espaceurs ont été utilisés pour évaluer l'influence de la distance entre le PS et le *quencher* sur les propriétés photophysiques et l'activation enzymatique du PMB.

Mots-clés : Photodynamic Molecular Beacon (PMB), Métalloprotéinases Matricielles (MMP), FRET, Ciblage.

Abstract :

Angiogenesis is a key step in the tumoral progression process. It is characterized by an over-expression of a number of matrix metalloproteinases (MMP). Among these MMPs, gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are known to play a critical role in tumor angiogenesis and the growth of many cancers. Photodynamic Molecular Beacons (PMB) can be designed for cancer treatment by associating a chlorin-like photosensitizer and a black hole quencher linked by a gelatinase substrate peptide with the aim of silencing photosensitizer toxicity in non-targeted cells and restore its toxicity only in surrounding gelatinases. We investigated the PS/quencher pair allowing the best singlet oxygen production inhibition, and then we synthesized a novel family of PMB triggering gelatinases MMP-2 and MMP-9. Different lengths of peptide and spacers were used in order to determinate the influence of the distance between PS and quencher on the PMB photophysical properties and enzymatic activation.

Key words: Photodynamic Molecular Beacon (PMB), Matrix Metalloproteinases (MMP), FRET, Targetting.

Table des matières

Table des matières	2
Liste des abréviations	10
Introduction générale	17
Chapitre I : État de l’art	23
I. La Thérapie PhotoDynamique (PDT) anticancéreuse	23
I.1. Le cancer	24
I.1.1. Bref historique.....	24
I.1.2. Généralités sur le cancer	25
<i>I.1.2.a. Définition générale</i>	25
<i>I.1.2.b. Guérir du cancer</i>	26
I.1.3. L’angiogenèse tumorale	27
<i>I.1.3.a. Définition</i>	27
<i>I.1.3.b. Le mécanisme angiogénique</i>	29
I.1.4. Rôle des MMPs dans l’angiogenèse tumorale	30
<i>I.1.4.a. La famille des métalloprotéinases matricielles</i>	31
<i>I.1.4.b. Les MMPs et le cancer</i>	34
<i>I.1.4.c. Les MMP-2 et -9</i>	35
I.2. Historique de la Thérapie PhotoDynamique.....	38
I.2.1. Introduction du terme « photodynamique »	38
I.2.2. Utilisation de l’hématoporphyrine	39
I.2.3. Découverte de l’« hematoporphyrin derivative » (HpD).....	39
I.2.4. La Thérapie PhotoDynamique récente.....	40
I.3. Mécanismes photophysiques	41
I.3.1. Excitation électronique et états excités.....	42
<i>1.3.1.a. Définition de l’état excité</i>	42
<i>1.3.1.b. Etats singulet et triplet</i>	43
<i>1.3.1.c. Processus photophysiques de désactivation des états excités</i>	44
I.3.2. Réaction de type I ou de type II	47

1.3.3. Définition de la zone thérapeutique.....	49
I.4. Le ciblage en PDT	51
I.4.1. Ciblage direct	51
I.4.2. Ciblage indirect (ou VTP).....	52
II. Les photosensibilisateurs porphyriniques pour la PDT	55
II.1. Présentation des différents types de PS tétrapyrrolique	58
II.1.1. Les porphyrines	58
II.1.1.a. Structure	58
II.1.1.b. Caractéristiques photophysiques.....	60
II.1.1.c. Synthèse.....	61
II.1.1.d. Exemples de porphyrines	67
II.1.2. Les chlorines et bactériochlorines.....	70
II.1.2.a. Structure	70
II.1.2.b. Caractéristiques photophysiques.....	70
II.1.2.c. Synthèse.....	72
II.1.2.d. Exemples de chlorines et bactériochlorines	75
II.1.3. Noyaux porphyriniques expansés ou dérivés.....	77
II.1.3.a. Les purpurines et benzochlorines	77
II.1.3.b. Les porphycènes.....	79
II.1.3.c. Les phtalocyanines.....	79
II.2. Les stratégies de ciblage en PDT.....	81
II.2.1. Rappels sur les PS de 1 ^{ère} génération	81
II.2.2. Les PS de 2 ^{ème} génération et ciblage passif.....	82
II.2.2.a. La m-THPC, ou Foscan®.....	83
II.2.2.b. L'ALA.....	83
II.2.2.c. Résumé des PS de seconde génération.....	84
II.2.3. Les PS de 3 ^{ème} génération et ciblage actif.....	87
II.2.3.a. Ciblage actif direct	87
II.2.3.b. Ciblage indirect actif.....	90
Conclusion.....	93
Références	94
Chapitre II : La régulation de l'oxygène singulet et l'utilisation de	
<i>Molecular Beacons</i>	106

I. L'oxygène singulet	106
I.1. Introduction historique : oxygène et thérapie	107
I.2. Photophysique	109
I.2.1. Structure électronique de l' ¹ O ₂	109
I.2.2. Spectroscopie	111
I.3. Formation	115
I.3.1. Par réaction chimique.....	115
1.3.1.a. Conversion thermique	115
1.3.1.b. Décomposition du perchromate de potassium.....	116
1.3.1.c. Dismutation de l'anion peroxyde.....	116
1.3.1.d. Génération par l'ozone.....	116
I.3.2. Génération enzymatique in vivo	116
1.3.2.a. Activité de la lactoperoxydase.....	117
1.3.2.b. Activité de la chloroperoxydase	117
1.3.2.c. Activité supposée d'autres enzymes.....	117
I.3.3. Par réaction photosensibilisée	117
1.3.3.a. A partir de l'état singulet du PS.....	118
1.3.3.b. A partir de l'état triplet du PS.....	119
I.4. Inhibition de l'oxygène singulet	121
I.4.1. Quenching chimique	121
1.4.1.a. Réaction de type Alder-ène	122
1.4.1.b. Cycloaddition [2+2]	124
1.4.1.c. Cycloaddition [4+2]	126
1.4.1.d. Réactions avec des hétéroatomes.....	131
I.4.2. Quenching physique.....	132
1.4.2.a. Les caroténoïdes.....	133
1.4.2.b. L'azide de sodium	134
1.4.2.c. Les phénols.....	134
1.4.2.d. Les flavonoïdes.....	135
1.4.2.e. Les acides aminés et les protéines.....	136
1.4.2.f. Les indigoïdes	137
1.4.2.g. Cas particulier du DABCO	137
I.5. Détection	138

I.5.1. Mesure directe.....	138
1.5.1.a. <i>En solution</i>	139
1.5.1.b. <i>In vitro</i>	139
1.5.1.c. <i>In vivo</i>	140
I.5.2. Mesure indirecte.....	140
1.5.2.a. <i>Sondes dont les propriétés d'absorption varient avec la formation d'oxygène singulet</i>	140
1.5.2.b. <i>Sondes dont les propriétés de fluorescence varient avec la formation d'oxygène singulet</i>	140
1.5.2.c. <i>Sondes détectables par ESR/EPR</i>	141
II. Généralités sur les Molecular Beacons.....	142
II.1. Présentation générale.....	142
II.1.1. Principe structural.....	142
II.1.2. Applications des molecular beacons.....	145
II.1.2.a. <i>Applications en imagerie</i>	145
II.1.2.b. <i>Applications en PDT</i>	147
II.1.3. Avantages et inconvénients des molecular beacons pour la PDT.....	147
II.2. Principe photophysique.....	148
II.2.1. Le quenching collisionnel.....	150
II.2.2. Le quenching par FRET.....	152
II.2.3. Choisir le bon couple de fluorophores.....	155
III. Régulation de la production d'oxygène singulet en PDT.....	158
III.1. Notre revue: Modulation of Photosensitization Processes for an Improved Targeted Photodynamic Therapy (<i>Curr. Med. Chem.</i> , 2010).....	158
III.2. Avancées récentes.....	158
III.2.1. Régulation passive de l'oxygène singulet.....	158
III.2.1.a. <i>En utilisant le pH acide de la tumeur</i>	158
III.2.1.b. <i>En contrôlant l'agrégation et la désagrégation du PS</i>	159
III.2.2. Régulation active de l'oxygène singulet.....	160
Références.....	163
Chapitre III : Vers la conception d'un nouveau PMB ciblant les MMP-2 et MMP-9.....	172
I. Stratégie de synthèse.....	172

II. Détermination et synthèse du photosensibilisateur.....	174
II.1. Synthèse de la TPC.....	175
II.1.1. Synthèse de la porphyrine.....	175
II.1.2. Synthèse de la chlorine.....	176
II.2. Caractérisations photophysiques.....	178
II.2.1. Propriétés photophysiques de la P ₁ COOH.....	178
II.2.1.a. Propriétés d'absorption ($S_0 \rightarrow S_{n<2}$).....	178
II.2.1.b. Propriétés d'émission de fluorescence.....	179
II.2.1.c. Formation d'oxygène singulet.....	181
II.2.2. Propriétés photophysiques de la C ₁ COOH.....	182
II.2.2.a. Propriétés d'absorption.....	182
II.2.2.b. Propriétés d'émission de fluorescence.....	183
II.2.2.c. Formation d'oxygène singulet.....	185
II.3. Synthèse du pseudo-Foscan.....	185
II.3.1. Synthèse de la P ₂ COOH.....	186
II.3.1.a. Sans groupement protecteur ($R = H$).....	186
II.3.1.b. Avec un groupement acétyle ($R = Ac$).....	187
II.3.1.c. Avec un groupement triméthylsilane ($R = TMS$).....	187
II.3.1.d. Avec un groupement méthyle ($R = Me$).....	187
II.3.2. Synthèse de la C ₂ COOH.....	188
III. Synthèse du conjugué PS-peptide.....	190
III.1. Synthèse du peptide.....	190
III.1.1. Généralités sur les peptides et protéines.....	190
III.1.2. La synthèse peptidique sur phase solide.....	195
III.1.3. Synthèse du peptide GPLGIAGQK.....	198
III.2. Synthèse et caractérisation du conjugué « PS-peptide ».....	200
III.2.1. Synthèse du conjugué.....	200
III.2.1.a. Activation du photosensibilisateur.....	200
III.2.1.b. Couplage au peptide.....	200
III.2.2. Caractérisations photophysiques du conjugué.....	202
IV. Choix et synthèse du quencher.....	203
IV.1. Choix du <i>quencher</i>	203

IV.1.1. Les quenchers testés	203
IV.1.2. Les tests de quenching.....	205
IV.1.2.a. Protocole expérimental.....	205
IV.1.2.b. Résultats.....	205
IV.1.3. Conclusion.....	208
IV.2. Synthèse du caroténoïde.....	209
IV.2.1. Synthèse du bromure de 4-carbométhoxybenzyltriphenylphosphonium	209
IV.2.2. Réaction de Wittig – Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)-β-carotène....	210
IV.2.3. Saponification – Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)-β-carotène.....	211
IV.3. Conclusion	211
V. Couplage enzymatique	212
V.1. Détermination du solvant de réaction.....	213
V.2. Réactions de couplage enzymatique.....	214
V.3. Conclusions sur l'emploi du caroténoïde comme <i>quencher</i>	216
Références	218
Chapitre IV : Elaboration et caractérisation photophysique et biologique d'une nouvelle famille de PMB	221
I. Introduction.....	221
Discussion	259
Introduction	259
Stratégie synthétique	260
Propriétés photophysiques.....	261
Caractérisation biochimique.....	264
Conclusion.....	267
Conclusions et perspectives	269
Matériel	273
Produits chimiques	273
Synthèse peptidique sur support solide.....	273
Propriétés photophysiques.....	274

Spectroscopie statique	274
Spectroscopie dynamique.....	274
Analyses.....	276
Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	276
Chromatographie sur couche mince (CCM)	276
Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	277
Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	277
Méthodes	278
Synthèse chimique (les synthèses des photosensibilisateurs, des conjugués et des PMBs sont décrits dans la publication).....	278
Synthèse du caroténoïde.....	278
Synthèse de couplage enzymatique :.....	280
Propriétés biologiques.....	280
Publication	281
Liste des figures	320
Liste des tableaux	330

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
τ_Δ	Temps de vie de l'oxygène singulet
τ_F	Temps de vie de fluorescence
Φ_Δ	Rendement quantique d'oxygène singulet
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
AA	Acide Aminé
Ac	Acétyle
ADMDMA	Acide 9,10-anthracènediyl-bis-(méthylène)dimalonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique cyclique
ADPA	Acide 9,10-anthracènedipropionique disodique
Ahx	Acide aminohexanoïque
Ala (A)	Alanine
ALA	Acide aminolévulinique
Alloc	Allyloxy-carbonyle
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Ang-1	<i>Angiopoietin-1</i>
Asp (D)	Acide aspartique
APC	<i>Activated Protein C</i>
Ar	Aryle
ARC	Association pour la Recherche sur le Cancer
ARN	Acide ribonucléique
Arg (R)	Arginine
BBQ650	<i>BlackBerry Quencher</i>
b-FGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
[Bmim] ⁺	1-butyl-2-méthylimidazolium

BHQ-3	<i>Black Hole Quencher - 3</i>
Boc	Tert-Butyloxycarbonyle
BPDMA	<i>BenzoPorphyrin Derivative Monoacid ring A</i>
C ₁ COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine
C ₂ COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tri (3-hydroxy) phénylchlorine
CA	<i>Cystein Array</i>
Car-COOH	7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)-β-carotène
Car-COOMe	7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)-β-carotène
Cat	Domaine Catalytique
CAV	Centre Alexis Vautrin
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI	Conversion Interne
CIRC	Centre Internationale de Recherche sur le Cancer
CIS	Croisement Inter Système
CoA	Coenzyme A
CoproIII	<i>Coproporphyrinogen III</i>
CP	Domaine Cytoplasmique
CRAN	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
Cy5.5	Cyanine 5.5
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMA	9,10-diméthylanthracène
DMAD	Diméthylacétylène dicarboxylate
DMAX	9-[2-(3-carboxy-9,10-diméthyl)anthryl]-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge

DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dpa	<i>N</i> -3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionyle
DPA	9,10-diphénylanthracène
DPAX	9-[2-(3-carboxy-9,10-diphényl)anthryl]-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one
DPG	Département de Photochimie Générale
ENSAIA	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
EtOH	Ethanol
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
Fu	Furine
Gln (Q)	Glutamine
Gly (G)	Glycine
GP	Groupe Protecteur
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
HATU	Héxafluorophosphate d'azabenzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
HbO ₂	Hémoglobine
HBTU	Héxafluorophosphate de <i>O</i> -benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HP	Hématoporphyrine
HpD	<i>Hematoporphyrin Derivative</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPPH	2-(1-hexyloxyéthyl)-2-divinylpyrophéorbide - alpha
HR-LCMS	<i>High Resolution Liquid Chromatography Mass Spectroscopy</i>
IDL	Intervalle Drogue-Lumière

Ig	Immunoglobuline
Ile (I)	Isoleucine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCMS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectroscopy</i>
LCPM	Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
Leu (L)	Leucine
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
Lys (K)	Lysine
M ₂ B ₂	2-méthyl-2-butanol
Mca	(7-Méthoxycoumarin-4-yl)acétyle
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MeONa	Méthanoate de sodium
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Métalloprotéinases matricielles (<i>Matrix MetalloProteinases</i>)
MMPI	<i>Matrix MetalloProteinases Inhibitors</i>
<i>m</i> -THPC	<i>mé</i> ta-tétrahydroxyphénylchlorine
<i>m</i> -THPP	<i>mé</i> ta-tétrahydroxyphénylporphyrine
MT-MMP	<i>Membrane-Type Matrix MetalloProteinases</i>
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthylpyrrolidone
NPc	Naphtalocyanine
NRP-1	Neuropiline - 1
OE _t ₂	Ether diéthylique

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisations Non Gouvernementales
P ₁ COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
P ₂ COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tri (3-hydroxy) phénylporphyrine
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle
PBG	Porphobilinogène
Pc	Phtalocyanine
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PDT	Thérapie Photodynamique (<i>PhotoDynamic Therapy</i>)
PEDF	<i>Pigment Epitelium-Derived Factor</i>
PEG	PolyEthylène Glycol
[PF ₆] ⁻	Hexafluorophosphate
Ph	Phényle
pH	Potentiel Hydrogène
PMB	<i>Photodynamic Molecular Beacon</i>
Pro (P)	Proline
ProtoIX	Protoporphyrinogène IX
PpIX	Protoporphyrine IX
PS	Photosensibilisateur
<i>p</i> -TSH	<i>para</i> -toluènesulfonylhydrazine
RASI-1	<i>Rheumatoid Arthritis Synovium Inflamed - 1</i> (MMP-19)
RCHO	Aldéhyde
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNH ₂	Amine primaire
S ₀	Etat fondamental singulet
S ₁	Premier état excité singulet

S_n	$n^{\text{ème}}$ état excité singulet
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>
SPPS	Synthèse Peptidique sur Phase Solide (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
T_1	Premier état excité triplet
T_n	$n^{\text{ème}}$ état excité triplet
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photon Counting</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor - beta</i>
THF	Tétrahydrofurane
Thr (T)	Thréonine
Tie-2	<i>Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains - 2</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of MetalloProteinases</i>
TM	Domaine TransMembranaire
TMS	Triméthylsilane
TNBSA	Acide trinitrobenzènesulfonique
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>
t-PA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>
TPC	Tétraphénylchlorine
TPP	Tétraphénylporphyrine
t_R	Temps de rétention
Trt	Trityle
Trp (W)	Tryptophane
u-PA	<i>Urokinase-type Plasminogen Activator</i>
UroIII	<i>Uroporphyrinogen III</i>
UV	Ultra-Violet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
Vn	Vitronectine
VTP	<i>Vascular Targeted Photodynamic therapy</i>
Z	Benzyloxycarbonyl

Introduction générale

Cette thèse se présente comme le fruit d'un travail interdisciplinaire dont la thématique est la Thérapie Photodynamique (PDT) anticancéreuse. La PDT est une stratégie thérapeutique anticancéreuse à visée curative ou palliative, faisant intervenir une molécule photosensible, activée par une lumière de longueur d'onde appropriée et de l'oxygène. Cette approche thérapeutique peut également être employée dans d'autres domaines médicaux, comme le traitement antibactérien, en dermatologie, en ophtalmologie etc., mais ces applications ne font pas partie du cadre de cette thèse et ne seront donc pas abordées.

La PDT est reconnue comme une modalité thérapeutique alternative de certains cancers. Cette méthode est basée sur l'activation d'une molécule photosensible, appelée « photosensibilisateur » (PS), par un rayonnement lumineux. Cette activation engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (aussi appelées EROs, de l'anglais ROS : *Reactive Oxygen Species*), dont le principal acteur est admis comme étant l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), qui correspond à une espèce extrêmement réactive du dioxygène, capable de réagir avec de nombreux substrats biologiques et ainsi provoquer la mort cellulaire. L'oxygène singulet étant une espèce très réactive, seuls les tissus dans l'environnement direct du PS sont concernés, offrant ainsi une excellente résolution spatiale et une protection des tissus n'incorporant pas le PS.

Malgré ses aspects attractifs, la PDT souffre d'un certain nombre de limites, comme la disponibilité de photosensibilisateurs sélectifs pour les tissus cancéreux et, dans certaines applications, la faible absorption des PS dans la zone thérapeutique. La Recherche se tourne donc vers l'élaboration de nouveaux composés plus adaptés à la réalité du traitement et aux conditions cliniques, tout en s'intéressant à la dosimétrie, l'efficacité de l'excitation lumineuse, la sélectivité du médicament envers les tissus ciblés, etc. Les stratégies de PDT anticancéreuse s'orientent aujourd'hui vers la création de molécules « hybrides », composées d'un principe actif photoactivable et d'un vecteur permettant la reconnaissance biologique (*e.g.* sucres, peptides, anticorps). Cette thèse s'inscrit donc dans la poursuite de l'effort dans l'élaboration de molécules utilisables pour la PDT, molécules dont la toxicologie, ainsi que

les propriétés physico-chimiques et photophysiques correspondent au cahier des charges développé dans ce manuscrit.

La finalité stratégique suivie dans ce travail a été le ciblage et la destruction de la néo-vascularisation tumorale afin de priver la tumeur de ses apports en oxygène et en nutriments, nécessaires à sa survie. Afin de parvenir à détruire la néo-vascularisation tumorale, l'élaboration d'une construction moléculaire appelée *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB), composée d'un PS associé à un inhibiteur d'états excités, couplés *via* un marqueur spécifique des tissus angiogéniques, a été réalisée. Ce PMB est « photophysiquement inactif » là où les marqueurs tumoraux spécifiques ne sont pas exprimés et ne pourra donc exprimer sa toxicité qu'au niveau des néo-vaisseaux tumoraux. Cette stratégie passe donc par la sélection d'un vecteur biologique de l'angiogenèse peu ou pas exprimé dans les tissus sains. Pour notre étude, nous avons décidé d'utiliser les métalloprotéinases matricielles (MMP), une famille d'enzymes très actives pendant la phase de croissance angiogénique. Parmi les MMPs, les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) sont connues pour être fortement exprimées dans les tissus tumoraux et donc d'excellentes cibles thérapeutiques pour la PDT anti-vasculaire.

L'élaboration et l'étude photophysique et biologique d'un PMB ciblant les MMP- 2 et 9 est un travail qui a demandé une collaboration interdisciplinaire étroite, les qualités de cette molécule étant liées à la chimie, à la photophysique et à la biologie. Dans cette thèse, nous avons élaboré une famille de PMB utilisant un unique photosensibilisateur, la tétraphénylchlorine (TPC), couplée à un inhibiteur, aussi appelé *quencher*, le *BlackBerry Quencher* (BBQ650), reliés par des peptides substrats des MMP-2 et -9 : les peptides H-GPLGIAGQ-OH et H-PLGL-OH. Des caractérisations photophysiques ont été menées sur ces PMB afin d'établir une relation entre la distance du PS et du *quencher* sur la qualité de l'effet photodynamique, ainsi que l'activité biologique de chaque composé.

Afin d'introduire les travaux de thèse à proprement parler, ce manuscrit débute avec une introduction globale sur le sujet. Le chapitre I traite de l'état de l'art en PDT anticancéreuse et présente les principaux photosensibilisateurs existant en PDT aujourd'hui en clinique et dans le domaine de la recherche. Le chapitre II est consacré à l'oxygène singulet et aux *molecular beacons*. Une revue (Verhille *et al.*, *Current Medicinal Chemistry*, 2010) concernant la régulation de la production d'oxygène singulet en PDT conclut cette partie.

Le chapitre III relate l'élaboration rationnelle d'un PMB intégrant notre stratégie en VTP. Dans ce chapitre, nous discutons du choix du couple photosensibilisateur/*quencher*, des synthèses et des études photophysiques des acteurs du PMB ainsi que les différentes stratégies de couplage de ces entités sur le peptide. Parmi ces stratégies de couplage, nous détaillerons une approche originale élaborée avec l'équipe LRGP de l'ENSAIA, à savoir la tentative de couplage enzymatique du *quencher* sur le peptide. Ces études préliminaires ont permis de mieux appréhender l'effet des constituants du PMB et d'en connaître les limites. Cette étude a servi de base pour définir une stratégie globale afin d'élaborer une nouvelle famille de PMB décrite dans le chapitre IV. Celui-ci est consacré à l'élaboration et de l'étude approfondie d'une série de composés faisant intervenir la TPC et le BBQ650, reliés *via* des peptides et des bras espaceurs de différentes tailles, permettant d'étudier l'efficacité de l'effet PDT en fonction de la distance TPC/BBQ650. Ces travaux font l'objet d'une publication (acceptée dans *Current Medicinal Chemistry*) et sont donc présentés comme tels. Néanmoins l'introduction, la discussion et la conclusion sont proposées en français à la suite du document.

Enfin, la conclusion de ce manuscrit a pour objectif de tirer un bilan de cette étude et propose des ouvertures quant à la poursuite du projet.

Une coopération aussi étroite entre différents laboratoires autour d'une thématique interdisciplinaire nécessite l'intervention et la compétence de nombreux partenaires. Les tableaux suivants décrivent et énoncent l'« équipe PDT » de Nancy, ainsi que les principaux collaborateurs ayant participé à ce projet.

Equipe PDT Nancy :

Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés, LRGP UPR 3349 CNRS (ENSIC)	Synthèse de photosensibilisateurs, Etudes photophysiques
Céline Frochot (directrice de thèse)	D.R.
Jean-Claude André	D.R.
Philippe Arnoux	I.E.
Francis Barros	C.R.
Pierre Couleaud	Doctorant (2007-2011)
Aymeric Sève	Doctorant
Rima Chouikrat	Doctorante
Khalil Zhagdoudi	Doctorant
Albert Moussaron	Post-doctorant

Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules (LCPM) UMR 7568 CNRS, ENSIC	Synthèse de photosensibilisateurs, Synthèse peptidique
Régis Vanderesse (co-directeur de thèse)	C.R.
Mathilde Achard	Technicienne
Ludovic Colombeau	Post-doctorant (2010)
Ezatul Kamarulzaman	Doctorante (2007-2012)

Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN-CAV)	Caractérisations biologiques
UMR 7039 CNRS, Centre Alexis Vautrin	
Muriel Barberi-Heyob	HdR
Hamanou Bénachour	Post-doctorant
Denise Béchet	Doctorante (2007-2011)
Marlène Pernot	Doctorante
Gaëlle Creusat	Post-Doctorante

Collaborations extérieures :

Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés (LRGP)	Synthèse enzymatique, Spectrométrie de masse haute résolution
UPR 3349 CNRS, ENSAIA	
Isabelle Chevalot	D.R.
Catherine Humeau	MdC
Cédric Paris	I.E.

Département de Photochimie Générale (DPG)	Spectrométrie d'absorption transitoire
UMR 7525 CNRS, Mulhouse Université	
Xavier Allonas	D.R.
Ahmad Ibrahim	Doctorant (2007-2011)

Chapitre I : État de l'art

Chapitre I : État de l'art

I. La Thérapie PhotoDynamique (PDT) anticancéreuse

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme. Le cancer est un terme général pour décrire la division incontrôlée de certaines cellules du corps humain ; les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (néoplasme) ou se propager à travers le corps (métastases). En 2008, le cancer était la cause de 7,8 millions de décès, soit 13% de la mortalité mondiale (derniers chiffres de l'OMS). Le cancer touche essentiellement les pays industrialisés (figure 1-1), mais 70% des décès dus au cancer touchent les pays à revenus faibles ou intermédiaires.

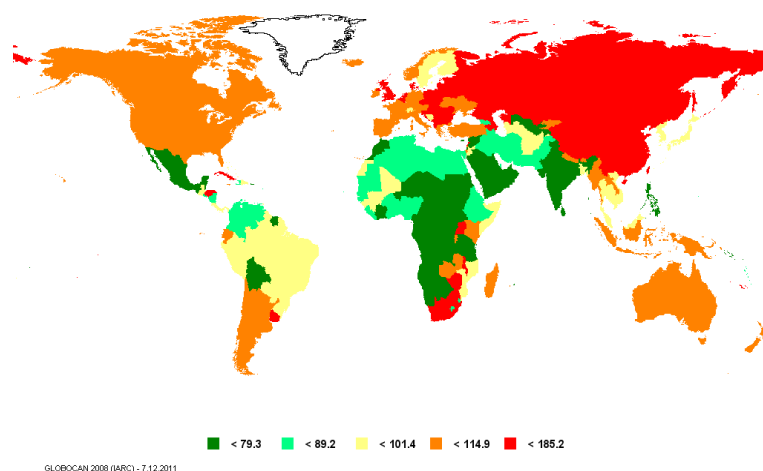


Figure 1-1 : Carte du monde sur l'estimation du nombre de malades du cancer par pays (tous cancers, tous sexes, tous âges) sur 100000 habitants. Source : GLOBOCAN 2008 de l'OMS.

La Thérapie PhotoDynamique (ou PDT pour l'anglais *PhotoDynamic Therapy*) est une des méthodes de traitement du cancer. Le principe du traitement correspond à l'utilisation conjointe d'une molécule appelée « photosensibilisateur » et d'une lumière de longueur d'onde appropriée, en présence d'oxygène.

Le cancer est aujourd'hui au centre des préoccupations du grand public, il bénéficie donc d'une forte mobilisation des acteurs médicaux, de la recherche et des ONG. Les principales organisations de lutte contre le cancer en France et dans le monde sont :

- La Ligue
- ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer)
- UNICANCER
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dont la branche cancer se nomme le CIRC (Centre Internationale de Recherche sur le Cancer)

I.1. Le cancer

I.1.1. Bref historique

Si le cancer touche toutes les populations et tous les âges, il a également sévi de tous temps (1, 2). Les premiers textes traitant du cancer remontent à l'Antiquité et quelques types de tumeurs ont été retrouvés dans des os datant de la préhistoire. Le cancer a donc toujours fait partie de nos vies, mais ce n'est que depuis le milieu du XX^e siècle qu'il est devenu le centre des préoccupations du corps médical et social.

On trouve des écrits relatifs au cancer dans toutes les premières civilisations méditerranéennes (Égypte, Mésopotamie, Perse). Au IV^e siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate donne la première définition de ce mal sous le nom de « carcinome » ou de « sqi(h)rre », que le latin traduira par « cancer ». Des descriptions plus tardives l'appelleront « tumeur dure », « non inflammatoire », « avec tendance à la récurrence et à la généralisation, amenant une issue fatale ». Au I^e siècle après J.C., Galien reporte que les tumeurs étaient dues à un excès d'humeur, ou de bile noire, qui se solidifiait dans certaines parties du corps.

Au XVI^e siècle de notre ère, Ambroise Paré relie la formation de métastases à des manifestations de l'humeur noire. Entre le XVII^e et le XIX^e siècle, Sennert affirme que le cancer est contagieux, ce qui aura pour conséquence l'exclusion des cancéreux. En réponse, le

chanoine Godinot fonde en 1740 un « hôpital des cancérés », à Reims, destiné à « recueillir les cancéreux pour soulager leurs misères physiques et morales » (1).

C'est à partir du XVII^e siècle que le corps scientifique commence à se faire une idée plus précise du cancer. L'emploi du microscope en biologie marque un tournant décisif dans la compréhension de sa biologie et de sa structure. Après bien des théories, il devient la maladie des cellules, et l'on introduit le concept de mutation cellulaire, ce qui permettra aux médecins et aux chirurgiens de traiter avec plus d'efficacité les malades du cancer (1, 2).

1.1.2. Généralités sur le cancer

1.1.2.a. Définition générale

Le cancer désigne une multiplication et une prolifération anormale de certaines cellules. Presque tous les tissus de notre organisme peuvent être affectés par ce dérèglement dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses.

Une cellule dite normale a un cycle de vie bien défini comprenant sa mort programmée : l'apoptose. Une série de mutations génétiques d'au moins une cellule est à l'origine du processus de cancérisation : la cellule développe une insensibilité à l'apoptose et n'est plus capable de réparer cette erreur sur l'ADN. En fonction du type de cellule dans laquelle s'est produite la première transformation, les cancers vont être dits lymphomes, carcinomes ou sarcomes. Par la suite, la première cellule maligne va se diviser, formant la tumeur primaire. Les cellules cancéreuses ne pouvant plus rentrer en apoptose « normale », il en résulte une croissance non régulée de la masse tumorale (figure 1-2).

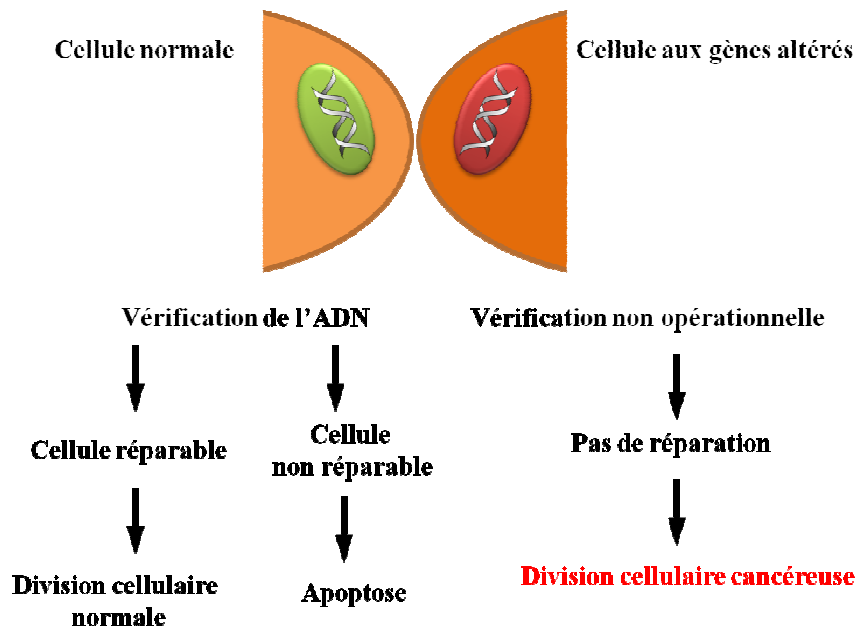


Figure 1-2 : Schéma simplifié de la différenciation cellulaire entre une cellule saine et une cellule cancéreuse. Source : l'ARC.

Il est admis qu'une tumeur ne peut se développer seule au-delà de 2 mm^3 . Le manque d'accès à l'oxygène et aux nutriments ambiants n'est plus suffisant pour que la tumeur croisse de manière indépendante. La tumeur rentre en hypoxie. Cette hypoxie va être accompagnée par la sécrétion de messagers chimiques induisant la formation de néo-vaisseaux tumoraux dans le but d'accéder à l'oxygène et aux nutriments de la circulation sanguine générale (3, 4).

Le développement tumoral s'accompagne finalement de la production de métastases, à savoir la croissance de la tumeur à distance de la tumeur primaire. Des cellules vont en effet se décrocher de la masse tumorale pour se loger dans d'autres organes et initier une tumeur secondaire. Différentes métastases existent, dépendant principalement du mode de drainage veineux de l'organe atteint par la tumeur. Ce stade du processus de cancérisation correspond à un cancer généralisé.

1.1.2.b. Guérir du cancer

Pendant longtemps, la seule méthode utilisée pour guérir du cancer était l'ablation de la tumeur. L'intervention chirurgicale a néanmoins un frein : elle n'est efficace que si le cancer évolue lentement, comme le cancer du sein par exemple. La chirurgie est donc

inefficace dans le cas de la formation de métastases, c'est pour cela qu'aujourd'hui la chirurgie est souvent accompagnée de traitements complémentaires.

Les principales méthodes utilisées aujourd'hui sont :

- **La radiothérapie** : ce traitement consiste en l'utilisation de rayons X contre la tumeur afin de détruire son capital génétique et d'empêcher sa reproduction. Elle peut être utilisée avant la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur ou après pour détruire les cellules ayant échappé à l'exérèse.
- **La chimiothérapie** : il s'agit de la prise de substances chimiothérapeutiques fonctionnant majoritairement par arrêt de la mitose. Ces médicaments ciblent préférentiellement les cellules se divisant rapidement ; ils sont donc peu sélectifs des cellules néoplasiques et touchent également les cellules saines.
- **L'immunothérapie** : les défenses immunitaires sont renforcées afin de pouvoir combattre plus efficacement les tumeurs malignes.
- **L'hormonothérapie** : dans les cancers hormono-dépendants, la survie et la prolifération cellulaire sont maintenues par des hormones. Il s'agit donc de priver les cellules tumorales de cette influence hormonale.
- **Le traitement anti-angiogénique** : ce traitement est basé sur l'inhibition des facteurs de croissance des néo-vaisseaux tumoraux, ralentissant l'angiogenèse.

D'autres méthodes existent encore (les thérapies ciblées, la thérapie génique, la chimiothérapie métronomique, la curithérapie, l'hyperthermie, etc.) mais sont soit peu connues, soit peu encore utilisées. C'est le cas notamment de la **thérapie photodynamique**, qui sera l'objet de la suite de ce chapitre.

1.1.3. L'angiogenèse tumorale

1.1.3.a. Définition

L'angiogenèse est définie comme la formation d'un réseau de nouveaux capillaires sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle intervient lors de différents processus de remodelage du réseau vasculaire comme le développement embryonnaire, la régénération de l'utérus (5), la cicatrisation ou encore l'adaptation musculaire à l'effort physique (6), mais elle intervient également lors du développement de certaines maladies, telles que la

dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), le sarcome de Kaposi, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'obésité, la maladie d'Alzheimer (7) et le cancer (8). C'est donc un mécanisme physiologique indispensable et hautement régulé (9).

Les cellules endothéliales tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins et constituent l'endothélium vasculaire tumoral. Une face des cellules, la face luminale, est en contact avec le sang, alors que l'autre face est en contact avec la lame basale, principalement constituée de collagène. Dans la vie adulte normale, les cellules endothéliales ont une vitesse de renouvellement très lente, de l'ordre de 1000 jours. On dit que l'arbre vasculaire est quiescent. Les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques sont en équilibre et empêchent ainsi la prolifération des cellules endothéliales. Or, le fonctionnement normal d'un tissu est dépendant de sa capacité à s'alimenter en oxygène. Comme mentionné précédemment, Folkman *et al.* ont démontré que les tumeurs pouvaient s'étendre indépendamment jusqu'à 1 ou 2 mm³, limite de diffusion de l'oxygène, des nutriments et d'élimination des déchets métaboliques (10). On appelle cette phase *la phase dormante* ou *avasculaire*. Au-delà de cette taille, les tumeurs ont besoin de s'alimenter en oxygène et en nutriments *via* une néo-vascularisation. Il y a rupture de l'équilibre entre activation et inhibition de l'angiogenèse et sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, c'est le « *switch* » *angiogénique* (11). La figure 1-3 illustre le processus de néo-vascularisation tumorale.

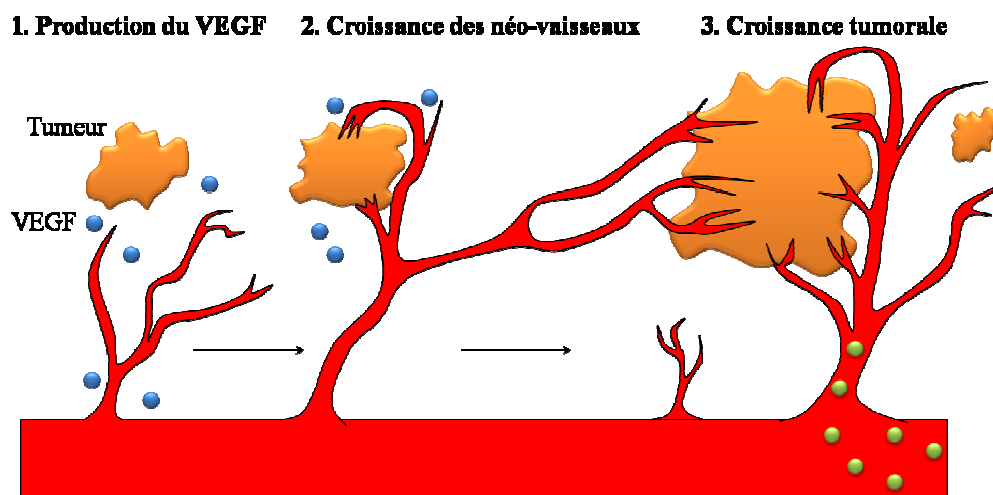


Figure 1-3 : Schéma du processus de néo-vascularisation tumorale. Réf. : (12).

1.1.3.b. Le mécanisme angiogénique

Le mécanisme angiogénique peut être divisé en plusieurs étapes (figure 1-4) (13) :

- L'initiation ou bourgeonnement : activation des cellules endothéliales suite à l'induction d'un régulateur positif.
- Dégradation de la lame basale et de la matrice extracellulaire (MEC).
- Migration des cellules endothéliales dans la MEC en direction du stimulus, puis formation d'un bourgeon capillaire.
- Prolifération des cellules endothéliales.
- Reconstitution de la lame basale afin de permettre la fonctionnalité des tubules et d'être capable d'assurer un flux sanguin.

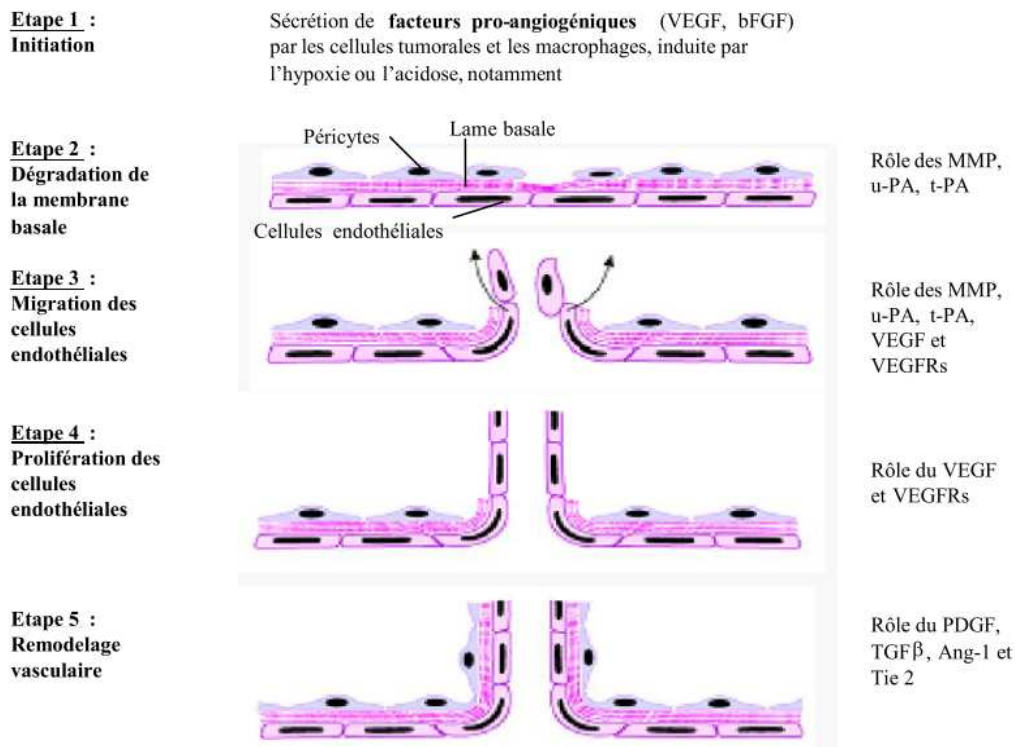


Figure 1-4 : Etapes de l'angiogenèse tumorale. Réf. : (10). Annotations françaises tirées de la thèse de Loraine Tirand (14).

Ces différentes étapes dans la construction des néo-vaisseaux tumoraux sont assurées par de nombreux facteurs angiogéniques tels que le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), les *Fibroblast Growth Factors* (FGF), les angiopoïétines, les inhibiteurs et les activateurs du plasminogène, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et les métalloprotéinases matricielles

(MMPs). La figure 1-5 récapitule l'intervention de certaines de ces biomolécules durant l'angiogenèse.

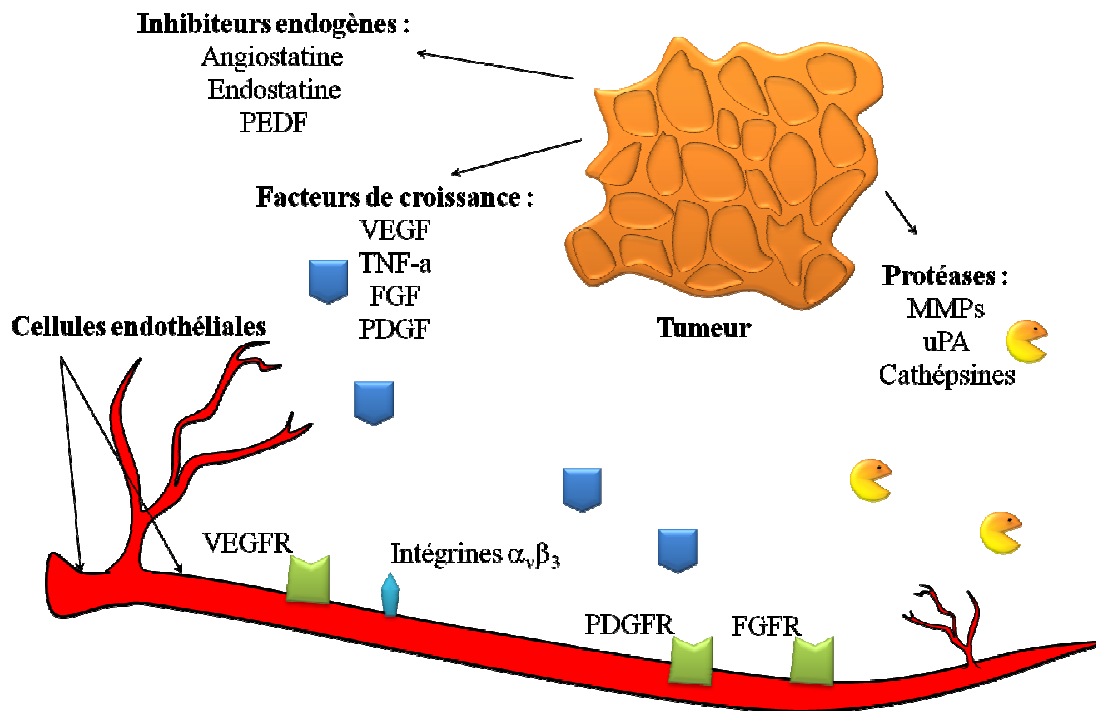


Figure 1-5 : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale. PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor ; FGF : Fibroblast Growth Factor ; FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor ; PDGF : Platelet-Derived Growth Factor ; PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor ; uPA : urokinase-type Plasminogen Activator.

1.1.4. Rôle des MMPs dans l'angiogenèse tumorale

La MEC est un réseau complexe de macromolécules capables d'influencer profondément la fonction cellulaire et l'architecture tissulaire. De nombreux processus biologiques sont dépendants des interactions avec la MEC, tels que la migration et la différenciation cellulaire, la morphogenèse et le remodelage tissulaire. Durant l'angiogenèse, la dégradation de la MEC afin de permettre la migration cellulaire est assurée par une famille d'endopeptidases : les métalloprotéinases matricielles, ou MMPs (de l'anglais *Matrix MetalloProteinases*).

I.1.4.a. La famille des métalloprotéinases matricielles

Les MMPs forment une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes qui interviennent dans différents types de processus cellulaires comme le développement d'organes, l'ovulation, l'implantation du fœtus dans l'utérus, l'embryogenèse, et l'angiogenèse (15). Leur activité principale est de dégrader la matrice extracellulaire, elles ont donc une activité peptidase extrêmement sélective. Elles sont actives à pH neutre et nécessitent la présence d'ions Ca^{2+} pour une meilleure efficacité.

Vingt-six MMPs humaines sont connues et classifiées en fonction de leur spécificité. Elles peuvent être classées en deux groupes : les MMPs sécrétées et les MMPs associées à la membrane (MT-MMPs). Les MT-MMPs sont caractérisées par un domaine transmembranaire et intracellulaire supplémentaires. Les MMPs sécrétées sont classifiées sur la base de la spécificité et l'homologie de leurs substrats (16), elles comprennent les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), les gélatinases (gélatinase A : MMP-2, gélatinase B : MMP-9), les stromélysines (stromélysine-1 : MMP-3, stromélysine-2 : MMP-10, stromélysine-3 : MMP-11) et les autres MMPs (matrilysine : MMP-7, MT-MMP...) (17). Le tableau 1-1 présente la classification de ces enzymes (17).

Tableau 1-1 : Classification des MMPs. Réf. : (17).

No.	MMP No.	Classe	Enzyme
1	MMP-1	Collagénases	Collagénase-1
2	MMP-8		Collagénase neutrophile
3	MMP-13		Collagénase-3
4	MMP-18		Collagénase-4
5	MMP-2	Gélatinases	Gélatinase-A
6	MMP-9		Gélatinase-B
7	MMP-3	Stromélysines	Stromélysine-1
8	MMP-10		Stromélysine-2
9	MMP-11		Stromélysine-3
10	MMP-27		Homologie à la stromélysine-2 (51,6%)
11	MMP-7	Matrilysines	Matrilysine
12	MMP-26		Matrilysine-2

Tableau 1-1 (suite).

13	MMP-14	MT-MMP (<i>membrane type</i>)	MT1-MMP
14	MMP-15		MT2-MMP
15	MMP-16		MT3-MMP
16	MMP-17		MT4-MMP
17	MMP-24		MT5-MMP
18	MMP-25		MT6-MMP
19	MMP-12	Autres enzymes	Métalloélastase du macrophage
20	MMP-19		RASI 1
21	MMP-20		Enamelysine
22	MMP-21		MMP identifiée sur le chromosome 1
23	MMP-22		MMP identifiée sur le chromosome 1
24	MMP-23		De l'ADNc ovarien
25	MMP-28		Epilyisine
26	MMP-29		-

Les MMPs sont régulées par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines. Leur activité est, quant à elle, strictement contrôlée par des inhibiteurs endogènes de MMPs (MMPIs) ainsi que des inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs).

Les structures des MMPs diffèrent, mais trois domaines sont conservés. La figure 1-6 représente les structures des différentes MMPs. Les MMPs peuvent être divisées en huit groupes structuraux distincts, dont cinq correspondent à des MMPs sécrétées et trois à des MMPs membranaires. Pour les MMPs sécrétées, le domaine minimal contient une séquence signal au niveau de l'amine terminale (Pre) qui les dirige vers le réticulum endoplasmique, un pro-peptide (Pro), comprenant un groupement thiol interagissant avec le zinc qui les maintient sous forme de zymogènes inactifs, et un domaine catalytique (Cat) comprenant un site coordonné à un zinc (Zn^{2+}). En plus des domaines rencontrés dans le domaine minimal des MMPs, certaines MMPs ont un domaine « *hemopexin-like* » qui fait office d'intermédiaire avec les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases, certaines molécules transmembranaires et certains substrats protéiques. Ce domaine « *hemopexin-like* » est relié au domaine catalytique par une charnière peptidique et la première et la dernière des quatre répétitions dans le domaine « *hemopexin-like* » sont liées *via* un pont disulfure (S-S). Les gélatinases

contiennent des séquences apparentées à la fibronectine. Les MMPs sécrétées activées par une furine contiennent un motif de reconnaissance pour protéinases intracellulaire (Fu) entre le pro-peptide et le domaine catalytique permettant, l'activation intracellulaire par ces protéinases. Ce motif est également rencontré dans les MMPs contenant des séquences apparentées à la vitronectine (Vn) et les MMPs membranaires. Les MT-MMPs incluent les MMPs transmembranaires ayant un domaine transmembranaire (TM) et un très petit domaine cytoplasmique (CP), et les MMPs attachées au glycosylphosphatidylinositol (GPI). La MMP-23 représente un troisième type de MMP membranaire. Elle est caractérisée par son « *cysteine array* » (CA) et son domaine immunoglobuline (Ig) (18).

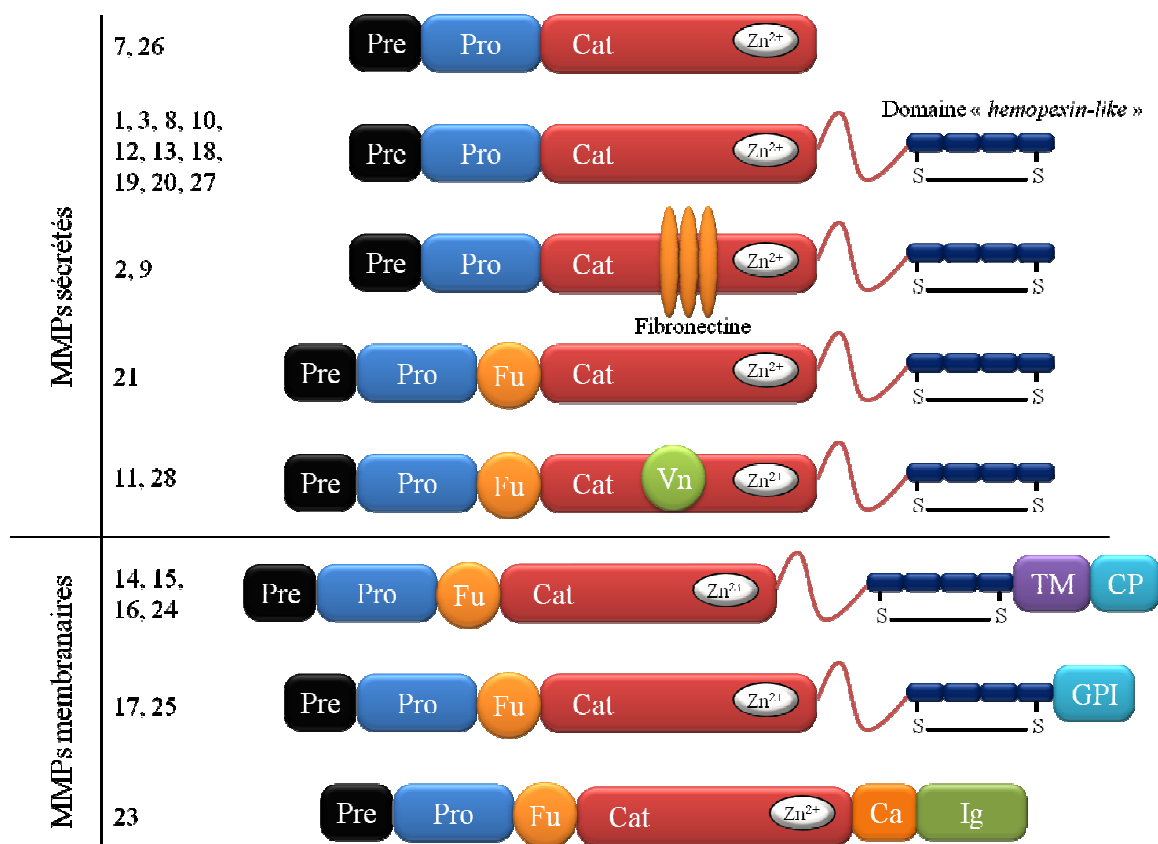


Figure 1-6 : Structures des différentes MMPs. Pre : séquence signal. Pro : pro-peptide. Cat : domaine catalytique. Zn^{2+} : zinc. Fu : site de reconnaissance de furine. Vn : motifs de vitronectine. TM : domaine transmembranaire. CP : domaine cytoplasmique. GPI : glycosylphosphatidylinositol. CA : Cysteine array. Ig : immunoglobuline. Le domaine catalytique est lié au domaine « hemopexin-like » (en bleu foncé) par une région charnière (en rouge).

Les MMPs sont initialement synthétisées sous forme d'enzymes inactives (appelées zymogène ou proenzyme) en raison de la présence du domaine pro-peptidique bloquant le domaine catalytique. Leur activation peut se faire par l'action de protéinases, ou *in vitro* par activation chimique. Ces agents interviennent sur l'interaction entre le groupement thiol porté par le pro-peptide et le zinc du domaine catalytique. La rupture de cette interaction s'appelle le « *cysteine switch* » (19, 20) et provoque l'activation de la MMP.

1.1.4.b. Les MMPs et le cancer

L'expression de nombreuses MMPs a été démontrée comme étant surexprimée dans presque tous les types de cancer et est souvent associée avec un stade précoce, avancé, invasif et métastatique du cancer (18, 21). L'expression des MMPs, soit par les cellules tumorales elles-mêmes, soit par les cellules stromales environnantes, participe au remodelage de la MEC et stimule le relargage des facteurs de croissance tumoraux. Ceci a pour conséquence de créer un micro-environnement favorable au développement de la tumeur primaire.

Les MMPs sont aujourd'hui utilisées comme marqueurs tumoraux à différents stades de progression. Leur implication dans les différents types de cancers est résumée dans le tableau 1-2 (22).

Tableau 1-2 : Exemples d'expressions de MMPs dans différents cancers.

Type de cancer	MMP	Tissu	Niveau d'expression	Réf.
Leucémie myéloïde aiguë	MMP-2	Cellules leucémiques de la moelle osseuse	Positif	(23)
Tumeur du cerveau	MMP-2	Cellules tumorales	Positif	(24)
Cancer du sein	MMP-2	Cellules tumorales	Positif	(25)
	MMP-11	Cellules tumorales	Elevé	(26)
Cancer des cervicales	MMP-2	Cellules tumorales	Elevé	(27)
Cancer colorectal	MMP-1	Cellules tumorales	Positif	(28)
	MMP-2	Sérum	Elevé	(29)
	MMP-9	Cellules tumorales	Elevé	(30)
	MMP-9	Sérum	Elevé	(31)

Tableau 1-2 (suite).

Cancer gastrique	MMP-1	Cellules tumorales	Positif	(32)
	MMP-2	Cellules tumorales	Positif	(33)
	MMP-2	Cellules tumorales	Elevé	(34)
	MMP-2	Cellules tumorales	Elevé	(35)
	MMP-9	Cellules tumorales	Elevé	(34)
	MT1-MMP	Cellules tumorales/saines	ratio > 4,8	(36)
	MT1-MMP	Tumeur/stroma	Positif	(37)
Cancer hépatocellulaire	MT1-MMP	Cellules tumorales	Elevé	(38)
Carcinome à cellule squameuse (tête et cou)	MMP-9	Cellules tumorales	Positif	(39)
Adénocarcinome pulmonaire	MMP-2, -9	Cellules tumorales	Elevé	(40)
Cancer du poumon	MMP-9	Sérum	Elevé	(41)
Cancer du poumon à petites cellules	MMP-3, -11, MT1-MMP	Cellules tumorales	Positif	(42)
Cancer du poumon à non petites cellules	MMP-2	Cellules tumorales	Elevé	(43)
	MMP-2, -9	Cellules tumorales	Bas	(44)
	MMP-9	Cellules tumorales	Positif	(45)
Cancer de l'œsophage	MMP-1	Cellules tumorales	Positif	(46)
	MMP-1	Cellules tumorales	Elevé	(47)
	MMP-7	Cellules tumorales	Elevé	(48)
	MMP-13	Cellules tumorales	Elevé	(49)
Cancer des ovaires	MMP-2	Cellules tumorales	Elevé	(50)
	MMP-9	Cellules tumorales	Elevé	(51)
Adénocarcinome pancréatique	MMP-1	Cellules tumorales	Positif	(52)
	MMP-7	Cellules tumorales	Positif	(53)

Des taux élevés de certaines MMPs circulantes peuvent donc être détectés dans les cellules tumorales ou le sérum de patients atteints de cancers avancés. Ces MMPs peuvent servir d'indicateurs pour un pronostic cancéreux mais également de cible thérapeutique, soit par inhibition de ces MMPs, soit par utilisation de leur activité peptidase.

1.1.4.c. Les MMP-2 et -9

Les MMPs -2 et -9 sont appelées les gélatinase-A et gélatinase-B respectivement et font partie des MMPs les mieux caractérisées. Elles sont connues pour jouer un rôle important dans la dégradation de la MEC et sont donc des marqueurs importants de l'angiogenèse.

Leurs structures diffèrent des autres MMPs par la présence d'inserts de fibronectines dans leur domaine catalytique (voir figure 1-6). Les MMP-2 (Gélatinase A, 72 kDa) et MMP-9 (Gélatinase B, 92 kDa) sont très similaires, tant dans leur configuration structurale que dans leurs propriétés de reconnaissance de substrats. De plus, elles partagent de nombreuses caractéristiques en ce qui concerne les mécanismes d'activation et de régulation (tableau 1-3). Les MMP-2 et -9 doivent être localisées sur des récepteurs de la surface cellulaire spécifiques pour être activées.

Tableau 1-3 : Caractéristiques générales des gélatinases. Réf. : (14).

Nom commun	Gélatinase A	Gélatinase B
Nomenclature	MMP-2	MMP-9
Spécificité du substrat	Gélatine, collagènes de type I, IV, V, élastine	Gélatine, collagènes de type I, IV, V, élastine
Masse moléculaire	72 kDa	92 kDa
Masse moléculaire des espèces actives	64 kDa, 62 kDa	82 kDa, 67 kDa
Activateurs physiologiques	MT1-MMP, collagène de type I, lipopolysaccharide, facteur de croissance hépatocytaire, thrombine, protéine C activée	Protéases à sérine
Forme latente liée aux TIMPs	TIMP-2	TIMP-1
Synthèse par les cellules endothéliales	Constitutive	Inductible

Les gélatinases dégradent plusieurs types de collagène, notamment le type IV des membranes basales. Les trois répétitions de fibronectine type II du domaine catalytique des gélatinases confèrent de plus aux gélatinases une capacité à dégrader le collagène dénaturé (gélatine), d'où leur nom.

La dégradation de la MEC est considérée comme une étape essentielle dans la croissance invasive et la formation de métastases. La MMP-2 est capable de cliver les triples hélices de collagène de type I, II, et III au niveau d'une liaison peptidique H-Gly-Leu-OH de la séquence largement reconnue par les MMPs : L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-leucine (54).

Alors que les cellules endothéliales migrent pendant cette phase initiale de l'angiogenèse, les gélatinases sont successivement activées pour dégrader la lame basale (figure 1-7).

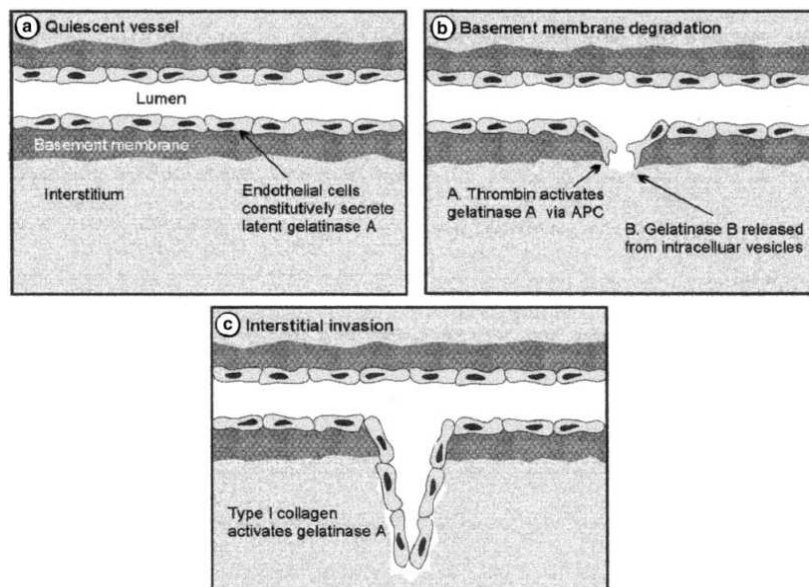


Figure 1-7 : Rôle des gélatinases pendant l'angiogenèse. a) la gélatinase A est sécrétée par les cellules endothéliales. b) la thrombine, dont le taux est élevé pendant l'angiogenèse, active la protéine C. L'APC (Activated Protein C) résultante active rapidement la gélatinase A permettant aux cellules endothéliales de dégrader la membrane basale. La gélatinase B stockée dans des vésicules des cellules endothéliales est alors activée et relarguée pour participer à la dégradation de la membrane basale. c) Le collagène de type I active les gélatinases A. Réf. : (55).

Les gélatinases sont rapidement désactivées par les TIMPs dont le mécanisme inhibiteur joue un rôle important pour limiter la protéolyse incontrôlée. Dans le cas de l'angiogenèse tumorale, l'activation de la gélatinase A semble persister jusqu'à ce que le nouveau capillaire formé sécrète sa propre membrane basale (55).

Ces deux métalloprotéinases sont associées dans les stades précoces et tardifs de la progression tumorale, et sont particulièrement reconnues pour leur rôle dans l'invasion d'une large variété de tumeurs solides (56, 57). Les MMP-2 et -9 sont impliquées dans différents types de cancer, où elles facilitent la progression de la tumeur et la formation de métastases, comme dans le cancer colorectal. De nombreuses études ont été conduites sur le rôle de la MMP-9 dans le développement des carcinomes du sein, de la vessie, du pancréas, du colon, de la prostate, ou de l'adénome hypophysaire. Le rôle de la MMP-9 a été démontré dans le

cancer du sein avancé, dans le cancer du poumon à petites cellules, et dans le cancer du pancréas (56, 57). De ce fait, des peptides substrats des gélatinases ont été employés afin d'élaborer des prodrogues relargant des substances cytotoxiques, utilisées en chimiothérapie anticancéreuse, telles que la doxorubicine (58), le melphalan (59) ou la camptothécine (60).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc choisi de cibler l'activité peptidase de ces enzymes pour l'activation d'une prodrogue. L'importance des gélatinases dans les processus angiogéniques et les nombreuses études réalisées sur ces enzymes, notamment au niveau de la connaissance de leurs peptides substrats, nous ont mené à orienter notre stratégie de ciblage vasculaire *via* ces systèmes enzymatiques.

I.2. Historique de la Thérapie PhotoDynamique

I.2.1. Introduction du terme « photodynamique »

L'observation qu'une molécule pouvait être utilisée en combinaison avec la lumière et l'oxygène pour induire une toxicité date de 1898 avec les travaux d'Oscar Raab, alors étudiant du Professeur Hermann von Tappeiner, directeur de l'Institut de Pharmacologie de l'Université Ludwig-Maximilian à Munich (figure 1-8) (61, 62). Oscar Raab travaillait sur la toxicité de l'acridine sur la paramécie et a observé que les effets résultants étaient fortement influencés par la luminosité dans le laboratoire ; il émit alors l'hypothèse que les substrats fluorescents comme l'acridine peuvent convertir l'énergie lumineuse en une énergie chimique active qui tue la paramécie (61, 62). Sur cette base, H. von Tappeiner et son collègue A. Jesionek réalisèrent la première expérience de PDT en utilisant l'éosine et la lumière blanche pour traiter des tumeurs de la peau. H. von Tappeiner, en association avec Jodlbauer, mirent ensuite en évidence le rôle de l'oxygène et introduisirent le terme d'« action photodynamique » (63, 64).

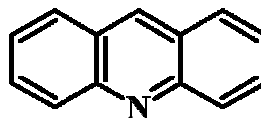


Figure 1-8 : A gauche : Hermann von Tappeiner. A droite : Formule chimique de l'acridine.

1.2.2. Utilisation de l'hématoporphyrine

L'hématoporphyrine (HP) a été découverte en 1841 par Scherer après traitement de sang sec avec de l'acide sulfurique, lavage du précipité sans fer et traitement avec de l'alcool (65). Ce composé ne fut utilisé comme photosensibilisateur (PS) qu'à partir de 1911 par Hausmann ; il réalisa des expériences *in vitro* utilisant l'HP et de la lumière sur des paramécies, puis décrivit les réactions de phototoxicité cutanée sur des souris exposées à la lumière après injection systémique d'HP (66). Le premier cas de photosensibilisation observée sur un humain fut réalisé par l'allemand Friedrich Meyer-Betz en 1913. Afin de déterminer si les effets observés sur les souris pouvaient s'appliquer à l'Homme, Meyer-Betz s'injecta 200 mg d'HP en intraveineuse et fut victime de brûlures et de gonflements sur toutes les zones exposées au soleil (67).

En 1924, Policard mit en évidence la localisation de porphyrines endogènes dans une tumeur par fluorescence grâce à une lampe à ultraviolet (68). En 1942, Auler et Banzer décrivent la localisation et la fluorescence de porphyrines administrées de manière exogène (69), puis en 1948, Figge et Weiland confirmèrent l'accumulation préférentielle de ces substances dans les tissus tumoraux et suggérèrent l'utilisation de l'HP pour localiser les tissus tumoraux chez l'Homme (70). S'en suivit une série d'expériences utilisant l'HP pour détecter les tumeurs chez des sujets humains, couronnées de succès et d'échecs.

1.2.3. Découverte de l'« hematoporphyrin derivative » (HpD)

Les études avec l'HP avaient le désavantage de nécessiter de grandes quantités de produit pour pouvoir en détecter la fluorescence et induire une phototoxicité cutanée

rémanente importante. En 1955, Schwartz *et al.* démontrèrent que l'HP utilisée était composée d'un mélange de plusieurs porphyrines, toutes ayant des propriétés différentes (71). La fraction d'HP la plus pure n'ayant en fait que peu d'affinité avec les cellules tumorales, ils se concentrèrent alors sur les résidus impurs et isolèrent un produit après traitement avec un mélange acide acétique / acide sulfurique, filtration et neutralisation avec de l'acétate de sodium pour donner l'« hematoporphyrin derivative » (HpD). Cette substance était caractérisée par une bonne accumulation dans les cellules tumorales et une phototoxicité deux fois supérieure à celle de HP.

Par la suite, Lipson et Baldes démontrèrent que l'HpD était bien plus efficace que l'HP dans le diagnostic des tumeurs, à bien moindre dose, et en firent le principal agent photodynamique (72, 73).

1.2.4. La Thérapie PhotoDynamique récente

En 1978, l'équipe du docteur Thomas Dougherty, du *Roswell Park Cancer Institute*, aux Etats-Unis, permit une avancée considérable dans le domaine de la PDT en réalisant le premier traitement d'une série de patients (74). 25 patients, avec un total de 113 tumeurs de la peau, furent traités par administration d'HpD suivie d'une exposition à la lumière rouge d'une lampe à arc à xénon (600 – 700 nm). 98 lésions régressèrent, 13 montrèrent une réponse partielle et 2 seulement furent résistantes au traitement, prouvant que la PDT pouvait être efficacement utilisée pour traiter des tumeurs malignes là où les thérapies conventionnelles avaient échoué. Par la suite, il remplaça la lampe à arc à xénon par un laser médical pour une localisation plus précise de la zone à traiter.

Entre 1983 et 1985, les principales fractions actives en PDT de l'HpD sont identifiées : l'éther et l'ester de dihématoporphyrine (figure 1-9) (75). En 1985, une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD reçoit l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et est commercialisée sous le nom de Photofrin II. En 1993, son utilisation est autorisée en clinique au Canada pour traiter le cancer de la vessie, puis aux États-Unis en 1995 pour traiter le cancer de l'œsophage. Le Photofrin® est autorisé en France depuis 1996 pour le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'oesophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur.

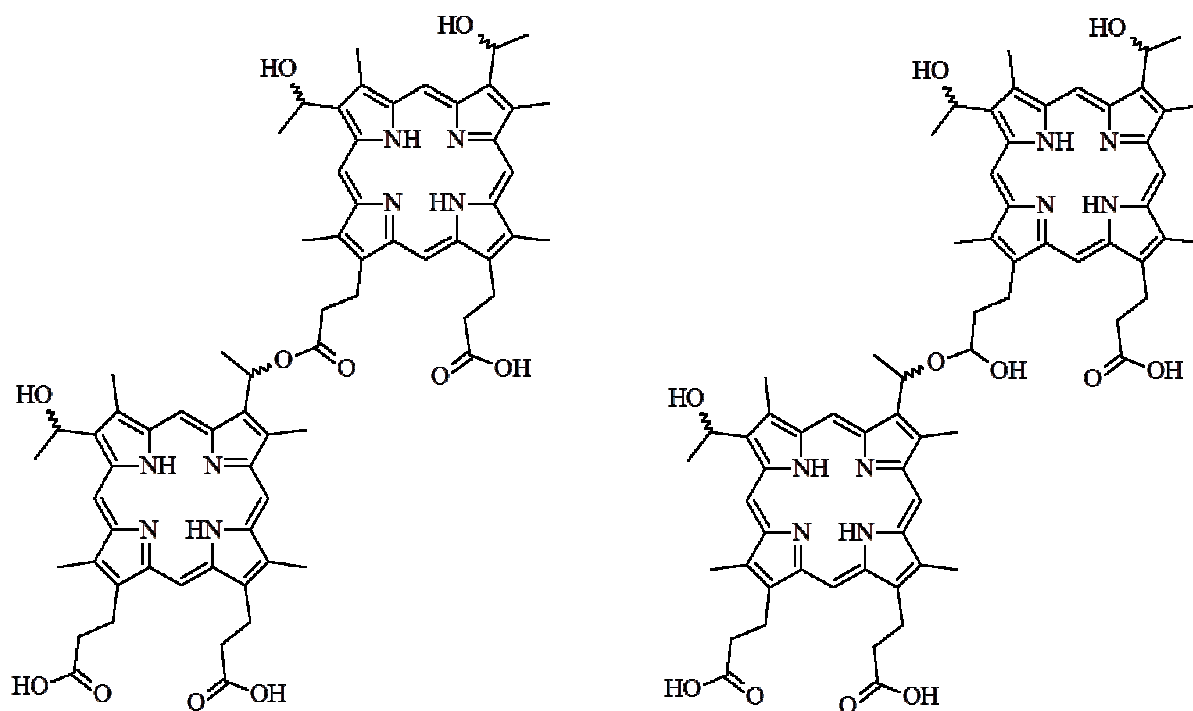


Figure 1-9 : Principaux composants de l'HpD. A gauche : ester de dihématoporphyrine. A droite : éther de dihématoporphyrine.

I.3. Mécanismes photophysiques

La PDT est basée sur l'utilisation d'une famille de composés chimiques appelés « photosensibilisateurs ». Ces PS ont la capacité d'absorber une énergie lumineuse, conduisant à une transition énergétique et de la transférer à des molécules du milieu environnant, amenant à la production d'espèces oxygénées réactives (ROS), dont l'oxygène singulet, responsables de la destruction des composants de la cellule, ayant pour conséquence la mort cellulaire. Il est admis que le principal agent responsable de l'effet PDT est l'oxygène singulet (76), même si d'autres phénomènes sont impliqués. Ce processus est appelé « action photodynamique ».

1.3.1. Excitation électronique et états excités

1.3.1.a. Définition de l'état excité

Une molécule peut exister sous différentes formes énergétiques. Son spectre d'absorption renseigne sur la capacité de celle-ci à absorber un photon à une certaine longueur d'onde qui, d'après la relation de Planck (équation 1), est porteur d'un quanta d'énergie.

$$(1) \quad E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

où E est l'énergie du photon [J.s], h est la constante de Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34}$ J.s.photon⁻¹), c est la vitesse de la lumière ($2,9979 \cdot 10^8$ m.s⁻¹), λ la longueur d'onde de la radiation [m] et ν la fréquence de la radiation [s⁻¹].

Ce photon absorbé, permettant une transition électronique dans la molécule, induit une transition énergétique de l'état fondamental de la molécule, de plus basse énergie, vers un niveau supérieur de même multiplicité. On dit que cette molécule est dans un état excité électronique. Cette transition électronique est caractérisée par le « saut » d'un électron de son orbitale moléculaire (*HOMO*, de l'anglais *Highest Occupied Molecular Orbital*) vers une orbitale moléculaire inoccupée généralement la plus proche (*LUMO*, de l'anglais *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Pour cela, le photon absorbé doit avoir une énergie au moins égale à la différence d'énergie ΔE entre la *HOMO* et la *LUMO* (figure 1-10).

Les états excités des molécules ont une énergie, une structure et une durée de vie bien définies.

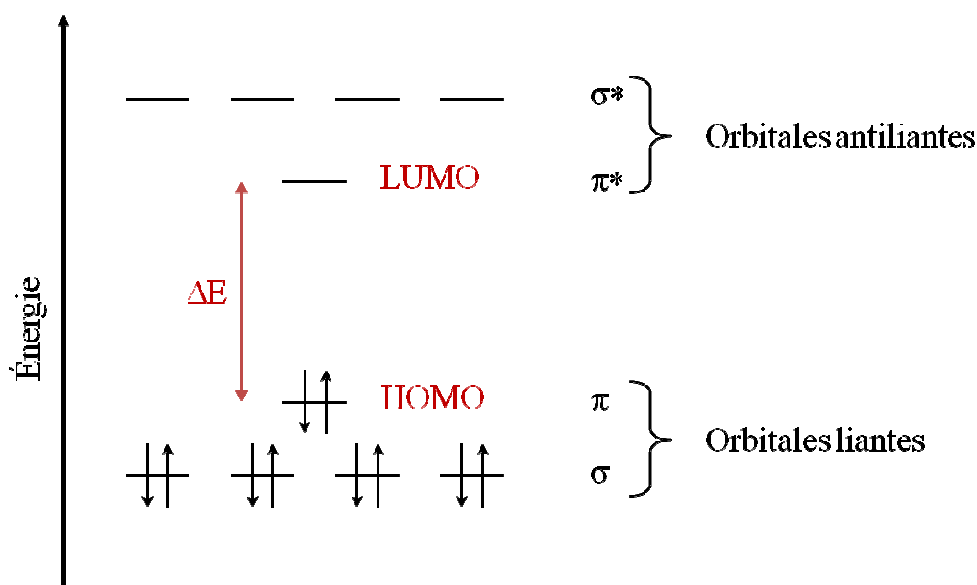


Figure 1-10 : Diagramme énergétique d'orbitales moléculaires à l'état fondamental. ΔE : différence énergétique entre l'état fondamental et l'état électroniquement excité.

1.3.1.b. Etats singulet et triplet

Les électrons suivent le **principe d'exclusion de Pauli**, à savoir que deux d'entre eux ne peuvent se trouver dans le même état quantique au sein d'une même orbitale ; ils doivent se différencier au minimum par l'une de leurs caractéristiques quantiques, telles que le spin ou le niveau énergétique. Étant donné que les molécules organiques comptent généralement un nombre d'électrons pair, il s'en suit que les états fondamentaux ont des électrons à spins appariés, on dit alors que l'état est **singulet** (noté S_0) suivant l'équation 2 :

$$(2) \quad M = 2S + 1$$

où M est la multiplicité de spin et S le spin de chaque électron. Les spins pouvant être de valeur $+1/2$ ou $-1/2$, une molécule ayant les électrons de sa couche de valence appariés a une multiplicité de 1 (état singulet), alors que si les électrons sont de même spin, la multiplicité est de 3 (état triplet) (figure 1-11).

Lors de l'excitation électronique initiale, un électron est normalement transféré de la *HOMO* vers la *LUMO* sans changement de spin total (Règle de Wigner). L'état excité résultant sera donc un état également singulet (noté S_1). La transition singulet-singulet est dite

permise. Les transitions singulet-triplet sont dites interdites par le spin, il est donc extrêmement peu probable qu'un état excité triplet se forme à partir de l'état fondamental de la molécule ($S_0 \rightarrow T_1$). Cependant, l'état excité triplet peut être formé à partir du premier état excité singulet ($S_1 \rightarrow T_1$) sous l'effet du couplage spin-orbite. Cette transition est appelée *Croisement InterSystèmes* (CIS) (figure 1-11).

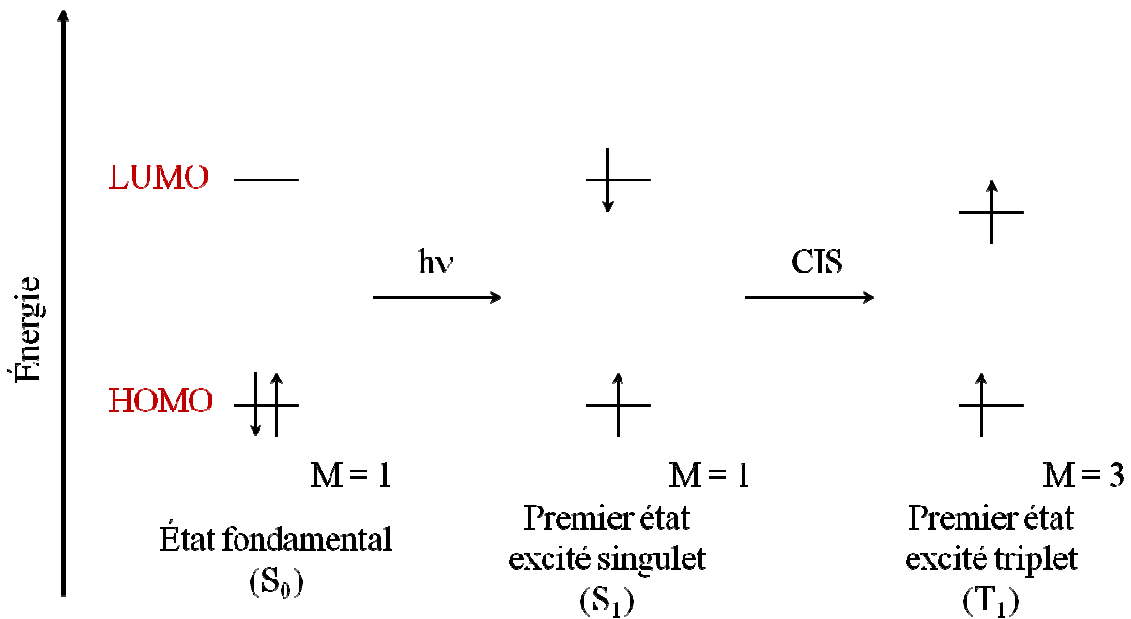


Figure 1-11 : Configurations de spin des états singulet S_0 et S_1 , et de l'état triplet T_1 . CIS : croisement intersystème.

1.3.1.c. Processus photophysiques de désactivation des états excités

L'énergie acquise par une molécule lors d'une excitation électronique peut être dissipée par deux processus photophysiques :

- la désactivation non-radiative : processus de relaxation vibrationnelle dû soit à la collision avec d'autres molécules (phénomène important en phase liquide), soit à la production de chaleur,
- la désactivation radiative : émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le niveau émetteur.

Les désactivations radiatives sont accompagnées par l'émission d'un photon (luminescence). On distingue deux types de luminescence en fonction des niveaux énergétiques émetteurs :

- la transition $S_1 \rightarrow S_0$ émet un photon de *fluorescence*.
- la transition $T_1 \rightarrow S_0$ émet un photon de *phosphorescence*.

D'après le principe de Franck-Condon, un état électronique d'une molécule est perturbé par les mouvements des noyaux de ses atomes ; il en résulte l'existence de plusieurs niveaux vibrationnels d'énergie quantifiés. La distance interatomique d'équilibre de chaque état, correspondant au minimum des courbes d'énergie potentielle (figure 1-12), est souvent différente entre l'état fondamental et l'état excité. Le principe de Franck-Condon stipule que l'excitation électronique, correspondant à l'absorption, se fait de manière quasi instantanée (10^{-16} à 10^{-15} s) ; la transition électronique est dite verticale. Étant donné le décalage des courbes d'énergie potentielle, cette transition verticale correspond à un état vibrationnel excité de S_1 . Une relaxation vibrationnelle de manière non-radiative se fait alors rapidement (10^{-13} à 10^{-12} s) pour atteindre le minimum 0' de la courbe d'intensité potentielle, ce phénomène est appelé *Conversion Interne* (CI) (figure 1-12). La transition $S_1 \rightarrow S_0$ se faisant à partir du niveau 0' de S_1 , il en résulte que le photon de fluorescence est moins énergétique que le photon absorbé. Il en va de même pour la phosphorescence (figure 1-12).

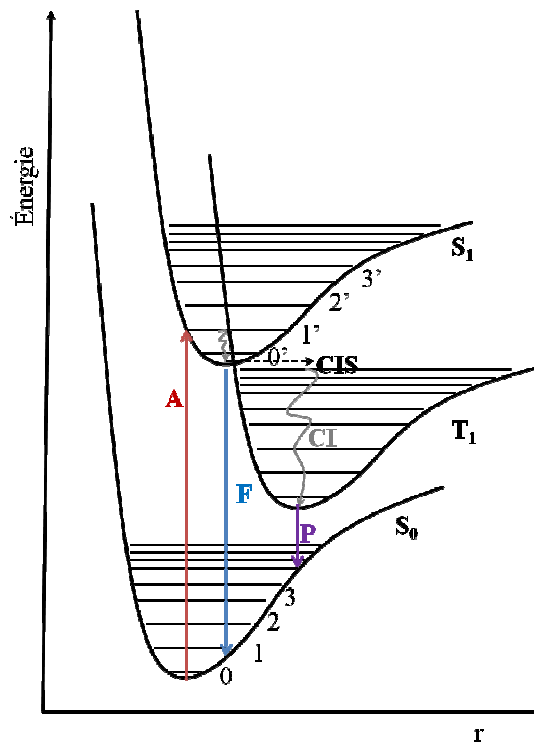


Figure 1-12 : Courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et des états excités d'une molécule. r : distance interatomique. A : absorption. F : fluorescence. P : phosphorescence. CI : conversion interne. CIS : croisement intersystème.

Les ordres de grandeur des temps de vie des différentes désactivations sont (77) :

- Absorption $S_0 \rightarrow S_n$: 10^{-16} à 10^{-15} s
- Conversion interne $S_n \rightarrow S_1$: 10^{-13} à 10^{-12} s
- Fluorescence $S_1 \rightarrow S_0$: 10^{-12} à 10^{-6} s
- Conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$: 10^{-12} à 10^{-6} s
- Croisement intersystème $S_1 \rightarrow T_n$: 10^{-11} à 10^{-6} s
- Phosphorescence $T_n \rightarrow S_0$: 10^{-7} à 10 s
- Conversion interne $T_1 \rightarrow S_0$: 10^{-7} à 10 s

Le diagramme de Perrin-Jablonski est un schéma représentant les différents processus photophysiques intervenant après excitation d'une molécule (figure 1-13).

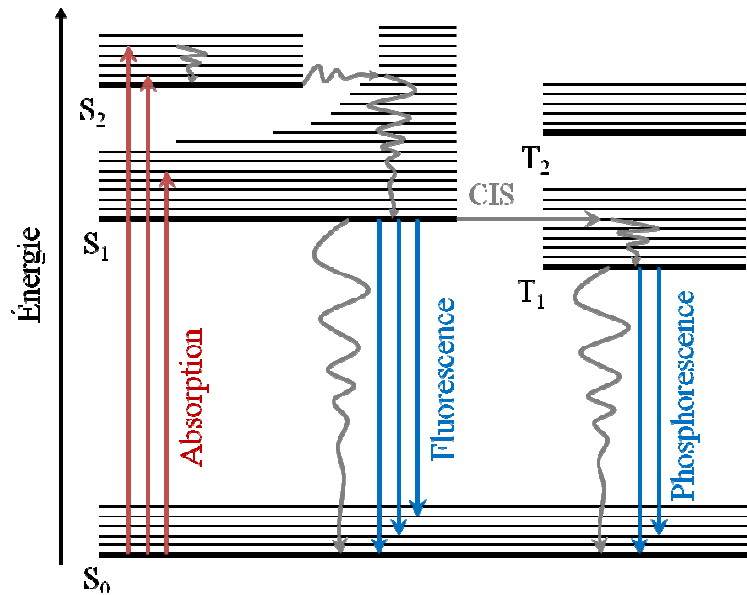


Figure 1-13 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié des processus photophysiques d'une molécule photosensible.

1.3.2. Réaction de type I ou de type II

L'action photodynamique est déterminée en termes de processus de type I ou de type II et se rapporte au mécanisme par lequel l'état T₁ se désexcite, induisant la destruction cellulaire. Le PS, dans son état excité triplet (T₁), peut transmettre son énergie au milieu environnant ; en fonction de la nature de la molécule recevant cette énergie, nous allons parler de réaction de type I ou de type II :

- **Les réactions de type I** concernent les transferts d'énergie vers tout type de molécules excepté ³O₂. Les mécanismes de type I couvrent les transferts d'électrons, d'atomes (en particulier l'hydrogène), les photoadditions et encore d'autres réactions photochimiques bimoléculaires.
- **Les réactions de type II** concernent un transfert d'énergie par collision vers l'oxygène moléculaire O₂. Le produit de ce transfert d'énergie est l'oxygène singulet qui lui-même réagit sur des substrats biologiques, cette partie sera traitée en détail dans le chapitre II.

Les réactions de type I peuvent être résumées comme suit :

- ${}^3\text{PS} + \text{S} \rightarrow \text{PS}^{\cdot+} + \text{S}^{\cdot-}$

- ${}^3\text{PS} + \text{S} \rightarrow \text{PS}^\cdot + \text{S}^\cdot$
- ${}^3\text{PS-H} + \text{S} \rightarrow \text{PS}^\cdot + \text{S-H}^\cdot$
- ${}^3\text{PS} + \text{S-H} \rightarrow \text{PS-H}^\cdot + \text{S}^\cdot$

où « S » désigne un substrat.

Les espèces radicalaires générées peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire présent dans le milieu et ainsi former des peroxydes, amorçant des chaînes d'auto-oxydations.

- $\text{PS}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{PS-O-O}^\cdot$
- $\text{PS-O-O}^\cdot + \text{PS-H} \rightarrow \text{PS-OOH} + \text{PS}^\cdot$
- $\text{S}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{S-O-O}^\cdot$
- $\text{S-O-O}^\cdot + \text{S-H} \rightarrow \text{S-OOH} + \text{S}^\cdot$

Les anions radicaux formés peuvent également réagir avec l'oxygène et former l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, souvent issu de PS-H^\cdot après déprotonation ($\text{PS}^{\cdot-}$) :

- $\text{PS}^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{PS} + \text{O}_2^{\cdot-}$
- $\text{S}^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{S} + \text{O}_2^{\cdot-}$

L'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut soit réagir avec différents substrats et conduire à la destruction de cellules, soit être précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène (EROs) comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le radical hydroxyle OH^\cdot :

- $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOO}^\cdot$
- $\text{HOO}^\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$

Les EROs tels que les radicaux oxygénés, ainsi que tous les autres radicaux générés, peuvent donc interagir avec les biomolécules telles que les chaînes grasses insaturées, certains acides aminés ou encore le cholestérol, conduisant ainsi la cellule à sa destruction selon deux modes possibles : l'apoptose ou la nécrose.

Les études portant sur les mécanismes de destruction cellulaire par PDT montrent que les deux phénomènes agissent conjointement, bien que les mécanismes de type II semblent être prédominants (76). Il est cependant difficile de déterminer l'importance de ces mécanismes de manière quantitative, il est même possible qu'ils soient différents d'un tissu à l'autre. Néanmoins, il s'avère que les PS les plus efficaces *in vitro* sont ceux qui possèdent le meilleur rendement quantique de production d'oxygène singulet (78).

D'un point de vue général, il est admis que l'action photodynamique est dépendante de plusieurs facteurs, incluant la nature du photosensibilisateur, le substrat, le solvant (incluant le pH), l'agrégation et la longueur d'onde d'irradiation. *In vivo*, d'autres facteurs tels que la localisation du PS, l'intervalle drogue-lumière, pouvant conduire à une relocalisation, et la possible métabolisation du PS pendant cet intervalle sont susceptibles de jouer un rôle important. Les conditions physiologiques au moment du traitement ont également leur importance. En effet, en cas d'hypoxie du milieu ou en cas de forte concentration du photosensibilisateur, ce sont les processus de type I qui prédominent (78).

1.3.3. Définition de la zone thérapeutique

L'effet PDT repose donc sur l'activation d'une molécule par l'absorption d'un photon à une longueur d'onde appropriée ; or, *in vivo*, le photosensibilisateur va entrer en compétition avec les constituants du sang et des tissus qui, eux même, absorbent dans le visible (figure 1-14). En effet, l'eau absorbe dans l'ultraviolet jusqu'à 400 nm, puis au-delà de 800 nm ; de même, les constituants organiques, tels que l'oxyhémoglobine, les flavines ou la mélanine, absorbent fortement jusqu'à 600 nm. Il existe d'autres fluorochromes endogènes tels que les cofacteurs à nicotinamide comme NADH et ceux à flavines tels que FADH, molécules nécessaires aux enzymes des voies métaboliques cellulaires, qui possèdent une fluorescence spontanée à 520 nm. Pour une pénétration profonde dans les tissus, les composés utilisés pour la PDT doivent donc absorber dans une zone de moindre absorbance des tissus, d'où la notion de « fenêtre thérapeutique » : zone d'absorption, située entre 650 et 1000 nm environ, où les composants des tissus absorbent le moins (figure 1-14) et où l'énergie est suffisante pour produire l'oxygène singulet.

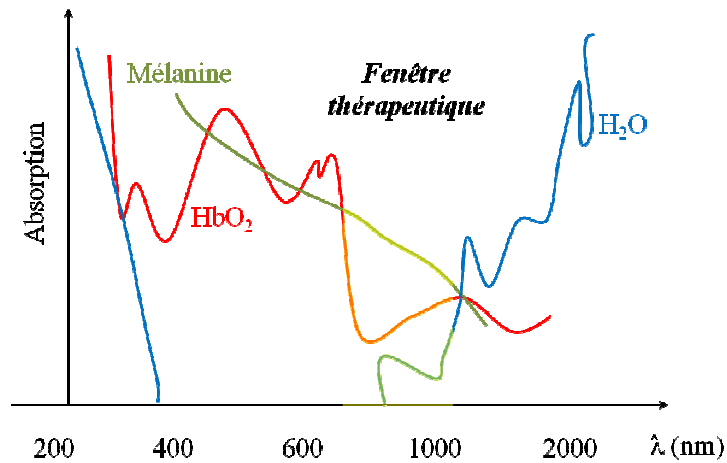


Figure 1-14 : Spectre d'absorption des composants du sang et définition de la « fenêtre thérapeutique ». HbO₂ : oxyhémoglobine.

Ainsi, la longueur d'onde utilisée pour exciter le photosensibilisateur va définir la profondeur de pénétration de la lumière ; la figure 1-15 schématise la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde utilisée.

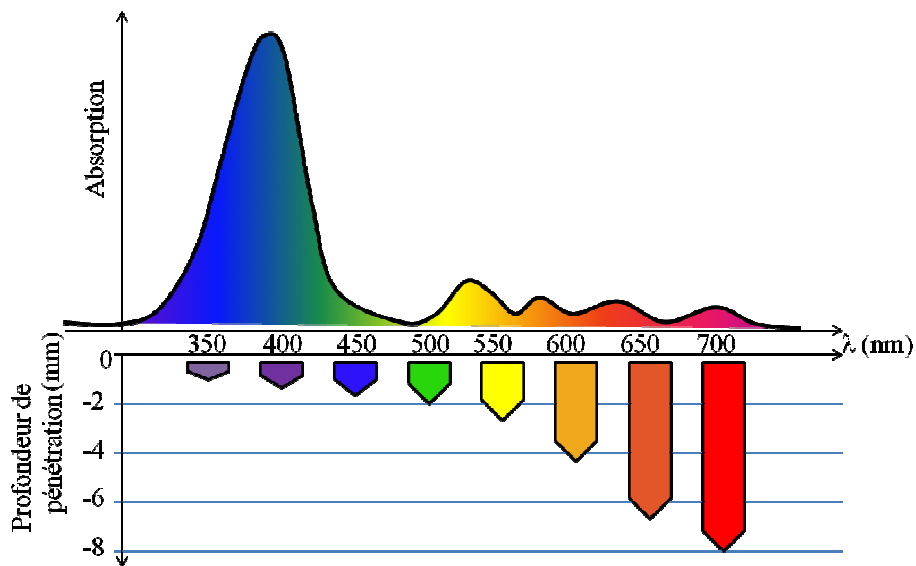


Figure 1-15 : Propagation (en mm) de la lumière à différentes longueurs d'onde (en nm) dans un tissu.

Les notions de « fenêtre thérapeutique » et de pénétration dans les tissus mènent à la conclusion que l'excitation des photosensibilisateurs dépend du type de cancer à traiter. En effet, différentes longueurs d'onde sont préconisées en fonction de la profondeur de la tumeur

à atteindre. Par exemple, le cancer de l'œsophage de Barrett est traité à l'aide d'un laser émettant dans le vert (79), les cancers de la peau sont traités à l'aide d'une illumination bleue (80–82) et les cancers plus profonds peuvent être traités grâce à une illumination dans le rouge.

I.4. Le ciblage en PDT

Les modifications génétiques inhérentes à la formation de cellules cancéreuses sont également responsables de modifications du micro-environnement tumoral. Les cellules malades peuvent exprimer des protéines et sont porteuses de récepteurs normalement peu présents ou de façon constitutive dans les cellules dites saines. Il est alors possible d'utiliser ces particularités cellulaires pour amener le médicament anticancéreux jusqu'à sa cible. Les stratégies anticancéreuses peuvent donc s'orienter soit vers la destruction des cellules de la tumeur elle-même, appelé ciblage direct, soit vers la destruction des néo-vaisseaux, appelé ciblage indirect.

I.4.1. Ciblage direct

Le ciblage direct consiste en l'adressage du PS vers les cellules tumorales. Lors des premiers essais PDT avec l'HP ou l'HpD, il a été observé que ces molécules avaient une tendance à s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs ; ceci est dû en partie au fait que les PS tétrapyrroliques ont une forte affinité avec les protéines du sérum, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL, de l'anglais *Low Density Lipoprotein*). Les cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs au LDL, les PS augmentent donc leur affinité envers les cellules tumorales par rapport aux cellules saines.

Un autre facteur de sélectivité peut être recherché dans une propriété « physico-chimique » des tumeurs liée à leurs besoins nutritionnels. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. De ce fait, le glucose est métabolisé partiellement par une voie anaérobie avec formation d'acide lactique qui est rejeté par les cellules. Le milieu interstitiel des tumeurs est ainsi plus acide

que celui des tissus normaux, la différence pouvant atteindre 0,6 unité de pH. Par le biais des équilibres acido-basiques, le caractère lipophile de photosensibilisateurs possédant des groupes carboxyliques tels que le Photofrin® est augmenté, favorisant leur incorporation dans les cellules tumorales par simple diffusion à travers la membrane plasmique (83).

Cette approche de la sélectivité du photosensibilisateur envers les cellules cancéreuses mène à l'élaboration de molécules utilisant le micro-environnement tumoral pour un ciblage encore plus spécifique. De nombreuses molécules ont été synthétisées par couplage « PS – marqueur tumoral spécifique », utilisant des vecteurs spécifiques des zones tumorales (84).

Les vecteurs peuvent être :

- Des anticorps monoclonaux (85–89) afin d'utiliser la très grande affinité des antigènes envers leur cible antigénique,
- Des protéines, telles que la transferrine (90–92), les LDL (93, 94) ou d'autres (95),
- Des peptides ou des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance épidermal (96) ou le sérum albumine bovin (97, 98),
- Des polymères (99, 100),
- Des petites molécules, tels que l'acide folique (101–103), des hormones stéroïdiennes (104, 105) et des sucres (106–108).

Les couplages « PS – marqueurs » seront vus plus en détail dans la suite de ce chapitre, en partie II.2.3.

1.4.2. Ciblage indirect (ou VTP)

Le ciblage de la vascularisation tumorale est devenu une stratégie prometteuse dans le développement de thérapies anticancéreuses (109, 110).

Les vaisseaux qui nourrissent les tumeurs possèdent des propriétés fonctionnelles et structurelles différentes de celles des vaisseaux normaux (figure 1-16). La vascularisation normale est caractérisée par des ramifications, alors que la vascularisation tumorale est inorganisée et montre des anomalies dans l'architecture des vaisseaux (tortuosité, dilatation, ramifications irrégulières) et de ses fonctions (flux sanguin stagnant et plus grande perméabilité vasculaire) (111).

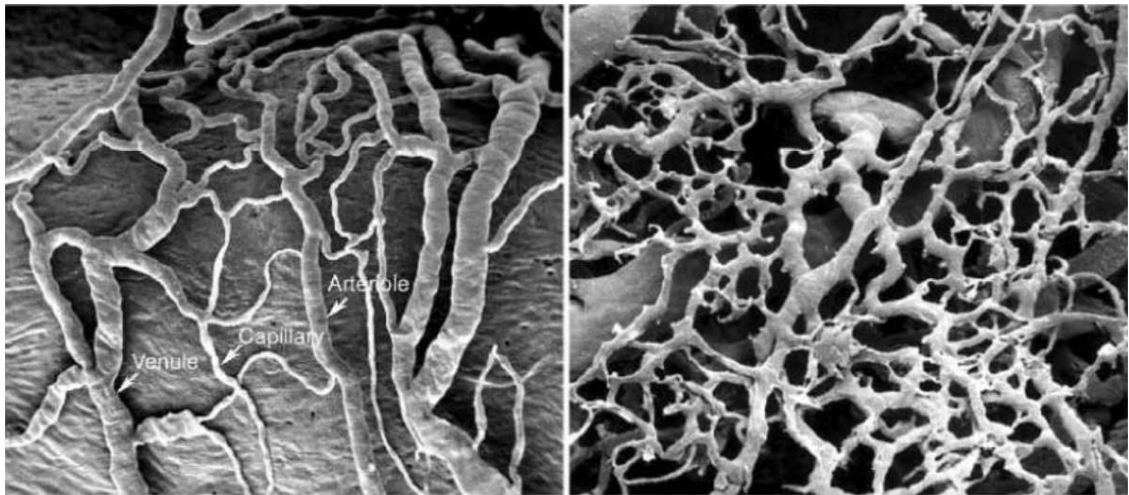


Figure 1-16 : Différentiation structurale de vaisseaux normaux (vasa vasorum de carotide sinus rat, à gauche) et de vascularisation tumorale (tumeur humaine xenogreffée sur « nude mice », à droite) utilisant la microscopie SEM (112, 113).

Judah Folkman a proposé l'hypothèse que les tumeurs solides étaient dépendantes de l'angiogenèse, et qu'un traitement anti-angiogénique pouvait être une thérapie anticancéreuse prometteuse (10). Il a démontré que les cellules cancéreuses implantées dans un site vascularisé grossissaient rapidement et formaient des tumeurs importantes, alors que celles implantées dans des sites avasculaires ne s'étendaient pas au-delà de 2 mm³. Dès lors, il a proposé que l'inhibition de la néovascularisation pouvait être une stratégie anticancéreuse intéressante. Cette méthode permettrait en effet d'inhiber la progression tumorale et ainsi d'éviter la formation de métastases. De plus, sans réseau vasculaire, la tumeur ne serait plus alimentée ni en oxygène, ni en nutriments, et n'aurait aucun moyen d'éliminer les déchets métaboliques (114). Il existe deux principales stratégies visant la vascularisation tumorale : la thérapie anti-angiogénique, caractérisée par l'inhibition du développement angiogénique, et la thérapie ciblant les néovaisseaux déjà existants, caractérisée par la destruction de ceux-ci (115–118).

La *Vascular Targeted Photodynamic therapy* (VTP) consiste en l'éradication des néovaisseaux tumoraux déjà existant par PDT. La VTP peut être faite de manière active (élaboration de molécules ciblant les néovaisseaux) ou passive (en jouant sur l'intervalle drogue-lumière ou en utilisant une forte irradiance) (119–122). La VTP offre de nombreux avantages :

- Les cellules endothéliales tumorales sont directement accessibles à un PS administré de manière intraveineuse, permettant ainsi la localisation rapide d'une grande partie de la dose injectée,
- L'oxygène nécessaire à l'effet PDT y est plus facile d'accès,
- Un néo-vaisseau tumoral irriguant plusieurs milliers de cellules cancéreuses, sa destruction entraîne un dommage plus important,
- Les néo-vaisseaux tumoraux ayant les mêmes propriétés morphologiques et biochimiques, cette stratégie peut être appliquée à de nombreux types de tumeurs (123).

Notre équipe s'est déjà fortement intéressée au ciblage actif de la néo-vascularisation tumorale par le biais du récepteur neuropiline-1 impliqué dans l'angiogenèse tumorale et ayant pour ligand le VEGF165 (124–127) ou en ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (128, 129). Cette thèse vient donc s'inscrire dans la continuité du ciblage de la néovascularisation tumorale en utilisant cette fois l'activité peptidase des MMPs, surexprimées dans de nombreux cancers.

II. Les photosensibilisateurs porphyriniques pour la PDT

Les PS sont des molécules capables d'utiliser l'énergie lumineuse afin de la transmettre au milieu extérieur local pour former des espèces réactives de l'oxygène. Elles sont utilisées en thérapie photodynamique pour leur capacité à détruire les cellules environnantes *via* les mécanismes de photosensibilisation décrits en **I.3.2**.

Il existe de nombreux PSs d'origine naturelle ou synthétique ; ceux utilisés en PDT sont facilement différenciables selon leur structure tétrapyrrolique ou non-tétrapyrrolique. Dans le cadre de cette thèse, seuls les composés tétrapyrroliques ont été traités, c'est pourquoi la suite de ce document portera essentiellement sur ces molécules. Néanmoins, d'autres PS existants sont d'une importance significative en PDT ; les PSs d'origine naturelle sont les suivants :

- L'acridine, dont il a été question précédemment et dont la formule est illustrée en figure 1-8,
- Les psoralènes, dont il sera question dans le deuxième chapitre,
- Le Bleu de Méthylène (figure 1-17). Ce composé est caractérisé par une forte absorption à 660 nm et a longtemps été utilisé comme marqueur de cellules tumorales. Il est cependant peu utilisé en PDT en raison de son manque de stabilité *in vivo* (130),

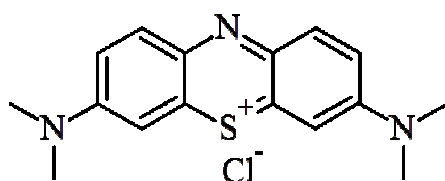


Figure 1-17 : Structure chimique du Bleu de Méthylène.

- L'hypericine (figure 1-18). Ce composé est une quinone extraite du millepertuis (*Hypericum perforatum*). Elle est caractérisée par une absorption à 590 nm et est utilisée en PDT pour ses bonnes propriétés de localisation tumorale, fluorescence et production d'oxygène singulet (131),

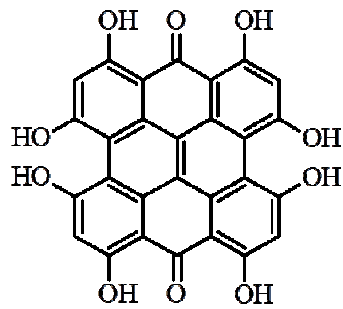


Figure 1-18 : A gauche, structure chimique de l'hypericine. A droite, Hypericum perforatum.

- Le Rose de Bengale (figure 1-19). Il s'agit d'un composé extrêmement hydrosoluble. Il absorbe à 430 nm et a un rendement de production d'oxygène singulet important (0,69 dans l'éthanol). Des essais PDT ont été réalisés avec du Rose de Bengale encapsulé dans des liposomes afin de s'affranchir de sa forte lipophobie (132),

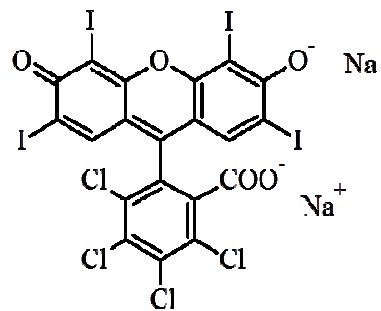


Figure 1-19 : Structure chimique du Rose de Bengale.

- L'éosine (figure 1-20). Ce composé a été utilisé par H. von Tappeiner lors de la première expérience PDT en collaboration avec A. Jesionek en 1903. Son spectre d'absorption est caractérisé par une bande intense vers 510 nm,

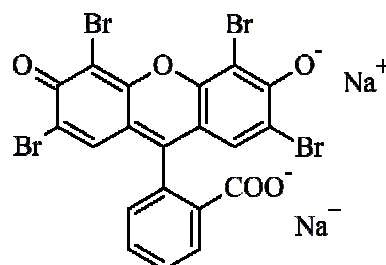


Figure 1-20 : Structure chimique de l'éosine.

- L'érythrosine (figure 1-21). Ce composé est apparenté au Rose de Bengale et a été utilisé dans le cas de traitements antibactériens par PDT (133),

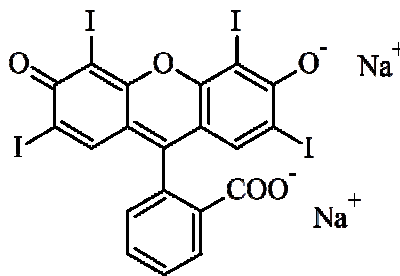


Figure 1-21 : Structure chimique de l'érythrosine.

- La toluidine blue (figure 1-22). Ce composé, apparenté au bleu de méthylène, a été utilisé dans le cas de traitements antibactériens par PDT (134).

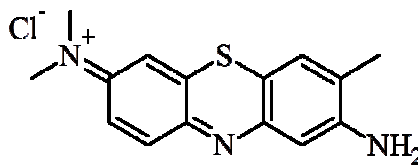


Figure 1-22 : Structure chimique de la toluidine blue.

Les photosensibilisateurs les plus répandus sont néanmoins les PS de structures tétrapyrroliques, ou également appelés porphyriniques, dont le chef de file est la porphyrine. Ce noyau de base peut être sujet à de nombreuses modifications chimiques, aspect que nous développerons ultérieurement.

II.1. Présentation des différents types de PS tétrapyrrolique

II.1.1. Les porphyrines

II.1.1.a. Structure

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués formés de quatre unités pyrrole, reliées entre elles par des ponts méthines. Cette structure comporte 16 carbones entièrement conjugués (figure 1-23) avec 18 électrons π , lui conférant ses caractéristiques photophysiques si particulières.

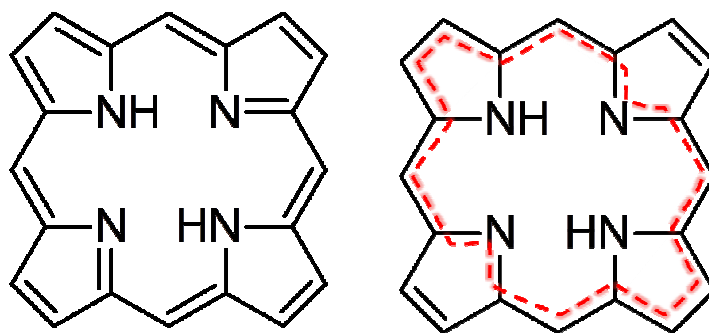


Figure 1-23 : A gauche : structure chimique du noyau de base porphyrinique. A droite : représentation du système des 18 électrons π aromatiques (en rouge).

Le système de nomenclature des porphyrines a été développé par Hans Fischer dans les années 1930 (135). Il distingue les carbones pyrroliques, dont les parties liées sont dites α -pyrroliques et les parties libres sont notées β -pyrroliques et notées de 1 à 8, et les carbones des positions méthines sont dits « méso » et notés α , β , δ et γ (figure 1-24). En 1987, une nomenclature systématique du macrocycle a été adoptée où les carbones des positions « méso » sont notés 5, 10, 15 et 20 et les azotes sont numérotés 21, 22, 23 et 24 (figure 1-24) (136).

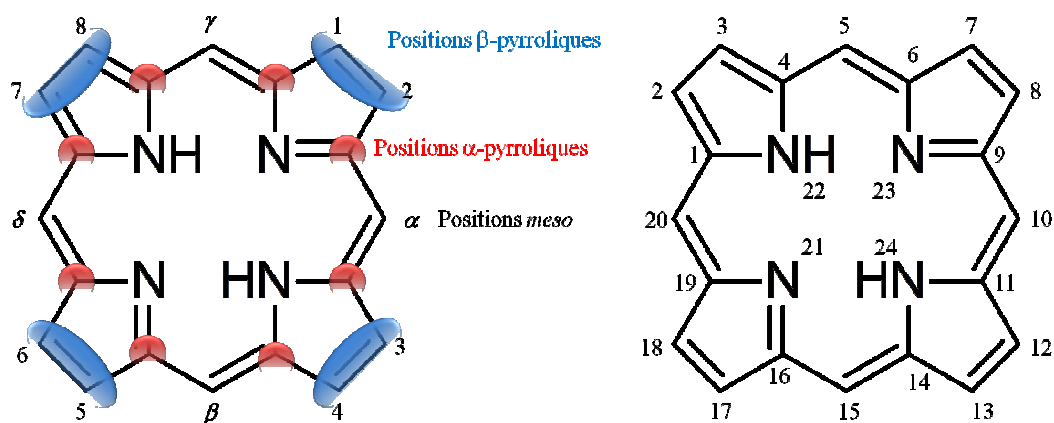


Figure 1-24 : A gauche : nomenclature selon Fischer. A droite : nomenclature IUPAC.

Les porphyrines sont des structures planes, sauf dans les cas de protonation et de métallation des azotes centraux, ainsi que dans le cas de la présence de groupements volumineux en position « *méso* ». Par exemple, des groupements phényles en « *méso* » sortent du plan afin de ne pas rentrer en interaction avec les protons β-pyrroliques (figure 1-25).

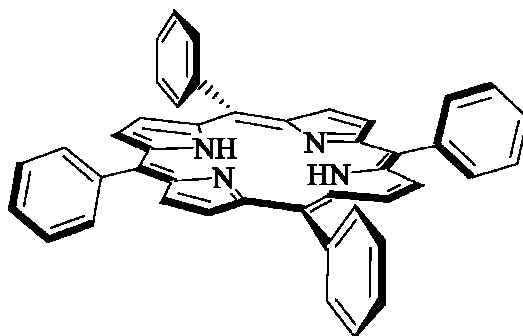


Figure 1-25 : Structure 3D de la tétraphénylporphyrine.

Les molécules tétrapyrroliques sont susceptibles d'accepter un ion métallique au centre du macrocycle, généralement dicationique (figure 1-26). Cet ion peut être inséré de manière chimique ou enzymatique (137) ; en effet, les métalloporphyrines jouent un grand rôle en biologie, la nature du métal influant sur les propriétés du macrocycle. Dans la nature, le métal (M) associé à la biomolécule peut être :

- Un fer (hème)
- Un magnésium (chlorophylle)

- Un cobalt (vitamine B12)

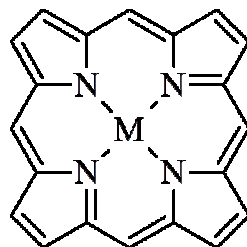


Figure 1-26 : Structure chimique d'une métalloporphyrine.

Les métalloporphyrines présentent une chimie et des propriétés photophysiques qui ne seront pas traités dans le cadre de cette thèse.

II.1.1.b. Caractéristiques photophysiques

Le nom « porphyrine » vient du grec « *porphyrá* », signifiant « pourpre ». Ces composés sont connus depuis longtemps et le violet intense qui les caractérise a été synonyme de noblesse depuis l'antiquité. En effet, le système d'électrons π conjugués confère à cette molécule des particularités photophysiques uniques.

Le spectre d'absorption est généralement composé de quatre bandes dans le domaine visible, appelées bandes Q, et d'une bande très intense, appelée bande de Soret ou bande B, dans le proche ultraviolet (figure 1-27). La bande de Soret provient d'une forte transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'état fondamental vers le second état excité ($S_0 \rightarrow S_2$), alors que les bandes Q proviennent d'une transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ de faible probabilité vers le premier état excité ($S_0 \rightarrow S_1$). Ces bandes Q, notées I, II, III et IV des grandes longueurs d'onde vers les petites, sont sensibles à la nature des substituants du macrocycle et peuvent se présenter de quatre façons différentes : *éthio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo* (figure 1-27).

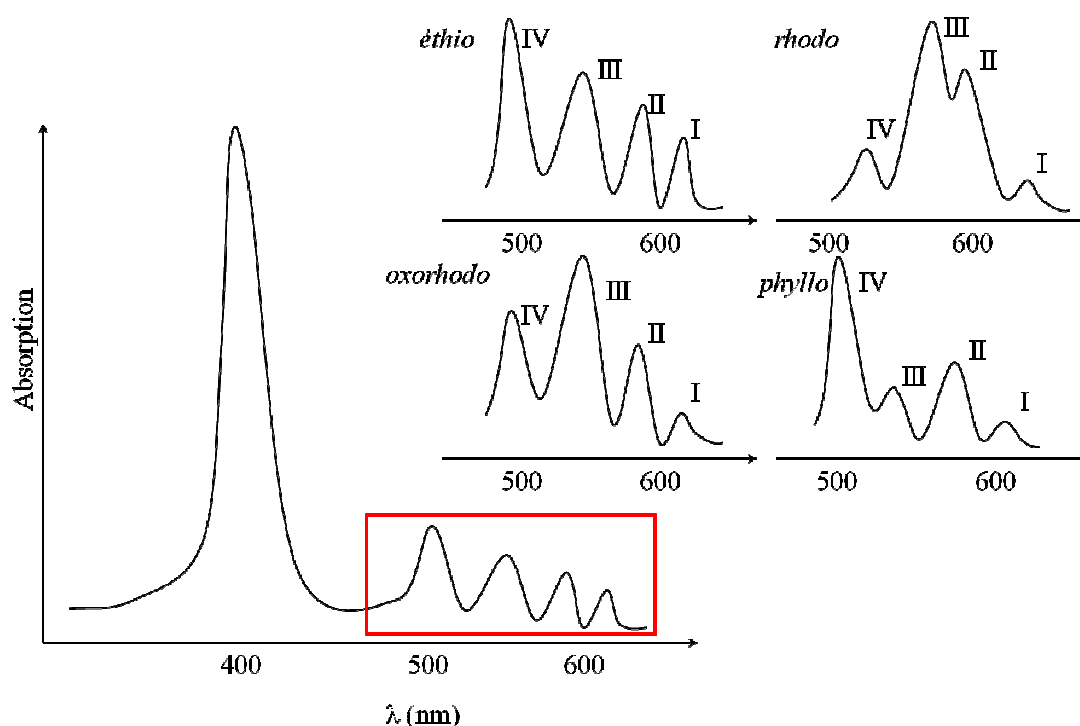


Figure 1-27 : Spectres d'absorption d'une porphyrine. A droite sont représentés les quatre spectres possibles pour les bandes Q : éthio, rhodo, oxorhodo et phyllo.

La plupart des porphyrines sont capables d'émettre de la fluorescence et de produire de l'oxygène singlet. Dans le cas de porphyrines non métallées, la fluorescence s'observe dans le rouge, vers 650 nm, mais la longueur d'onde d'émission, ainsi que le rendement quantique de fluorescence sont dépendants de la substitution (138). De même, la production d'oxygène singlet est fortement influencée par la substitution des macrocycles (139), les rendements quantiques de production d'oxygène singlet dans l'éthanol pouvant aller de 0,1 à 0,9 pour des photosensibilisateurs utilisés en PDT.

Ces caractéristiques photophysiques viennent se complexifier avec la formation d'un complexe métal-porphyrine, dont les effets sont directement dépendants de la nature du métal inséré dans le macrocycle.

II.1.1.c. Synthèse

L'intérêt suscité par les porphyrines pour leur application en PDT (et dans d'autres domaines) a conduit à l'élaboration de nombreuses stratégies de synthèse. Ces stratégies ont

majoritairement visé à contrôler la nature des substituants des positions β -pyrroliques et des positions « *méso* », offrant ainsi une infinité de possibilités quant à leur structure. Dans le cadre de cette thèse, il sera question des principales stratégies de synthèse utilisées pour l'élaboration de porphyrines substituées en « *méso* ».

La première synthèse de porphyrines substituées en position « *méso* » a été décrite par Rothemund en 1935 (140). La synthèse consistait à faire réagir de l'acétaldéhyde avec du pyrrole dans le méthanol, sous atmosphère d'azote, à différentes températures. Les rendements obtenus en *méso*-tétraméthylporphyrine étaient relativement faibles. Avec les mêmes conditions opératoires, il synthétisa des porphyrines *méso*-substituées avec des propyle, butyle, phényle, etc. En 1941, il obtient la tétraphénylporphyrine (TPP) avec 5% de rendement en faisant réagir du pyrrole et du benzaldéhyde dans la pyridine (141) (figure 1-28).

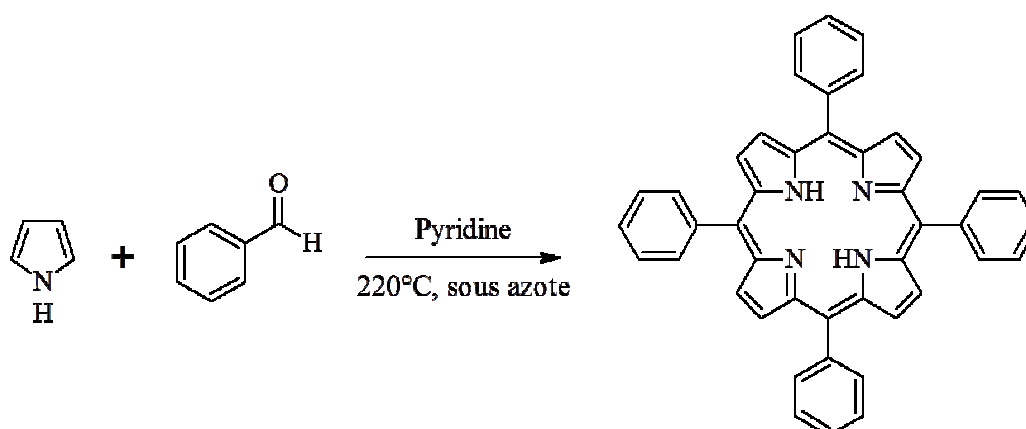


Figure 1-28 : Synthèse de la TPP par Rothemund en 1941.

En 1967, Adler et Longo ont synthétisé la TPP en faisant réagir du pyrrole et du benzaldéhyde à reflux de l'acide propionique dans un réacteur ouvert (142). Cette synthèse a non seulement permis d'obtenir la TPP avec un rendement de 20%, mais les conditions de réaction étant plus douces, elle a aussi contribué à élargir les possibilités structurales des substituants.

Le mécanisme de cette réaction fait intervenir un intermédiaire porphyrinogène obtenu par condensation de plusieurs motifs pyrroliques avec un aldéhyde, puis cyclisation (figure 1-

29). Ensuite, l'oxydation de cet intermédiaire (par l'air par exemple) conduit à la perte des protons en position « *méso* » du macrocycle, permettant son entière conjugaison (figure 1-29).

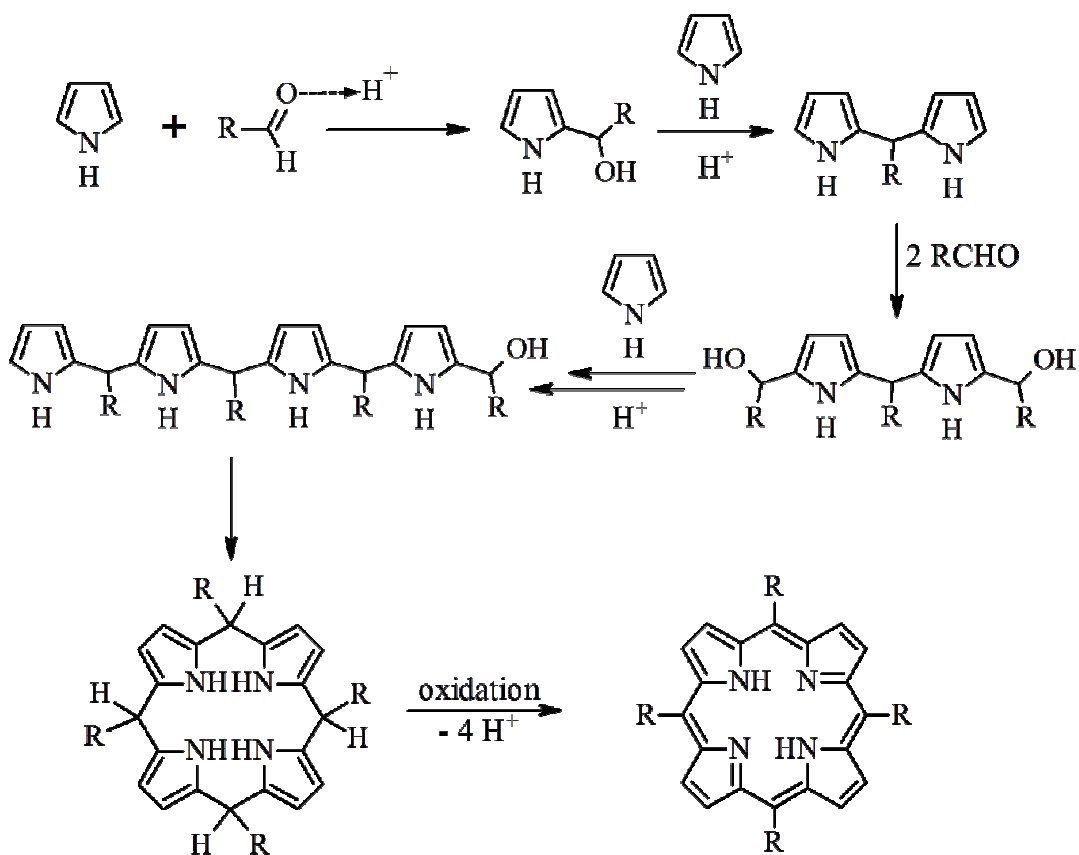


Figure 1-29 : Mécanisme de la synthèse de porphyrine.

Ce protocole a été utilisé en 1975 par Little pour synthétiser une série de *méso*-arylporphyrines non symétriques (143); cette méthode, dite aux « aldéhydes mixtes », consiste à faire réagir du pyrrole avec un mélange d'aldéhydes en quantités stœchiométriques dans de l'acide propionique à reflux (figure 1-30).

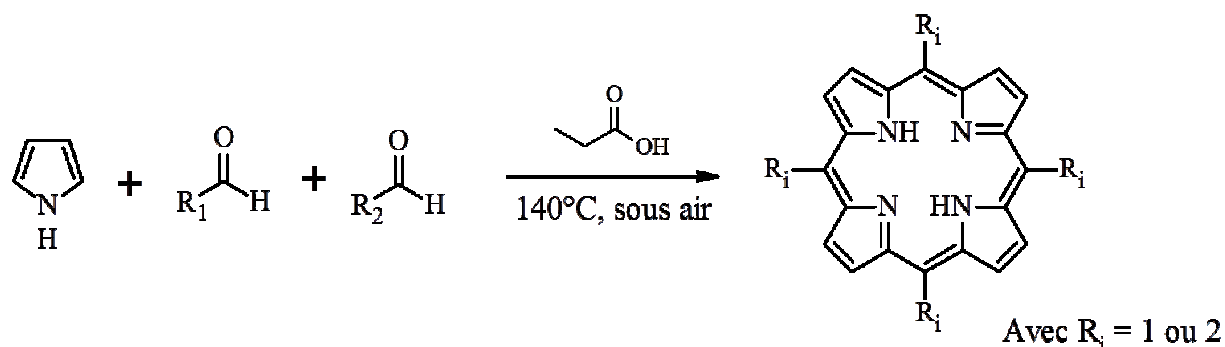


Figure 1-30 : Synthèse de porphyrines méso-tétrasubstituées par la méthode des « aldéhydes mixtes » de Little.

Cette méthode comporte néanmoins un inconvénient, la distribution des substituants ne peut pas être contrôlée et l'on obtient un mélange d'isomères de position. Par exemple, des aldéhydes A et B introduits en proportion 1:3 vont donner six porphyrines différentes dont la distribution statistique est donnée en figure 1-31 (144). En pratique, il existe de nombreuses réactions secondaires pouvant interférer avec la bonne formation du macrocycle, comme la polymérisation du pyrrole, des enchainements chaotiques de motifs pyrrole et aldéhyde, des chaînes non cyclisées, etc... Toutes ces réactions parasites viennent non seulement diminuer les rendements en produit désiré, mais également compliquer les phases de purification après la synthèse. La production de la porphyrine désirée (AB_3) se limite généralement à 20% de rendement environ.

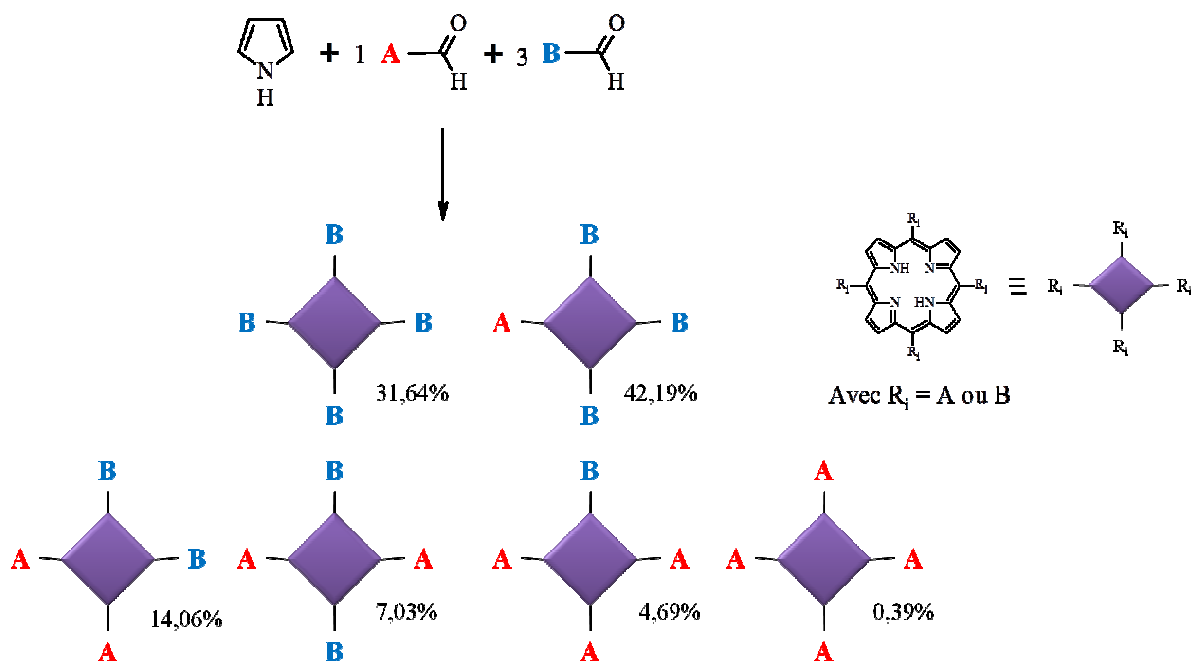


Figure 1-31 : Distribution statistique des porphyrines synthétisées par la méthode des aldéhydes mixtes avec un mélange d'aldéhydes A et B en proportion 1:3. Réf. : (144).

Pour palier cette perte de sélectivité dans l'enchaînement des substituants, ainsi que pour limiter les étapes fastidieuses de purification, un protocole de synthèse de porphyrine asymétrique sur phase solide a été proposé en 1978 (145) (figure 1-32).

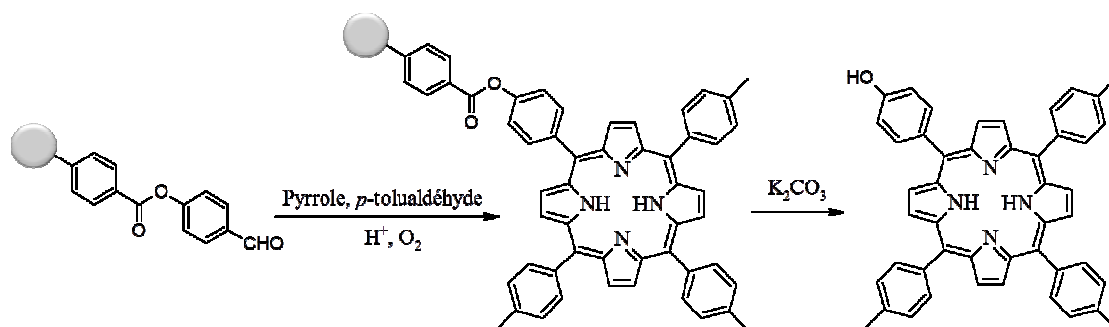


Figure 1-32 : Synthèse d'une porphyrine asymétrique sur phase solide.

Cette méthode, bien que plus économique et plus rapide, n'a malheureusement pas conduit aux résultats escomptés, la porphyrine monosubstituée ayant été obtenue avec des rendements allant de 2 à 4,5%.

En 1986, Lindsey a mis au point un protocole à partir de la synthèse de Rothemund (146) et d'une observation de Gonsalves (147) qui consistait à remplacer l'acide propionique par l'acide trifluoroacétique (TFA) en quantité catalytique dans le dichlorométhane (DCM). Il propose donc la synthèse de *méso*-tétra-arylporphyrines à l'aide d'un acide de Lewis dans le DCM anhydre, sous un courant d'argon, la phase d'oxydation de l'intermédiaire porphyrinogène étant assurée par une quinone : la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone). Ce protocole a permis l'obtention de la TPP avec un rendement de 46%.

L'avantage de cette méthode est qu'elle fonctionne avec un rendement optimal pour des solutions très diluées, dans des conditions extrêmement douces, ce qui permet l'utilisation d'une plus grande variété d'aldéhydes, même peu stables. Cette méthode est également utilisée pour la synthèse de porphyrines asymétriques avec des rendements supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes précédentes. Ce protocole est toujours très largement employé pour la synthèse de porphyrines. Notre équipe l'utilise dans la synthèse de porphyrines asymétriques dont le protocole exact sera détaillé dans la partie expérimentale. Dans cette synthèse, nous utilisons comme acide de Lewis le trifluoroborate étherate (BF₃. OEt₂) (148) et comme agent réducteur une autre quinone : le *p*-chloranile (2,3,5,6-tétrachlorobenzoquinone).

Une autre stratégie consiste à former le macrocycle tétrapyrrolique par l'intermédiaire de deux entités dipyrrométhanés (149–151). Cette stratégie, développée au début des années 1960 par Woodward et MacDonald, consiste à former les deux moitiés du cycle séparément et de les assembler ensuite (figure 1-33).

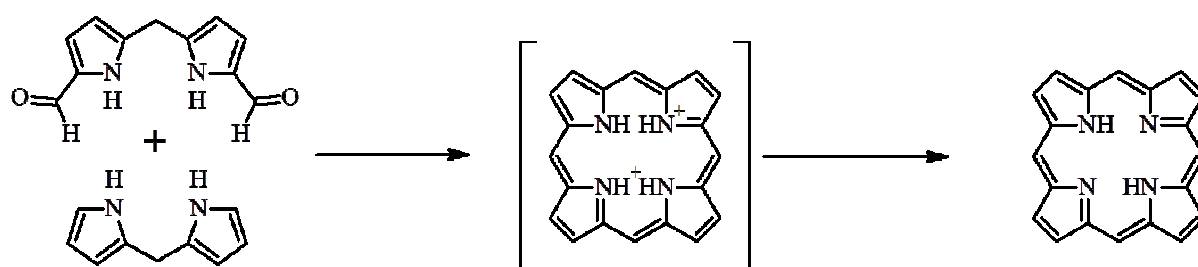


Figure 1-33 : Schéma de synthèse de MacDonald et Woodward.

En préparant des dipyrrométhanés par la méthode de Lindsey, un grand nombre de synthons de base pour la porphyrine peut être créé (152). La condensation des entités dipyrrométhanés peut se faire par l'intermédiaire d'aldéhydes portant des groupements variés,

cette méthode, dite « 2+2 », est donc particulièrement adaptée pour la synthèse de porphyrines asymétriques (figure 1-34).

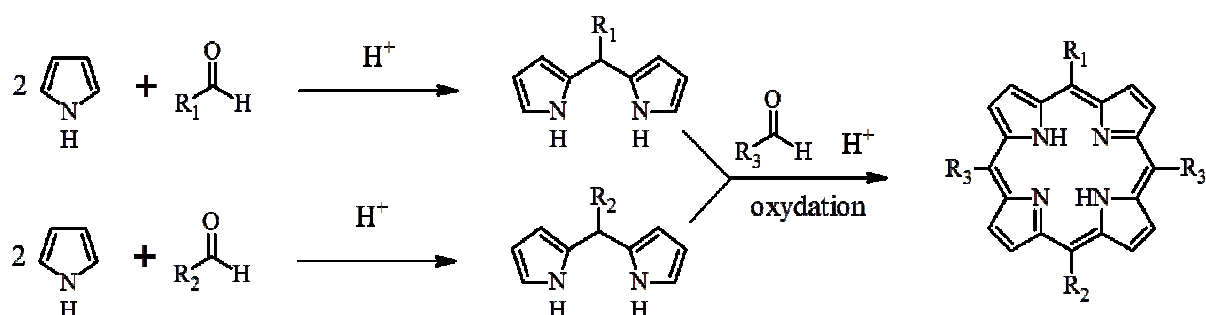


Figure 1-34 : Schéma de synthèse « 2+2 » d'une porphyrine asymétrique.

Suivant cette méthode, les porphyrines peuvent donc comporter autant de groupes fonctionnels différents qu'il est possible de mettre sur les positions « méso », tout en simplifiant les étapes de purification. En effet, l'avantage de cette méthode est la relative simplicité des purifications à chaque étape, le nombre de sous-produits étant moindre.

De fait, une stratégie « 3+1 » a également été développée par condensation d'un tripyrrane et d'une entité pyrrolique (153).

Une autre stratégie, enfin, consiste à constituer un noyau tétrapyrrolique et d'y insérer les groupements désirés aux positions « méso ». La réactivité des positions « méso » du macrocycle permet en effet l'halogénéation de ces positions et ainsi servir de support à des réactions de type Suzuki (figure 1-35) (154, 155).

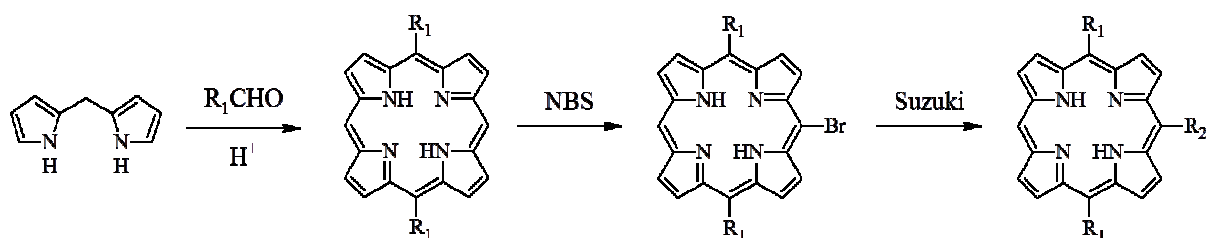


Figure 1-35 : Schéma de synthèse d'une porphyrine asymétrique par la méthode « 2+2 », suivie d'une réaction de type Suzuki.

II.1.1.d. Exemples de porphyrines

La porphyrine la plus célèbre est sans doute l'hème. Cette molécule, qualifiée à juste titre de « pigment de la vie » (156), est la molécule constitutive de l'hémoglobine, protéine responsable du transport d'oxygène dans les organismes des vertébrés. L'hème est une métalloporphyrine biosynthétisée en huit étapes à partir d'un précurseur utilisé aujourd'hui en PDT : l'acide aminolévulinique (ALA) (157). En effet, la biosynthèse de l'hème fait intervenir la condensation d'une glycine et du succinyl CoA pour donner le 5-ALA, catalysé par la 5-ALA synthétase. Deux molécules de 5-ALA vont par la suite se condenser en une molécule de porphobilinogène (PBG), catalysé par la 5-ALA déshydrase. Une cascade de réactions enzymatiques va ensuite convertir quatre molécules de PBG en un cycle tétrapyrrolique, suivi de réactions de décarboxylation et d'oxydation afin de donner la protoporphyrine IX (PpIX). Cette PpIX, sous l'action de la ferrochélatase, va former un complexe métallique avec un ion ferreux Fe^{2+} pour produire l'hème. L'hème va par la suite effectuer un contrôle négatif sur la production de 5-ALA. Cette biosynthèse est résumée figure 1-36.

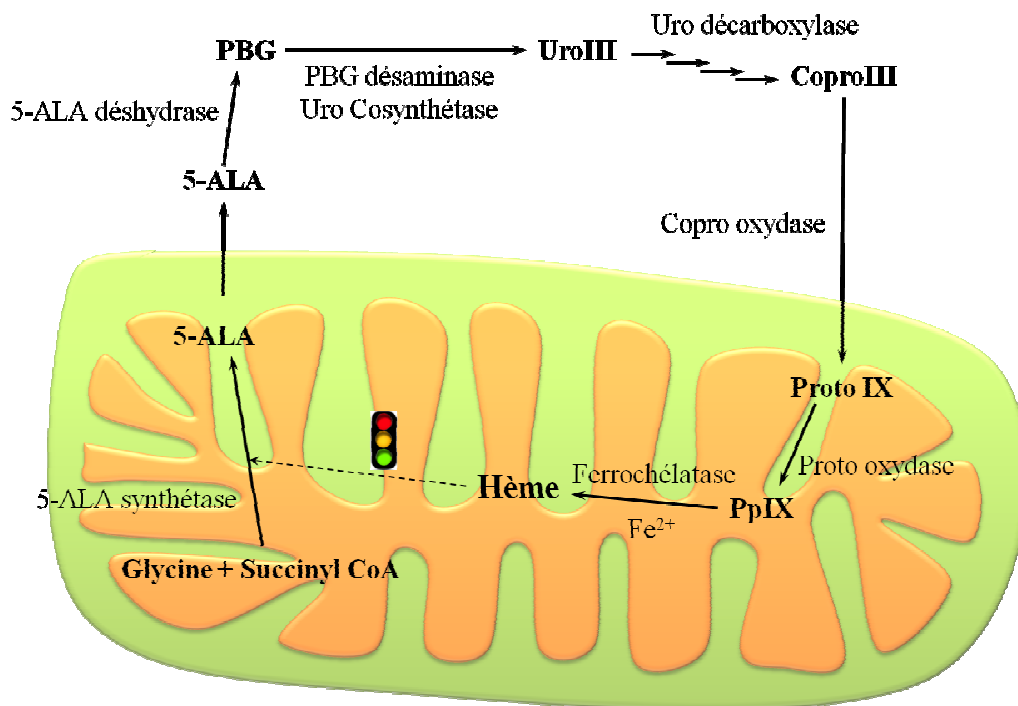


Figure 1-36 : Biosynthèse de l'hème. UroIII : uroporphyrinogène III. CoproIII : coproporphyrinogène III. Proto IX : protoporphyrinogène IX. Réf. : (157).

Ainsi, pour éviter la surproduction de porphyrine dans l'organisme, la production de 5-ALA est régulée par de nombreux mécanismes, dont un contrôle négatif de l'hème. Or le 5-ALA administré de manière exogène arrive à saturer ce contrôle négatif et induit une augmentation temporaire des précurseurs de l'hème, dont la PpIX qui, sans la présence de fer en son centre, garde ses propriétés de photosensibilisation et peut agir en tant que photosensibilisateur (figure 1-37). L'accumulation de PpIX s'observe majoritairement dans les cellules néoplasiques, faisant de l'ALA-PDT un traitement particulièrement sélectif. Les applications PDT de l'ALA seront traitées plus avant dans ce manuscrit.

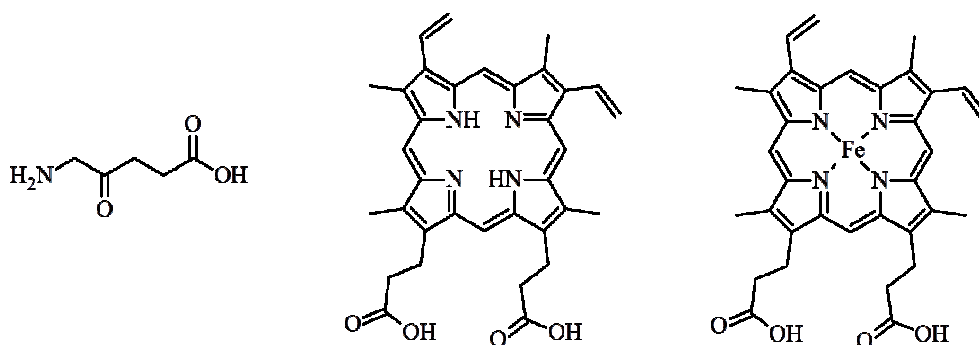


Figure 1-37 : De gauche à droite : structures chimiques du 5-ALA, de la PpIX et de l'hème.

De même, l'hématoporphyrine et l'HpD sont des porphyrines extraites du sang (voir figure 1-9). Le Photofrin® est un mélange de polymères sodique de l'HpD (figure 1-38).

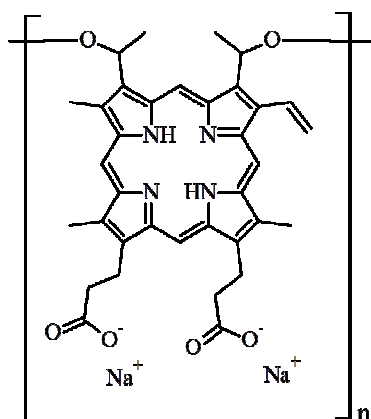


Figure 1-38 : Structure chimique du Photofrin®.

II.1.2. Les chlorines et bactériochlorines

II.1.2.a. Structure

Les porphyrines peuvent subir deux réactions de réduction. Deux pyrroles du macrocycle porphyrinique peuvent être réduits successivement ; la première réduction donne une chlorine et la seconde donne une bactériochlorine (figure 1-39). Tous les macrocycles respectent la règle de Hückel, à savoir qu'il faut $4n+2$ électrons π pour que la molécule soit aromatique, or le trajet électronique le plus court compte 18 électrons.

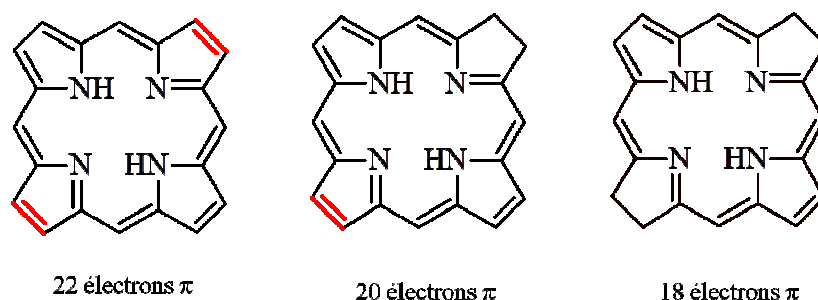


Figure 1-39 : Structures chimiques des macrocycles porphyriniques. De gauche à droite : porphyrine, chlorine et bactériochlorine.

Les chlorines (2,3-dihydroporphyrines) se distinguent donc des porphyrines par la réduction d'une double liaison périphérique et les bactériochlorines par deux doubles liaisons en vis-à-vis du macrocycle. Les bactériochlorines dont les doubles liaisons réduites sont sur deux entités pyrroliques vicinales sont dites isobactériochlorines.

A l'instar des porphyrines, les chlorines et bactériochlorines sont des molécules planes, pouvant accueillir un métal en leur centre (158).

II.1.2.b. Caractéristiques photophysiques

La réduction du macrocycle apporte des changements importants dans les caractéristiques photophysiques de la molécule. Le changement le plus important est au niveau du spectre d'absorption. En effet, la bande Q_I des chlorines et des bactériochlorines possède un meilleur coefficient d'absorption molaire et peut également être décalée vers les grandes longueurs d'onde. Ces molécules constituent ainsi une classe intéressante de molécules pour la PDT.

La première réduction vient légèrement transformer le spectre d'absorption : la bande de Soret est moins intense et plus large et reste centrée vers 415 nm ; de plus, la bande Q_T augmente d'intensité (figure 1-40). La fluorescence reste toujours centrée vers 650 nm, mais ne se compose que d'une bande. La deuxième réduction entraîne un changement complet dans le spectre d'absorption, la bande de Soret est déplacée dans l'ultra-violet et la bande Q la plus intense se situe vers 760 nm (figure 1-40).

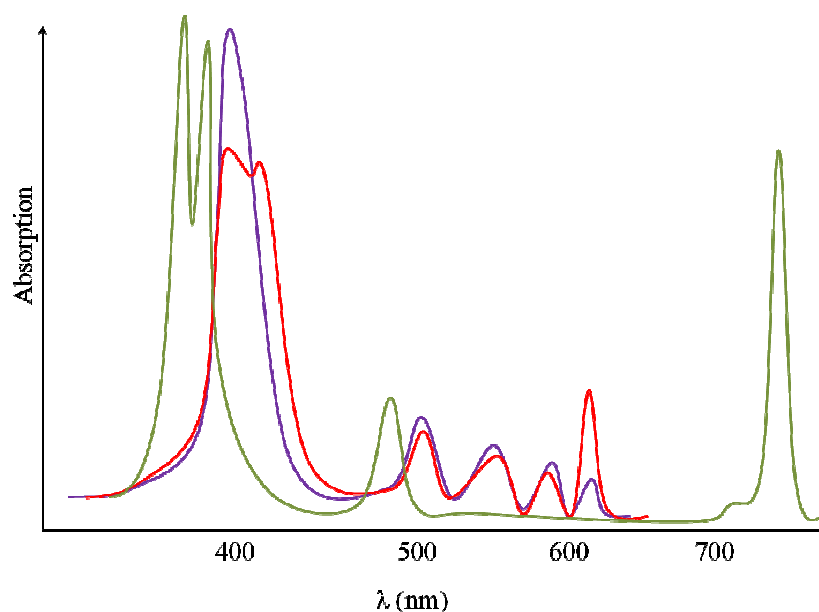


Figure 1-40 : Spectres d'absorption des composés tétrapyrroliques dans l'éthanol. En violet : porphyrine ; en rouge : chlorine ; en vert : bactériochlorine.

Tout comme les porphyrines, les rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet dépendent énormément des substituants sur les macrocycles.

L'inconvénient majeur de ces molécules est leur relativement faible stabilité. En effet, elles sont capables de s'oxyder à l'air (ou en milieu oxydant) et redonnent un cycle insaturé. Les bactériochlorines sont connues pour être des molécules particulièrement peu stables ; elles s'oxydent rapidement en chlorines, qui elle-mêmes peuvent s'oxyder en porphyrines. Des bactériochlorines stables ont été développées par modification chimique des noyaux pyrrolines pour garantir une meilleure stabilité des formes réduites ; des groupements méthyles peuvent être introduits en position 2 et 3 des motifs pyrrolines pour bloquer la position (159) (figure 1-41).

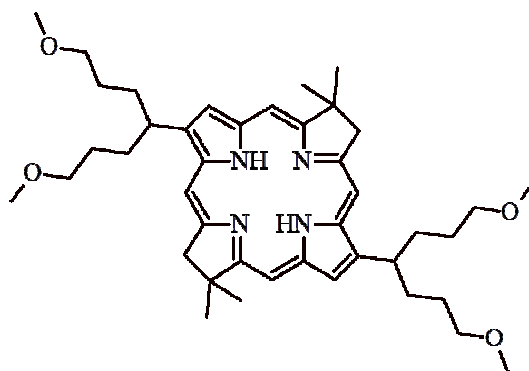


Figure 1-41 : Structure chimique d'une bactériochlorine stable.

II.1.2.c. Synthèse

Les chlorines et bactériochlorines présentent un intérêt en PDT en raison de leur forte absorbance dans les grandes longueurs d'onde ; le fait qu'il n'existe aucune voie simple et rapide de synthèse totale fait que la principale technique de synthèse consiste à réduire la porphyrine correspondante. La réduction du macrocycle porphyrinique est pourtant loin d'être aisée ; théoriquement, les 11 doubles liaisons du cycle sont toutes aussi susceptibles d'être réduites, mais la pratique montre que non. Seules certaines doubles liaisons vont être réactives à un agent réducteur donné, et il s'avère que les carbones des positions « méso » et β -pyrroliques sont les plus réactifs. De plus, des agents trop réducteurs, tels que ceux correspondant à des hydrogénations catalytiques, peuvent conduire à la réduction totale du cycle. D'autres tentatives de réduction (électrochimiques, photochimiques ou autres (160)) ont aussi été testées, mais aucune n'a eu autant d'applications que la réduction à l'aide d'un diimide (161). Aujourd'hui, l'un des agents réducteurs pour la synthèse de chlorines et bactériochlorines les plus employés est le *para*-toluènesulfonylhydrazine (*p*-TSH).

A cela vient s'ajouter la difficulté de la régiosélectivité de la réaction. Mis à part des stratégies de synthèse orientant la réduction grâce à des facteurs électroniques ou d'encombrement stérique (figure 1-42) (162), il est très compliqué d'obtenir une seule chlorine sans son isomère de position. Il est, pour les mêmes raisons, très difficile d'être sélectif dans le degré de réduction. Si la porphyrine peut être convertie en chlorine, la chlorine peut l'être aussi en bactériochlorine dans la même réaction ; ainsi, les réactions de synthèse de chlorines sont généralement composées de deux phases : une réduction de la porphyrine en un mélange chlorine / bactériochlorine, puis une oxydation douce de ce mélange pour convertir

la bactérochlorine en chlorine, cette dernière étant moins réactive que la bactérochlorine pour une réaction d'oxydation. L'un des agents oxydants les plus utilisés dans cette étape est l'*o*-chloranile.

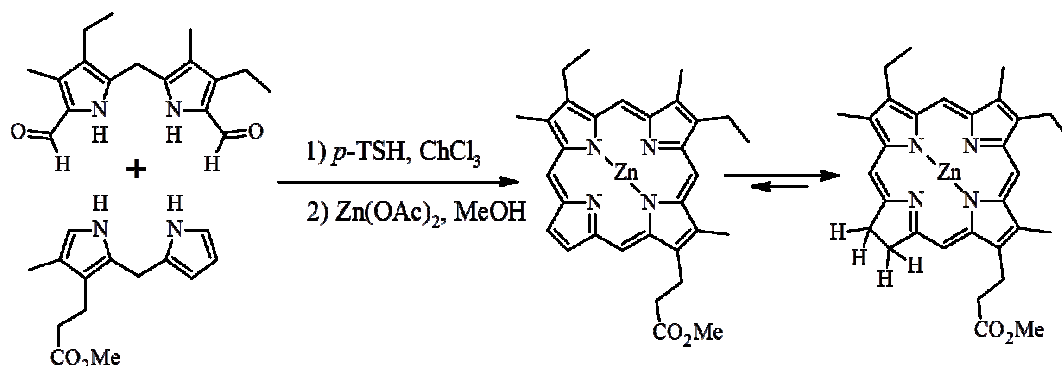


Figure 1-42 : Synthèse sélective d'une chlorine.

En 2007, Varamo *et al.* ont développé une stratégie de synthèse sélective de chlorine par réduction complète d'une porphyrine asymétrique en bactérochlorine, utilisant 10 équivalents de *p*-TSH, puis suivie d'une oxydation sélective à l'*o*-chloranile, utilisant l'encombrement stérique de la molécule pour permettre une bonne sélectivité (figure 1-42) (154).

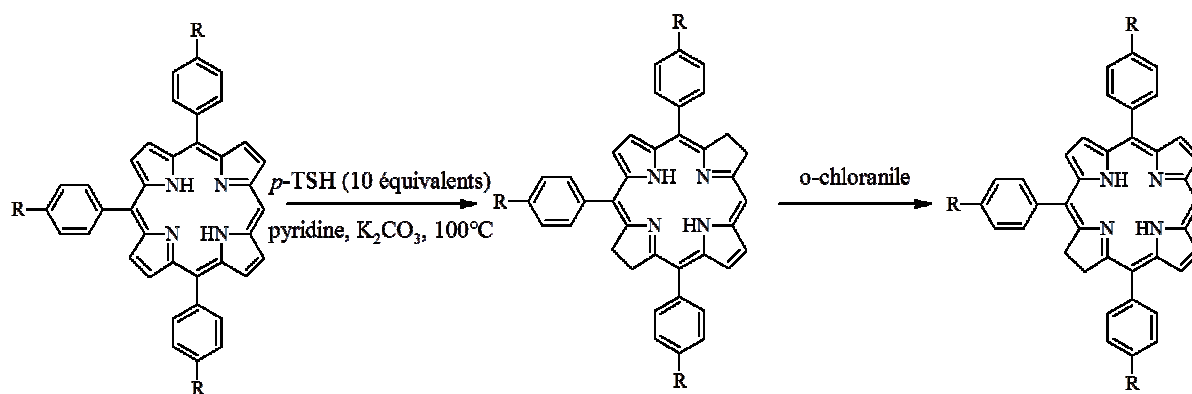


Figure 1-42 : Synthèse sélective de 5,10,20-triarylchlorine.

Une autre approche dans la synthèse de chlorines consiste à utiliser la bonne réactivité des carbones en position « *méso* » pour fonctionnaliser la molécule. Cette même équipe a développé une voie de synthèse où l'asymétrie de la chlorine se fait par introduction d'un groupement par réaction de Suzuki en position « *méso* » du cycle (figure 1-43) (154).

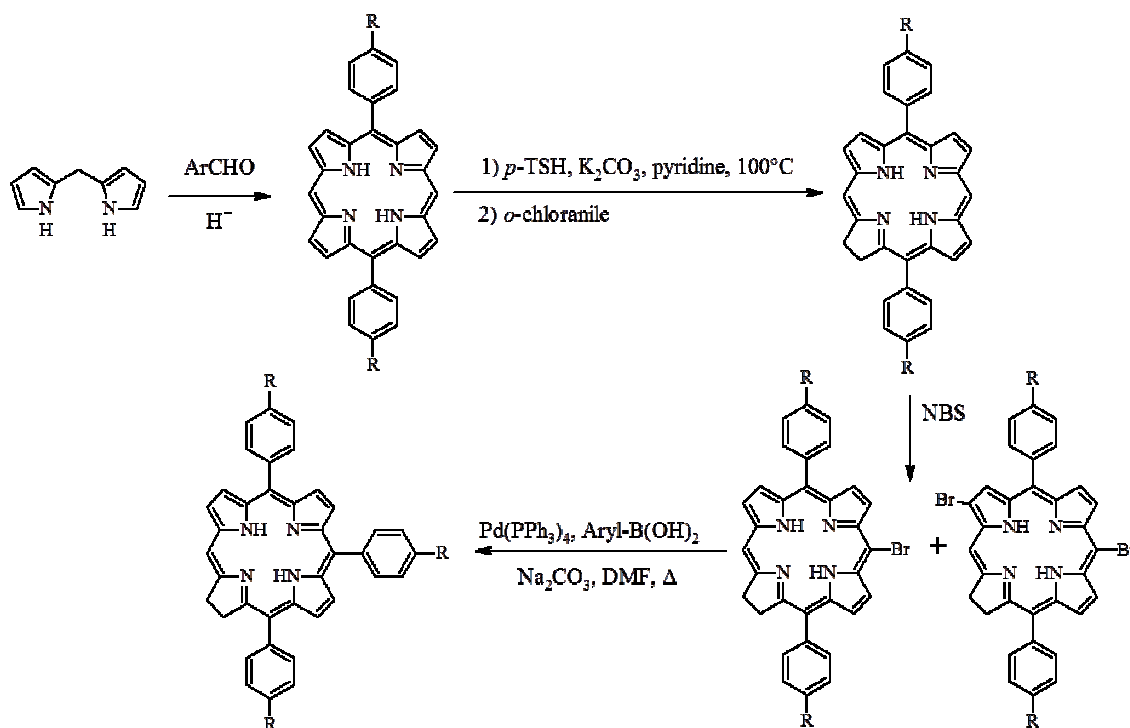


Figure 1-43 : Synthèse « 2+2 » de 5,10,20-triarylechlorine.

Un autre agent oxydant peut être employé pour oxyder les porphyrines : OsO_4 . Cette oxydation s'accompagne de l'addition de deux groupements hydroxyles sur les carbones β de la chlorine (figure 1-44) (163).

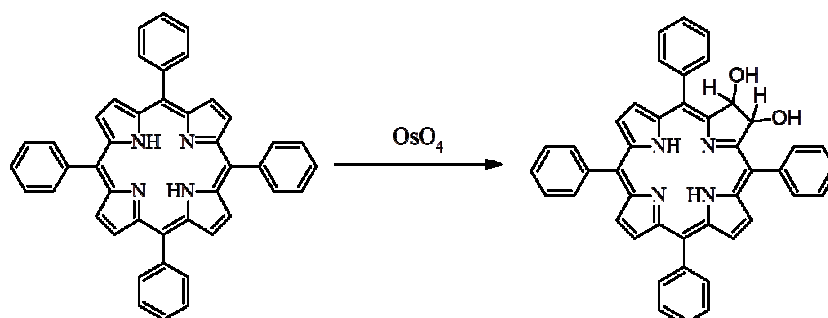


Figure 1-44 : Synthèse de chlorine à l'aide d' OsO_4 .

Une autre méthode de production de chlorine peut se faire par réaction de Diels-Alder sur la PpIX-diméthyl ester (164). La PpIX contient des motifs diènes sur ses cycles A et B (figure 1-44), une réaction de cycloaddition [2+4] de type Diels-Alder conduit ainsi à la formation d'une chlorine. La réaction de cette molécule avec le diméthylacétylène

dicarboxylate (DMAD) conduit à la formation de BPDMA, aussi connu sous le nom de Visudyne (figure 1-45).

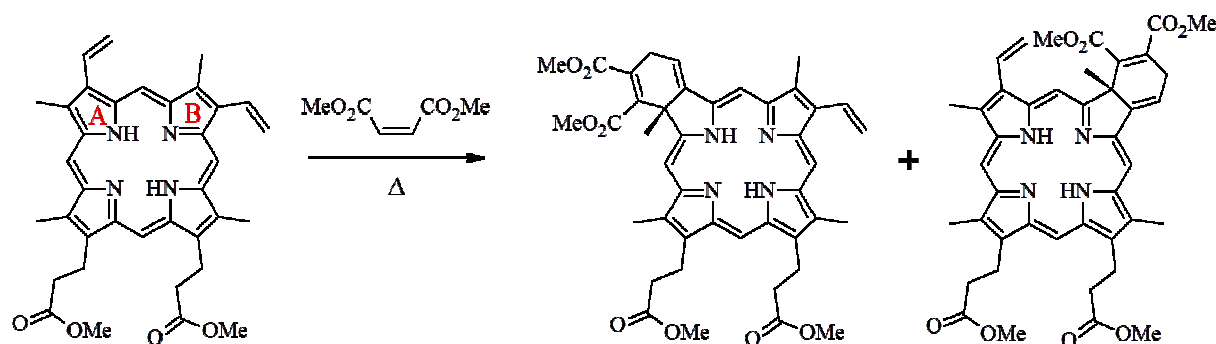


Figure 1-45 : Synthèse de la BPDMA.

Cette molécule, très intéressante pour ses propriétés photophysiques en raison de sa bande Q_I déplacée dans le rouge ($\lambda(Q_I) = 666 \text{ nm}$ dans le méthanol), est utilisée dans le traitement de la DMLA.

II.1.2.d. Exemples de chlorines et bactériochlorines

Une multitude de dérivés tétrapyrroliques existent à l'état naturel, tant dans le système photosynthétique que pour des applications encore inconnues. La plupart de ces pigments sont de bons photosensibilisateurs pour une application en PDT, mais le manque de voie simple et efficace en synthèse totale rend ces composés difficiles à utiliser.

La chlorine la plus connue à l'état naturel est la chlorophylle (figure 1-46). Il existe différents types de chlorophylles, mais les chlorophylles *a*, *b* et *c* sont les plus abondantes dans la nature ; leur utilisation comme synthon de base pour la conception d'autres chlorines a fait l'objet de nombreuses études. L'un des photosensibilisateurs directement dérivé de la chlorophylle est la phéophytine *a*, molécule issue de la chlorophylle *a*, démétaillée et transestérifiée (figure 1-46).

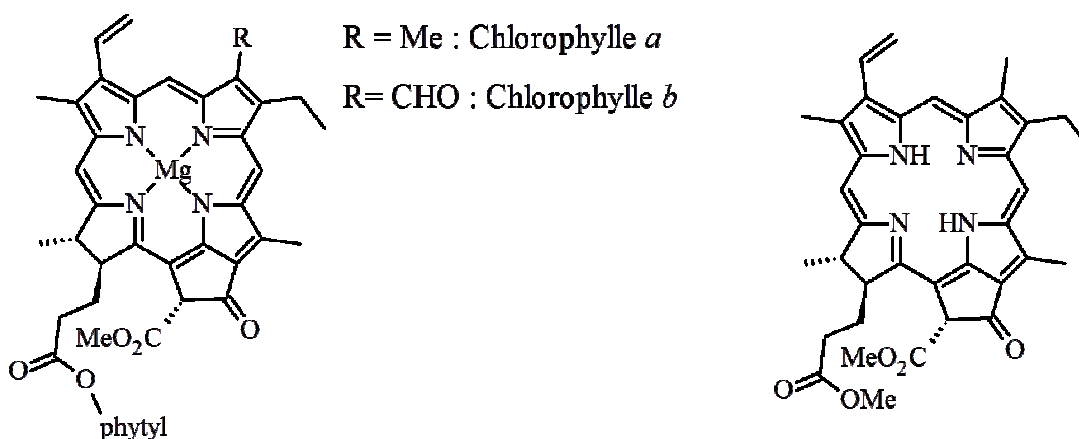


Figure 1-46 : Structures chimiques des chlorophylles (à gauche) et de la phéophytine a (à droite).

D'autres composés de type chlorine, également issus de la structure de la chlorophylle, existent et sont étudiés pour des applications en PDT ; parmi eux : le pyrophéophorbide *a* (165) et la chlorine *e*₆ (166) (figure 1-47).

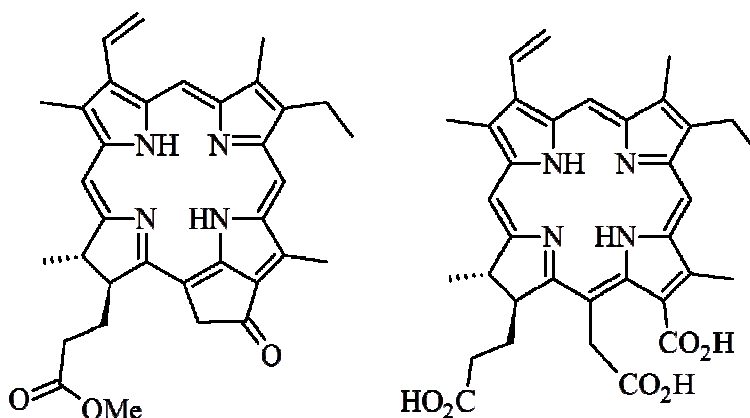


Figure 1-47 : Structures chimiques du pyropheophorbide a (à gauche) et de la chlorine e6 (à droite).

Les bactériochlorines naturelles se retrouvent dans des bactéries, d'où leur nom (167). La figure 1-48 montre la structure chimique d'une bactériochlorine isolée de *Rhodobacter capsulatus*. Le dérivé métallé, avec insertion d'un palladium au centre du cycle est utilisé en PDT sous le nom de Tookad® (la forme soluble est en phase III pour le traitement du cancer de la prostate).

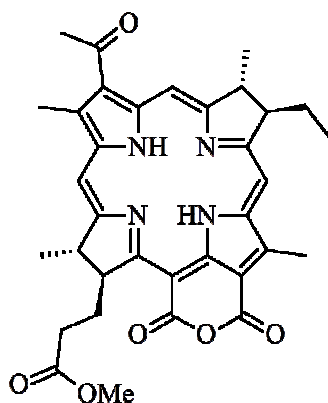


Figure 1-48 : Structure chimique d'une bactériochlorine isolée de Rhodobacter capsulatus.

II.1.3. Noyaux porphyriniques expansés ou dérivés

Dans le but d'élaborer de nouveaux photosensibilisateurs, des recherches se sont tournées vers des isomères des porphyrines, soit en changeant la structure du macrocycle, soit en modifiant la nature chimique des éléments du noyau. De nombreuses molécules en ont découlé, toutes plus ou moins utilisables en PDT. Parmi ces molécules, certaines ont un fort potentiel d'application en PDT.

II.1.3.a. Les purpurines et benzochlorines

Les purpurines et benzochlorines sont des dérivés de la chlorine dans lesquels un cycle vient fusionner avec le macrocycle porphyrinique entre une position « méso » et β -pyrrolique (figure 1-49).

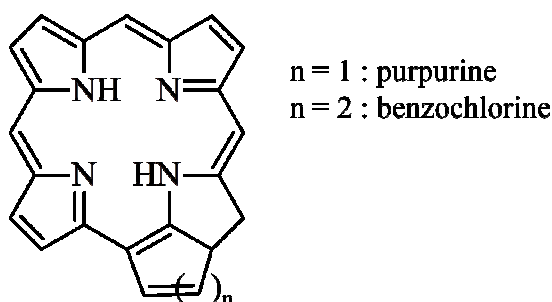


Figure 1-49 : Structure chimique des purpurines et benzochlorines.

Les purpurines ont été synthétisées pour la première fois en 1960 par Morgan et Tertel (168) ; ils ont élaboré une série de purpurines issues de la chlorophylle et montré leur potentielle application comme PS en PDT (figure 1-50). En effet, ces molécules perdent la symétrie des porphyrines, ce qui entraîne une modification de leur spectre d'absorption ; la bande Q_I des purpurines non métallées se situe généralement autour de 660 nm. L'insertion d'un métal, tel que l'ion Sn(IV) , déplace le spectre d'absorption d'environ 20 nm vers le rouge. Ces molécules sont aussi caractérisées par un rendement quantique d'état triplet relativement élevé, ce qui les rend très bons producteurs d'oxygène singulet (169).

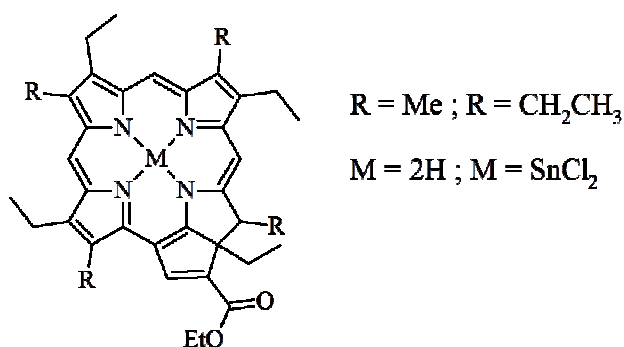


Figure 1-50 : Structure chimique des purpurines synthétisées par Morgan et al.

Les benzochlorines sont des molécules avec un cycle à 6 chaînons fusionné au cycle porphyrinique ; leur synthèse se fait généralement à partir d'une chlorine *méso*-substituée (170). Morgan *et al.* ont synthétisé une benzochlorine comprenant une fonction iminium en position « *méso* » (figure 1-51) ; cette modification entraîne une forte absorption à 750 nm (171).

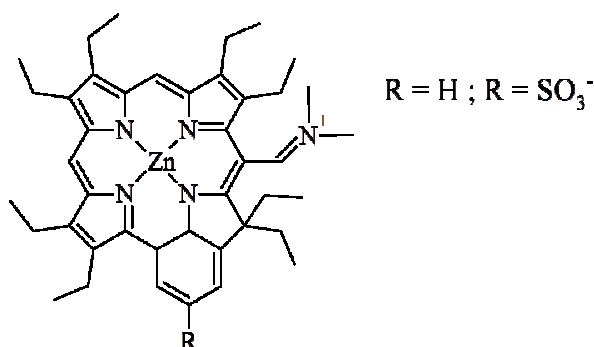


Figure 1-51 : Structure chimique des benzochlorines synthétisées par Morgan et al.

II.1.3.b. Les porphycènes

Les porphycènes sont des molécules tétrapyrroliques dont les ponts méthines ont été modifiés (172) ; dans cette structure, chaque motif pyrrolique est lié directement à un autre pyrrole d'un côté et lié *via* deux carbones de l'autre (figure 1-52). Ces molécules, synthétisées par Vogel en 1986 pour la première fois, sont issues d'un couplage de McMurry entre deux bipyrroles bialdéhydes (figure 1-52).

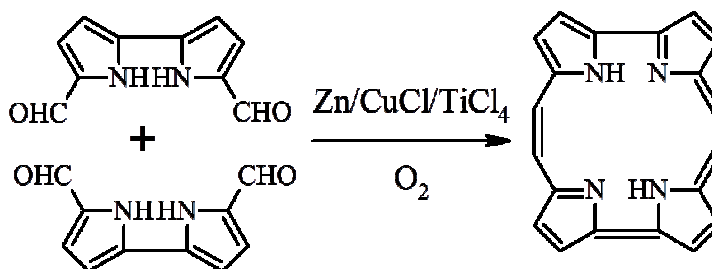


Figure 1-52 : Schéma de synthèse d'une porphycène.

La porphycène non substituée est néanmoins peu utilisée en raison de sa faible solubilité dans les solvants usuels et de son spectre d'absorption semblable à celui de la porphyrine, comprenant une bande d'absorption dans le rouge relativement peu intense.

Nonell *et al.* ont synthétisé une tétraphénylporphycène, dont les caractéristiques photophysiques sont compatibles avec des utilisations PDT (173). Cette porphycène a une absorption maximum à 659 nm avec un rendement quantique d'oxygène singulet proche de 0,25 dans l'éthanol.

II.1.3.c. Les phtalocyanines

Les phtalocyanines (Pc) ont une structure semblable à celle de la porphyrine. Elles sont composées de motifs isoindoliques reliés entre eux par des atomes d'azote (figure 1-53) (174). L'extension de ces molécules s'appelle des naphthalocyanines (NPc) et leur structure se trouve changée uniquement par la présence d'une fonction naphthalène fusionné à chaque motif isoindolique (figure 1-53).

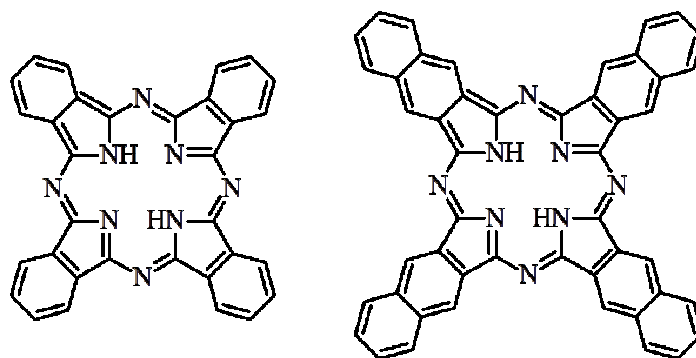


Figure 1-53 : Structures chimiques d'une phthalocyanine (à gauche) et d'une naphthalocyanine (à droite).

Elles sont souvent synthétisées sous forme de métallophthalocyanines, comprenant en leur centre un ion zinc, aluminium (Photosense®) ou silicium. L'inconvénient majeur de ces molécules est leur très mauvaise solubilité dans les solvants usuels, et notamment dans l'eau. Des dérivés hydrophiles, comme le Photosense®, ont été synthétisés en fonctionnalisant les motifs isoindoliques avec des groupements SO_3^- .

Les spectres d'absorption de ces molécules diffèrent complètement de leurs homologues porphyriniques ; en effet, ils sont caractérisés par une forte absorption dans le rouge en raison de leur conjugaison étendue (figure 1-54).

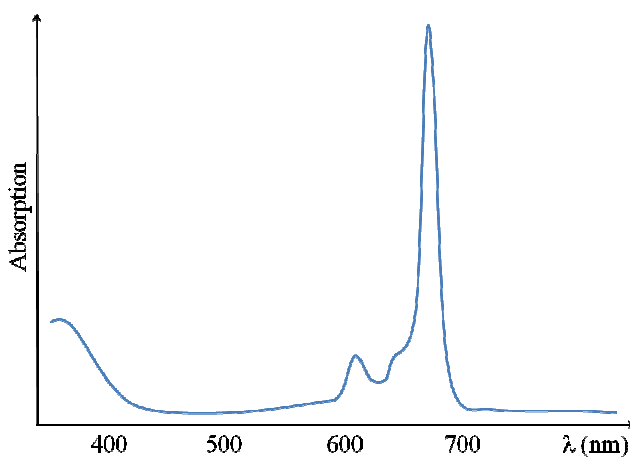


Figure 1-54 : Spectre d'absorption caractéristique d'une phthalocyanine zinguée.

II.2. Les stratégies de ciblage en PDT

Depuis le développement du Photofrin®, les efforts de la recherche dans le domaine des PS se sont tournés vers l'élaboration de PS de plus en plus performants, en répondant à un cahier des charges multicritères, concernant des propriétés physico-chimiques, photophysiques ou biologiques. Les « caractéristiques idéales » d'un PS pourraient se décliner comme suit :

- Etre chimiquement pur et issu d'une synthèse facile et reproductible,
- Avoir un rendement quantique en oxygène singulet (ou en EROs) important,
- Avoir une forte absorption dans la fenêtre thérapeutique, à savoir entre 600 nm et 800 nm,
- S'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux,
- Ne pas être toxique à l'obscurité,
- Avoir une structure amphiphile afin d'obtenir une bonne biodistribution,
- Avoir une formulation compatible avec un usage clinique (stabilité et solubilité),
- Avoir une clairance plasmatique rapide, sans risques pour le patient.

A la suite du Photofrin®, beaucoup d'autres PS ont ainsi été synthétisés, se basant sur les critères énoncés ci-dessus comme base de leur conception. Le Photofrin® est alors qualifié de « PS de première génération » et des molécules, plus complexes, ont vu le jour sous la dénomination « PS de seconde et troisième générations ».

II.2.1. Rappels sur les PS de 1^{ère} génération

Les PS de première génération en PDT correspondent à l'HpD puis, par la suite, au Photofrin®. Ce sont ces photosensibilisateurs qui ont permis les premiers pas de la PDT et dont l'historique a été développé en partie I.2.

Le Photofrin® a été le seul PS autorisé sur le marché entre 1993 et 2000 et reste aujourd'hui le PS le plus utilisé en PDT malgré les inconvénients qu'il présente. Tout d'abord, c'est un mélange de polymères de porphyrines. Des analyses par spectrométrie de masse, puis par des techniques plus poussées, ont montré que le Photofrin® est un mélange de composés allant du dimère à des oligomères de neuf monomères (175–177). Les molécules sont majoritairement liées entre elles par des liaisons éther et ester, mais des liaisons *via* les positions « *méso* » ont aussi été détectées (177–179).

De plus, le Photofrin® est limité par son profil pharmacocinétique ; en effet, cette molécule est mal éliminée du corps et son accumulation dans les tissus peut durer jusqu'à six semaines (180), entraînant une photosensibilité cutanée importante. Le patient traité avec le Photofrin® est alors obligé de se protéger de la lumière du soleil pendant cette période. Cet inconvénient, bien que mineur comparé à ceux engendrés par les chimiothérapies, limite cependant son utilisation clinique. A cela s'ajoute une limitation photophysique intrinsèque, le Photofrin® absorbe peu dans les grandes longueurs d'onde : son absorption correspondant à la bande Q_I, à 630 nm, est relativement faible ($\epsilon_{630\text{nm}} = 3000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans l'éthanol).

Ces considérations ont mené, depuis les années 1980, à la recherche et à l'élaboration de nouveaux composés. Ces composés, appelés composés de seconde et de troisième générations, font l'objet de la suite de cette partie.

II.2.2. Les PS de 2^{ème} génération et ciblage passif

Les travaux concernant l'élaboration des PS de nouvelle génération ont consisté à synthétiser des molécules répondant plus précisément au cahier des charges, précédemment cité. Les efforts ont aussi porté sur les modalités de traitement PDT, en favorisant par exemple une meilleure prise en compte de l'intervalle drogue-lumière (IDL), une excitation continue ou fractionnée, ou encore en développant des procédés d'excitation biphotonique.

Les PS de seconde génération sont caractérisés par une accumulation passive dans les tissus tumoraux, absorbant « mieux » que le Photofrin® à des longueurs d'onde plus élevées. Des PS hydrophiles ou lipophiles ont été développés, soit par modification chimique de la structure des molécules, soit en jouant sur leur formulation avec le développement de systèmes d'encapsulation comme des liposomes ou des micelles.

II.2.2.a. La *m*-THPC, ou Foscan®

L'un des PS de deuxième génération ayant obtenu l'AMM en 2001 en France est la *m*éta-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC, ou Foscan®), commercialisée par le laboratoire *Biotech Pharma LTD* (figure 1-55). C'est une chlorine, caractérisée par une bande Q_I plus intense à 652 nm ($\epsilon_{652\text{nm}} = 22000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans l'éthanol) ; de plus, sa structure chimique comportant des groupements hydroxy rend la *m*-THPC plus soluble que son homologue tétraphénylchlorine.

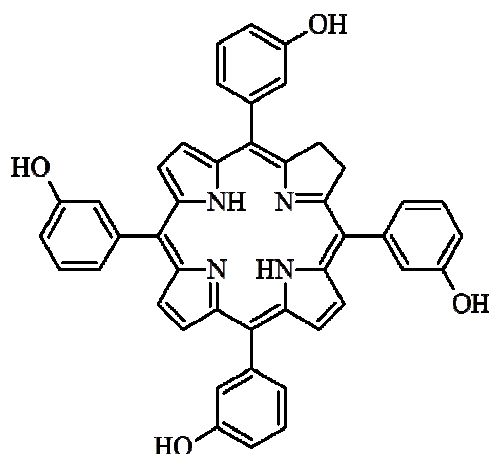


Figure 1-55 : Structure chimique du Foscan®.

Cette molécule est employée dans le cas de traitements palliatifs de carcinomes épidermoïques avancés de la tête et du cou lorsque les traitements dits conventionnels (radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie) ont échoué.

Le Foscan® fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses études afin d'améliorer sa biodistribution, notamment grâce à une encapsulation dans des liposomes (Foslip), des formulations PEGylées (Fospeg) (181–183), ou incorporé dans des nanoparticules de silice.

II.2.2.b. L'ALA

L'ALA, dont il a été question en partie II.1.1.d, est une prodrogue utilisée aujourd'hui en PDT, dont la sélectivité pour les cellules néoplasiques en a fait un candidat intéressant pour les traitements dans les domaines de l'urologie (184), la pneumologie (185) ou encore la neurochirurgie (186). Néanmoins, l'ALA n'a reçu l'AMM que pour des applications en dermatologie : le traitement PDT de la kératose actinique (187).

L'ALA a été l'objet de nombreuses modifications structurales afin d'améliorer sa pharmacocinétique. En effet, l'ALA, dans sa forme la plus simple, est un composé zwitterionique très hydrosoluble, ce qui a des conséquences néfastes sur sa biodistribution. Afin d'être distribué de manière efficace dans le corps, c'est-à-dire d'être à la fois transporté dans le sang et capable de traverser efficacement les membranes des cellules, le médicament doit avoir un équilibre entre hydrophilie et lipophilie. L'ALA a donc été un sujet d'étude quant à sa fonctionnalisation, notamment les modifications concernant sa partie acide carboxylique ; quelques dérivés de l'ALA synthétisés et leur coefficient de partage ($\log P$) sont montrés en figure 1-56 (157).

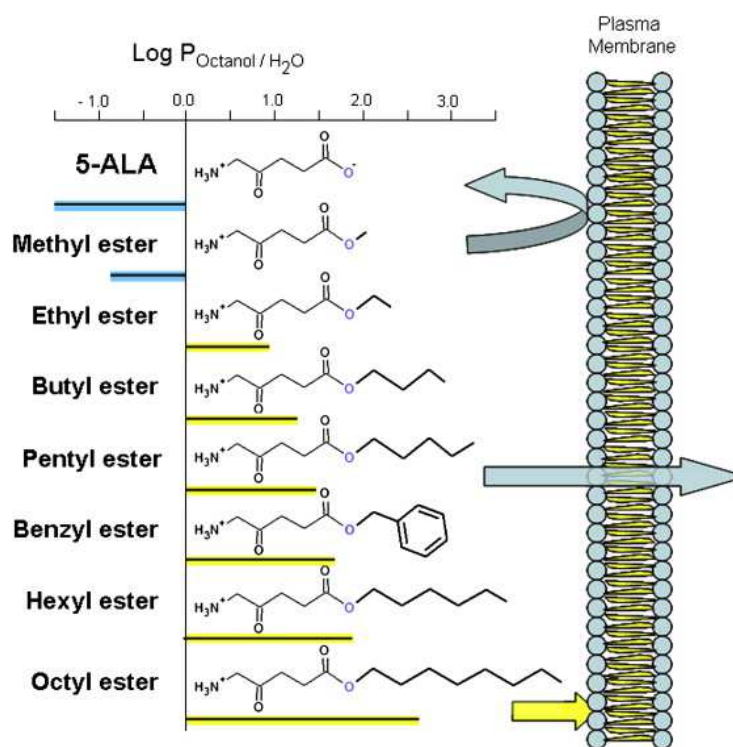


Figure 1-56 : Structures chimiques et coefficient de partage ($\log P$) de l'ALA et de certains esters dérivés. Le comportement vis-à-vis d'une membrane cellulaire est symbolisé à droite par des flèches. Réf. : (157).

Certains des esters de l'ALA ont reçu l'AMM, c'est le cas par exemple du Metvix (ester méthylique) pour le traitement des carcinomes basocellulaires et de l'Hexvix (ester hexylique) pour le traitement du cancer de la rate.

II.2.2.c. Résumé des PS de seconde génération

La liste des PS de deuxième génération ayant reçu une AMM (ou en cours d'essais cliniques) dans différents pays est donné en Tableau 1-4 (188). Les formules chimiques de certaines molécules sont données en figure 1-57.

Tableau 1-4 : Liste des principaux PS en essais clinique ou préclinique en PDT (188).

<i>Photosensibilisateur</i>	<i>Nom commercial</i>	λ_{exc} (nm)	<i>Indications</i>
<i>m</i> -THPC	Foscan®	652	Cancers de l'œsophage, de la prostate et du pancréas ; tumeurs avancées de la tête et du cou
Vertéporphine	Visudyne®	689	Carcinome basocellulaire et squameux
HPPH 2-(1-hexyloxyethyl)-2-divinyl pyropheophorbide-alpha	Photochlor®	665	Carcinome basocellulaire, cancers de l'œsophage et cancer de la tête et du cou
Palladium- bacteriopheophorbide	Tookad®	763	Cancer de la prostate
5-ALA	Levulan®	630	Tumeurs de la peau, de la tête et du cou, tumeurs gynécologiques et carcinome basocellulaire
		375-400	Photodétection des cancers du cerveau, de la tête et du cou, et des reins
Acide méthyl- δ - aminolévulinique	Metvix®	635	Carcinome basocellulaire
Acide benzyl- δ - aminolévulinique	Benzvix®	635	Tumeurs gastro-intestinales
Acide hexyl- δ - aminolévulinique	Hexvix®	375-400	Photodétection du cancer du rein
Lutetium(III)-texaphyrin ou Motexafin-lutetium	Lutex®, Lutrin®, Optrin®, Antrin®	732	Cancer de la prostate, des cervicales, du sein et du cerveau
SnEt2 ou éthiopurpurine d'éthyle d'étain (IV)	Purlitine®, Photrex®	659	Sarcome de Kaposi, cancer du sein, carcinome basocellulaire, cancer de la prostate

Tableau 1-4 (suite).

NPe6, mono-L-aspartyl chlorin e6, talaporfin sodium	Talaporfin®, Laserphyrin®	664	Tumeurs solides, cancer des poumons
BOPP, protoporphyrine borée	BOPP	630	Tumeurs cérébrales
Phtalocyanine zinguée	CGP55857	670	Carcinome à cellules squameuses
Phtalocyanine de silicone	Pc 4	675	Lésions cutanées et subcutanées de diverses tumeurs solides
Mélange de phtalocyanines sulfonées d'aluminium	Photosense®	675	Cancers de la peau, du sein, du poumon, du larynx, de la tête et du cou, tumeurs des yeux et des cervicales
Phtalocyanine zinguée	CGP55857	670	Carcinome squameux

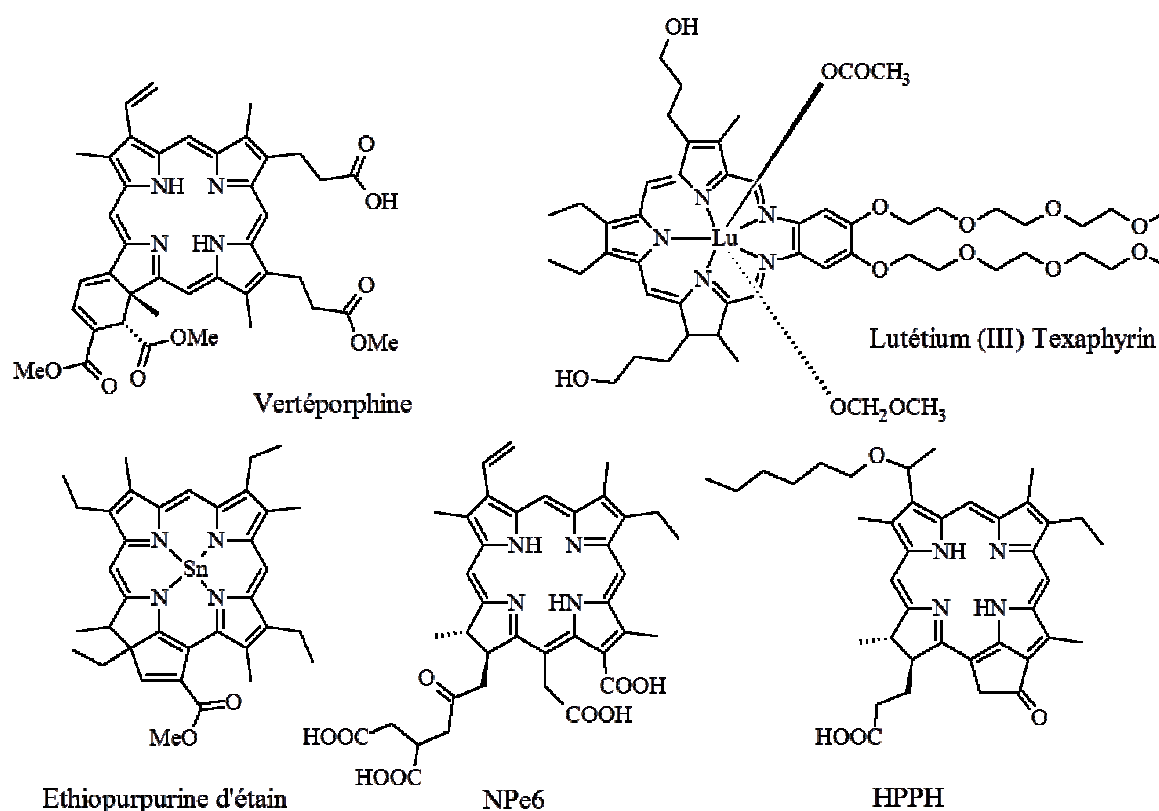


Figure 1-57 : Structures chimiques de quelques PS ayant reçu l'AMM, utilisés en PDT.

II.2.3. Les PS de 3^{ème} génération et ciblage actif

Les PS de troisième génération diffèrent de la seconde génération par l'utilisation d'un module d'adressage ou d'une formulation spécifique qui favorise la sélectivité du PS.

Les modules d'adressage peuvent être de natures diverses, il peut s'agir de ligands vecteurs ou de biomolécules servant de prodrogues. On distingue deux catégories de ciblage actif, dont il a déjà été question précédemment : le ciblage actif direct, visant les cellules de la tumeur, et le ciblage actif indirect, visant les néo-vaisseaux tumoraux.

II.2.3.a. Ciblage actif direct

Le ciblage actif direct utilise des vecteurs biologiques ciblant directement les récepteurs surexprimés à la surface des cellules de la tumeur.

Parmi les stratégies les plus utilisées en PDT, le ciblage des récepteurs aux œstrogènes est particulièrement intéressant en raison de leur surexpression dans les cas de cancer du cerveau, du sein et des ovaires (189). Une première étude a consisté à coupler un photosensibilisateur à l'œstradiol *via* un bras espaceur (figure 1-57). Cette étude a montré que ce conjugué montrait une meilleure internalisation dans les cellules surexprimant des récepteurs à l'œstrogène que dans des cellules saines (190).

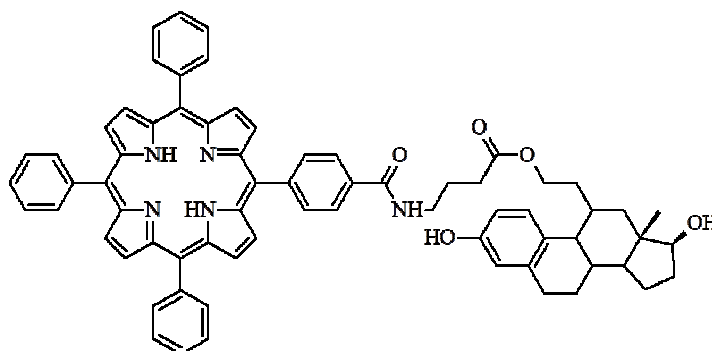


Figure 1-58 : Structure chimique du conjugué porphyrine-œstradiol.

Une étude plus récente fait intervenir le phéophorbide *a*, couplé à un motif œstrogénique. El Akra *et al.* démontrent par microscopie confocale que le conjugué se

localise préférentiellement dans les cellule tumorales et est accompagné d'une action photodynamique sept fois supérieure comparé à l'action du PS seul (191).

Une autre stratégie consiste à cibler les récepteurs à l'acide folique ; en effet, ce récepteur est surexprimé de manière importante dans le cas des cancers, notamment de l'ovaire, de l'utérus et du cerveau (192). Notre équipe s'est intéressée à ce ciblage des cellules tumorales ; la thèse de Julien Gravier (2004-2008) (193) a consisté en la synthèse et la caractérisation d'un conjugué chlorine – acide folique (figure 1-58).

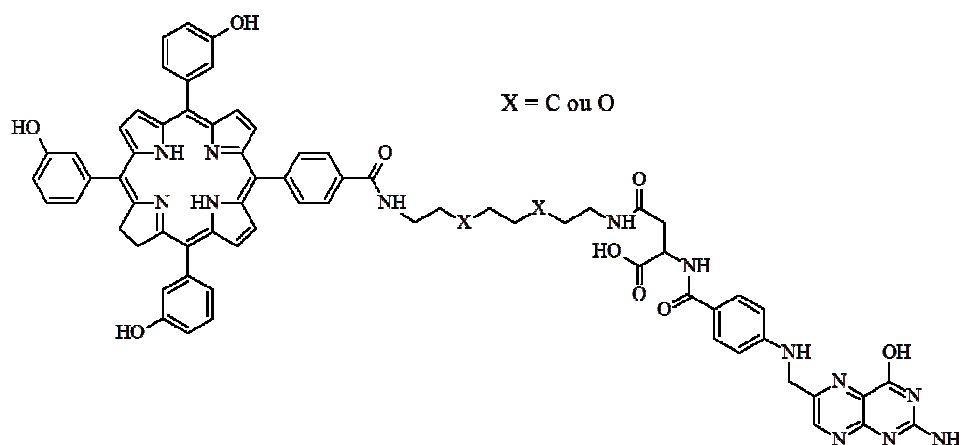


Figure 1-59 : Structure chimique des conjugués « m-THPC-like » - acide folique synthétisés par Julien Gravier.

Il a été démontré, chez la souris xénotransgénée, quatre heures après injection, que l'accumulation des molécules était deux fois supérieure pour le conjugué que pour le PS seul ; de plus, la sélectivité envers les cellules cancéreuses était cinq fois supérieure qu'envers les cellules saines. Il a également été démontré que cette incorporation se faisant effectivement *via* le récepteur à l'acide folique, car si lors de l'expérience, de l'acide folique libre est ajouté, une diminution de l'incorporation cellulaire est détectée (194, 195). Cette étude a été poursuivie dans notre équipe avec la thèse de Vincent Morosini (2006-2010) qui a étudié la vectorisation de *quantum dots* par l'acide folique pour une application PDT (196).

Une autre voie de ciblage possible est d'utiliser la surexpression des récepteurs aux sucres dans certaines cellules cancéreuses. En effet, les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement à certains types de carbohydrates, et dont la surexpression a été démontrée dans les cancers du foie, du sein, de la prostate et des poumons (197). Pour cela, des

conjugués PS – sucres, appelés PS glycoconjugués, ont été synthétisés entre autre par notre équipe pendant la thèse de Benoît Di Stasio (2003-2007) (198). Cette étude s’est articulée autour du couplage entre un photosensibilisateur et des dérivés de la glucosamine, favorisant leur incorporation dans des cellules cancéreuses par rapport au PS seul (199, 200). Des tétraphénylporphyrines mono- et di-glucosylées, ainsi qu’une tétraphénylchlorine mono-glucosylée ont été testées sur une lignée cellulaire de carcinome humain HT29 et ont montré une activité photodynamique sensiblement supérieure à celle d’une porphyrine seule (la tétraphénylporphyrine).

Cette approche consistant en la condensation de sucres et de macrocycles tétrapyrroliques a été initiée par Maillard *et al.* en utilisant les fonctions hydroxyles en « *méso* » des groupes aryles et phtalyles des porphyrines et phtalocyanines respectivement (figure 1-59) (201). Les PS glycoconjugués synthétisés ont le multiple avantage d’être hydrophiles, non-ionisables et non agrégés en raison de l’encombrement stérique des sucres.

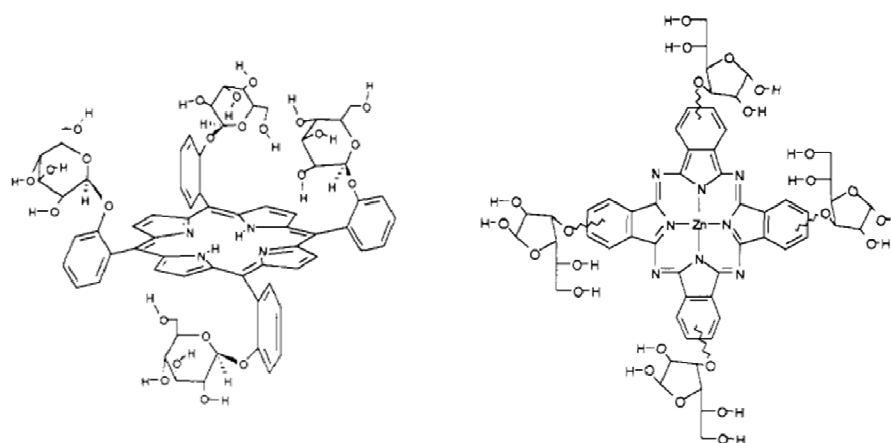


Figure 1-60 : Structures chimiques des dérivés glycosylés de macrocycles tétrapyrroliques. Réf. : (201).

Par la suite, cette stratégie a été généralisée à l’étude photophysique et biologique de dérivés tétra- et tri-glycosylés de la *m*-THPC (202–204) et de la *m*-THPP (202) (figure 1-60). Ces études ont démontré que les dérivés tri-glycosylés présentent une plus grande activité photodynamique que les composés parents ou que les conjugués tétra-glycosylés (202, 205). Les études visant à déterminer les effets de la glycoconjugaison sur la photoactivité des molécules ont révélé que les composés tri-glycosylés présentent une meilleure internalisation

dans les cellules de carcinome humain HT29 en partie grâce à un mécanisme d'endocytose médié par des récepteurs avec une localisation préférentielle dans les mitochondries (202). L'activité photodynamique de ces composés a été mesurée quatre fois supérieure à celle de la *m*-THPC seule.

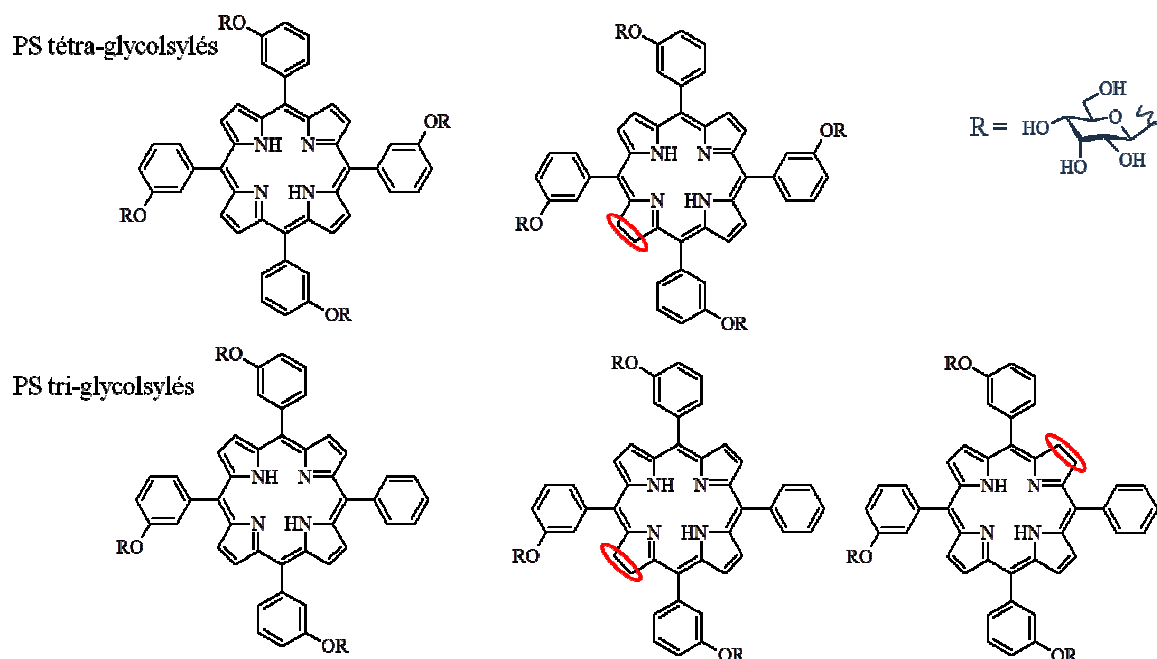


Figure 1-61 : Structures chimiques des PS glycosylés synthétisés par Maillard et al. Réf. : (202).

D'autres équipes encore travaillent sur cette conjugaison, utilisant différents types de sucres, comme le mannose ou le galactose (206–210).

Enfin, l'utilisation du métabolisme des cellules cancéreuses a beaucoup inspiré de voies de ciblage. En effet, lors de son développement, la cellule va beaucoup attirer des composés type polyamine comme la spermine ou la spermidine (211, 212). Des équipes travaillent donc sur des conjugués PS – polyamines, utilisant la bonne incorporation de ces composés pour générer un effet PDT.

II.2.3.b. Ciblage indirect actif

Cette stratégie consiste à utiliser de manière active le micro-environnement des néovaisseaux tumoraux afin de produire un effet VTP, comme décrit précédemment. Cette stratégie, initiée au laboratoire depuis 2005, se poursuit encore aujourd'hui et vise à cibler les

marqueurs spécifiques de l'angiogenèse pour éradiquer la néo-vascularisation tumorale. Dans ce domaine, trois cibles ont été choisies :

- **Les intégrines.** Les intégrines sont des récepteurs membranaires exprimés à la surface des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse. Il existe de nombreuses intégrines et elles ont un rôle de régulation dans l'angiogenèse. Le tripeptide RGD est un motif reconnu par les intégrines, il a de surcroît une grande affinité et une grande spécificité. Notre équipe a démontré que le couplage entre une porphyrine et deux motifs RGD, l'un cyclique, l'autre linéaire, améliorait fortement l'activité PDT *in vitro* (128, 129) : la chlorine liée au motif RGD linéaire est incorporée 98 fois plus que la chlorine seule, et celle liée au motif RGD cyclique est incorporée 80 fois plus que la chlorine seule dans des cellules HUVEC surexprimant les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

- **NRP-1.** Le VEGF (de l'anglais *Vascular Endothelial Growth Factor*) est une protéine exprimée pendant la phase d'hypoxie tumorale et est considéré comme le principal régulateur de l'angiogenèse, aussi bien physiologique que tumoral. Les récepteurs du VEGF sont donc des cibles potentielles pour la PDT. Parmi ces récepteurs, nous pouvons distinguer les VEGFR (Récepteurs du VEGF) et les neuropilines. Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires, jouant le rôle de co-récepteur du VEGF. L'étude et l'utilisation de ces récepteurs est une stratégie utilisée par notre équipe. Lors des thèses de Noémie Thomas, Loraine Tirand, Ezatul Kamarulzaman, Pierre Couleaud et Denise Béchet, l'équipe a développé plusieurs composés ciblant le récepteur neuropiline (NRP-1). Dans un premier temps, un conjugué chlorine – peptide a été synthétisé et testé biologiquement (figure 1-62). Le peptide H-ATWLPPR-OH, spécifique du co-récepteur NRP-1, est lié à la TPC par l'intermédiaire d'un bras espaceur de type acide aminohexanoïque (Ahx). Malgré de bons résultats quant à son incorporation dans des cellules endothéliales et dans l'endothélium tumoral de tumeurs cérébrales xéno greffées chez la souris, il a été observé que sa stabilité *in vivo* était altérée (*cf.* thèses Pierre Couleaud, Loraine Tirand et Noémie Thomas).

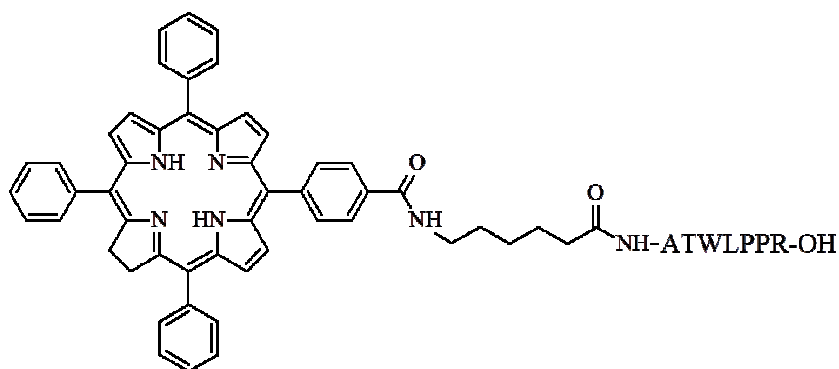


Figure 1-62 : Structure chimique du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR.

Pour pallier entre autre ce manque de stabilité, l'équipe a développé une stratégie consistant à encapsuler le PS dans une nanoparticule de silice, dont le cœur est en oxyde de gadolinium pour une détection par IRM, dont la surface est composée de motifs PEG afin de la rendre furtive *in vivo*, et de peptides ATWLPPR pour un ciblage actif des récepteurs NRP-1 (figure 1-63).

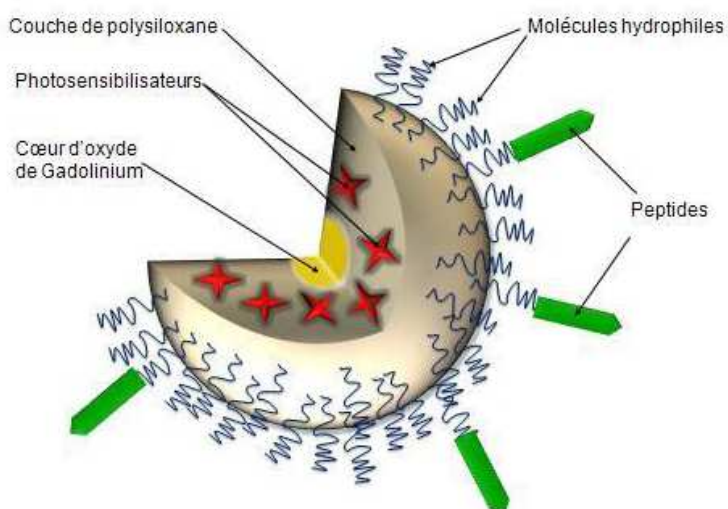


Figure 1-63 : Représentation de la nanoparticule développée par notre équipe. Tiré de la thèse de Pierre Couleaud.

La thèse en cours d'Aymeric Sève a pour but de déterminer la composition optimale de cette nanoparticule.

- **Les MMPs.** Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), présentées précédemment, ont été choisies comme sujet de notre étude. Notre stratégie s'articule autour

de la conception d'un *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB), qui sera présenté en détail en chapitres II, III et IV, activé par les gélatinases. Cette stratégie a déjà été éprouvée par l'équipe du professeur Zheng au Canada qui utilise l'activité peptidase de la MMP-7 pour cliver le peptide H-GPLGLARK-OH afin de séparer un photosensibilisateur d'un inhibiteur, ou *quencher*, d'état excité. Cette stratégie, détaillée plus loin dans cette thèse, a été le point de départ pour notre stratégie, initiée par Pierre Couleaud en 2008, puis poursuivie pendant cette thèse.

Conclusion

La PDT demeure une modalité de traitement anticancéreuse prometteuse. Contrairement aux méthodes « classiques » de traitement, cette approche thérapeutique peut se révéler extrêmement sélective et améliorer la qualité de vie des patients. Pour cela, au niveau de la Recherche, de grands efforts sont fournis et continuent à être fournis pour trouver les conditions idéales de thérapie. Les PS de troisième génération sont des molécules à fort potentiel, offrant de multiples applications et se rapprochant le plus possible du « PS idéal ». Notre équipe s'est tournée vers la VTP en raison de son potentiel prometteur en tant que thérapie anticancéreuse ; la connaissance de plus en plus pointue du micro-environnement tumoral nous amène à élaborer des stratégies de plus en plus sélectives et efficaces.

L'objectif de cette thèse s'inscrit donc dans la continuité des efforts pour trouver une modalité de traitement plus sélective et plus efficace. La conception et l'élaboration de *Molecular Beacons* est une alternative intéressante, tant par son côté original que par sa pertinence.

Références

1. Imbault-Huart, M. J. (1984) L'histoire du Cancer. , *L'Histoire* 74, 74-77.
2. Olson, J. S. (1989) The history of cancer: an annotated bibliography. ABC-CLIO.
3. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? , *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 4-6.
4. Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. , *Nat. Med.* 1, 27-31.
5. Reynolds, L. P., et Redmer, D. A. (2001) Angiogenesis in the Placenta. , *Biology of Reproduction* 64, 1033 -1040.
6. Kojda, G., et Hambrecht, R. (2005) Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? , *Cardiovasc. Res.* 67, 187-197.
7. Vagnucci, A. H., Jr, et Li, W. W. (2003) Alzheimer's disease and angiogenesis. , *Lancet* 361, 605-608.
8. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. , *Nat. Med.* 9, 653-660.
9. Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. , *Nature* 386, 671-674.
10. Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. , *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
11. Hanahan, D., et Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. , *Cell* 86, 353-364.
12. Spannuth, W. A., Sood, A. K., et Coleman, R. L. (2008) Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. , *Nature Clinical Practice Oncology* 5, 194-204.
13. Pepper, M. S. Angiogenèse et morphogénèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique. , *MS. Médecine sciences* 16, 1378-1386.
14. Tirand, L. (2003, 2007) Développement d'un photosensibilisateur couplé à un peptide ciblant la neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour des applications en cancérologie. Thèse. Nancy Université, Nancy.
15. Brown, S., Bernardo, M. M., Li, Z.-H., Kotra, L. P., Tanaka, Y., Fridman, R., et Mobashery, S. (2000) Potent and Selective Mechanism-Based Inhibition of Gelatinases. , *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6799-6800.
16. Sekton, B. (2010) Matrix metalloproteinases - an overview. , *Research and Reports in Biology* 1, 1-20.
17. Verma, R. P., et Hansch, C. (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. , *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2223-2268.
18. Egeblad, M., et Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. , *Nature Reviews Cancer* 2, 161-174.
19. Dong, Z., Kumar, R., Yang, X., et Fidler, I. J. (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. , *Cell* 88, 801-810.
20. Lang, R., Kocourek, A., Braun, M., Tschesche, H., Huber, R., Bode, W., et Maskos, K. (2001) Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure. , *Journal of Molecular Biology* 312, 731-742.
21. Coussens, L. M., Fingleton, B., et Matrisian, L. M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. , *Science* 295, 2387-2392.
22. Vihinen, P., et Kähäri, V.-M. (2002) Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. , *Int. J. Cancer* 99, 157-166.
23. Thompson, R. W., et Parks, W. C. (1996) Role of Matrix Metalloproteinases in Abdominal Aortic Aneurysms. , *Annals of the New York Academy of Sciences* 800, 157-174.
24. Jäälinojä, J., Herva, R., Korpela, M., Höyhty, M., et Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000) Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. , *J. Neurooncol.* 46, 81-90.
25. Talvensaari-Mattila, A., Pääkkö, P., Höyhty, M., Blanco-Sequeiros, G., et Turpeenniemi-Hujanen, T. (1998) Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. , *Cancer* 83, 1153-1162.

26. Chenard, M. P., O'Siorain, L., Shering, S., Rouyer, N., Lutz, Y., Wolf, C., Basset, P., Bellocq, J. P., et Duffy, M. J. (1996) High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. , *Int. J. Cancer* 69, 448–451.
27. Davidson, B., Goldberg, I., Kopolovic, J., Lerner-Geva, L., Gotlieb, W. H., Ben-Baruch, G., et Reich, R. (1999) MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma--a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. , *Gynecol. Oncol.* 73, 372–382.
28. Murray, G. I., Duncan, M. E., O'Neil, P., Melvin, W. T., et Fothergill, J. E. (1996) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. , *Nat. Med.* 2, 461–462.
29. Oberg, A., Höyhty, M., Tavelin, B., Stenling, R., et Lindmark, G. (2000) Limited value of preoperative serum analyses of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal cancer. , *Anticancer Res.* 20, 1085–1091.
30. Zeng, Z. S., Huang, Y., Cohen, A. M., et Guillem, J. G. (1996) Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. , *J. Clin. Oncol.* 14, 3133–3140.
31. Zucker, S., Lysik, R. M., Zarrabi, M. H., et Moll, U. (1993) M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. , *Cancer Res.* 53, 140–146.
32. Inoue, T., Yashiro, M., Nishimura, S., Maeda, K., Sawada, T., Ogawa, Y., Sowa, M., et Chung, K. H. (1999) Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. , *Int. J. Mol. Med.* 4, 73–77.
33. Grigioni, W. F., D'Errico, A., Fortunato, C., Fiorentino, M., Mancini, A. M., Stetler-Stevenson, W. G., Sobel, M. E., Liotta, L. A., Onisto, M., et Garbisa, S. (1994) Prognosis of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells and basement membrane. , *Mod. Pathol.* 7, 220–225.
34. Sier, C. F., Kubben, F. J., Ganesh, S., Heerding, M. M., Griffioen, G., Hanemaaijer, R., van Krieken, J. H., Lamers, C. B., et Verspaget, H. W. (1996) Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. , *Br. J. Cancer* 74, 413–417.
35. Allgayer, H., Babic, R., Beyer, B. C., Grützner, K. U., Tarabichi, A., Schildberg, F. W., et Heiss, M. M. (1998) Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. , *Oncology* 55, 152–160.
36. Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Fujie, T., Baba, K., Kusumoto, H., Haraguchi, M., Ueo, H., et Akiyoshi, T. (1997) Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers. , *Int. J. Cancer* 74, 316–321.
37. Bando, E., Yonemura, Y., Endou, Y., Sasaki, T., Taniguchi, K., Fujita, H., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G., Miwa, K., et Seiki, M. (1998) Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis. , *Oncol. Rep.* 5, 1483–1488.
38. Määttä, M., Soini, Y., Liakka, A., et Autio-Harmainen, H. (2000) Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. , *Clin. Cancer Res.* 6, 2726–2734.
39. Riedel, F., Götte, K., Schwalb, J., Bergler, W., et Hörmann, K. (2000) Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. , *Int. J. Oncol.* 17, 1099–1105.
40. Kodate, M., Kasai, T., Hashimoto, H., Yasumoto, K., Iwata, Y., et Manabe, H. (1997) Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. , *Pathol. Int.* 47, 461–469.
41. Ylisirniö, S., Höyhty, M., et Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000) Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. , *Anticancer Res.* 20, 1311–1316.
42. Michael, M., Babic, B., Khokha, R., Tsao, M., Ho, J., Pintilie, M., Leco, K., Chamberlain, D., et Shepherd, F. A. (1999) Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. , *J. Clin. Oncol.* 17, 1802–1808.
43. Passlick, B., Siel, W., Seen-Hibler, R., Wöckel, W., Thetter, O., Mutschler, W., et Pantel, K. (2000) Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. , *Clin. Cancer Res.* 6, 3944–3948.

44. Herbst, R. S., Yano, S., Kuniyasu, H., Khuri, F. R., Bucana, C. D., Guo, F., Liu, D., Kemp, B., Lee, J. J., Hong, W. K., et Fidler, I. J. (2000) Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. , *Clin. Cancer Res.* 6, 790–797.
45. Cox, G., Jones, J. L., et O’Byrne, K. J. (2000) Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. , *Clin. Cancer Res.* 6, 2349–2355.
46. Murray, G. I., Duncan, M. E., O’Neil, P., McKay, J. A., Melvin, W. T., et Fothergill, J. E. (1998) Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. , *J. Pathol.* 185, 256–261.
47. Yamashita, K., Mori, M., Kataoka, A., Inoue, H., et Sugimachi, K. (2001) The clinical significance of MMP-1 expression in oesophageal carcinoma. , *Br. J. Cancer* 84, 276–282.
48. Yamashita, K., Mori, M., Shiraiishi, T., Shibuta, K., et Sugimachi, K. (2000) Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. , *Clin. Cancer Res.* 6, 1169–1174.
49. Etoh, T., Inoue, H., Yoshikawa, Y., Barnard, G. F., Kitano, S., et Mori, M. (2000) Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. , *Gut* 47, 50–56.
50. Westerlund, A., Apaja-Sarkkinen, M., Höyhty, M., Puistola, U., et Turpeenniemi-Hujanen, T. (1999) Gelatinase A-immunoreactive protein in ovarian lesions- prognostic value in epithelial ovarian cancer. , *Gynecol. Oncol.* 75, 91–98.
51. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G., Nesland, J. M., Berner, A., Bryne, M., et Reich, R. (1999) High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. , *Clin. Exp. Metastasis* 17, 799–808.
52. Ito, T., Ito, M., Shiozawa, J., Naito, S., Kanematsu, T., et Sekine, I. (1999) Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor. , *Mod. Pathol.* 12, 669–674.
53. Yamamoto, H., Itoh, F., Iku, S., Adachi, Y., Fukushima, H., Sasaki, S., Mukaiya, M., Hirata, K., et Imai, K. (2001) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. , *J. Clin. Oncol.* 19, 1118–1127.
54. Brown, S., Bernardo, M. M., Li, Z. H., Kotra, L. P., Tanaka, Y., Fridman, R., et Mobashery, S. (2000) Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. , *Journal of the American Chemical Society* 122, 6799–6800.
55. Nguyen, M., Arkell, J., et Jackson, C. J. (2001) Human endothelial gelatinases and angiogenesis. , *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 960-970.
56. Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., et Engler, J. A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. , *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197–250.
57. Sekton, B. (2010) Matrix metalloproteinases - an overview. , *Research and Reports in Biology* 1.
58. Kratz, F., Dreves, J., Bing, G., Stockmar, C., Scheuermann, K., Lazar, P., et Unger, C. (2001) Development and in vitro efficacy of novel MMP2 and MMP9 specific doxorubicin albumin conjugates. , *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2001–2006.
59. Timár, F., Botyánszki, J., Süli-Vargha, H., Babó, I., Oláh, J., Pogány, G., et Jeney, A. (1998) The antiproliferative action of a melphalan hexapeptide with collagenase-cleavable site. , *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 41, 292–298.
60. Sun, L.-C., Luo, J., Mackey, L. V., Fuselier, J. A., et Coy, D. H. (2007) A conjugate of camptothecin and a somatostatin analog against prostate cancer cell invasion via a possible signaling pathway involving PI3K/Akt, alphaVbeta3/alphaVbeta5 and MMP-2/-9. , *Cancer Lett.* 246, 157–166.
61. von Tappeiner, H. (1900) Ueber die Wirkung fluorescierenden Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. , *Munch. Med. Wochenschr.* 47, 5.
62. Raab, O. (1900) Ueber die Wirkung fluorescierenden Stoffe auf Infusorien. , *Zeitschrift für Biologie* 39, 524-526.
63. von Tappeiner, H., et Jesionek, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluorescierenden Stoffen. , *Munch. Med. Wochenschr.* 47, 2042-2044.
64. Jesionek, A., et von Tappeiner, H. (1905) Zur behandlung der Hautcarcinome mit fluorescierenden Stoffen. , *Arch. Klin. Med.* 82, 223.

65. Scherer, H. (1841) Chemisch-physiologische Untersuchungen. , *Ann. Chem. Pharm.* 40, 1.
66. Hausmann, W. (1911) Die sensibilisierende Wirkung des hematoporphyrins. , *Biochem. Z.* 30, 279.
67. Meyer-Betz, F. (1913) Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs. , *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112, 476-503.
68. Policard, A. (1924) Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examines a la lumiere de Wood. , *CR Soc. Biol.* 91, 1423-1424.
69. Auler, H., et Banzer, G. (1942) Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine beigeschwulstkranken Menschen und Tieren. , *Z. Krebsforsch* 53, 65-68.
70. Figge, F. H., et Weiland, G. S. (1948) The Affinity of Neoplastic, Embryonic and Traumatized Tissue for Porphyrins and Metalloporphyrins. , *Anat. Rec.* 100, 659.
71. Schwartz, S., Absolon, K., et Vemund, H. (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. , *Bull. Minnesota Univ. School Med.* 27, 7-13.
72. Lipson, R. L., et Baldes, E. J. (1960) The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. , *Arch Dermatol* 82, 508-516.
73. Lipson, R. L., Baldes, E. J., et Olsen, A. M. (1961) Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. , *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 42, 623-629.
74. Dougherty, T. J. (1948) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours. , *Cancer Res.* 36, 2668-2635.
75. Dougherty, T. J. (1987) Photosensitizers: Therapy and Detection of Malignant Tumors. , *Photochemistry and Photobiology* 45, 879-889.
76. Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., et Peng, Q. (1998) Photodynamic therapy. , *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889-905.
77. Braun, A. M., Maurette, M.-T., et Oliveros, E. (1986) Technologie photochimique. Presses Polytechniques Romandes.
78. Bonnett, R. (2000) Chemical aspects of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publishers.
79. Grosjean, P., Wagnieres, G., Fontollet, C., van den Bergh, H., et Monnier, P. (1998) Clinical photodynamic therapy for superficial cancer in the oesophagus and the bronchi: 514 nm compared with 630 nm light irradiation after sensitization with Photofrin II. , *Br J Cancer* 77, 1989-1995.
80. Piacquadio, D. J., Chen, D. M., Farber, H. F., Fowler, J. F., Glazer, S. D., Goodman, J. J., Hruza, L. L., Jeffes, E. W. B., Ling, M. R., Phillips, T. J., Rallis, T. M., Scher, R. K., Taylor, C. R., et Weinstein, G. D. (2004) Photodynamic Therapy With Aminolevulinic Acid Topical Solution and Visible Blue Light in the Treatment of Multiple Actinic Keratoses of the Face and Scalp: Investigator-Blinded, Phase 3, Multicenter Trials. , *Arch Dermatol* 140, 41-46.
81. Bissonette, R., Bergeron, A., et Liu, Y. (2004) Large surface photodynamic therapy with aminolevulinic acid: treatment of actinic keratoses and beyond. , *J Drugs Dermatol* 3, S26-31.
82. Smith, S., Piacquadio, D., Morhenn, V., Atkin, D., et Fitzpatrick, R. (2003) Short incubation PDT versus 5-FU in treating actinic keratoses. , *J Drugs Dermatol* 2, 629-635.
83. Barberi-Heyob, M., Frochot, C., Bezdetsnaya-Bolotina, L., Brault, D., Dumas, D., Guillemain, F., Krausz, P., Maillard, P., Maunit, B., Merlin, J.-L., Mordon, S., Muller, J.-F., Patrice, T., Simmoneaux, G., et Tanielian, C. (2007) La photochimie pour mieux vivre. , *L'Actualité Chimique* 308-309, 26-34.
84. Schmitt, F., et Juillerat-Jeanneret, L. (2012) Drug Targeting Strategies for Photodynamic Therapy. , *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 5, 500-525.
85. Mew, D., Wat, C. K., Towers, G. H., et Levy, J. G. (1983) Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. , *J. Immunol.* 130, 1473-1477.
86. Donald, P. J., Cardiff, R. D., He, D. E., et Kendall, K. (1991) Monoclonal antibody-porphyrin conjugate for head and neck cancer: the possible magic bullet. , *Otolaryngol Head Neck Surg* 105, 781-787.
87. Berki, T., et Németh, P. (1992) Photo-immunotargeting with haematoporphyrin conjugates activated by a low-power He-Ne laser. , *Cancer Immunol. Immunother.* 35, 69-74.

88. Soukos, N. S., Hamblin, M. R., Keel, S., Fabian, R. L., Deutsch, T. F., et Hasan, T. (2001) Epidermal Growth Factor Receptor-targeted Immunophotodiagnosis and Photoimmunotherapy of Oral Precancer in Vivo. , *Cancer Research* 61, 4490 -4496.
89. Savellano, M. D., et Hasan, T. (2003) Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates. , *Photochem. Photobiol.* 77, 431-439.
90. Hamblin, M. R., et Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. , *Journal of photochemistry and photobiology B Biology* 26, 45-56.
91. Cavanaugh, P. G. (2002) Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability. , *Breast Cancer Res. Treat.* 72, 117-130.
92. Derycke, A. S. L., et De Witte, P. A. M. (2002) Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. , *Int. J. Oncol.* 20, 181-187.
93. Hamblin, M. R., et Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. , *Journal of photochemistry and photobiology B Biology* 26, 147-157.
94. Schmidt-Erfurth, U., Diddens, H., Birngruber, R., et Hasan, T. (1997) Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. , *Br J Cancer* 75, 54-61.
95. Tarragó-Trani, M. T., Jiang, S., Harich, K. C., et Storrie, B. (2006) Shiga-like toxin subunit B (SLTB)-enhanced delivery of chlorin e6 (Ce6) improves cell killing. , *Photochem. Photobiol.* 82, 527-537.
96. Gijssens, A., et De Witte, P. Photocytotoxic action of EGF-PVA-Sn(IV)chlorin e6 and EGF-dextran-Sn(IV)chlorin e6 internalizable conjugates on A431 cells. , *International journal of oncology* 13, 1171-1177.
97. Sobolev, A. S., Akhlynina, T. V., Yachmenev, S. V., Rosenkranz, A. A., et Severin, E. S. (1992) Internalizable insulin-BSA-chlorin E6 conjugate is a more effective photosensitizer than chlorin E6 alone. , *Biochem. Int.* 26, 445-450.
98. Akhlynina, T. V., Rosenkranz, A. A., Jans, D. A., Gulak, P. V., Serebryakova, N. V., et Sobolev, A. S. (1993) The use of internalizable derivatives of chlorin E6 for increasing its photosensitizing activity. , *Photochem. Photobiol.* 58, 45-48.
99. Davis, N., Liu, D., Jain, A. K., Jiang, S. Y., Jiang, F., Richter, A., et Levy, J. G. (1993) Modified polyvinyl alcohol-benzoporphyrin derivative conjugates as phototoxic agents. , *Photochem. Photobiol.* 57, 641-647.
100. Peterson, C. M., Shiah, J.-G., Sun, Y., Kopecková, P., Minko, T., Straight, R. C., et Kopecek, J. (2003) HPMA copolymer delivery of chemotherapy and photodynamic therapy in ovarian cancer. , *Adv. Exp. Med. Biol.* 519, 101-123.
101. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., Guillemin, F., Müller, J.-F., et Barberi-Heyob, M. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. , *Bioorg. Med. Chem.* 13, 2799-2808.
102. Stefflova, K., Li, H., Chen, J., et Zheng, G. (2007) Peptide-based pharmacomodulation of a cancer-targeted optical imaging and photodynamic therapy agent. , *Bioconjug Chem* 18, 379-388.
103. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., Didelon, J., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2008) Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. , *J. Med. Chem.* 51, 3867-3877.
104. James, D. A., Swamy, N., Paz, N., Hanson, R. N., et Ray, R. Synthesis and estrogen receptor binding affinity of A porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. , *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 9, 2379-2384.
105. Swamy, N., Purohit, A., Fernandez-Gacio, A., Jones, G. B., et Ray, R. (2006) Nuclear estrogen receptor targeted photodynamic therapy: selective uptake and killing of MCF-7 breast cancer cells by a C17alpha-alkynylestradiol-porphyrin conjugate. , *J. Cell. Biochem.* 99, 966-977.

106. Di Stasio, B., Frochot, C., Dumas, D., Even, P., Zwier, J., Müller, A., Didelon, J., Guillemin, F., Viriot, M.-L., et Barberi-Heyob, M. (2005) The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. , *Eur J Med Chem* 40, 1111-1122.
107. Frochot, C., Di Stasio, B., Barberi-Heyob, M., Carré, M. C., Zwier, J. M., Guillemin, F., et Viriot, M. L. (2003) New glycosylated porphyrins for PDT applications. , *Oftalmologia* 56, 62-66.
108. Zheng, G., Graham, A., Shibata, M., Missert, J. R., Oseroff, A. R., Dougherty, T. J., et Pandey, R. K. (2001) Synthesis of beta-galactose-conjugated chlorins derived by enyne metathesis as galectin-specific photosensitizers for photodynamic therapy. , *J. Org. Chem.* 66, 8709-8716.
109. Tozer, G. M., Ameer-Beg, S. M., Baker, J., Barber, P. R., Hill, S. A., Hodgkiss, R. J., Locke, R., Prise, V. E., Wilson, I., et Vojnovic, B. (2005) Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. , *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 135-152.
110. Siemann, D. W., Chaplin, D. J., et Horsman, M. R. (2004) Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. , *Cancer* 100, 2491-2499.
111. Fukumura, D., et Jain, R. K. (2007) Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. , *J. Cell. Biochem.* 101, 937-949.
112. Konerding, M. A., Fait, E., et Gaumann, A. (2001) 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. , *Br J Cancer* 84, 1354-1362.
113. McDonald, D. M., et Choyke, P. L. (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. , *Nat Med* 9, 713-725.
114. Denekamp, J. (1999) The tumour microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective. , *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 733-736.
115. Bloemendal, H. J., Logtenberg, T., et Voest, E. E. (1999) New strategies in anti-vascular cancer therapy. , *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 802-809.
116. Ellis, L. M., Liu, W., Ahmad, S. A., Fan, F., Jung, Y. D., Shaheen, R. M., et Reinmuth, N. (2001) Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. , *Seminars in Oncology* 28, 94-104.
117. Siemann, D. W., Bibby, M. C., Dark, G. G., Dicker, A. P., Eskens, F. A. L. M., Horsman, M. R., Marmé, D., et LoRusso, P. M. (2005) Differentiation and Definition of Vascular-Targeted Therapies. , *Clinical Cancer Research* 11, 416 -420.
118. Thorpe, P. E. (2004) Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics. , *Clinical Cancer Research* 10, 415 -427.
119. Star, W. M., Marijnissen, H. P., van den Berg-Blok, A. E., Versteeg, J. A., Franken, K. A., et Reinhold, H. S. (1986) Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. , *Cancer Res.* 46, 2532-2540.
120. Fingar, V. H. (1996) Vascular effects of photodynamic therapy. , *J Clin Laser Med Surg* 14, 323-328.
121. Kurohane, K., Tominaga, A., Sato, K., North, J. R., Namba, Y., et Oku, N. (2001) Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. , *Cancer Letters* 167, 49-56.
122. Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., et Alitalo, K. (2000) Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. , *Cancer Research* 60, 203 -212.
123. Tirand, L., Thomas, N., Dodeller, M., Dumas, D., Frochot, C., Maunit, B., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2007) Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An *in Vivo* and *in Vitro* Study. , *Drug Metabolism and Disposition* 35, 806-813.
124. Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., Trinquet, E., Pinel, S., Viriot, M.-L., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2006) A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. , *J Control Release* 111, 153-164.
125. Thomas, N., Bechet, D., Becuwe, P., Tirand, L., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2009) Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*. , *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96, 101-108.
126. Thomas, N., Tirand, L., Chatelut, E., Plénat, F., Frochot, C., Dodeller, M., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2008) Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type

- photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. , *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 433-441.
127. Bechet, D., Tirand, L., Faivre, B., Plénat, F., Bonnet, C., Bastogne, T., Frochot, C., Guillemin, F., et Barberi-Heyob, M. (2010) Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. , *Pharm. Res.* 27, 468-479.
 128. Frochot, C., Di Stasio, B., Vanderesse, R., Belgy, M.-J., Dodeller, M., Guillemin, F., Viriot, M.-L., et Barberi-Heyob, M. (2007) Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. , *Bioorg. Chem.* 35, 205-220.
 129. Boisbrun, M., Vanderesse, R., Engrand, P., Olié, A., Hupont, S., Regnouf-de-Vains, J.-B., et Frochot, C. (2008) Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins. , *Tetrahedron* 64, 3494–3504.
 130. Aghahosseini, F., Arbabi-Kalati, F., Fashtami, L. A., Djavid, G. E., Fateh, M., et Beitollahi, J. M. (2006) Methylene blue-mediated photodynamic therapy: a possible alternative treatment for oral lichen planus. , *Lasers Surg Med* 38, 33–38.
 131. Head, C. S., Luu, Q., Sercarz, J., et Saxton, R. (2006) Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma. , *World Journal of Surgical Oncology* 4, 87.
 132. Chang, C.-C., Yang, Y.-T., Yang, J.-C., Wu, H.-D., et Tsai, T. (2008) Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. , *Dyes and Pigments* 79, 170–175.
 133. Metcalf, D., Robinson, C., Devine, D., et Wood, S. (2006) Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. , *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 190–192.
 134. Bhatti, M., MacRobert, A., Meghji, S., Henderson, B., et Wilson, M. (1998) A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. , *Photochem. Photobiol.* 68, 370–376.
 135. Fischer, H., Orth, H., et Stern, A. (1934) Die Chemie des Pyrrols. Lpz.
 136. Moss, G. P. (1988) Nomenclature of tetrapyrroles. , *European Journal of Biochemistry* 178, 277–328.
 137. Lavalee, D. K. (1988) Porphyrin metallation reactions in biochemistry. , *Mol. Struct. Energ.* 9, 279–313.
 138. Seybold, P. G., et Gouterman, M. (1969) Porphyrins: XIII: Fluorescence spectra and quantum yields. , *Journal of Molecular Spectroscopy* 31, 1–13.
 138. Mathai, S., Smith, T. A., et Ghiggino, K. P. (2007) Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. , *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 995–1002.
 140. Rothmund, P. (1939) Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System. , *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2912–2915.
 141. Rothmund, P., et Menotti, A. R. (1941) Porphyrin Studies. IV. The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. , *J. Am. Chem. Soc.* 63, 267–270.
 142. Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J., et Korsakoff, L. (1967) A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. , *J. Org. Chem.* 32, 476.
 143. Little, R. G., Anton, J. A., Loach, P. A., et Ibers, J. A. (1975) The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. , *Journal of Heterocyclic Chemistry* 12, 343–349.
 144. Lindsey, J. (1999) Synthesis of meso-substituted porphyrins. *The Porphyrins Handbook*.
 145. Leznoff, C. C., et Svirskaya, P. I. (1978) The Synthesis of Unsymmetrical Tetraarylporphyrins on Solid Phases. , *Angewandte Chemie International Edition in English* 17, 947–947.
 146. Lindsey, J. S., Hsu, H. C., et Schreiman, I. C. (1986) Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. , *Tetrahedron Letters* 27, 4969–4970.
 147. Gonsalves, A. M. D. R., et Pereira, M. M. (1985) A new look into the rothemund meso-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis. , *Journal of Heterocyclic Chemistry* 22, 931–933.
 148. Geier, G. R., Riggs, J. A., et Lindsey, J. S. (2001) Investigation of acid cocatalysis in syntheses of tetraphenylporphyrin. , *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 5, 681–690.
 149. Woodward, R. B. (1960) Total synthesis of chlorophylls. , *Angew. Chem.* 72, 651–662.
 150. Woodward, R. B. (1961) The total synthesis of chlorophyll. , *Pure and Applied Chemistry* 2, 383–404.

151. Arsenault, G. P., Bullock, E., et MacDonald, S. F. (1960) Pyrromethanes and porphyrins therefrom. , *J. Am. Chem. Soc.* *82*, 4384–4389.
152. Lee, C., Li, F., Iwamoto, K., Dadok, J., Bothner-by, a. A., et Lindsey, J. S. (1995) Synthetic Approaches to Regioisomerically Pure Porphyrins Bearing Four Different meso-Substituents. , *Tetrahedron* *51*, 29.
153. Boudif, A., et Momenteau, M. (1994) Synthesis of a porphyrin-2,3-diacrylic acid using a new “3 + 1” type procedure. , *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2069–2070.
154. Varamo, M., Loock, B., Maillard, P., et Grierson, D. S. (2007) Development of strategies for the regiocontrolled synthesis of meso-5,10,20-triaryl-2,3-chlorins. , *Org. Lett.* *9*, 4689–4692.
155. Shi, D.-F., et Wheelhouse, R. T. (2002) A novel, high-yielding synthesis of meso-substituted porphyrins via the direct arylation of porphine. , *Tetrahedron Letters* *43*, 9341–9342.
156. Milgrom, L. R. (1997) *The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds.* Oxford University Press.
157. Lange, N. (2008) *Pharmaceutical and Biological Considerations in 5-Aminolevulinic Acid in PDT. Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical.* Artech House.
158. Kadish, K. M., Smith, K. M., et Guillard, R. (2010) *Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine (volume 2).* World Scientific.
159. Huang, L., Huang, Y.-Y., Mroz, P., Tegos, G. P., Zhiyentayev, T., Sharma, S. K., Lu, Z., Balasubramanian, T., Krayner, M., Ruzié, C., Yang, E., Kee, H. L., Kirmaier, C., Diers, J. R., Bocian, D. F., Holten, D., Lindsey, J. S., et Hamblin, M. R. (2010) Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins as Selective Antimicrobial Photosensitizers. , *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 3834–3841.
160. Wilhelm, F. (1988) *The Chemistry of 4-Azaazulenes. Advances in Heterocyclic Chemistry*, pp 35–72. Academic Press.
161. Whitlock, H. W., Hanauer, R., Oester, M. Y., et Bower, B. K. (1969) Diimide reduction of porphyrins. , *J. Am. Chem. Soc.* *91*, 7485–7489.
162. Burns, D. H., Caldwell, T. M., et Burden, M. W. (1993) A rational step-by-step preparation of a chlorin from linear tetrapyrroles. , *Tetrahedron Letters* *34*, 2883–2886.
163. Chang, C. K., Sotitiou, C., et Wu, W. (1986) Differentiation of bacteriochlorin and isobacteriochlorin formation by metallation. High yield synthesis of porphyrindiones via OsO₄ oxidation. , *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1213–1215.
164. Ma, L., et Dolphin, D. (1997) Chemical modification of chlorophyll a: synthesis of new regiochemically pure benzoporphyrin and dibenzoporphyrin derivatives. , *Canadian Journal of Chemistry* *75*, 262–275.
165. Krasnovsky, A. A., Jr, Neverov, K. V., Egorov, S., Yu, Roeder, B., et Levald, T. (1990) Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence. , *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* *5*, 245–254.
166. Boyle, R. W., et Dolphin, D. (1996) Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. , *Photochem. Photobiol.* *64*, 469–485.
167. Kozyrev A.N., Gang Z., Chunfeng Z., Dougherty T.J., Smith K.M., et Pandey R.K. (1996) Syntheses of Stable Bacteriochlorophyll-a Derivatives As Potential Photosensitizers For Photodynamic Therapy. , *Tetrahedron Letters* *37*, 6431–6434.
168. Morgan, A. R., et Tertel, N. C. Observations on the synthesis and spectroscopic characteristics of purpurins. , *Journal of organic chemistry* *51*, 1347–1350.
169. Macpherson, A. N., Kessel, D., Morgan, A. R., Munro, I., et Truscott, T. G. (1990) A photophysical study of some purpurins. , *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* *86*, 3081–3085.
170. Arnold, D. P., Gaete-Holmes, R., Johnson, A. W., Smith, A. R. P., et Williams, G. A. (1978) Wittig condensation products from nickel meso-formyl-octaethyl-porphyrin and -aetioporphyrin I and some cyclisation reactions. , *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1660–1670.
171. Morgan, A. R., et Gupta, S. (1994) Synthesis of benzochlorin iminium salts with improved photosensitizing properties. , *Tetrahedron Letters* *35*, 5347–5350.
172. Vogel, E., Jux, N., Rodriguez-Val, E., Lex, J., et Schmickler, H. (1990) Porphyrin Homologues: [22]Porphyrin(2.2.2.2), a “Stretched Porphycene.” , *Angewandte Chemie International Edition in English* *29*, 1387–1390.

173. Nonell, S., Bou, N., Borrell, J., Teixidó, J., Villanueva, A., Juarranz, A., et Cañete, M. (1995) Synthesis of 2,7,12,17-tetraphenylporphycene (TPPo). First aryl-substituted porphycene for the photodynamic therapy of tumors. , *Tetrahedron Letters* 36, 3405–3408.
174. Rio, Y., Rodríguez-Morgade, M. S., et Torres, T. (2008) Modulating the electronic properties of porphyrinoids: a voyage from the violet to the infrared regions of the electromagnetic spectrum. , *Org. Biomol. Chem.* 6, 1877–1894.
175. Bellnier, D. A., Ho, Y., Pandey, R. K., Missert, J. R., et Dougherty, T. J. (1989) Distribution and elimination of Photofrin II in mice. , *Photochemistry and Photobiology* 50, 221–228.
176. Pandey, R. K., Siegel, M. M., Tsao, R., McReynolds, J. H., et Dougherty, T. J. (1990) Fast atom bombardment mass spectral analyses of Photofrin II® and its synthetic analogs. , *Biological Mass Spectrometry* 19, 405–414.
177. Mironov, A. F., Nizhnik, A. N., et Nockel, A. Y. (1990) On the nature of chemical bonds in haematoporphyrin derivative. , *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 6, 337–341.
178. Byrne, C. J., et David Ward, A. (1989) The identification of a carbon linked oligomer in hematoporphyrin derivative and photofrin II. , *Tetrahedron Letters* 30, 6211–6214.
179. Mironov, A. F., Nizhnik, A. N., et Nockel, A. Y. (1990) Hematoporphyrin derivatives: An oligomeric composition study. , *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 4, 297–306.
180. Dougherty, T. J., Cooper, M. T., et Mang, T. S. (1990) Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin®. , *Lasers in Surgery and Medicine* 10, 485–488.
181. Petri, A., Kyriazi, M., Alexandratou, E., Rallis, M., Grafe, S., et Yova, D. (2009) Evaluation of the PDT effect of Foscan and Fospeg in the LNCaP human prostate cancer cell line, p 73731I–73731I–8. SPIE.
182. Senge, M. O., et Brandt, J. C. (2011) Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)—A Second-generation Photosensitizer., *Photochemistry and Photobiology* 87, 1240–1296.
183. Lassalle, H.-P., Dumas, D., Gräfe, S., D’Hallewin, M.-A., Guillemin, F., et Bezdetsnaya, L. (2009) Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. , *Journal of Controlled Release* 134, 118–124.
184. Jichlinski, P., Forrer, M., Mizeret, J., Glanzmann, T., Braichotte, D., Wagnières, G., Zimmer, G., Guillou, L., Schmidlin, F., Graber, P., van den Bergh, H., et Leisinger, H. J. (1997) Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. , *Lasers Surg Med* 20, 402–408.
185. Baumgartner, R., Huber, R. M., Schulz, H., Stepp, H., Rick, K., Gamarra, F., Leberig, A., et Roth, C. (1996) Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. , *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 36, 169–174.
186. Friesen, S. A., Hjortland, G. O., Madsen, S. J., Hirschberg, H., Engebraten, O., Nesland, J. M., et Peng, Q. (2002) 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). , *Int. J. Oncol.* 21, 577–582.
187. Jeffes, E. W., McCullough, J. L., Weinstein, G. D., Kaplan, R., Glazer, S. D., et Taylor, J. R. (2001) Photodynamic therapy of actinic keratoses with topical aminolevulinic acid hydrochloride and fluorescent blue light. , *J. Am. Acad. Dermatol.* 45, 96–104.
188. Sekkat, N., Bergh, H. van den, Nyokong, T., et Lange, N. (2011) Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. , *Molecules* 17, 98–144.
189. Murphy, L. C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Coutts, A., et Watson, P. (1998) The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. , *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 175–180.
190. Swamy, N., James, D. A., Mohr, S. C., Hanson, R. N., et Ray, R. (2002) An estradiol-Porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-Positive breast cancer cells. , *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10, 3237–3243.
191. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J.-C., et Souchard, J.-P. (2006) Synthesis of estradiol-pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells. , *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 996–999.

192. Tran, T., Shatnawi, A., Zheng, X., Kelley, K. M. M., et Ratnam, M. (2005) Enhancement of Folate Receptor α Expression in Tumor Cells Through the Glucocorticoid Receptor: A Promising Means to Improved Tumor Detection and Targeting. , *Cancer Res* 65, 4431–4441.
193. Gravier, J. (2004, 2008) Photosensibilisateurs vectorisés par l'acide folique pour une thérapie photodynamique ciblée. Nancy, Nancy.
194. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., Guillemain, F., Müller, J.-F., et Barberi-Heyob, M. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. , *Bioorg. Med. Chem.* 13, 2799–2808.
195. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., Didelon, J., Guillemain, F., et Barberi-Heyob, M. (2008) Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. , *J. Med. Chem.* 51, 3867–3877.
196. Morosini, V. (2006, 2010) Pour une amélioration de la thérapie photodynamique appliquée à la cancérologie : Potentialités des dendrimères poly(amidoamine) et des Quantum Dots CdTe adressés par l'acide folique. Nancy, Nancy.
197. Medina, R. A., et Owen, G. I. (2002) Glucose transporters: expression, regulation and cancer. , *Biol. Res.* 35, 9–26.
198. Di Stasio, B. (2003, 2007) Etudes de nouveaux photosensibilisants pour des applications en thérapie photodynamique. Nancy, Nancy.
199. Frochot, C., Di Stasio, B., Barberi-Heyob, M., Carre, M. C., Zwier, J. M., Guillemain, F., et Viriot, M. L. (2003) New glycosylated porphyrins for PDT applications. , *Ophthalmologia* 56, 62–66.
200. Di Stasio, B., Frochot, C., Dumas, D., Even, P., Zwier, J., Müller, A., Didelon, J., Guillemain, F., Viriot, M.-L., et Barberi-Heyob, M. (2005) The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. , *Eur J Med Chem* 40, 1111–1122.
201. Maillard, P., Gaspard, S., Guerquin-Kern, J. L., et Momenteau, M. (1989) Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. , *J. Am. Chem. Soc.* 111, 9125–9127.
202. Laville, I., Figueiredo, T., Loock, B., Pigaglio, S., Maillard, P., Grierson, D. S., Carrez, D., Croisy, A., et Blais, J. (2003) Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glycoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins. , *Bioorg. Med. Chem.* 11, 1643–1652.
203. Laville, I., Pigaglio, S., Blais, J.-C., Loock, B., Maillard, P., Grierson, D. S., et Blais, J. (2004) A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. , *Bioorg. Med. Chem.* 12, 3673–3682.
204. Maillard, P., Loock, B., Grierson, D. S., Laville, I., Blais, J., Doz, F., Desjardins, L., Carrez, D., Guerquin-Kern, J.-L., et Croisy, A. (2007) In vitro phototoxicity of glycoconjugated porphyrins and chlorins in colorectal adenocarcinoma (HT29) and retinoblastoma (Y79) cell lines. , *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 4, 261–268.
205. Momenteau, M., Maillard, P., De Bélinay, M.-A., Carrez, D., et Croisy, A. (1999) Tetrapyrrolic Glycosylated Macrocycles for an Application in PDT. , *Journal of Biomedical Optics* 4, 298–318.
206. Sol, V., Blais, J. C., Carré, V., Granet, R., Guilloton, M., Spiro, M., et Krausz, P. (1999) Synthesis, Spectroscopy, and Photocytotoxicity of Glycosylated Amino Acid Porphyrin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Phototherapy. , *J. Org. Chem.* 64, 4431–4444.
207. Kaldapa, C., Blais, J. ., Carré, V., Granet, R., Sol, V., Guilloton, M., Spiro, M., et Krausz, P. (2000) Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrins dimers. , *Tetrahedron Letters* 41, 331–335.
208. Sol, V., Charmot, A., Krausz, P., Trombotto, S., et Queneau, Y. (2006) Synthesis of New Glucosylated Porphyrins Bearing an α -Linkage. , *Journal of Carbohydrate Chemistry* 25, 345–360.
209. Sol, V., Chaleix, V., Champavier, Y., Granet, R., Huang, Y.-M., et Krausz, P. (2006) Glycosyl bis-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in PDT. , *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7745–7760.
210. Vedachalam, S., Choi, B.-H., Pasunooti, K. K., Ching, K. M., Lee, K., Yoon, H. S., et Liu, X.-W. (2011) Glycosylated porphyrin derivatives and their photodynamic activity in cancer cells. , *Med. Chem. Commun.* 2, 371–377.

211. Casero, R. A., Jr, et Woster, P. M. (2001) Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. , *J. Med. Chem.* *44*, 1–26.
212. Sol, V., Lamarche, F., Enache, M., Garcia, G., Granet, R., Guilloton, M., Blais, J. C., et Krausz, P. (2006) Polyamine conjugates of meso-tritolyldipyrromethane and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. , *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 1364–1377.

Chapitre II : La régulation de l'oxygène singulet et l'utilisation de « *Molecular Beacons* »

Chapitre II : La régulation de l'oxygène singulet et l'utilisation de *Molecular Beacons*

I. L'oxygène singulet

L'oxygène moléculaire est un élément majeur sur Terre, représentant environ 30% de sa masse totale et 21% de son atmosphère. Ses propriétés photophysiques particulières font du dioxygène un acteur clé dans les mécanismes biologiques, le fonctionnement de la PDT et la beauté des ciels nocturnes des zones australes.

Comme nous l'avons vu précédemment, les processus de photosensibilisation impliqués en PDT font appel à l'action combinée d'un PS, de la lumière à une longueur d'onde appropriée, et de l'oxygène. Ce processus fait intervenir des espèces réactives de l'oxygène, aussi nommées EROs, et en particulier l'oxygène singulet. Ce dernier, en raison de sa très grande réactivité envers les substrats biologiques notamment, est considéré comme l'une des principales causes de l'effet PDT, si bien que les développements de nouveaux PS pour la PDT se mesurent en majorité par leur capacité à produire de l'oxygène singulet.

Néanmoins, si la production d'espèces réactives de l'oxygène est un point central en thérapie anticancéreuse, son contrôle n'en est pas moins important. Les recherches médicamenteuses incluent de plus en plus le ciblage et la sélectivité dans leurs stratégies, faisant apparaître les termes de « vecteur » ou de « prodrogue ». En effet, il est nécessaire de savoir amener le médicament jusqu'à sa cible, ou d'en déclencher les effets toxiques à l'endroit désiré. D'où le besoin, pour la PDT, de contrôler la production des EROs. Ceci est le rationnel de base qui mène vers la conception des *Molecular Beacons*, que nous allons présenter dans ce chapitre.

Dans cette partie, nous allons détailler les caractéristiques de l'oxygène singulet, de sa formation à son inhibition, ainsi que sa détection et sa photophysique.

I.1. Introduction historique : oxygène et thérapie

L'utilisation de l'oxygène singulet à des fins médicales existe depuis des millénaires, mais n'a réellement été démontré que depuis le XX^e siècle. En effet, le vitiligo est une maladie caractérisée par une forte dépigmentation de la peau, causée par la mort ou un dysfonctionnement des mélanocytes ; les premiers cas mentionnés remontent aux temps des anciens égyptiens, jusqu'à notre ère où de nombreuses personnes en sont encore atteintes. Cette maladie a été décrite dans le livre sacré indien *Antharva Veda*, vers 1400 avant J.C., dont les auteurs préconisaient de prendre des graines de *Psoralea corylifolia* et d'effectuer de nombreuses expositions à la lumière solaire pour en guérir (1). Au XI^e siècle de notre ère, un traitement similaire a été proposé par Ibn El Bitar, préconisant des expositions au soleil répétées ainsi que la prise de graines d'*Ammi Majus*, une plante qui pousse abondamment dans la vallée du Nil (1). Ce n'est qu'en 1911 que les psoralènes ont été identifiés comme principes actifs dans ces deux graines. En 1948, El Mofty fut le premier médecin à traiter des patients atteints du vitiligo avec des comprimés de 8-méthoxypsoralène (Meladinine®) (figure 2-1).

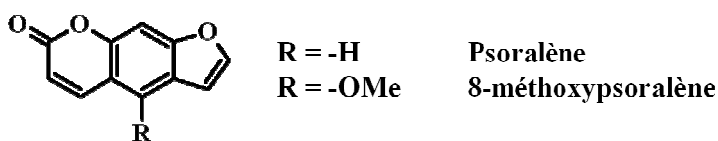


Figure 2-1 : En haut à gauche : Psoralea corylifolia. En haut à droite : Ammi Majus. En bas : structures chimiques de deux psoralènes.

La « photochimiothérapie » n'évoluera plus jusqu'en 1974 et l'utilisation de psoralènes en combinaison avec une irradiation UVA, ce traitement est dénommé PUVA et il est décrit comme traitement efficace contre le psoriasis et le vitiligo (2).

Le phénomène de photosensibilisation lui-même ne fut mis en lumière, à proprement parler, qu'à la fin du XIX^e siècle par Hermann von Tappeiner, comme énoncé précédemment dans le chapitre I (3, 4), à la base de la première expérience de PDT (5, 6).

Les géophysiciens furent en fait les premiers à déceler et caractériser l'oxygène singulet dans la nature. En observant le spectre émis par les aurores boréales, ils constatèrent que les radiations émettaient une raie dans le rouge, à 630 nm, correspondant à la désactivation de l'oxygène singulet ($^1\Delta_g$, $^1\Delta_g$), dit dimolaire, en oxygène triplet. En 1934, l'astrophysicien Herzberg, prix Nobel en 1971, découvrit une raie à 12 900 Å dans le spectre solaire infrarouge qu'il attribua à une forme excitée de l'oxygène : 1O_2 ($^1\Delta_g$) (7).

En 1927, les travaux du chimiste français Mallet permirent de remarquer une « *très faible luminescence rouge foncé* » lors de la réaction entre l'anion hypochlorite ClO^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (8). L'équation $H_2O_2 + ClO^- \rightarrow O_2 + H_2O + Cl^-$ fut proposée en raison du dégagement de dioxygène observé, mais pour être observable, cette réaction devait être faite en faisant barboter du dichlore Cl_2 dans le peroxyde d'hydrogène. L'équation s'écrit donc $H_2O_2 + Cl_2 \rightarrow O_2 + 2 HCl$. Plus tard, en 1963, Khan et Kasha reprirent l'expérience de Mallet et en étudièrent la luminescence (9, 10). Ils démontrèrent la similitude spectroscopique entre cette luminescence et celle observée dans la haute atmosphère et prouvèrent ainsi l'existence de la formation d'oxygène singulet par un système chimique. Leurs travaux dans le milieu des années 1960 montrèrent que 1O_2 ($^1\Delta_g$) peut être produit dans différentes réactions chimiques et qu'il apparaît en milieu aqueux de manière « *fugace* ». Ils reportèrent : « *La chimiluminescence qui survient au cours de réactions d'oxydation de molécules organiques est associée à l'excitation d'états métastables de l'oxygène moléculaire, en systèmes peroxydés* » (11).

Entre temps, de nombreuses études ont permis d'étudier et de caractériser l'oxygène singulet. Robert Mulliken, un des pères de la théorie des orbitales moléculaires, prix Nobel en 1966, montra qu'il existe deux formes excitées de l'oxygène moléculaire (12). En 1931, Hans Kautsky (figure 2-2) démontra que la fluorescence de la tryptaflavine diminue lorsqu'elle est irradiée en présence d'une quantité croissante d'oxygène (13). Dans le même système, il remarqua que le *Malachite Green* devient fluorescent lorsque la tryptaflavine est irradiée en présence d'oxygène. Il en conclut que l'oxygène permet un processus concurrent de celui de la fluorescence, qu'un transfert d'énergie doit intervenir entre le photosensibilisateur et

l'oxygène, et que ce dernier revêt un caractère oxydant pour permettre au *Malachite Green* d'exprimer sa fluorescence.

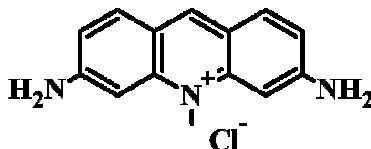


Figure 2-2 : A gauche : Hans Tautsky. A droite : formule de la trypaflavine.

Enfin, dans les années 1970, Christopher Foote étudia le rôle que tient l'oxygène singulet dans les milieux biologiques. Il mit notamment en avant le rôle protecteur du β -carotène dans les systèmes pouvant générer de l'oxygène singulet, agissant en tant que *quencher*, à la fois du photosensibilisateur (dans les milieux biologiques : la chlorophylle) et de l'oxygène singulet lui-même (14, 15). Ceci sera discuté plus en détail dans la partie I.4.

I.2. Photophysique

I.2.1. Structure électronique de l^1O_2

En 1840, Michael Faraday montra que l'oxygène moléculaire est attiré par un aimant. Cette constatation fut expliquée un siècle plus tard par Robert Mulliken, montrant que les orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène font apparaître deux électrons appariés, lui conférant des propriétés paramagnétiques (figure 2-3) (16). Notons que la molécule est de multiplicité de spin $M = 3$, soit un état fondamental *triplet*.

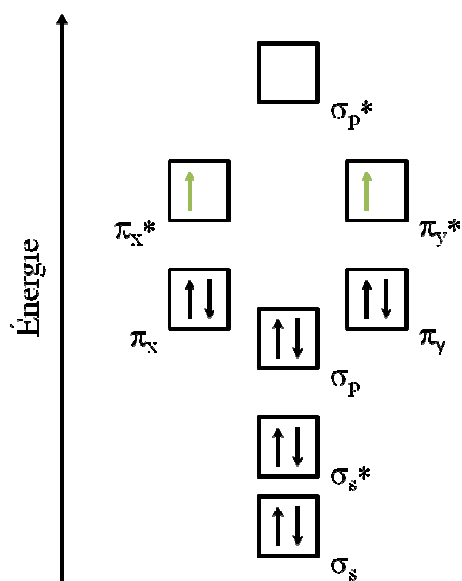
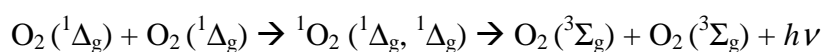


Figure 2-3 : Orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène.

Robert Mulliken prédit l'existence de deux formes excitées de l'oxygène moléculaire. Ces formes ont été observées par J. Ellis et H. Kesner en 1933 (17). Ces deux états singulets métastables, car normalement interdits par les règles de conservation de spin, sont notés $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g$, dont les énergies sont respectivement 22,4 kcal/mol et 37,5 kcal/mol au-dessus du niveau fondamental (figures 2-4 et 2-5). Il est à noter que l'oxygène singulet peut également exister sous forme de « dimère » ($^1\Delta_g, ^1\Delta_g$) (figure 2-6), même s'il ne s'agit pas d'un dimère à proprement parler. Michael Kasha reporta qu'il n'est pas besoin qu'un complexe se forme, mais que deux molécules soient assez proches pour qu'un transfert d'électron soit possible (18). La réaction peut s'écrire :



où l'énergie du photon émis est égale à la somme des deux énergies d' $O_2(^1\Delta_g)$.

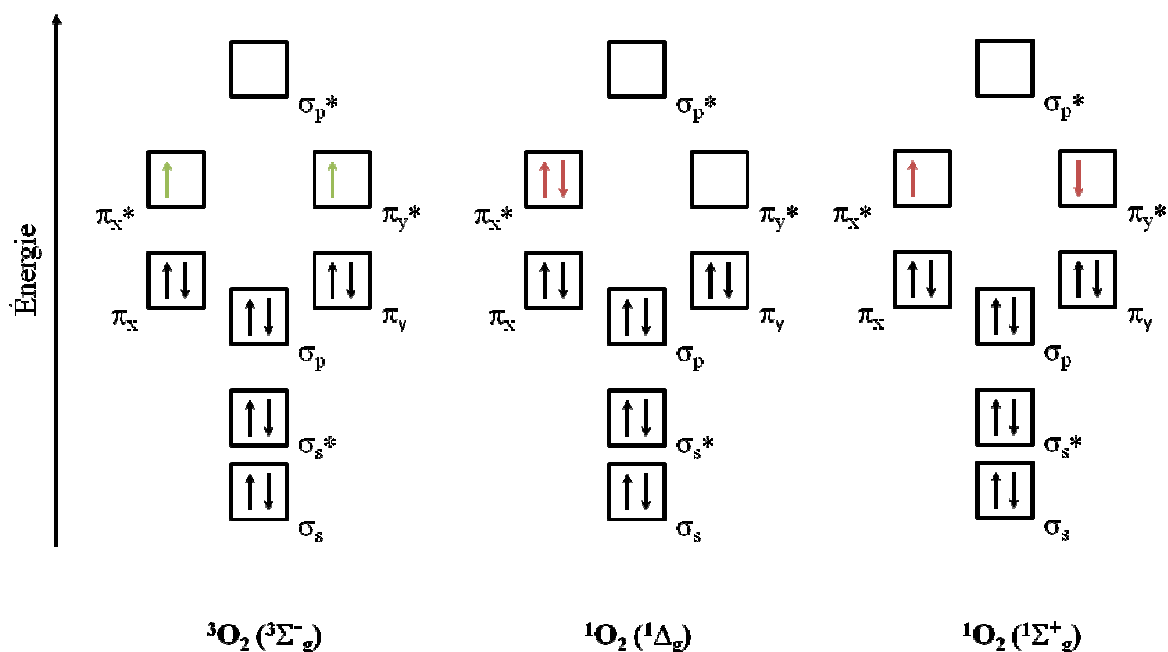


Figure 2-4 : Structures électroniques des oxygènes triplet et singlet.

Ainsi, nous voyons que « l’oxygène singlet » correspond en réalité à plusieurs états électroniques. Néanmoins, celui de géométrie Σ a un temps de vie très court (130 ns dans CCl_4 , alors que celui de ${}^1\Delta_g$ est de 87 ms (19)) et se désexcite quasi instantanément vers les états de plus basse énergie, de sorte qu’il n’intervient pas ou peu dans la réactivité de l’oxygène.

1.2.2. Spectroscopie

La désexcitation de l’oxygène singlet vers son état fondamental peut s’accompagner de production de lumière. Cette transition, qui consiste à faire passer une molécule d’un état singlet à un état triplet, émet un photon de phosphorescence. On parle alors de *luminescence*, de *chimiluminescence*, ou de *phosphorescence* de l’oxygène singlet.

Il est utile de rappeler dans un premier temps qu’une molécule excitée peut retourner à l’état fondamental de trois manières différentes : désexcitation sans radiation (*quenching* par le solvant, rotation interne...), transfert d’énergie à une tierce molécule (*quenching* physique) ou luminescence. La luminescence est un processus radiatif qui consiste à céder l’énergie excédentaire par émission d’un photon dont l’énergie correspond à la différence d’énergie entre l’état excité et l’état fondamental. Ainsi, si l’énergie d’excitation de l’oxygène singlet

$^1\Delta_g$ par rapport à l'état fondamental est d'environ 22,4 kcal/mol, soit 94,3 kJ·mol⁻¹, la relaxation correspondante se situe à 1269 nm, dans le proche infrarouge. Il en est de même avec les autres états excités : la transition $^1\Sigma_g \rightarrow ^3\Sigma_g$ se trouve à 762 nm, la transition ($^1\Delta_g, ^1\Delta_g$) $\rightarrow ^3\Sigma_g$ se trouve vers 635 nm. On observe aussi dans le spectre de l'oxygène singulet la faible émission de la transition $^1\Sigma_g \rightarrow ^1\Delta_g$ à 1910 nm (figure 2-5).

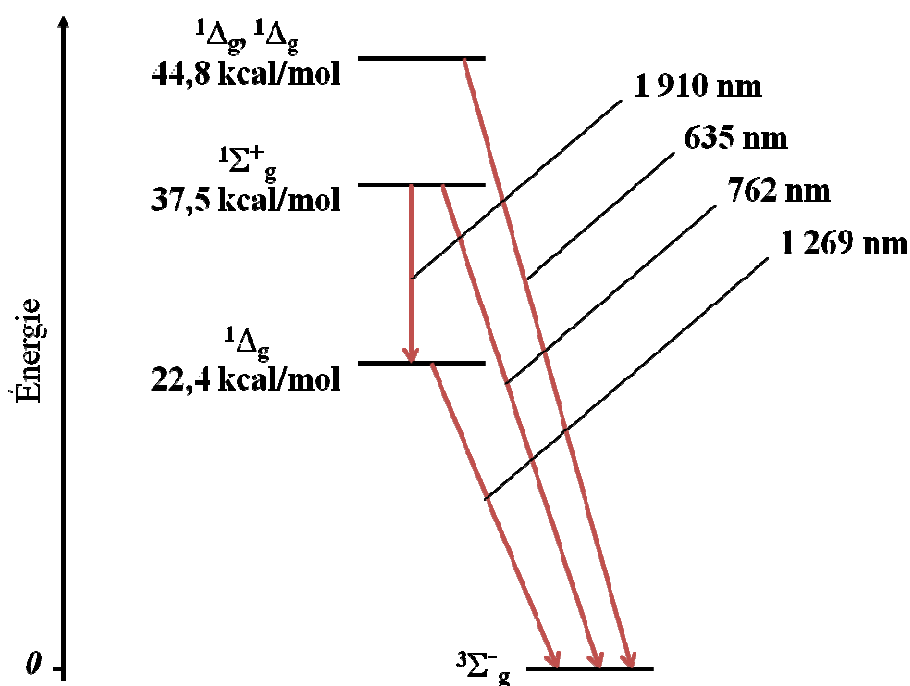


Figure 2-5 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'oxygène (les désactivations non-radiatives ne sont pas montrées). A gauche : énergies d'excitation des états excités par rapport à l'état fondamental. A droite : longueurs d'onde de luminescence.

La durée de vie de l'oxygène singulet ($^1\Delta_g$, il ne sera d'ailleurs plus question de lui par la suite) va quant à elle dépendre de nombreux facteurs : nature du solvant, température, *quenchers* présents en solution... Tous ces paramètres sont capables d'interférer avec l'oxygène singulet, sa formation et son déclin (figure 2-6).

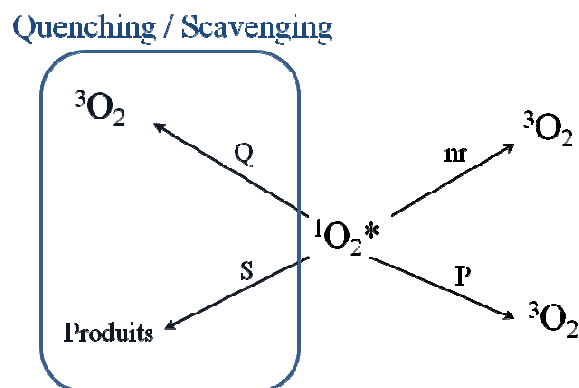


Figure 2-6 : Voies de désactivation de l'oxygène singulet. Q = quencher physique ; S = substrat ; nr = désactivation non-radiative ; P = phosphorescence.

Les *quenching* physique et chimique de l'oxygène singlet seront traités plus tard dans cette partie. La durée de vie « propre » de $^1\Delta_g$ peut donc être considérée comme étant fonction de la température (20) et du solvant, n'étant plus limitée que par sa désactivation non-radiative (nr) et radiative (phosphorescence).

Krasnovsky *et al.* (21) ont dressé une table des constantes de désactivation de l'oxygène singlet dans différents solvants (figure 2-7), montrant l'importance de la nature de ceux-ci.

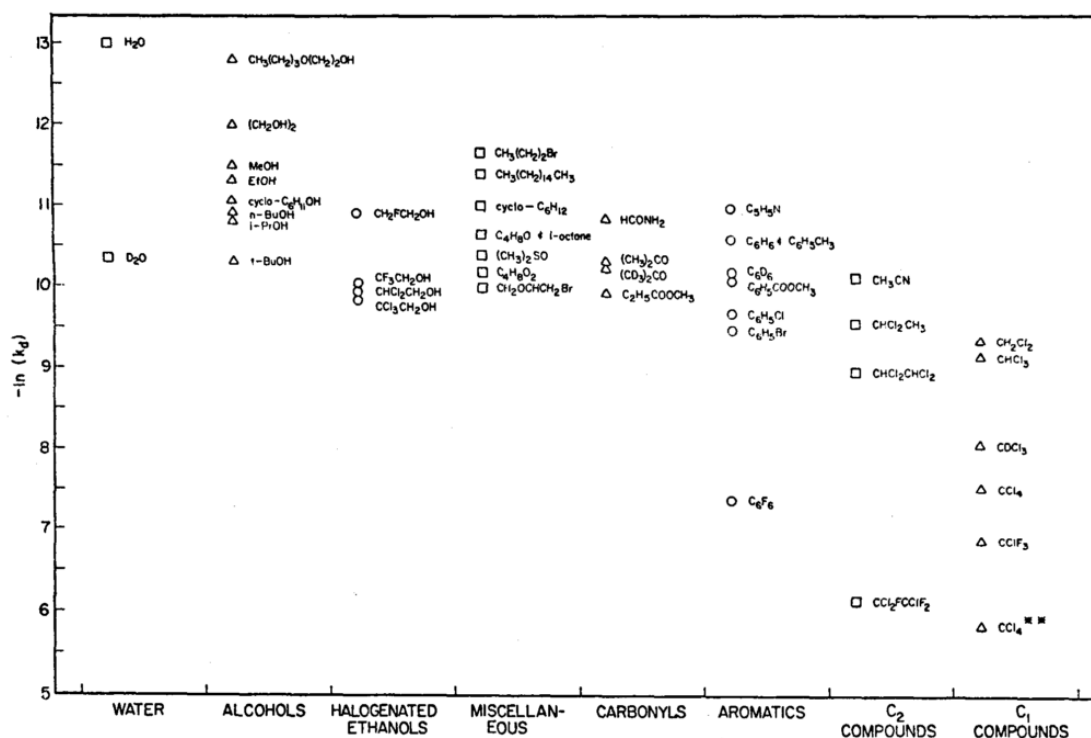


FIGURE 2. Plot of $-\ln(k_d)$ versus solvent class where k_d is the pseudo first order rate constant for physical deactivation of singlet oxygen by solvent molecules. ** Krasnovsky's value.

Figure 2-7 : Constante de pseudo premier ordre de la désactivation de l'oxygène singlet en fonction du type de solvant. Réf. : (21).

Observons que les solvants halogénés sont ceux qui, en général, engendrent les durées de vie de $^1\text{O}_2$ les plus grandes. A une même famille, les solvants deutérés augmentent également la durée de vie et le phénomène inverse est observé pour les solvants riches en liaisons C-H et O-H. L'eau est l'un des solvants dans lequel la durée de vie de $^1\Delta_g$ est la plus faible, environ 2 μs , et tombe à quelques centaines de nanosecondes en milieu biologique. Quelques valeurs de durées de vie de $^1\Delta_g$ sont données dans le tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Durée de vie de l'oxygène singlet (τ^A) dans différents solvants (22–24).

Solvant	τ^A (μs)	Solvant	τ^A (μs)
Acétone	51	Eau	~2
Acétonitrile	75	Ether diéthylique	34
Benzène	31	Hexafluorobenzène	3900
CHCl_3	207	Hexane	30

Tableau 2-1 (suite).

CCl ₄	87000	Freon-113	99000
CS ₂	34000	Méthanol	10
Chlorobenzène	45	Pyridine	16
Dioxane	27	Toluène	29

I.3. Formation

L'oxygène singulet peut être produit *via* des réactions d'origines diverses. S'il a d'abord été observé par les astrophysiciens dans la haute atmosphère, il a très vite intéressé les chimistes et biochimistes, rendant nécessaire, déjà, une collaboration entre spectroscopistes, chimistes et biologistes.

I.3.1. Par réaction chimique

La production d'oxygène singulet de façon chimique, nous l'avons vu plus tôt, a été décelée pour la première fois par Mallet lors de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion hypochlorite (8). Bien d'autres méthodes ont été découvertes à ce jour.

I.3.1.a. Conversion thermique

Bien que peu favorable d'un point de vue entropique, il est possible de générer de l'oxygène singulet en chauffant un mélange oxygène triplet / acétylène dans l'obscurité (25). Il est également possible de décomposer des endopéroxydes aromatiques par chauffage (figure 2-8).

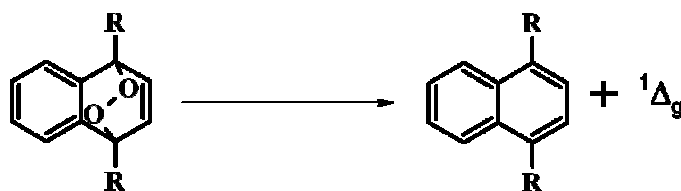


Figure 2-8 : Production d' 1O_2 ($^1\Delta_g$) à partir d'endopéroxydes aromatiques.

1.3.1.b. Décomposition du perchromate de potassium

Le perchromate de potassium peut aussi produire une luminescence d'oxygène singulet *via* sa réaction de réduction (26) :



1.3.1.c. Dismutation de l'anion peroxyde

La production d'oxygène singulet par dismutation de l'anion peroxyde a fait, et fait toujours, l'objet d'une grande polémique. Tout commence avec le schéma réactionnel d'Arneson (27) : $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{}^1\text{O}_2 ({}^1\Delta_g)$. En 1987, Elias James Corey, Prix Nobel trois ans plus tard, affirme avoir mis en évidence la production d'oxygène singulet par introduction d'eau dans une suspension de KO_2 en solvant aprotique (28). Cette observation a été réalisée par spectroscopie à 1268 nm. En 1994, Khan et Kasha observent également la production d'oxygène singulet par réaction de Haber-Weiss qui consiste à mettre en contact une solution de peroxyde d'hydrogène et une solution de superoxyde de potassium, solubilisé par un éther couronne dans le CCl_4 (29). Toutefois, cette réaction a été démontrée thermodynamiquement impossible par Martinez *et al.* (30). La polémique reste ouverte quant à la faisabilité de cette réaction.

1.3.1.d. Génération par l'ozone

Cette réaction met en jeu l'ozone O_3 et divers substrats organiques (31–33). Elle est néanmoins favorisée par la réaction avec des composés soufrés tels que la méthionine, la cystéine et le glutathion.

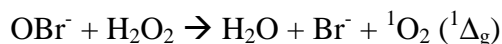
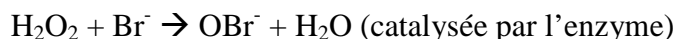


1.3.2. Génération enzymatique *in vivo*

L'oxygène singulet peut également être généré par l'action de différentes enzymes *in vivo*. Néanmoins, la complexité de ces milieux rend la détection de l'oxygène singulet extrêmement compliquée et de nombreuses polémiques et démentis ont concerné la capacité de certaines enzymes à produire de l'oxygène singulet ou non. Au final, la preuve formelle, non démentie, que de l'oxygène singulet est généré par une action enzymatique concerne relativement peu d'enzymes.

1.3.2.a. Activité de la lactoperoxydase

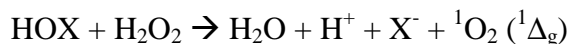
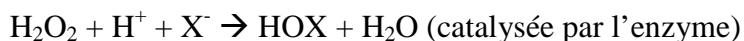
Kanofsky a montré que la production d'oxygène singulet était possible grâce au système lactoperoxydase, H₂O₂ et Br⁻ (34). La lactoperoxydase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de diverses molécules, dites accepteurs, par le peroxyde d'hydrogène. Les réactions suivantes ont été proposées :



Cette expérience est venue conforter les hypothèses d'Allen qui avaient également observé une luminescence dans le système lactopéroxydase, H₂O₂ et Cl⁻ (35).

1.3.2.b. Activité de la chloroperoxydase

La chloroperoxydase est également une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène singulet avec l'intervention d'un halogène. Les réactions peuvent s'écrire comme suit :



Cette production d'oxygène singulet a été détectée la même année par Khan et Kanofsky (36, 37).

1.3.2.c. Activité supposée d'autres enzymes

En dehors des deux enzymes citées ci-dessus, il est assez difficile de citer des études qui n'ont pas été remises en question quant à la possibilité de produire de l'oxygène singulet par action enzymatique. Il a été envisagé que les myéloperoxydases pouvaient produire de l'oxygène singulet pendant la phagocytose (38–46). Il en est de même concernant l'activité de la catalase, enzyme transformant le peroxyde d'hydrogène en eau (47, 48). Mais ces études ont été contestées et n'ont toujours pas fait l'unanimité.

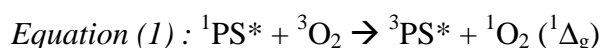
1.3.3. Par réaction photosensibilisée

Au cœur des mécanismes de photosensibilisation utilisés en PDT, la génération d'oxygène singulet par l'intermédiaire d'une molécule dite « photosensible » nous intéresse

tout particulièrement. Contrairement aux méthodes citées avant, celle-ci fait intervenir simultanément trois paramètres : un photosensibilisateur, de la lumière et de l'oxygène.

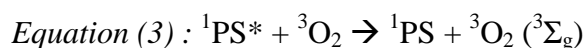
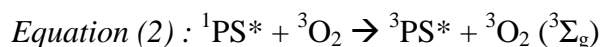
1.3.3.a. A partir de l'état singulet du PS

L'oxygène singulet est un état excité dont l'énergie se trouve à 22,4 kcal/mol au-dessus de l'énergie de l'état fondamental triplet. Si un photosensibilisateur a une telle différence d'énergie entre son état singulet et triplet, il est envisageable qu'un transfert d'énergie ait lieu vers l'oxygène :



Dans cette réaction, l'oxygène triplet est promu vers son état singulet par transfert d'énergie ; l'enthalpie de cette opération est $\Delta H = E_T - E_S + 22,4$ kcal/mol.

Si cette réaction n'est pas possible d'un point de vue énergétique, l'oxygène triplet peut encore interférer avec l'état singulet excité du PS par le seul processus autorisé par la multiplicité de spin : le quenching de $S_1(\text{PS})$ pour donner soit $T_1(\text{PS})$ (on parle alors de croisement inter système assisté) ou $S_0(\text{PS})$ et de l'oxygène triplet :



Quelques hydrocarbures aromatiques polynucléaires sont capables d'effectuer ce CIS assisté ou encore de se désactiver par simple collision avec l'oxygène triplet : le naphthalène, le phénanthrène, le pérylène, l'anthracène... Par exemple, pour le 9,10-dicyanoanthracène, 100% du quenching de S_1 par O_2 conduit à la formation d' $O_2 ({}^1\Delta_g)$ (49, 50).

Néanmoins, cette méthode reste extrêmement peu fréquente en raison du temps de vie généralement très court des états singulets. Seuls les photosensibilisateurs dont les états S_1 ont une durée de vie longue (plusieurs dizaines, voire centaine de nanosecondes) peuvent avoir un mécanisme concurrent de la fluorescence et du croisement intersystème, et donc se faire *quencher* par O_2 . De telles molécules peuvent ainsi donner lieu à des rendements quantiques d'oxygène singulet supérieurs à 1, soit grâce à l'équation (1), soit à l'équation (2).

1.3.3.b. A partir de l'état triplet du PS

La méthode la plus courante de produire l'oxygène singulet reste le transfert d'énergie à partir de l'état triplet du PS vers l'oxygène. En effet, l'oxygène est bien connu pour être un *quencher* d'états triplets en raison de leur durée de vie longue. Le diagramme de Jablonski simplifié (figure 2-9) présente les processus photophysiques qui amènent à la formation d' $^1\text{O}_2$.

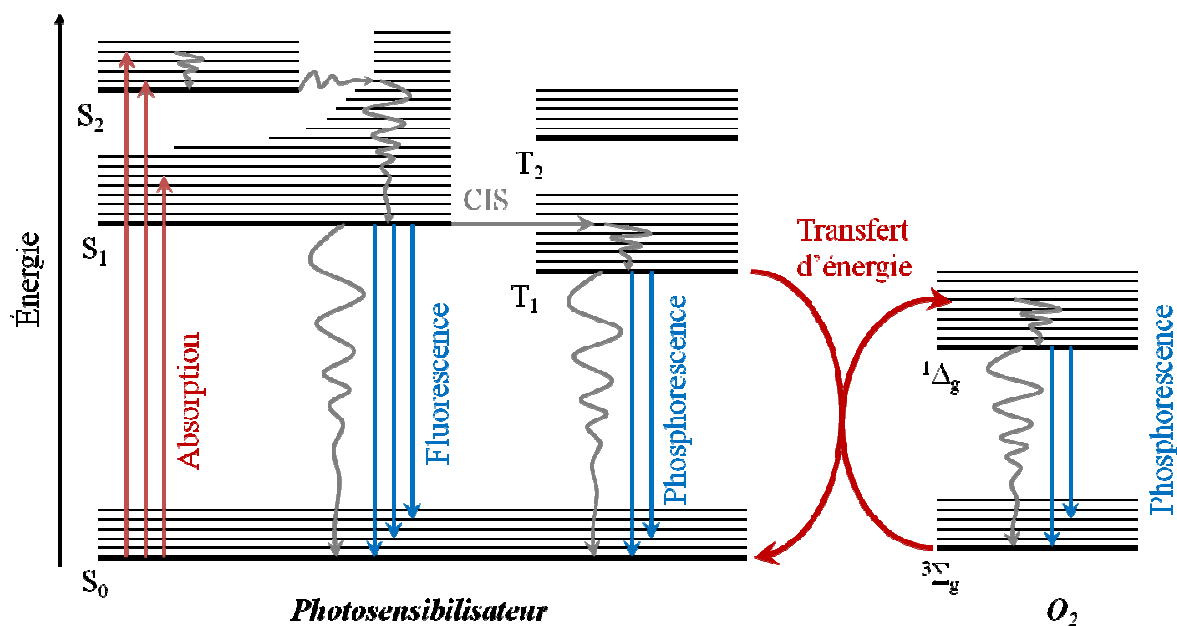


Figure 2-9 : Diagramme de Jablonski simplifié du processus de sensibilisation de l'oxygène.

Dans ce processus, la lumière absorbée par le PS doit dans un premier temps être acheminée vers l'état triplet *via* un croisement intersystème, puis être transmise à l'oxygène par un transfert d'énergie. Le transfert ne se fera que si la différence d'énergie entre l'état triplet et l'état fondamental du PS est d'au moins 22,4 kcal/mol, comme nous l'avons vu précédemment.

Ceci nous amène à définir une caractéristique des photosensibilisateurs : le rendement quantique de production d'oxygène singulet, Φ_{Δ} . Il peut s'écrire comme suit :

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\text{Moles d'oxygène singulet formées}}{\text{Moles de photons (Einstein) absorbées}} \quad (\text{Pendant le même temps})$$

Cette équation est sensible à plusieurs paramètres tels que la concentration d'oxygène dans le milieu, la température, l'efficacité du croisement intersystème et ne rend pas compte

des phénomènes tels que le croisement intersystème assisté, la génération d'oxygène par l'état singulet et la présence de *quenchers* en solution (figure 2-10). Elle est néanmoins fréquemment utilisée, car facile à résoudre. Ce rendement quantique peut difficilement se déterminer directement, mais il est aisé de le déterminer indirectement grâce à une référence dont le rendement quantique est connu dans un solvant donné.

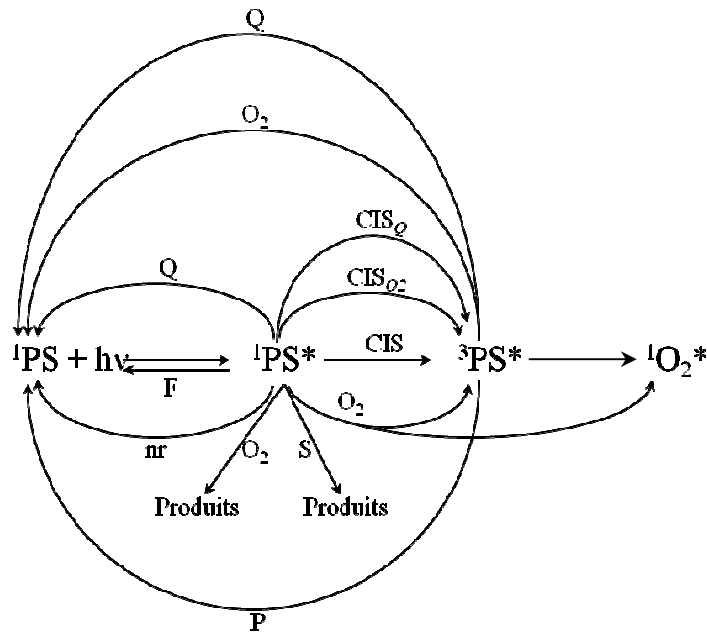


Figure 2-10 : Schéma de différents processus de formation et de désactivation d'un PS. F = fluorescence ; P = phosphorescence ; nr = désactivation non-radiative ; Q = quencher physique ; O₂ = dioxygène ; S = substrat. Réf. : (22).

Un autre paramètre est quelquefois rencontré dans la littérature : l'efficacité de l'état triplet vis-à-vis du transfert d'énergie, S_{Δ} . Il s'agit du pourcentage de quenching de l'état triplet par l'oxygène moléculaire qui conduira à la formation de 1O_2 ($^1\Delta_g$).

$$S_{\Delta} = \frac{\text{Moles d'oxygène singulet formées}}{\text{Moles d'états triplets quenchés par l'oxygène}}$$

Une version simplifiée de la relation entre Φ_{Δ} et S_{Δ} peut s'écrire sous la forme :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{CIS} \times S_{\Delta}$$

Des valeurs de S_{Δ} ont été déterminées dans la littérature par l'équipe de Wilkinson (49, 50) et d'autres équipes (51, 52), mais d'un point de vue pratique, les photosensibilisateurs sont le plus souvent caractérisés par leur rendement quantique Φ_{Δ} dans un solvant donné en raison de sa plus grande facilité d'accès et de la difficulté d'accès de S_{Δ} et Φ_{CIS} .

I.4. Inhibition de l'oxygène singulet

Dans cette partie, nous allons aborder les différentes manières dont l'oxygène singulet peut être inhibé. Nous avons vu précédemment les différentes désactivations de l'oxygène singulet et avons discuté des processus radiatifs et non-radiatifs. Il est maintenant question d'étudier son inhibition par une tierce molécule, également appelé *quenching*. Nous distinguons deux grands types: le *quenching* chimique et le *quenching* physique. Le premier consiste en une réaction chimique sur un substrat menant à une modification de la structure moléculaire, alors que le deuxième consiste en un transfert d'énergie, à l'instar de sa formation sensibilisée, vers une molécule capable d'accepter l'énergie.

I.4.1. Quenching chimique

Le quenching chimique est basé sur la réactivité de l'oxygène singulet face à des substrats insaturés, conjugués ou comportant des hétéroatomes. Les biomolécules font donc partie de ces substrats, ce qui rend l'oxygène singulet si intéressant pour la PDT (53) mais aussi source de problème pour la conservation des aliments (54). Les principales cibles de l'oxygène singulet en milieu biologique sont :

- les acides aminés (55, 56),
- les bases nucléiques (57, 58),
- les lipides, les acides gras (59, 60),
- le cholestérol (61),
- l'acide ascorbique (62, 63).

Les conséquences de cette réactivité envers ces biomolécules sont de natures diverses : destruction de certaines protéines, oxydation de l'ADN ou de l'ARN et surtout destruction des membranes cellulaires.

La détection de l'oxygène singlet, discutée plus tard en partie I.5, peut se faire indirectement par l'utilisation de molécules utilisant la réactivité de l'oxygène singlet. La présence de groupements sensibles à $^1\text{O}_2$ va entraîner une modification chimique de la molécule (aussi appelée sonde) et ainsi perturber son comportement spectroscopique.

I.4.1.a. Réaction de type Alder-ène

La réaction ène fait intervenir un alcène en présence d'un énophile qui vient attaquer la double liaison. L'oxygène singlet peut faire office d'énophile et conduit à la formation d'un hydroperoxyde allylique, comme illustré figure 2-11. Dans le cas où l'oxygène singlet est l'énophile, cette réaction s'appelle la réaction de Schenck (64).

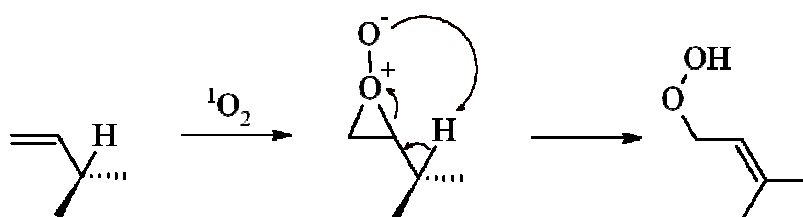


Figure 2-11 : Mécanisme de la réaction ène avec l'oxygène singlet.

Cette addition sur les alcènes ne suit pas forcément les règles de Markovnikov mais est très sensible à l'encombrement stérique et aux possibilités de créer des liaisons hydrogène. L'hydroperoxyde formé peut ensuite subir différentes transformations. Il peut par exemple se réarranger, conduisant au clivage de la molécule. Cette réaction est appelée clivage de Hock (figure 2-12).

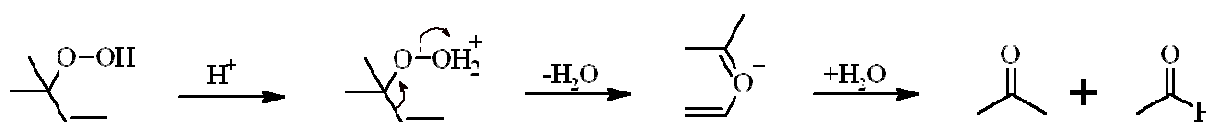


Figure 2-12 : Mécanisme du clivage de Hock (65).

Ces réactions vont être responsables de la dégradation de nombreuses molécules d'intérêt biologique. C'est le cas par exemple du cholestérol (figure 2-13).

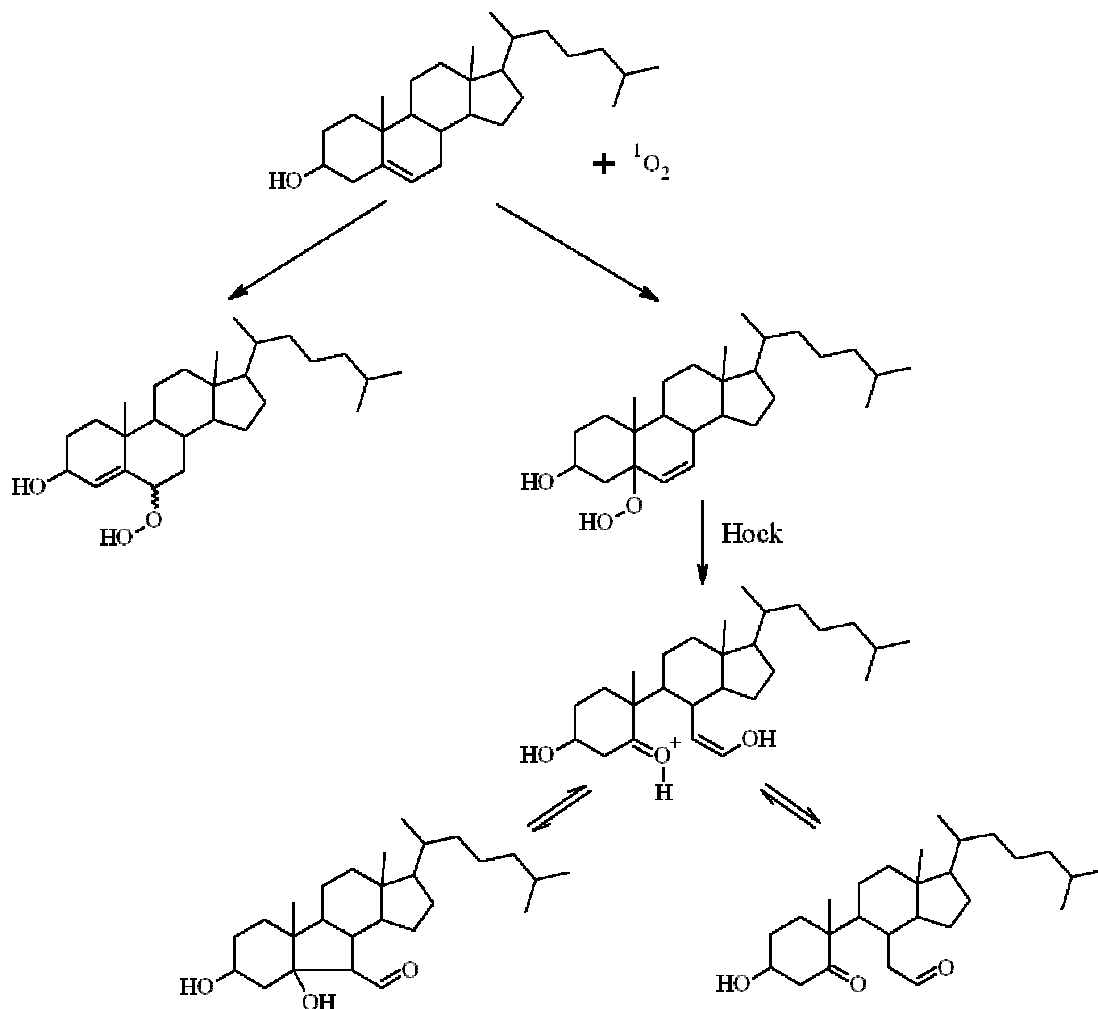


Figure 2-13 : Action de l'oxygène singlet sur le cholestérol (66).

Ainsi, l'action de l'oxygène singlet sur le cholestérol peut mener à de nombreuses transformations, de la « simple » addition menant à l'hydroperoxyde jusqu'au clivage du cycle B. L'hydroperoxyde en position 5 peut en effet subir un clivage de Hock avec intervention d'un proton. Cette réaction de clivage du cholestérol peut également faire intervenir l'ozone pour conduire à la formation du sous-produit cholestérol céto-aldéhyde.

La réaction de Schenck se rencontre également avec le tryptophane (figure 2-14).

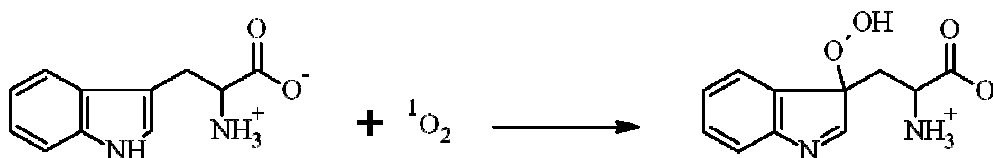


Figure 2-14 : Action de l'oxygène singlet sur le tryptophane (67).

Citons également l'action sur les acides gras tels que l'acide linoléique (Figure 2-15).

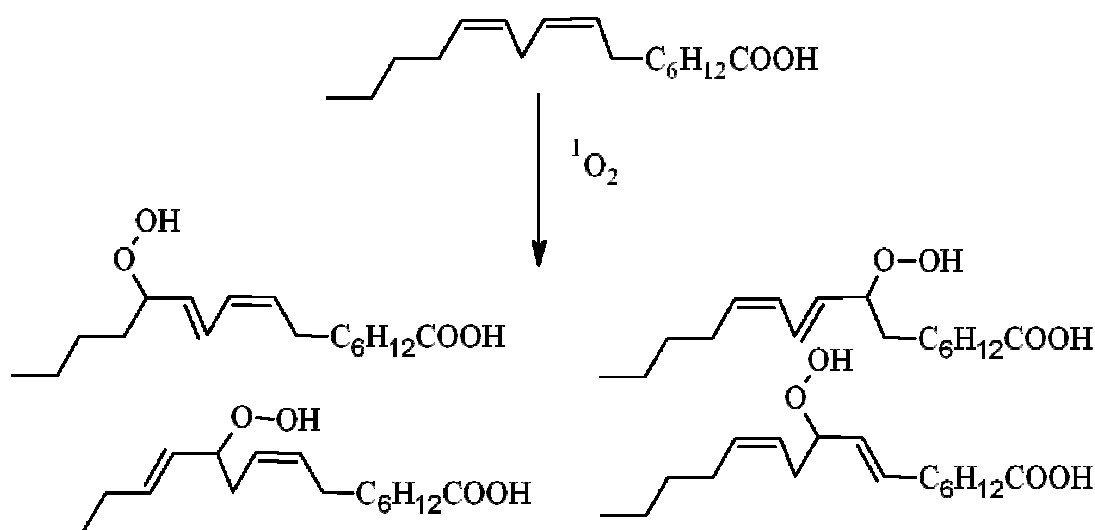


Figure 2-15 : Action de l'oxygène singulet sur l'acide linoléique.

Notons que les hydroperoxydes allyliques d'acide arachidonique et linoléique peuvent également subir un clivage de Hock conduisant à la coupure de ces molécules. Les fragments issus du clivage sont deux aldéhydes (68).

Pour une étude plus approfondie des mécanismes et des possibilités de cette réaction, le lecteur est invité à lire les revues de Clennan (69, 70).

1.4.1.b. Cycloaddition [2+2]

La cycloaddition [2+2] fait également intervenir l'oxygène singulet en présence d'un alcène, mais elle conduit à la formation d'un dioxétane (figure 2-16).

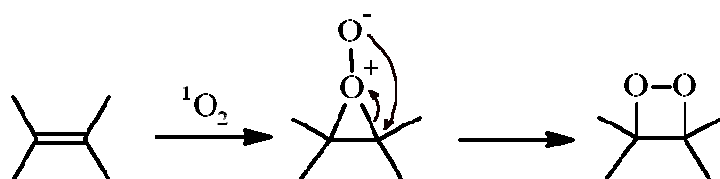


Figure 2-16 : Mécanisme de la cycloaddition [2+2].

Cette réaction est généralement favorisée par l'absence de proton en position allylique ou des effets électroniques ne favorisant pas son départ. Le peroxyde formé peut par la suite évoluer vers le clivage de la molécule. Certains acides aminés tels que l'histidine ou le

tryptophane peuvent interagir avec $^1\text{O}_2$ pour donner de telles cycloadditions, comme illustré figure 2-17.

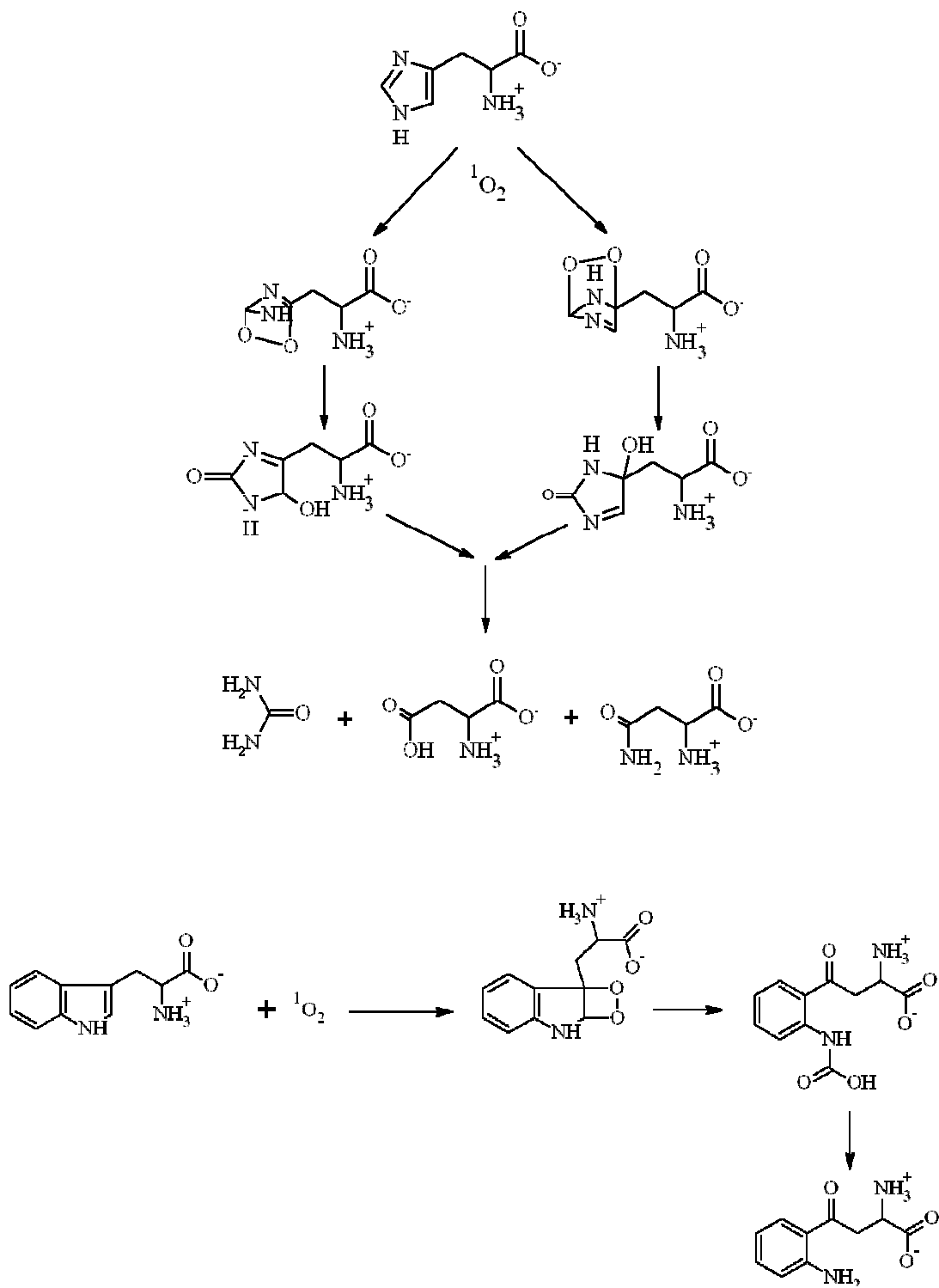


Figure 2-17 : Action de l'oxygène singulet sur l'histidine (en haut) et le tryptophane (en bas).

La vitamine D₂, dont l'action est d'accélérer l'absorption du calcium dans l'intestin, peut également réagir avec l'oxygène singulet (figure 2-18).

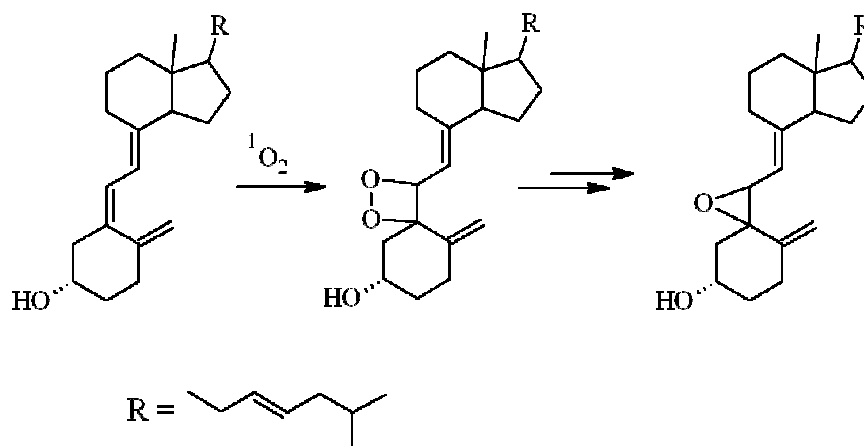


Figure 2-18 : Action de l'oxygène singulet sur la vitamine D₂.

Cette cycloaddition se retrouve également dans le processus de détection de l'oxygène singulet lors de sa réaction avec la sonde *trans*-1-(2'-méthoxyvinyl)pyrène (*t*-MVP) qui émet de la chimiluminescence lorsqu'elle se décompose en pyrèncarboxaldéhyde (figure 2-19), ces sondes seront présentées en partie I.5.2.b.

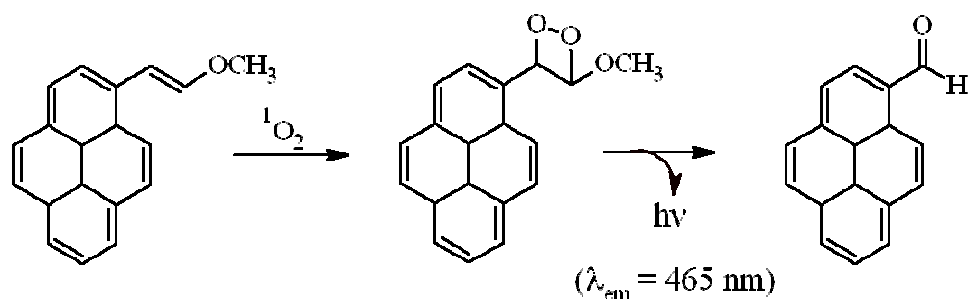


Figure 2-19 : Action de l'oxygène singulet sur la t-MVP.

I.4.1.c. Cycloaddition [4+2]

La cycloaddition [4+2] est aussi appelée réaction de Diels-Alder. Elle met en jeu un diène et un diénophile, ce dernier pouvant être l'oxygène singulet (figure 2-20).

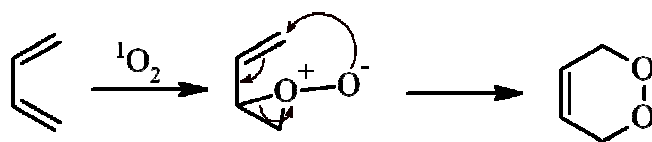


Figure 2-20 : Mécanisme de la cycloaddition [4+2].

Cette réaction a été l'objet de nombreuses études et a été très largement appliquée à la synthèse de molécules (71). C'est le cas par exemple des endoperoxides de naphthalène, notamment utilisés dans la production d'oxygène singlet par voie chimique, réaction discutée en section I.3.1.a. (figure 2-21).

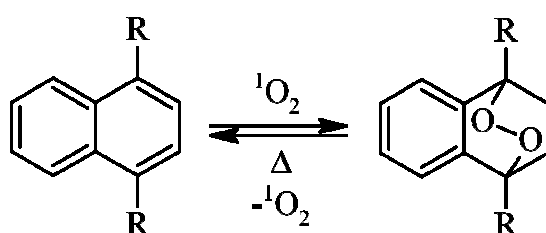


Figure 2-21 : Synthèse d'endoperoxide de naphthalène et sa dismutation par voie thermique.

Cette réactivité avec le cycle benzénique a bien des applications. La tyrosine réagit avec l'oxygène singlet pour former un endoperoxyde (72) comme illustré figure 2-22.

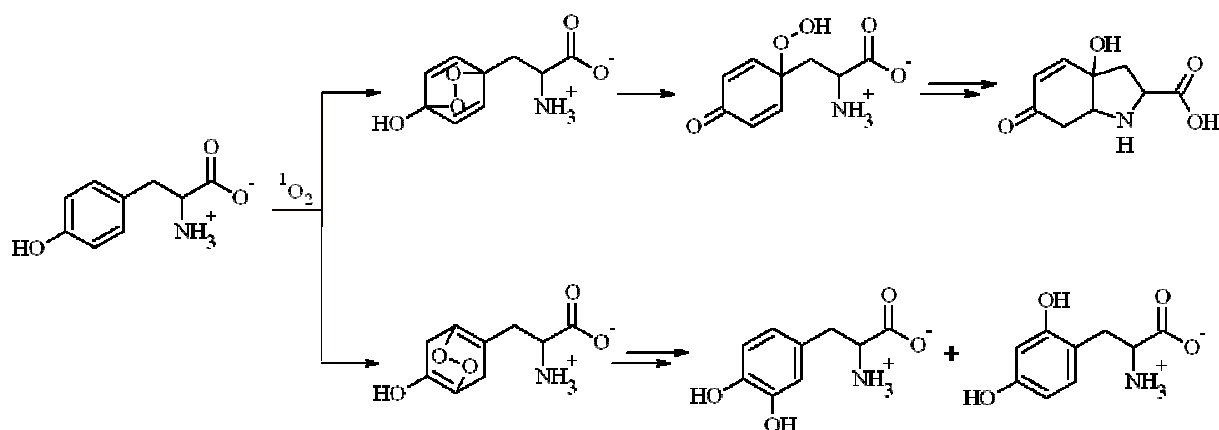


Figure 2-22 : Action de l'oxygène singlet sur la tyrosine.

Cette réaction se retrouve également dans le processus d'interaction de l'oxygène singlet avec l'ADN. La guanosine (dG) est la base nucléique la plus facilement oxydée par l'oxygène singlet (figure 2-23). La guanosine peut réagir une première fois avec l'oxygène

singulet pour former la 8-OH-dG, en équilibre avec la 8-oxo-dG. Remarquons que la 8-oxo-dG être réoxydée pour aboutir à la 4-OH-8-oxo-dG (73).

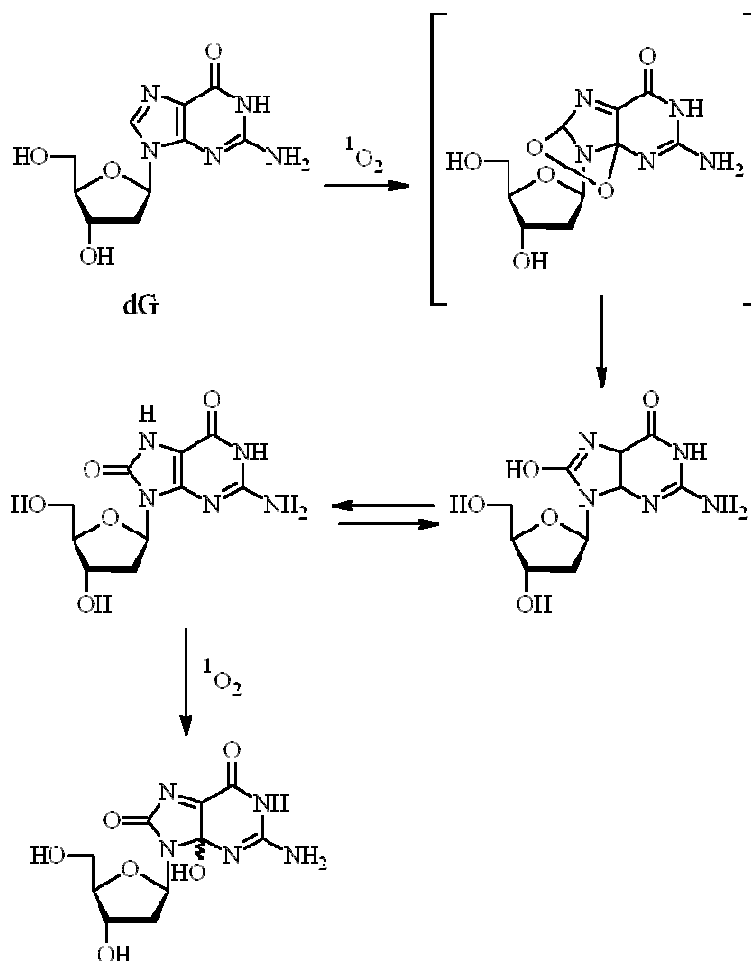
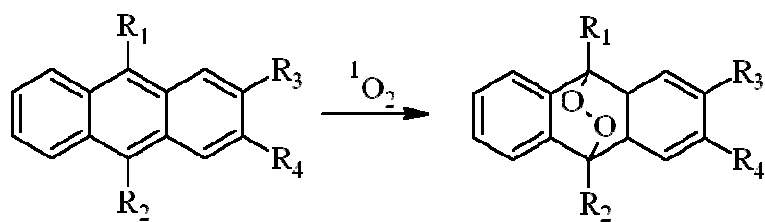


Figure 2-23 : Action de l'oxygène singulet sur la guanosine (dG) et sur la 8-oxo-dG.

Notons toutefois que la guanosine peut à la fois *quencher* l'oxygène singulet de manières physique ($6,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et chimique ($1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

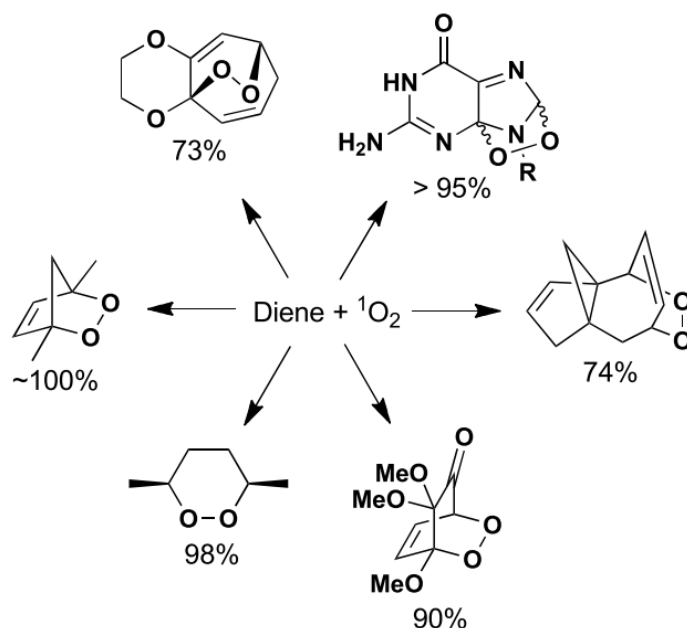
La réactivité du noyau benzénique, et en particulier le cycle central de l'anthracène, est utilisée pour la détection de l'oxygène singulet. Ce noyau est capable de capter l'oxygène singulet et de former un endoperoxyde de naphtalène, ce qui perturbe les propriétés spectroscopiques du composé. Quelques exemples sont donnés en figure 2-24.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ADMDMA			-H	-H
ADPA			-H	-H
DMA	-Me	-Me	-H	-H
DPA	-Ph	-Ph	-H	-H
DMAX	-Me	-Me	-COOH	
DPAX	-Ph	-Ph	-COOH	
SOSG	-Me		-H	-H

Figure 2-24 : Quelques sondes utilisées pour détecter l'oxygène singulet.

Quelques autres réactions possibles avec l'oxygène singulet, tirées du *Handbook of Synthetic Photochemistry*, sont données en exemple figure 2-25.



*Figure 2-25 : Quelques exemples de réactions de cycloaddition [4+2].
Réf : Handbook of Synthetic Photochemistry, p. 353.*

Notons que la réaction de Diels-Alder est également soumise à la concurrence avec la cycloaddition [2+2] et la réaction ène. C'est le cas de diènes cycliques, observé par Carpenter *et al.* (74), illustré figure 2-26.

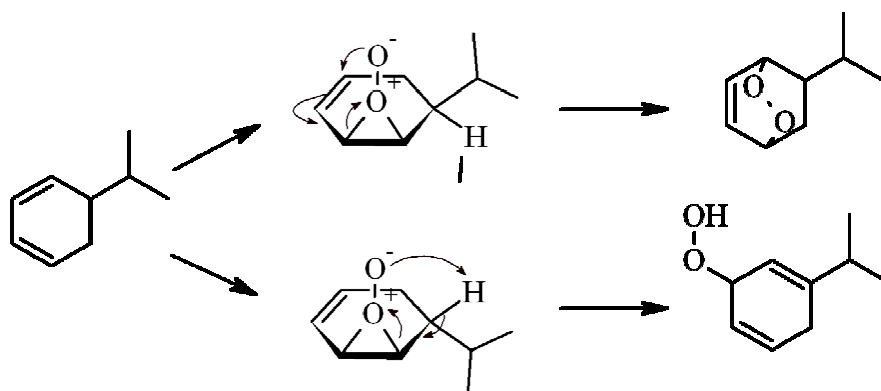


Figure 2-26 : Compétition entre réaction ène et la cycloaddition [4+2].

La cycloaddition [2+4] peut aussi se produire dans des hétérocycliques de type furane et benzofurane, pyrrole et indole, thiophènes, thiazoles, oxazoles, imidazoles (70)... La réactivité de l'oxygène singulet sur les dérivés du furane a d'ailleurs été largement décrite dans la revue de Tamsyn Montagnon *et al.* (75).

I.4.1.d. Réactions avec des hétéroatomes

Un dernier type de réaction peut intervenir avec l'oxygène singulet, il s'agit des réactions d'oxydation d'un hétéroatome, ou encore réactions d'oxygénation, où un atome tel que le soufre, le sélénium, le phosphore, l'iridium ou l'azote passent à un degré d'oxydation supérieur (70). Dans certains cas, cette réaction peut aller jusqu'au clivage de la molécule au niveau de l'hétéroatome. L'exemple du soufre est donné figure 2-27 :

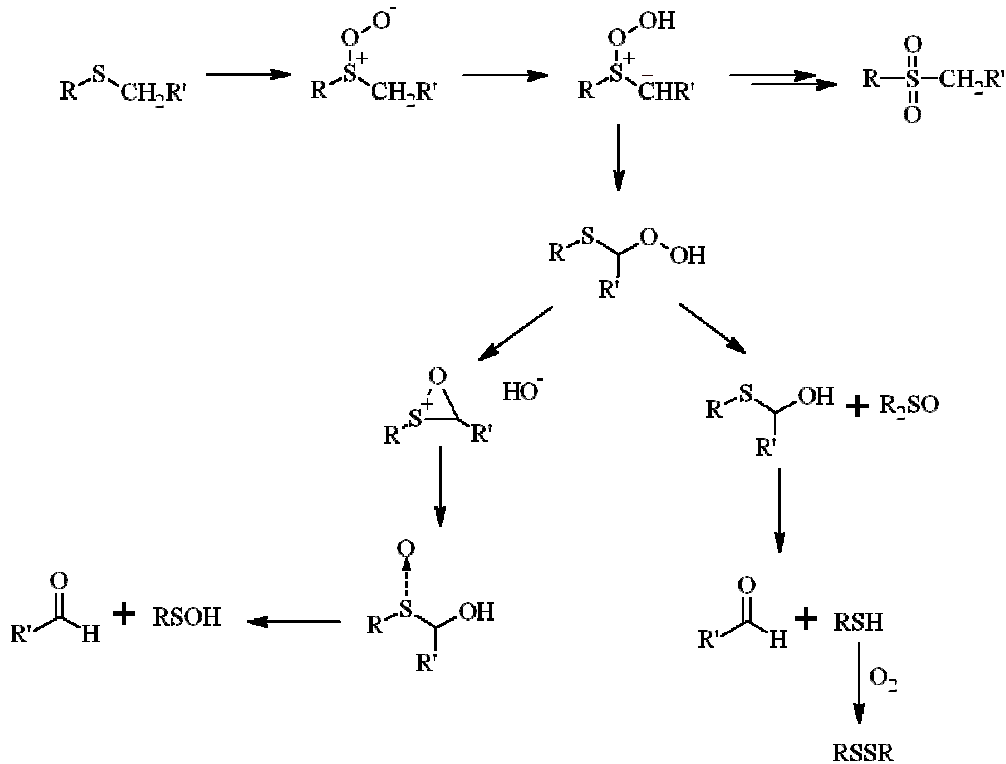


Figure 2-27 : Schéma de réaction de l'oxygène singulet avec un thioester (76).

Cette oxydation du soufre est observée en milieu biologique par l'oxydation des acides aminés de type thiol (cystéine) ou thioéther (méthionine), illustrée dans la figure 2-28.

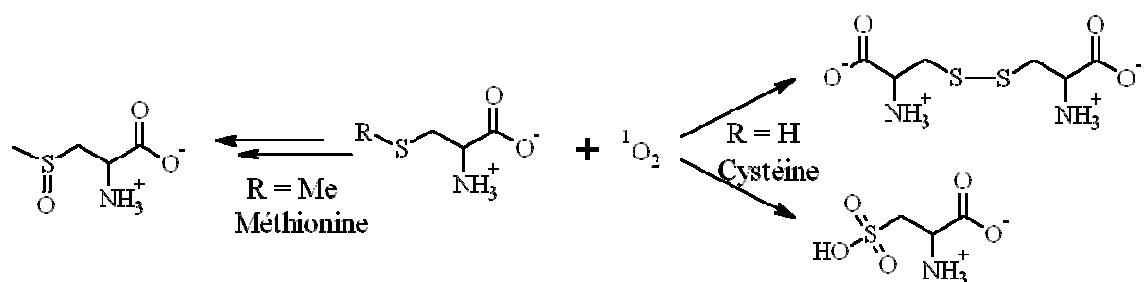


Figure 2-28 : Action de l'oxygène singulet sur les acides aminés soufrés : cystéine et méthionine.

Les amines forment un cas à part dans cette réactivité. Il a été bien établi que les amines ont un fort potentiel de « scavenger » vis-à-vis de l'oxygène singulet, dont le processus fait intervenir un transfert de charge, comme illustré figure 2-29.

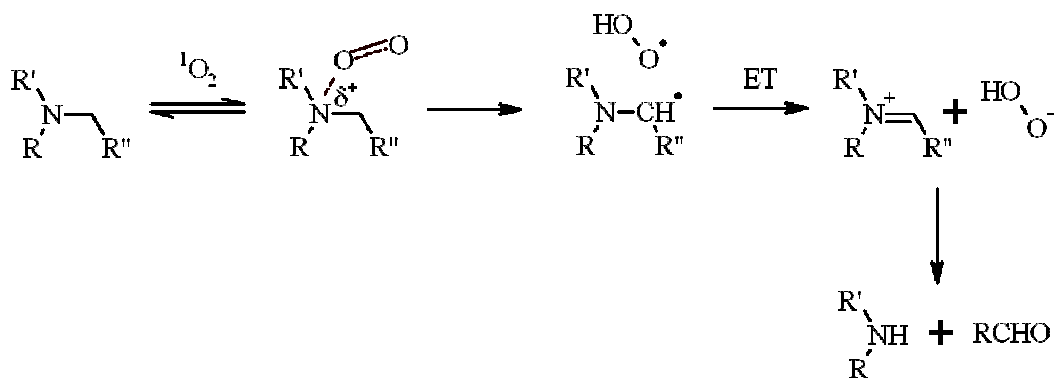


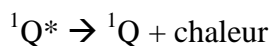
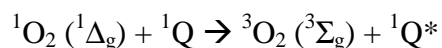
Figure 2-29 : Schéma de réaction de l'oxygène singulet sur une amine tertiaire (76).

1.4.2. Quenching physique

L'oxygène singulet a donc un potentiel fortement destructeur sur la machinerie biologique. Parce qu'il est naturellement généré *in vivo* (présence de photosensibilisateurs tels que la chlorophylle), la nature a développé des composés capables d'inhiber l'oxygène singulet d'une autre manière : par *quenching* physique.

Le *quenching* physique est le transfert d'énergie de l'oxygène singulet vers une tierce molécule, appelée accepteur, sans réaction chimique. Toujours en omettant les désactivations qui peuvent avoir lieu avec 1O_2 $^1\Sigma_g$, le transfert d'énergie se fait de manière non-radiative par collision avec la molécule inhibitrice (notée Q) dans son état fondamental (qu'on supposera

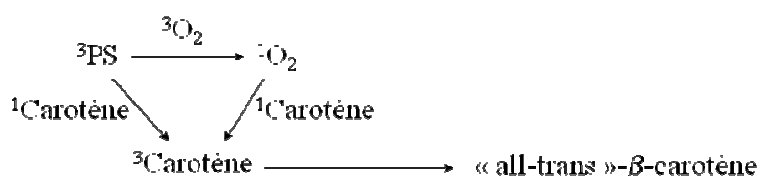
être singulet) et qui la dissipera généralement sous forme de chaleur. D'où l'équation suivante :



Puisque cette réaction se rencontre souvent dans des processus naturels de protection de l'organisme, les principaux *quencher*s d'origine naturelle seront présentés dans cette partie, ainsi que quelques *quencher*s d'origine synthétique.

I.4.2.a. Les caroténoïdes

Le *quencher* d'oxygène singulet le plus connu reste, pour des raisons historiques, le β -carotène. Parce qu'ils sont des éléments extrêmement importants dans la protection des systèmes biologiques, le β -carotène et ses analogues caroténoïdes ont fait l'objet de nombreuses études concernant leurs propriétés anti-oxydantes. Foote *et al.* ont été les premiers à réaliser une étude complète des mécanismes de *quenching* de ${}^1\text{O}_2$ par le β -carotène (15, 77–80). Ils ont observé qu'il agissait non seulement sur la capacité du PS à produire de l'oxygène singulet en *quenchant* son état triplet, mais également sur l'oxygène lui-même. En effet, ils ont montré que le *cis*- β -carotène pouvait s'isomériser en *trans*- β -carotène après transfert d'énergie avec l'oxygène (79) (figure 2-30).



*Figure 2-30 : Résumé des processus d'inhibition du β -carotène décrits par Foote *et al.* (79).*

Les caroténoïdes sont des polyènes, généralement conjugués, divisés en deux grandes familles : les carotènes (exclusivement des hydrocarbures sans hétéroatome) et les xanthophylles (hydrocarbures oxygénés). Il existe de nombreux caroténoïdes, environ 600 d'origine naturelle, que l'on retrouve principalement dans le règne végétal (81), et quelques uns synthétisés dans le but d'améliorer les propriétés de *quenching*. Quelques structures sont présentés figure 2-31.

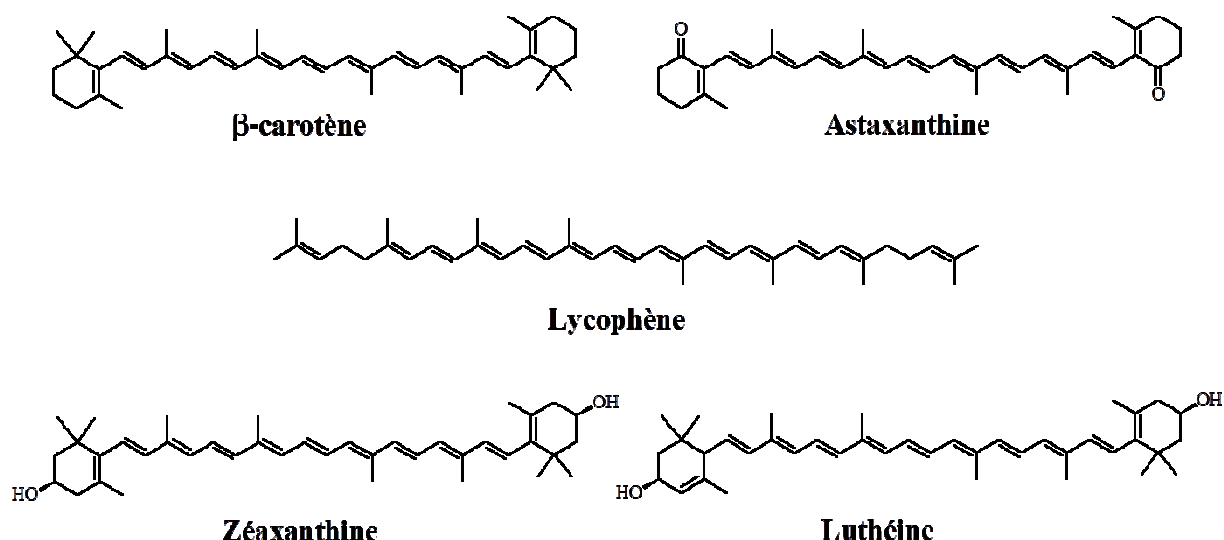


Figure 2-31 : Structures de quelques caroténoïdes naturels.

Le β-carotène est responsable de la couleur de nombreux fruits et légumes, comme les carottes, la citrouille, les tomates, etc. Il est aussi connu pour être précurseur de la vitamine A. La zéaxanthine est la xanthophylle la plus courante dans la nature. Elle est souvent associée à son isomère, la luthéine et sont les principaux responsables de la couleur caractéristique des paprikas, du maïs et du safran. Ces deux molécules jouent également un rôle important dans le mécanisme de la vue car ils sont contenus dans la rétine de l'œil, la zéaxanthine étant principalement localisée au centre et la luthéine à la périphérie. Elles servent notamment à filtrer la lumière bleue et les ultraviolets.

Les caroténoïdes constituent la plus importante famille de *quencher*s de l'oxygène singulet, leur constante de quenching k_q étant de l'ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en solution.

1.4.2.b. L'azide de sodium

L'un des *quencher*s par mécanisme physique de l'oxygène singulet le plus connu est l'azide de sodium, de formule NaN_3 . Il a été employé dans de nombreuses études faisant intervenir l'oxygène singulet en raison de sa sélectivité (82, 83). Sa constante de *quenching* a été estimée à environ $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau (22).

1.4.2.c. Les phénols

Les phénols sont des composés rencontrés dans de nombreux aliments en raison de leurs propriétés anti-oxydantes. Ils représentent une très grande famille dont quelques uns sont

présentés figure 2-32. Leurs propriétés vont du *scavenging* de radicaux à la réduction de substrats oxydés et dépassent largement le simple cadre du *quenching* physique de $^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$.

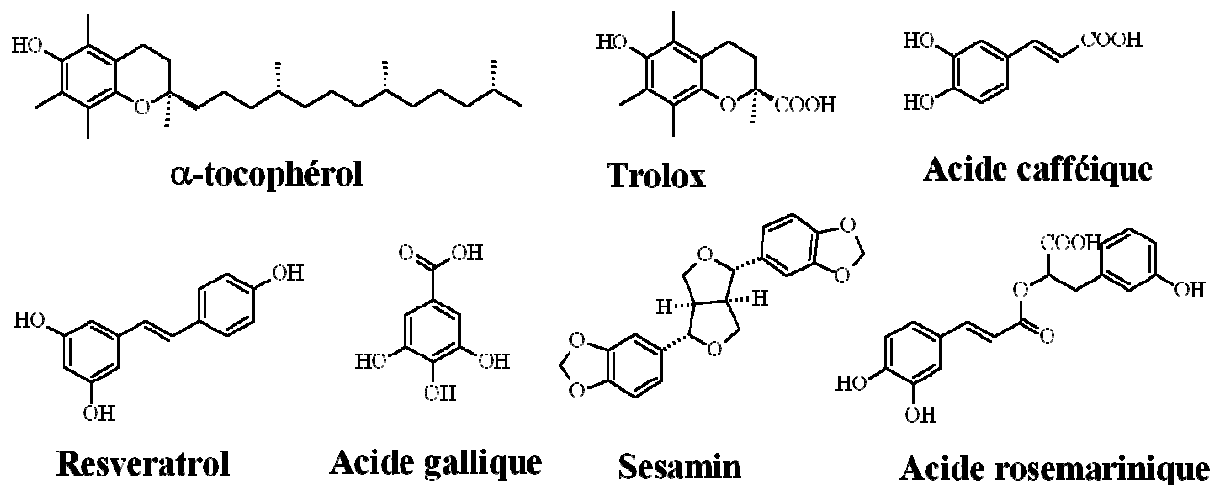


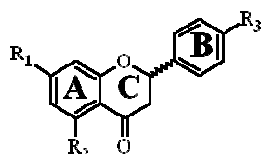
Figure 2-32 : Structures de quelques phénols.

Parmi ces molécules, l'α-tocophérol est le plus abondant dans la nature et est l'antioxydant principal des huiles végétales (84). Foote *et al.*, en 1970, démontrèrent que le mécanisme de *quenching* de l'oxygène singulet par le tocophérol implique un transfert de charge (85). Néanmoins, il est lui aussi sujet à la compétitivité entre *quenching* physique et chimique (86). De nombreuses études ont été réalisées sur la nature et l'abondance des antioxydants d'origine polyphénolique dans différentes plantes, épices ou fruits (87–92).

1.4.2.d. Les flavonoïdes

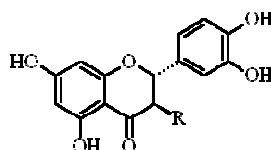
Les flavonoïdes sont une sous-classe de la famille des polyphénols, on les rencontre dans de nombreux fruits et légumes qui leur confèrent leur rôle antioxydant (93). Les flavonoïdes sont composés de deux cycles condensés (**A** et **C**) et d'un cycle aromatique de type phénolique (**B**), ils sont aussi appelés dérivés de la benzo-γ-pyrone (figure 2-33).

Flavonones



Flavanone : $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$

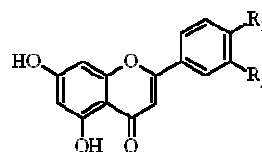
Naringenine : $R_1=OH$; $R_2=OH$; $R_3=OH$



Eriodictyol : $R=H$

Taxifoline : $R=OH$

Flavones

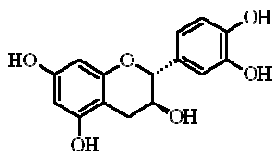


Chrysin : $R_1=H$; $R_2=H$

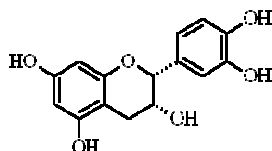
Apigenine : $R_1=OH$; $R_2=H$

Luteoline : $R_1=OH$; $R_2=OH$

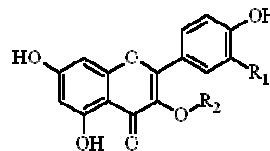
Flavan-3-ols



Catéchine



Epicatéchine



Kaempferol : $R_1=H$; $R_2=H$

Quercétine : $R_1=OH$; $R_2=H$

Rutine : $R_1=OH$; $R_2=$ rutinose

Figure 2-33 : Structures de quelques flavonoïdes.

Il a été démontré que les propriétés de *quenching* physique des flavonoïdes vis-à-vis de l'oxygène singulet sont dues au cycle **B**. La présence de groupements hydroxyles sur ce cycle joue un rôle important dans cette propriété. La réactivité chimique est, quant à elle, due à la présence de la double liaison sur le cycle **C** (dite position 2-3) (94, 95). Les flavonoïdes les plus actifs sont la quercétine, la catéchine et la morine (structures montrées en figure 2-33), mais leur constante de *quenching* est bien plus faible que celle des caroténoïdes, environ $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (96).

1.4.2.e. Les acides aminés et les protéines

Certains acides aminés possèdent également la capacité de *quencher* l'oxygène singulet de manière physique ; c'est le cas de l'histidine, la méthionine et le tryptophane (97). Pour le tryptophane, c'est son noyau indolique qui lui confère cette propriété, même si sa constante de *quenching* k_q reste relativement faible et est extrêmement dépendante du solvant,

de la température et du pH (98). Pour les mêmes raisons, les molécules de type indolique ont une certaine tendance à être des *quencher*s physique (et chimique) de l'oxygène singulet (99). C'est le cas par exemple de la strychnine (100).

I.4.2.f. Les indigoïdes

Les indigoïdes sont des chromophores comportant deux entités mérocyanine liées entre elles par des ponts polyéniques (101). La molécule de base est l'indigo, mais des structures plus élaborées ont été synthétisées par la suite (figure 2-34).

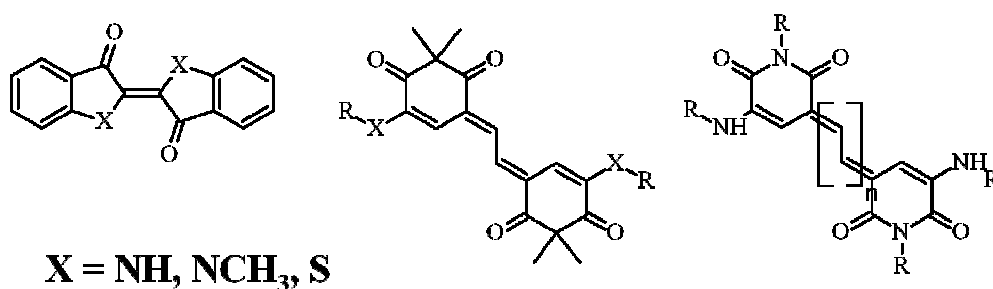


Figure 2-34 : Structures de quelques indigoïdes.

Ces composés ont longtemps été utilisés comme colorants dans le textile ou pour d'autres applications, mais une étude de leurs propriétés photophysiques a révélé qu'ils étaient de très bon *quencher*s d'oxygène singulet, leur k_q pouvant atteindre $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (96), c'est-à-dire comparable aux caroténoïdes.

I.4.2.g. Cas particulier du DABCO

Le 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, ou DABCO (figure 2-35), est une molécule qui pose problème quant à son caractère de *quencher* de l'oxygène singulet.

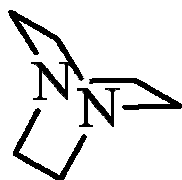


Figure 2-35 : Structure du DABCO.

S'il est fréquemment utilisé comme *quencher* physique de $^1\text{O}_2 \ ^1\Delta_g$ (102, 103), il est également capable de produire l'effet inverse : il favorise l'action de $^1\text{O}_2 \ ^1\Delta_g$ sur l'acide α -

cétocarboxylique (104), il stimule la luminescence de $^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$ pendant la décomposition de certains hydroperoxydes (105), ainsi que celle de $^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$ dimolaire pendant la réaction de Mallet (106). Il reste néanmoins connu et utilisé pour ses propriétés de *quencher*.

I.5. Détection

De par ses nombreuses applications dans les domaines de la biologie, de la chimie et même de la physique, il a toujours été important de savoir détecter l'oxygène singulet. L'oxygène triplet est un gaz incolore et inodore, et mis à part sa faible phosphorescence, il en va de même pour l'oxygène singulet. Néanmoins, ses propriétés photophysiques et sa réactivité chimique, vues précédemment, sont de bons outils pour les scientifiques afin de savoir si de l'oxygène singulet est généré.

I.5.1. Mesure directe

Mallet avait écrit avoir vu « *une très faible luminescence rouge foncé* » (8) que l'on a attribuée à l'oxygène singulet. En effet, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$ se désexcite vers son niveau fondamental $^1\text{O}_2$ $^3\Sigma_g$ avec émission d'un photon de phosphorescence dont la spectroscopie a été discutée en partie I.2.2. Cette luminescence, la principale, se détecte vers 1268 nm. Nous avons également vu qu'il existe d'autres émissions provenant de la désexcitation de l'oxygène singulet, mais leurs intensités sont si faibles qu'elles sont rarement détectées.

La détection de l'oxygène singulet est un outil indispensable en PDT. En effet, la recherche de nouveaux photosensibilisateurs, ainsi que les nouvelles méthodes de contrôle de leur phototoxicité, passe par la détection de l'oxygène singulet. Il est donc indispensable de savoir si de l'oxygène singulet a été généré (et « combien ? ») à trois niveaux : en solution, *in vitro* et *in vivo*. De plus, la détection de l'oxygène singulet à la fois *in vitro* et *in vivo* permet une approche dosimétrique de la question de la production d' $^1\text{O}_2$, question récurrente et qui constitue l'un des principaux verrous de la thérapie photodynamique aujourd'hui.

1.5.1.a. En solution

La détection du photon de phosphorescence émis par la relaxation de l'oxygène singulet se fait par un détecteur proche-infrarouge dont les détails sont fournis dans la partie expérimentale.

1.5.1.b. In vitro

La détection de l'oxygène singulet a longtemps été impossible d'un point de vue technique en raison de son temps de vie extrêmement court en milieu biologique (d'environ 2 μ s dans l'eau (107, 108)), du fait que sa forte réactivité avec des substrats biologiques qui réduit d'autant plus sa durée de vie, mais également de sa faible luminescence. Dans un premier temps, il a été démontré que la détection de $^1\text{O}_2$ en milieu biologique est faisable en changeant l'eau, H_2O , par de l'eau lourde, D_2O . En effet, la durée de vie des états excités de l'oxygène sont beaucoup plus longs dans l'eau lourde grâce à l'effet d'isotope présenté précédemment, la durée de vie de $^1\text{O}_2$ allant jusqu'à 68 μ s (24).

Par ailleurs, les développements techniques dans le domaine de la microscopie ont permis une avancée considérable dans ce domaine. L'équipe du professeur Peter Ogilby, à l'université d'Århus au Danemark, est spécialisée dans la mesure de l'oxygène singulet *in vitro*. Ils ont notamment démontré que la durée de vie de l'oxygène singulet dans une cellule est dépendante de la localisation de sa production (109). En effet, la nature du photosensibilisateur utilisé va directement influencer sur le lieu de la production d'oxygène singulet, et l'étude des temps de vie de l'oxygène singulet en fonction de sa localisation donne une idée de l'hétérogénéité d'une cellule (110).

L'équipe du professeur Brian Wilson, à l'Université de Toronto au Canada, a, pour sa part, réussi à mettre en œuvre une instrumentation capable de détecter l'oxygène singulet *in vitro* dans un milieu biologique réel, c'est-à-dire sans remplacer l'eau par de l'eau lourde (111, 112). Ces expériences, réalisées en utilisant la PpIX avec les lignées cellulaires AML5 et P388, permettent aux auteurs de l'étude de corrélérer la mort cellulaire à la quantité d'oxygène singulet produite, rendant leur système le premier instrument dosimétrique en PDT *in vitro*.

1.5.1.c. In vivo

L'équipe du Pr Brian Wilson a utilisé ce même système pour prouver la faisabilité de la dosimétrie de l'oxygène singulet *in vitro* et *in vivo*. Leur microscope est donc le premier permettant une image 1 cm x 1 cm de répartition de $^1\text{O}_2$ avec une résolution de 1 mm. Les détails de l'instrumentation sont présentés dans leur publication (111).

1.5.2. Mesure indirecte

Les mesures indirectes de l'oxygène singulet sont basées sur l'utilisation de molécules « relais » dont les propriétés photophysiques vont changer après action chimique de $^1\text{O}_2$ $^1\Delta_g$ sur la molécule. Ces molécules sont appelées des *sondes chimiques* et quelques unes ont été présentées en partie I.4.1. Notons toutefois que peu de ces sondes sont exclusivement sensibles à l'oxygène singulet, un artefact courant est la transformation de ces molécules par les espèces réactives de l'oxygène.

Une liste non exhaustive peut être faite en regroupant les sondes selon leurs trois principaux modes de fonctionnement.

1.5.2.a. Sondes dont les propriétés d'absorption varient avec la formation d'oxygène singulet

- acide 9,10-anthracènediyl-bis-(méthylène)dimalonique (ADMDMA) (113)
- acide 9,10-anthracènedipropionique disodique (ADPA) (114)
- acide 9-anthracènepropionique (APA) (114, 115)
- ditaurate de bilirubine (BDT) (116)
- 9,10-diphénylanthracène (DPA) (117)
- 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) (116)
- N,N-diméthyl-4-nitrosoaniline (RNO) en présence d'imidazole (116)

1.5.2.b. Sondes dont les propriétés de fluorescence varient avec la formation d'oxygène singulet

- acide 9,10-anthracènedipropionique disodique (ADPA) (114, 118)

- 3'-*p*-(aminophényl)fluorescéine (APF) et 3'-*p*-(hydroxyphényl)fluorescéine (HPF) (119)
- *bis*(2,2'-biphénylène) (BPE) (120)
- 9,10-diméthylantracène (DMA) (121)
- 9-[2-(3-carboxy-9,10-diméthyl)anthryl]-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one (DMAX) (121)
- 9-[2-(3-carboxy-9,10-diphényl)anthryl]-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one (DPAX) (121)
- 3,7-dihydro-6-[4[2[N'-(5-fluorescéinyl)thiouréido]éthoxy]phényl]-2-méthylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one (FCLA) (122)
- luminol (123)
- *trans*-1-(2'méthoxyvinyl)pyrène (*t*-MVP) (124–126)
- Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) en solution et *in vivo* (127)

1.5.2.c. Sondes détectables par ESR/EPR

L'ESR est l'*Electron Spin Resonance* et l'EPR est l'*Electron Paramagnetic Resonance*. L'oxygène singulet peut être détecté à l'aide de ces deux méthodes grâce au radical nitroxyde formé en utilisant la 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridone (TEMP) (128, 129) montré figure 2-36.

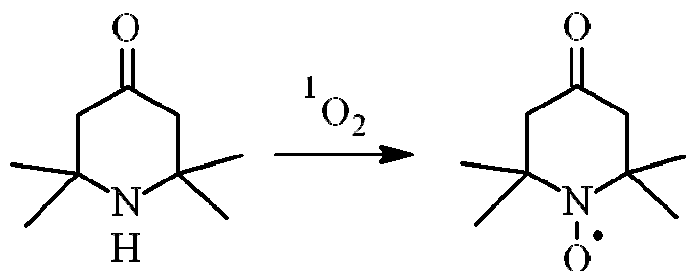


Figure 2-36 : Réaction de la TEMP avec l'oxygène singulet.

II. Généralités sur les Molecular Beacons

La recherche sur les *molecular beacons* est relativement récente. Les premières applications ont été tournées assez naturellement vers l'utilisation de chromophores pour l'imagerie et ce n'est que plus tard que le concept de *molecular beacon* appliqué au traitement a vu le jour. Ces composés sont alors appelés « *Photodynamic Molecular Beacons* », ou encore « *killer beacons* ». Le terme en lui-même n'a pas encore eu le temps de trouver une bonne adaptation en français, une traduction hâtive, mot pour mot, donnerait « balise moléculaire » ou encore « phare moléculaire photodynamique ». « *Beacon* » veut en effet dire « phare », mais dans le sens d'une lumière donnant un signal, une alarme, un guide dans le noir.

Les *molecular beacons* sont des constructions moléculaires dont l'élaboration et l'étude nécessitent une réflexion pluridisciplinaire car elles sont à l'interface chimie / photophysique / biologie. En effet, le rationnel de base qui a conduit à imaginer et élaborer ces molécules est de pouvoir observer une cible biologique précise grâce à une modulation de fluorescence. Grâce à une connaissance de plus en plus pointue en biologie et un grand panel de fluorophores, de nombreuses applications ont émergé et continuent encore. De la mesure de distances à l'intérieur d'une cellule à la localisation de protéines, les *molecular beacons* offrent un énorme éventail de possible qui sera discuté dans cette partie.

II.1. Présentation générale

II.1.1. Principe structural

Les *molecular beacons* sont des constructions moléculaires caractérisées par un changement de propriétés photophysiques après activation par une cible biologique. Il est classiquement composé d'un accepteur A et d'un donneur D, reliés par un lien sensible à un stimulus endogène. A l'état initial, l'accepteur et le donneur sont maintenus suffisamment proches pour permettre un transfert d'énergie et ainsi empêcher les propriétés photophysiques de D de s'exprimer (figure 2-37).

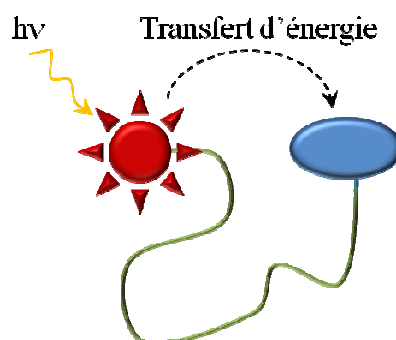


Figure 2-37 : Schéma simplifié d'un molecular beacon, composé d'un donneur et d'un accepteur, à l'état initial.

En présence d'une cible biologique/thérapeutique, le lien peut soit prendre une conformation telle que A soit distant de D, soit être clivé pour séparer A de D, tout cela dans le but de permettre la restauration des propriétés spectrales de D.

En imagerie, les *molecular beacons* sont composés d'une paire de fluorophores. Sous irradiation lumineuse dans la zone d'absorption de D, l'énergie est transférée à A qui est donc seul à fluorescer, mais en présence de la cible biologique, le transfert d'énergie n'est plus possible et D peut fluorescer. En thérapie, le même principe peut être appliqué en utilisant un photosensibilisateur (PS) et un *quencher* (Q). On parle alors de *Photodynamic Molecular Beacon*. En *quenchant* l'état excité du PS, la production d'oxygène singulet est inhibée et le PMB ne peut être toxique, même en présence de lumière. Les propriétés cytotoxiques du PS sont ainsi restaurées après activation en présence de la cible thérapeutique (figure 2-31). Les PMB sont ainsi des « prodrogues photodynamiques » car leur activité n'est révélée que lors de sa rencontre avec la biomolécule visée.

Dans la littérature, deux principaux types de structures ont été utilisés : la structure linéaire et la structure en tige-boucle (ou épingle à cheveux).

La structure « linéaire » est présentée figure 2-38 avec PS et *quencher* de chaque côté d'un peptide ou d'un oligonucléotide. Cette structure va, le plus souvent, être clivée afin de séparer le PS de son *quencher*.

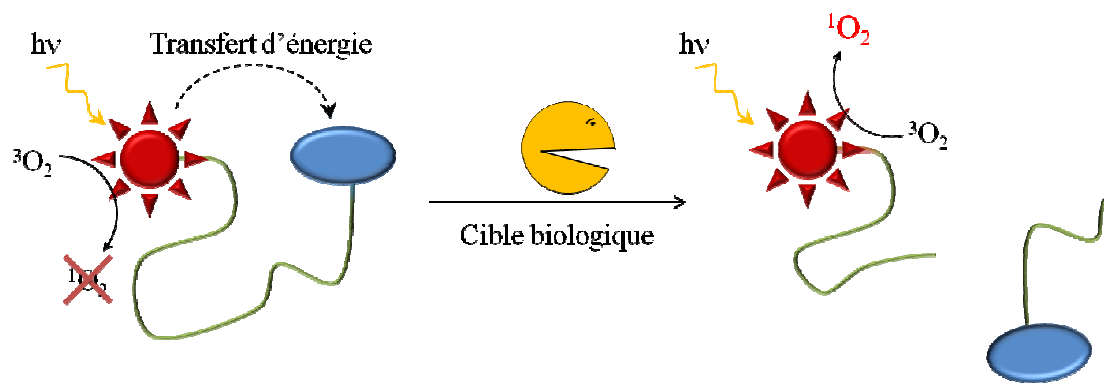


Figure 2-38 : Cas général de l'activation d'un PMB linéaire en présence d'une cible thérapeutique.

La structure en épingle à cheveux vient de la structure d'acides nucléiques, retrouvée dans l'ARN par exemple, où la partie centrale est constituée de séquences de bases complémentaires (figure 2-39). Après hybridation, la structure en épingle à cheveux s'ouvre et sépare le donneur de l'accepteur.

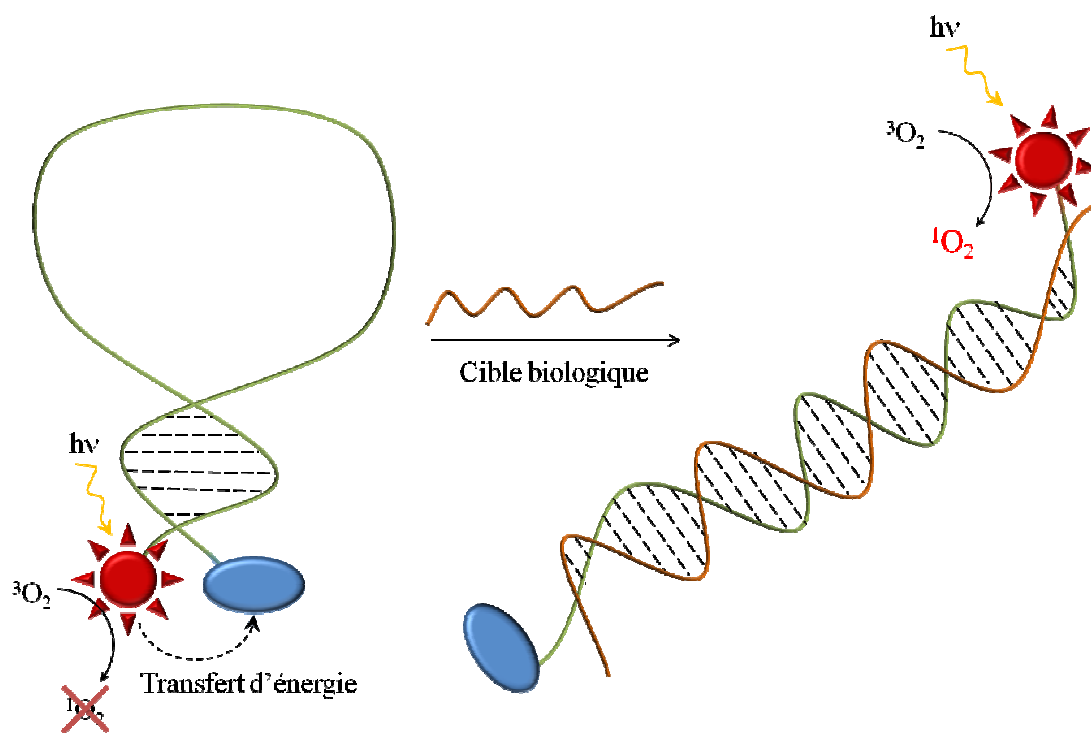


Figure 2-39 : Cas général de l'activation d'un PMB en épingle à cheveux en présence d'une cible thérapeutique.

II.1.2. Applications des molecular beacons

La spécificité d'un *molecular beacon* tient dans la séquence de son lien, c'est donc lui qui va en diriger l'application. Les applications des *molecular beacons* sont aujourd'hui nombreuses et ne cessent de se diversifier, mais ils ont longtemps été utilisés pour l'imagerie, notamment de l'ADN et de l'ARN. Le premier modèle de *molecular beacon* a été proposé par Tyagi et Kramer en 1996 (130).

II.1.2.a. Applications en imagerie

L'utilisation de *molecular beacon* a considérablement changé le domaine de « marquage de biomolécules ». De nombreuses études ont utilisé l'hybridation spécifique des brins d'ADN ou d'ARN pour pouvoir observer l'évolution, la présence ou la localisation du brin complémentaire ciblé, grâce à des *molecular beacons*. On les retrouve dans les applications suivantes :

- La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel (130, 131), où chaque nouveau brin d'ADN ou d'ARN produit amplifie le signal du PMB.
- L'analyse génétique, notamment dans la détection et l'identification d'une erreur dans une séquence d'oligonucléotides. La très grande affinité entre la séquence du *beacon* et celle du brin ciblé rend la moindre erreur détectable (131–133).
- Les « *DNA biosensors* » (134–137).
- Les interactions protéine – ADN (138). Heyduk et Heyduk ont utilisé cette technique pour identifier la protéine p53 (139), impliquée dans le développement de nombreux cancers.
- La détection de l'ARN *in vivo* (140–142).
- La détection d'enzymes.

Parmi ces enzymes, notre équipe s'intéresse tout particulièrement à la famille d'endopeptidases surexprimées pendant la néo-angiogenèse : les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces enzymes ont suscité l'intérêt des chercheurs depuis longtemps et plusieurs équipes ont eu recours à l'utilisation de *molecular beacons* pour étudier leur localisation et leur implication dans les processus biologiques (143–147).

L'équipe de Ralph Weissleder a été la première à réaliser l'imagerie des MMPs en utilisant un *beacon* (143) constitué d'un squelette de polylysine sur lequel est greffé un peptide substrat des MMPs et un fluorophore (figure 2-40). Le fluorophore utilisé est une fluorescéine : la FITC (fluorescéine isothiocyanate) et le peptide est substrat de la MMP-2 : *GPLGVRGKC*, où le site de reconnaissance est indiqué en italique et le site de clivage se situe entre Gly et Val (148).

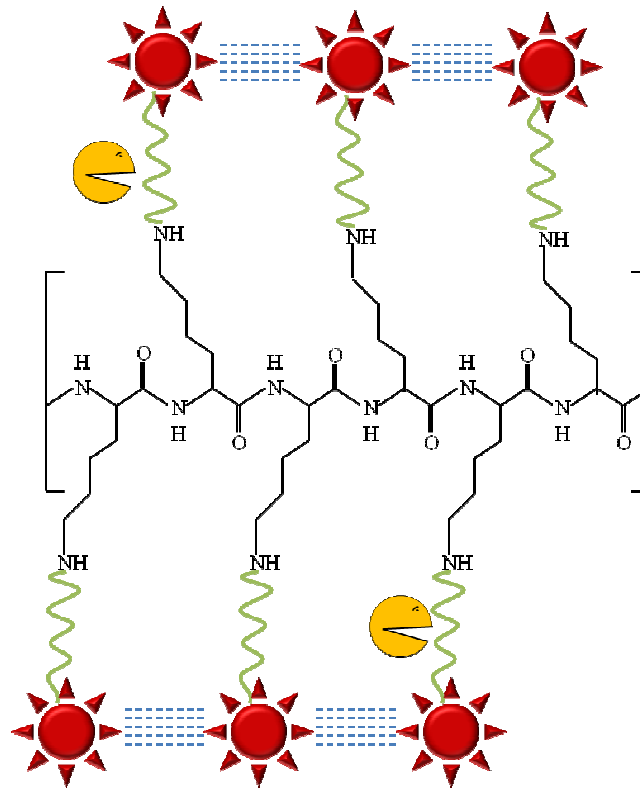


Figure 2-40 : Schéma du molecular beacon ciblant les MMP-2 et MMP-9. Sur le squelette de polylysine est attaché le peptide GPLGVRGKC (en vert). Sur la lysine du peptide est greffé le fluorophore FITC (en rouge).

Les fluorophores sont suffisamment proches les uns des autres pour s'« auto-quencher », ce n'est qu'après clivage du peptide par la MMP-2 que les fluorophores sont libérés et peuvent retrouver leur fluorescence.

Cette stratégie a été reprise en 2005 par Chen (144) utilisant cette fois le peptide SGKPRQITA, substrat des MMP-2 et MMP-9 (149).

Par la suite, d'autres stratégies ont ciblé les MMPs utilisant un *molecular beacon* : Cy5.5 – *GPLGVRGK(BHQ-3)GG* – R, où le fluorophore est la Cyanine 5.5 (Cy5.5), *quenché*

par le Black Hole Quencher (BHQ-3) et *R* représente une fonction particulière à la stratégie : du chitosan immobilisé sur une surface pour « kit MMP » (147), une nanoparticule (150), des fonctions polyéthylène glycol (145) ou un RGD cyclique (146). Notons néanmoins que le peptide utilisé n'est pas spécifique des MMP-2 et MMP-9, car il est aussi utilisé pour observer la MMP-13 (145).

L'équipe du professeur Gang Zheng, de l'Université de Toronto, a développé un *molecular beacon* ciblant la MMP-7. Ce *beacon* est composé d'un photosensibilisateur (Pyropheophorbide-a) et d'un quencher (BHQ-3) reliés par un peptide substrat de la MMP-7 : GPLGLARK. Le pyropheophorbide pouvant fluorescer, ce PMB est donc à la fois utile pour la détection de la MMP-7 et pour la destruction des cellules tumorales. Son étudiante, Tracy Liu, a d'ailleurs utilisé les capacités fluorescentes de ce PMB pour la détection des métastases dans la colonne vertébrale issues du cancer du sein (151). Ce *beacon* pourra être utilisé par la suite pour détruire ces métastases et remplir sa double fonction. Notons toutefois que le peptide est également clivé par les MMP-10 et MMP-12.

II.1.2.b. Applications en PDT

Les *molecular beacons* en PDT sont appelés *photodynamic molecular beacons*, ou encore *killer beacons*. Cette partie sera traitée en détail dans la 3^e partie de ce chapitre.

II.1.3. Avantages et inconvénients des *molecular beacons* pour la PDT

Les PMB ont comme avantage certain d'être inactif dans les zones non ciblées, c'est-à-dire que contrairement aux autres médicaments utilisés en PDT, l'exposition à la lumière d'un PMB non activé par « sa » biomolécule n'a aucun effet sur sa toxicité. En bref, un patient traité par PDT utilisant un PMB ne devrait pas souffrir des maux de Meyer-Betz et accepter la lumière extérieure pendant et après le traitement le traitement.

Cet avantage n'est bien entendu réel que pour un PMB « idéal », c'est-à-dire ayant 100% de *quenching* dans sa forme intègre et que la biomolécule visée n'est exprimée qu'à l'endroit ciblé. Une trop grande susceptibilité du lien au moindre clivage (ou à la moindre dénaturation) en ferait un PS de seconde génération uniquement.

Quelles sont donc les principales qualités qu'un PMB doit posséder ? Par analogie, il s'agirait des mêmes qualités qu'un bon photosensibilisateur doit posséder pour la PDT, c'est-à-dire une bonne reproductibilité de synthèse, pouvoir absorber aux grandes longueurs d'onde

pour éviter l'absorption des tissus, que son/ses état(s) excité(s) générant l'oxygène singulet aient une grande durée de vie (ou autrement dit, des Φ_{Δ} et S_{Δ} importants), être éliminé de l'organisme rapidement après son action, être soluble dans les fluides corporels. Deux caractéristiques se trouvent néanmoins changées :

- Un PMB ne doit être toxique ni en absence ni en présence de lumière, c'est-à-dire qu'il ne doit pas posséder une toxicité en lui-même, ni sous irradiation lumineuse,
- Avoir un *lien* le plus sélectif possible d'une cible donnée.

La toxicité en absence ou en présence de lumière vient directement de la capacité du couple de fluorophores à transférer 100% de l'énergie.

Les cibles biologiques spécifiques des tumeurs (ou autres maladies) font l'objet de nombreuses études et déjà d'innombrables stratégies ont vu le jour ces dernières années. L'intérêt principal des PMB est qu'il n'est phototoxique que dans la zone ciblée, c'est-à-dire que sa sélectivité doit être optimale. Le lien du PMB, qui gère les composantes « où » et « comment » se fait l'activation du PS, tend donc à être de plus en plus spécifique. Plus la connaissance de la biologie tumorale sera importante, plus la spécificité des PMB sera accrue.

II.2. Principe photophysique

Pour la PDT, il y a différentes façons d'inhiber l'action de l'oxygène singulet sur les tissus non ciblés : empêcher sa formation par *quenching* du PS ou l'inhiber directement (figure 2-41).

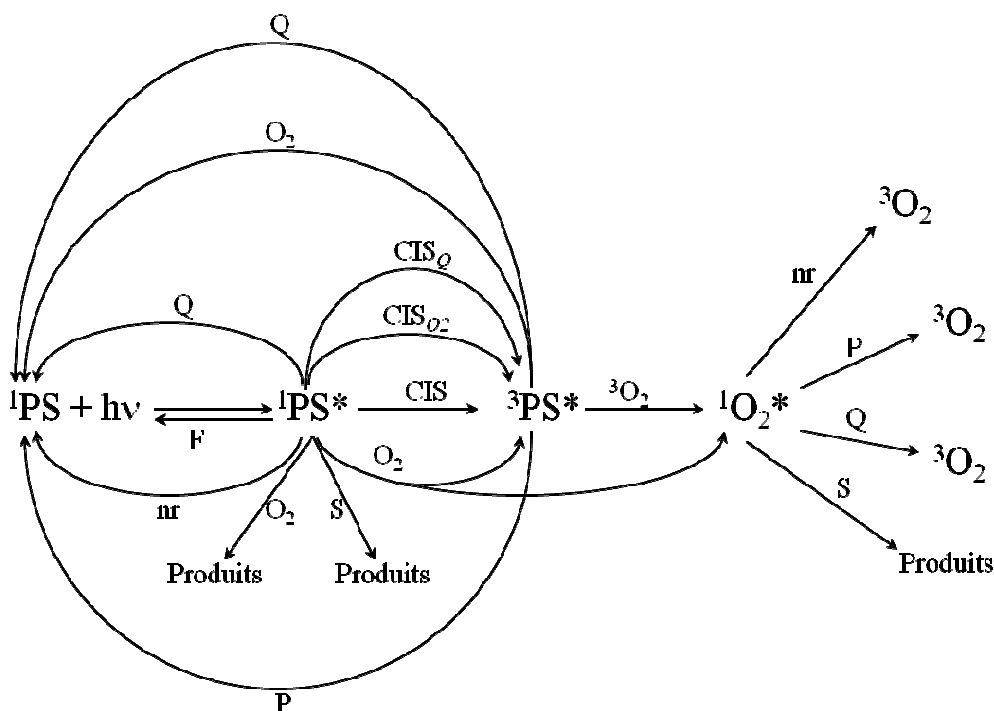


Figure 2-41 : Schéma de la formation de l'oxygène singulet de manière sensibilisée et quenching des états excités. *F* = fluorescence ; *P* = phosphorescence ; *nr* = désactivation non-radiative ; *Q* = quencher physique ; *O₂* = dioxygène ; *S* = substrat.

L'inhibition directe, physique, de l'oxygène singulet peut être effectuée par des composés tels que nous l'avons vu précédemment (partie I.4.2 du chapitre). Néanmoins, ces composés ont souvent une double réactivité vis-à-vis de l'oxygène, et s'il est très intéressant de pouvoir *quencher* $^1\Delta_g$ de manière physique, il n'en est pas de même du *quenching* chimique. En effet, le *quencher* chimique réagira une seule fois avec 1O_2 et, sitôt dégradé, il ne pourra plus assurer son rôle d'accepteur par la suite. Cette stratégie de « *quencher* à usage unique » ne peut donc pas être utilisée pour un PMB. De plus, la probabilité de *quenching* devient moindre si elle est seulement gérée par un facteur diffusionnel. En ne *quenchant* que l'oxygène singulet, qui est un *quenching* collisionnel (voir ci-après), seules les molécules de 1O_2 qui rentrent en contact avec le *quencher* seront désactivées, ce qui serait un frein à son efficacité. C'est pourquoi les PMB sont le plus souvent composés d'un PS et de son inhibiteur d'état excité.

Deux stratégies sont alors possibles : *quencher* l'état singulet ou l'état triplet du PS (figure 2-42). Plus généralement, il s'agit d'empêcher la formation d'un état triplet conduisant à la formation d'oxygène singulet.

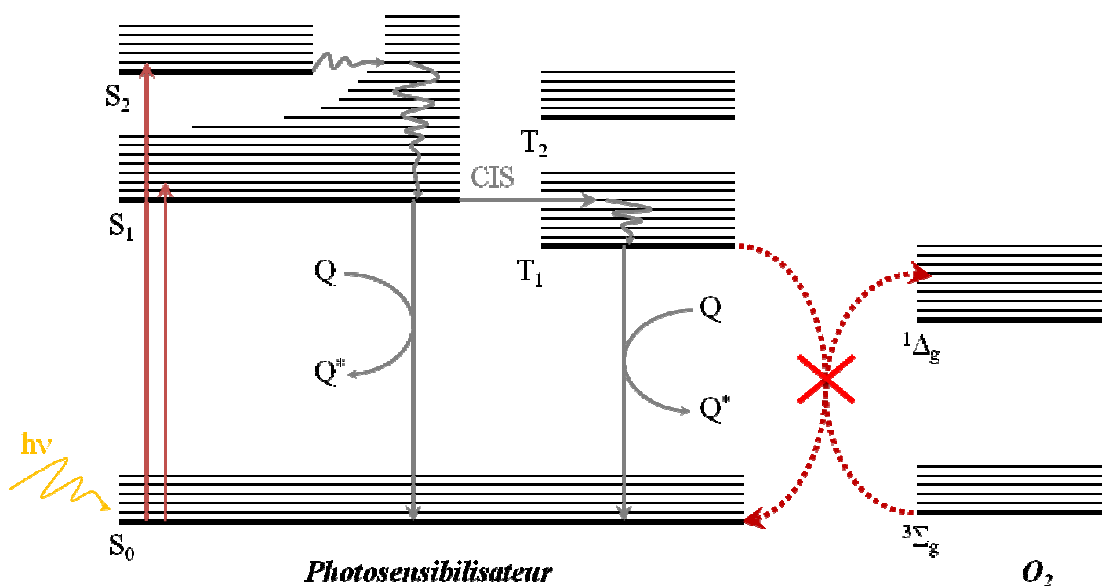


Figure 2-42 : Schéma de quenching des états excités d'un photosensibilisateur par un quencher physique.

Il existe deux grands modes de désactivation d'une molécule photophysiquement active : le *quenching* collisionnel et le FRET.

II.2.1. Le quenching collisionnel

Le transfert d'énergie par *quenching* collisionnel implique que le fluorophore (ou photosensibilisateur) et son *quencher* soient en contact pour permettre un échange. Ce contact est dû à un processus diffusif, on parle alors de *quenching* dynamique, ou à la formation d'un complexe, on parle alors de *quenching* statique.

Le *quenching* dynamique est illustré figure 2-43 où le photosensibilisateur PS est excité et se désexcite après collision avec le *quencher* Q. Q se désexcite selon son propre mode de désexcitation et les deux molécules reviennent à leur état fondamental.

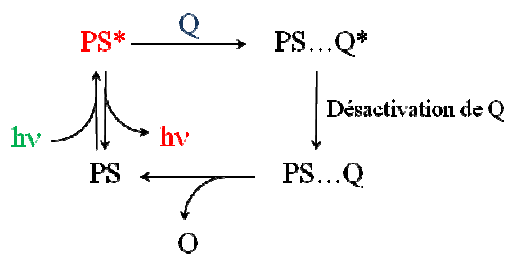


Figure 2-43 : Schéma du quenching dynamique.

Le *quenching* statique, quant à lui, est défini par formation d'un complexe, se formant à l'état fondamental ou excité du PS, qui se désexcite de manière généralement non fluorescente. La figure 2-44 illustre le cas d'un complexe se formant à l'état excité.

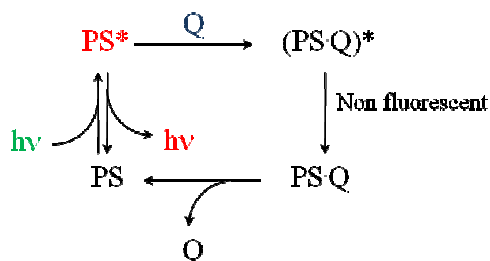


Figure 2-44 : Schéma du quenching statique formé à l'état excité du PS.

Une grande proximité est alors nécessaire pour observer ce transfert d'énergie, elle est sensible à tout ce qui peut limiter la diffusion : nature du solvant, température, encombrement stérique des molécules ou encore interaction de charges.

Le *quenching* est « décrit » par l'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

où F_0 et F sont les intensités observées (de fluorescence par exemple) sans *quencher* et en présence de *quencher* respectivement, K_D est la constante de Stern-Volmer $K_D = k_q \tau_0$, k_q est la constante de *quenching* bimoléculaire, τ_0 la durée de vie du fluorophore en absence de *quencher* et $[Q]$ la concentration en *quencher*.

Plusieurs mécanismes sont possibles pour ce type de *quenching* : le *quenching* par échange d'électron, ou mécanisme de Dexter, et le transfert d'électron photoinduit.

Dans le mécanisme de Dexter (152, 153), un électron est transféré de la LUMO du donneur vers celle de l'accepteur, puis il y a transfert « compensatoire » de la HOMO de l'accepteur vers la HOMO du donneur, comme illustré figure 2-45.

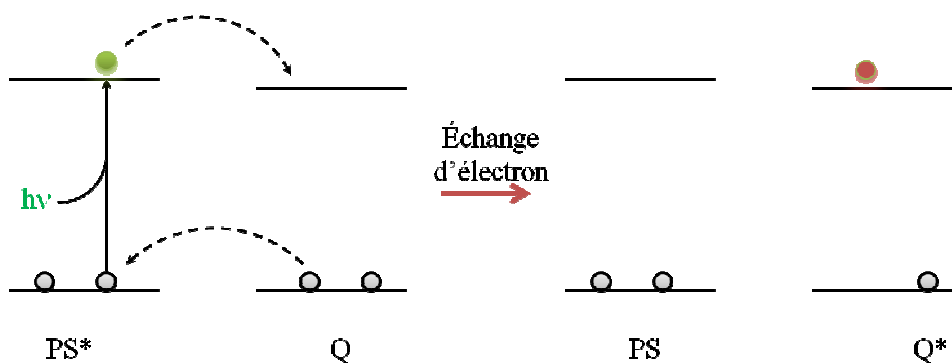


Figure 2-45 : Schéma du mécanisme concerté de Dexter.

Dans le transfert d'électron photoinduit (TEP), un complexe se forme entre le donneur et l'accepteur par échange d'un électron pour former PS^+Q^- (figure 2-46). Ce transfert de charge peut retourner à l'état fondamental sans émission de photon, ou avec l'émission d'un photon dû à l'exciplexe formé (153). Finalement, l'électron excédentaire retourne au donneur d'électron.

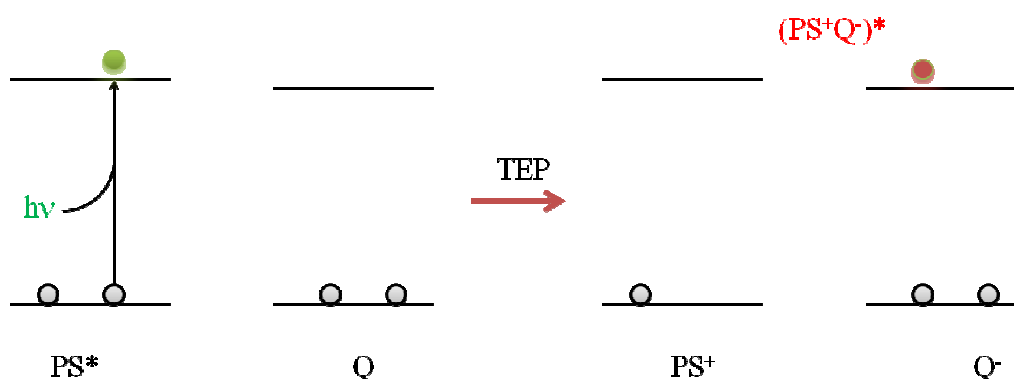


Figure 2-46 : Schéma du transfert d'électron photoinduit.

II.2.2. Le quenching par FRET

Le *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) est un transfert d'énergie à longue distance entre un donneur et un accepteur (ou *quencher*). Cette théorie a été développée par Jean Perrin, puis Theodor Förster (154) dont il garde le nom. Ce processus est exclusivement un transfert d'énergie, sans émission de photon, et intervient à partir du moment où le spectre d'émission du donneur recoupe la zone d'absorption de l'accepteur, comme illustré figure 2-47.

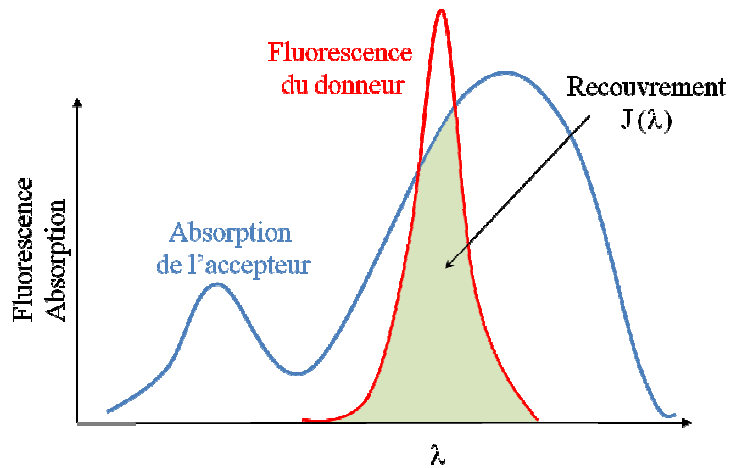


Figure 2-47 : Recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.

Le transfert est dû à une interaction dipôle – dipôle, où l'énergie est transmise de manière non-radiative du donneur vers l'accepteur, sur des distances pouvant aller de 10 à 100 Å (figure 2-48). Ce transfert concerne les états singulets excités S_1 , il ne sera donc question que de modulation de fluorescence pour la description du phénomène, mais il concerne également, de manière indirecte, la production d'état triplet et donc d'oxygène singulet (cf. figures 2-34 et 2-35).

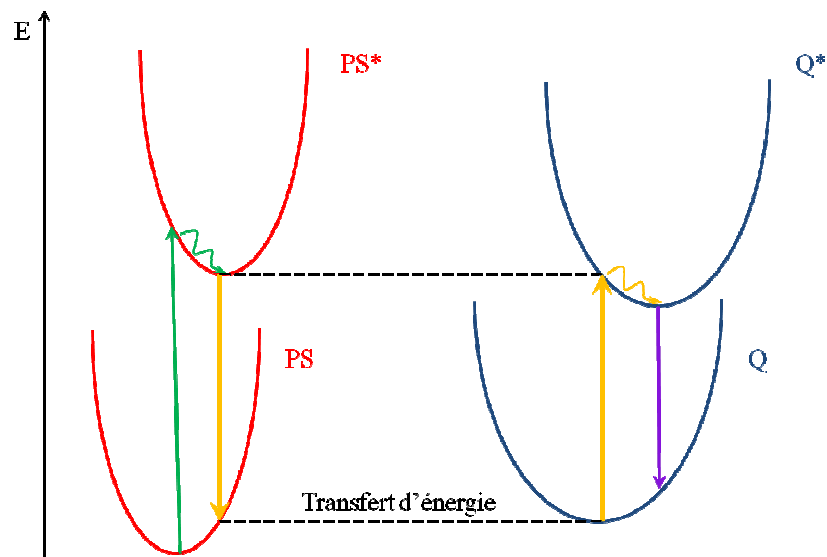


Figure 2-48 : Diagramme de Jablonski simplifié d'un transfert d'énergie par résonance.

La qualité du transfert est dépendante de plusieurs facteurs : le recouvrement spectral $J(\lambda)$ entre le donneur et l'accepteur, le rendement quantique de fluorescence du donneur, l'orientation relative des dipôles de transition et la distance entre le donneur et l'accepteur.

D'un point de vue « distances », la constante de transfert d'énergie k_T est donnée par :

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_{PS}} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

où τ_{PS} est le temps de vie de fluorescence du donneur en absence d'accepteur, R_0 est la distance de Förster, qui correspond à la distance à laquelle le transfert est efficace à 50%, et r est la distance entre PS et Q. Il en découle que la qualité du FRET dépend fortement de la distance (r^{-6}). Si l'on définit l'efficacité η du transfert comme la fraction de photons absorbés par le donneur et transférée à l'accepteur, cette fraction peut être définie comme :

$$\eta = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Cette équation montre la forte influence de la distance entre PS et Q, comme l'illustre la figure 2-49.

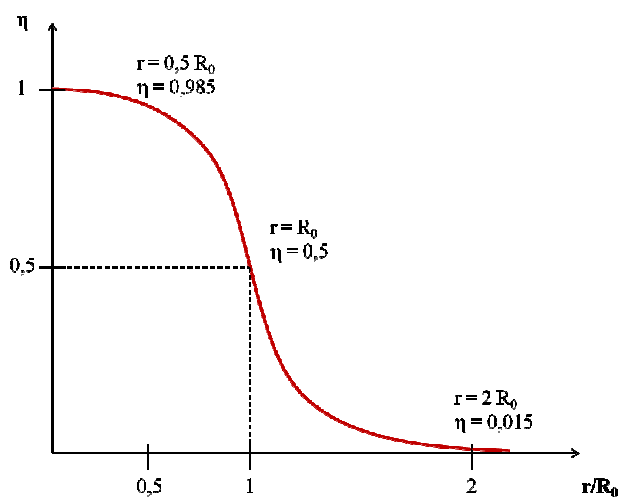


Figure 2-49 : Dépendance de l'efficacité du transfert d'énergie par rapport à la distance.

La constante de transfert d'énergie n'est pas uniquement dépendante de la distance PS – Q et peut également s'exprimer en fonction des paramètres décrits plus haut. Celle-ci est donnée par :

$$k_R(r) = \frac{\Phi_{PS}\kappa^2}{\tau_{PS}r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_{PS}(\lambda)\varepsilon_Q(\lambda)\lambda^4 .d\lambda$$

$$\text{d'où, } R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\Phi_{PS}\kappa^2}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_{PS}(\lambda)\varepsilon_Q(\lambda)\lambda^4 .d\lambda$$

où Φ_{PS} est le rendement quantique de fluorescence du donneur en absence d'accepteur, τ_{PS} le temps de vie (S_1) du donneur en absence d'accepteur, r la distance PS – Q, N le nombre d'Avogadro et n l'indice de réfraction du milieu. $F_{PS}(\lambda)$ est l'intensité de fluorescence corrigée du donneur dans l'espace $\lambda+\Delta\lambda$ avec l'intensité totale (aire sous la courbe), normalisée à l'unité. $\varepsilon_Q(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur Q à la longueur d'onde λ . Le terme κ^2 est un facteur représentant l'orientation relative dans l'espace des dipôles de transition du donneur et de l'accepteur, usuellement défini comme valant 2/3.

Le terme en intégrale n'est en fait que le recouvrement spectral $J(\lambda)$:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_{PS}(\lambda)\varepsilon_Q(\lambda)\lambda^4 .d\lambda$$

Ainsi, pour les *molecular beacons* fonctionnant par FRET, les fluorophores seront choisis en fonction de leurs longueurs d'onde d'émission et d'absorption.

II.2.3. Choisir le bon couple de fluorophores

Le choix du couple de fluorophores est la question centrale pour des applications en biochimie, et à plus forte raison en PDT.

Avant toutes choses, un couple de fluorophores fonctionnant par FRET ou par *quenching* collisionnel n'aura pas les mêmes propriétés. La résolution spatiale joue ici un rôle déterminant. Nous l'avons dit précédemment, le *quenching* collisionnel implique une « collision » (ou tout du moins une grande proximité) entre le donneur et l'accepteur, alors que le FRET se fait à des distances allant jusqu'à 100 Å. Or, dans un *molecular beacon*, la

distance entre les fluorophores n'est pas toujours maîtrisée. Le *quenching* par contact sera contrôlé par la diffusion, ou la formation de complexes, et n'est donc pas très compatible avec une structure rigide qui dicte la distance donneur – accepteur. Le FRET, dont R_0 est de l'ordre de plusieurs dizaines d'angströms, est beaucoup plus indiqué dans ce cas-là (figure 2-50).

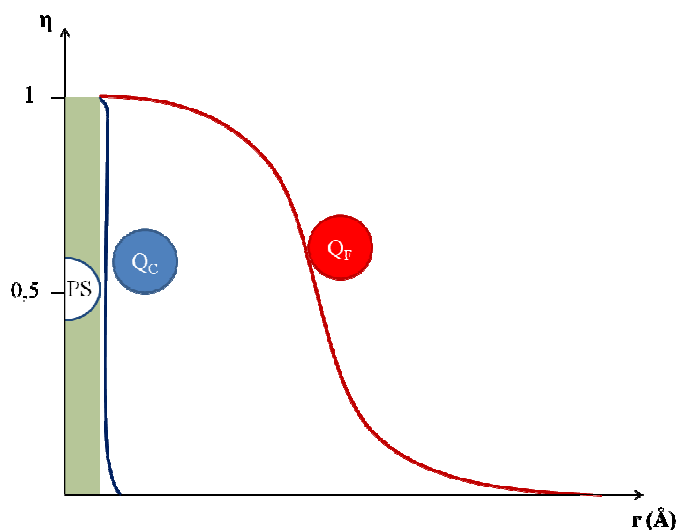


Figure 2-50 : Schéma de comparaison entre l'efficacité η du FRET (en rouge) et du quenching collisionnel (en bleu) en fonction de la distance de Q_F et Q_C par rapport au PS.

En imagerie, nous venons de le dire, le couple donneur / accepteur est défini en fonction de sa gamme spectrale. Les *molecular beacons* appliqués à l'imagerie sont généralement deux fluorophores émettant à des longueurs d'onde bien distinctes afin de pouvoir différencier aisément celui qui a atteint sa cible de celui qui ne l'a pas atteint. De plus, le donneur doit absolument émettre dans la zone d'absorption de l'accepteur. Cela suppose de grands déplacements de Stokes (plusieurs dizaines de nanomètres) à la fois de la part du donneur que de la part de l'accepteur.

Pour la PDT, dont le but est d'inhiber la production d'oxygène singulet, il n'est donc pas nécessaire que le PS fluoresce à l'état intègre. Un *quencher* non fluorescent ou la formation d'un complexe (à l'état fondamental ou excité) peut être utilisé en PDT. Néanmoins, il est nécessaire que la grande majorité de l'énergie soit transmise au *quencher*, ce qui implique soit une distance de 10 à 100 \AA dans le cas du FRET, soit la formation de complexes. En effet, de la qualité du transfert d'énergie va dépendre la quantité d'oxygène singulet produite à l'état intègre, soit la toxicité du *beacon* même. L'équipe du professeur

Gang Zheng, de l'Université de Toronto, a dans un premier temps développé un PMB utilisant les propriétés de *quenching* du PS et de l'oxygène singulet d'un dérivé caroténoïde. Le manque de stabilité de ce genre de composé les a amenés à utiliser les quenchers d'état singulet nommés *Black Hole Quenchers* ou *Dark Quenchers*. Cette partie sera discutée dans le chapitre III.

III. Régulation de la production d'oxygène singulet en PDT

L'oxygène singulet et les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle primordial en PDT. Quel que soit le mécanisme impliqué dans l'effet photodynamique d'un médicament pour la PDT (type I / type II), il est nécessaire de pouvoir contrôler l'endroit de l'activation. Pour cela, les *molecular beacons*, décrits précédemment, sont de puissants outils car leur activation dépend d'une cible biologique la plus spécifique possible.

De nombreuses stratégies d'activation de PS ont été développées, utilisant toutes les caractéristiques spécifiques d'une tumeur cancéreuse : pH acide, néo-vascularisation, surexpression de certains récepteurs, de certaines enzymes ou encore des transporteurs de glucose. Tous ces facteurs peuvent entrer en compte dans l'élaboration d'une stratégie anticancéreuse ciblée, et peuvent être utilisés dans le but de réguler la production d'oxygène singulet en PDT.

III.1. Notre revue: Modulation of Photosensitization Processes for an Improved Targeted Photodynamic Therapy (*Curr. Med. Chem.*, 2010)

La régulation de la production d'oxygène singulet appliquée à la PDT a fait l'objet d'une revue écrite par notre équipe, publiée dans *Current Medicinal Chemistry* en 2010 (155). Cette revue est disponible en annexe.

III.2. Avancées récentes

III.2.1. Régulation passive de l'oxygène singulet

III.2.1.a. En utilisant le pH acide de la tumeur

Une équipe coréenne a reporté l'utilisation de micelles, dont la tenue est dépendante du pH, contenant des photosensibilisateurs pour une utilisation en PDT (156). Ces travaux

font suite à de précédentes études dans lesquelles une micelle polymère MPEG poly-(acides β -aminés) peut se décomposer en milieu acide (157, 158). Utilisant ce principe, la micelle a été chargée avec un photosensibilisateur, la protoporphyrine IX (PpIX). Dans son état intègre, les PS à l'intérieur de la micelle s'agrègent, inhibant la fluorescence et la production d'oxygène singulet. Suite à la dégradation de la micelle, la PpIX est relarguée dans le milieu et peut retrouver ses propriétés photophysiques (figure 2-51).

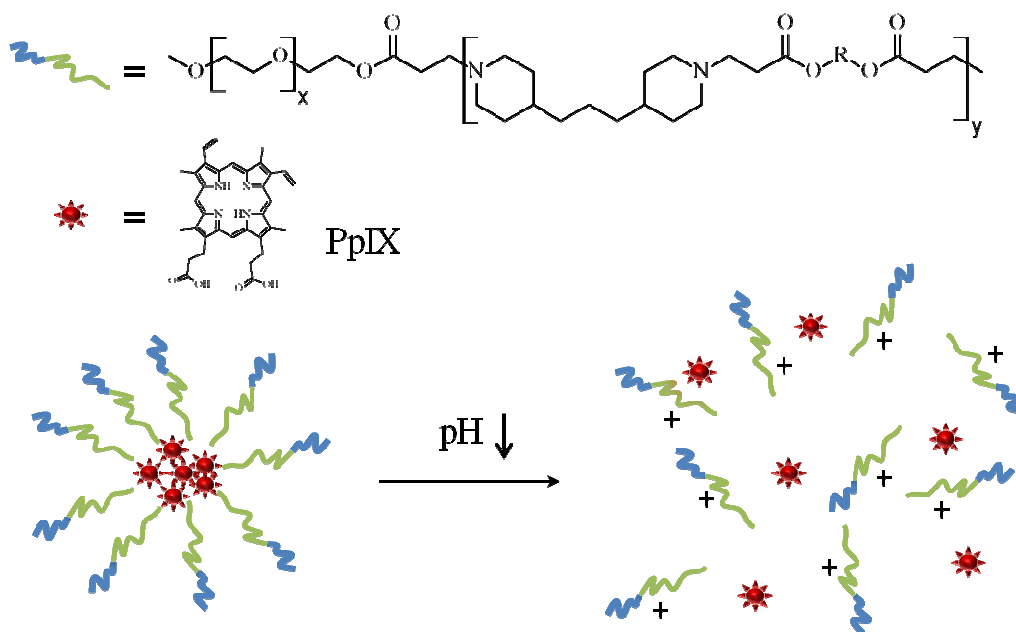


Figure 2-51 : Schéma de la micelle polymère MPEG poly-(acides β -aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide.

Ces micelles, de 122 nm de diamètre en moyenne, ont un pourcentage de relargage de PpIX de 23% à pH = 7,3 pendant un jour. En milieu acide (pH = 6,4), 60% de relargage est observé en 6 h. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont permis d'observer une accumulation de PpIX au niveau des cellules tumorales en raison de leur pH acide. Les tumeurs portées par des souris ont été significativement endommagées ou détruites.

III.2.1.b. En contrôlant l'agrégation et la désagrégation du PS

Plusieurs équipes ont reporté l'utilisation de nanoparticules dégradables chargées avec des photosensibilisateurs. Ces photosensibilisateurs sont couplés avec un polymère qui, en milieu aqueux, forme une nanoparticule. Les PS, emprisonnés dans la nanoparticule, s'agrègent et perdent leurs propriétés photophysiques. Après internalisation dans la cellule

cancéreuse, la nanoparticule se dégrade et libère les PS, retrouvant ainsi leur phototoxicité et leur fluorescence (figure 2-52). La sélectivité étant due à l'effet EPR.

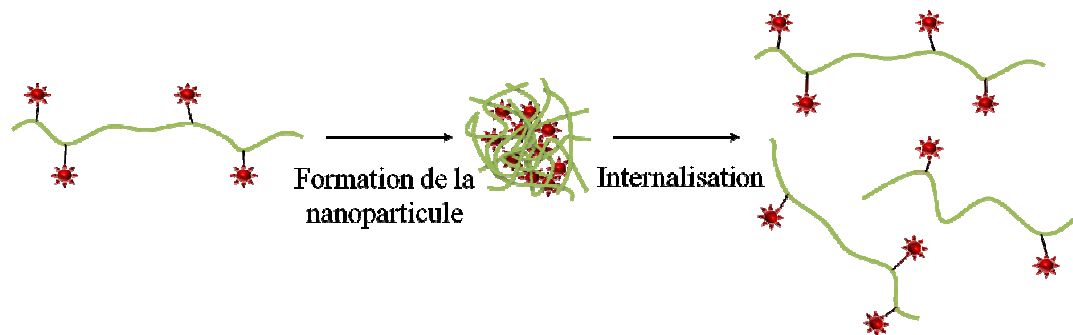


Figure 2-52 : Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables.

Une stratégie consiste en l'utilisation d'un polymère de glycol chitosane et de la PpIX comme PS (159). Ces molécules s'auto-assemblent dans l'eau pour former des nanoparticules de 280 nm où aucune formation d'oxygène singulet n'a été détectée (utilisation d'une sonde chimique : l'ADPA). Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés et les tumeurs portées par des souris ont montré un fort taux de nécrose avec une bonne sélectivité pour les cellules tumorales.

Une autre stratégie consiste en l'utilisation d'un polymère de sulfate de chondroïtine acétylée et de la chlorine e6 comme PS (160). Comme précédemment, ces molécules forment une nanoparticule en milieu aqueux, de taille d'environ 140 nm. Les propriétés photophysiques de la chlorine e6 sont ainsi inhibées dans la nanoparticule (utilisation d'une sonde chimique : le DMA) et retrouvent leur expression après internalisation dans les cellules cancéreuses. Des expériences ont été menées *in vitro* et *in vivo* pour la restauration de la fluorescence dans les cellules cancéreuses et l'imagerie de la tumeur, mais la cytotoxicité des conjugués n'a été testée que *in vitro* (cellules HeLa), où peu de différences dans l'efficacité PDT a été observé entre les nanoparticules et la chlorine e6 libre.

III.2.2. Régulation active de l'oxygène singulet

L'équipe du professeur Gang Zheng a continué depuis 2010 à développer ses *killer beacons*. Sur le principe du *zipper molecular beacon* développé par Chen *et al.* (161), consistant en une structure en épingle à cheveux avec la paire pyrophéophorbide-a et BHQ-3,

Lovell *et al.* ont amélioré la partie *quencher* et ont développé un « *super quencher* » (figure 2-53).

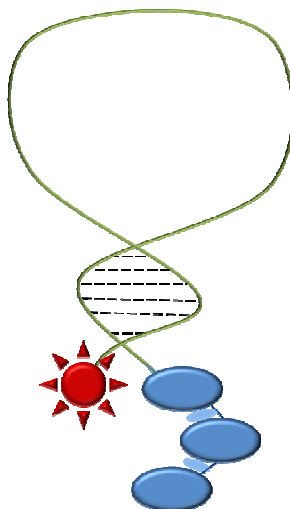


Figure 2-53 : Schéma du PMB « super quencher linéaire » dans lequel le PS est le Pyrophéophorbide-a, les quenchers sont les Black Berry Quenchers (BBQ) phosphoramidites.

Des *quenchers* (Black Berry Quencher) peuvent être mis de manière linéaire grâce à des liaisons phosphodiester. Cet assemblage permet au *beacon* d'avoir une diminution de fluorescence de 300 fois et une restauration de fluorescence de près de 90 fois. La production d'oxygène singulet du *beacon* fermé est décrite comme inférieure au seuil de détection de leur machine et réapparaît environ 80 s après introduction de la cible.

Récemment, il a été reporté la synthèse d'un nouveau *molecular beacon* utilisant une structure en épingle à cheveux ciblant l'ARNm de la survivine (162). Deux PMB ont été synthétisés dans cette étude, l'un comportant une chlorine e6 *quenchée* par le BHQ-3, l'autre comportant deux entités chlorine e6 se *quenchant* mutuellement à l'état intègre. La toxicité de ces PMB a été testée sur la lignée cellulaire SK-BR-3 où le PMB comportant les deux entités chlorine e6 a montré la plus grande efficacité PDT.

Enfin, une étude très récente utilise les propriétés de *quenching* de nanoparticules d'or pour inhiber la production d'oxygène singulet générée par le pyrophéophorbide a (163). Ce *molecular beacon* est activé par le clivage du peptide H-GPLGVRG-OH, séquence spécifique de la MMP-2 (figure 2-54).

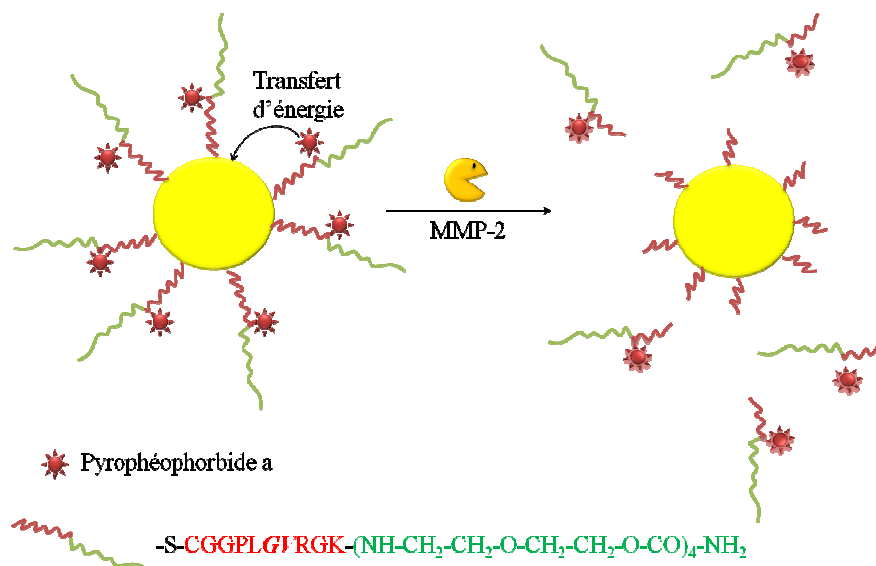


Figure 2-54 : Schéma du PMB utilisant le pyropheophorbide a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPLGVRGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique).

Le PMB obtenu est caractérisé par une inhibition efficace de la fluorescence ($\Phi_F = 0,004$) et de la production d'oxygène singulet ($\Phi_\Delta = 0,0089$) dans le PBS (la détection de l'oxygène singulet a été mesurée en présence de *Sensor Green*). Néanmoins, les auteurs stipulent que de l'agrégation du photosensibilisateur a été observé dans le PBS. L'incubation du PMB en présence de lignées cellulaires BT20 (n'exprimant pas MMP-2) et HT1080 (surexprimant MMP-2) a révélé une survie cellulaire *in vitro* de 63% et 16% respectivement. Les images de microscopie confocale révèlent de plus que la fluorescence du pyropheophorbide est restaurée dans la lignée cellulaire HT1080.

Références

1. Rahman, A.-ur-. (2000) Bioactive Natural Products. Elsevier.
2. Parrish, J. A., Fitzpatrick, T. B., Tanenbaum, L., et Pathak, M. A. (1974) Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. , *N. Engl. J. Med.* 291, 1207-1211.
3. von Tappeiner, H. (1900) Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. , *Munch. Med. Wochenschr.* 47, 5.
4. Raab, O. (1900) Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. , *Zeitschrift für Biologie* 39, 524-526.
5. von Tappeiner, H., et Jesionek, A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. , *Munch. Med. Wochenschr.* 47, 2042-2044.
6. Jesionek, A., et von Tappeiner, H. (1905) Zur behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffen. , *Arch. Klin. Med.* 82, 223.
7. Herzberg, G. (1934) Photography of infrared solar spectrum to wavelength 12,900Å. , *Nature (London)* 133, 759.
8. Mallet, L. (1927) Comptes Rendus Acad. Sci. Paris 185, 352.
9. Khan, A. U., et Kasha, M. (1963) Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. , *The Journal of Chemical Physics* 39, 2105-6.
10. Khan, A. U., et Kasha, M. (1964) Rotational Structure in the Chemiluminescence Spectrum of Molecular Oxygen in Aqueous Systems. , *Nature* 204, 241-243.
11. Khan, A. U., et Kasha, M. (1966) Physical Theory of Chemiluminescence in Systems Evolving Molecular Oxygen. , *J. Am. Chem. Soc.* 88, 1574-1576.
12. Mulliken, R. S. (1932) The Interpretation of Band Spectra Part III. Electron Quantum Numbers and States of Molecules and Their Atoms. , *Reviews of Modern Physics* 4, 1-86.
13. Kautsky, H., et Hirsch, A. (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. , *Die Naturwissenschaften* 19, 964.
14. Foote, C. S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. , *Science* 162, 963-970.
15. Foote, C. S., Chang, Y. C., et Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. , *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5216-5218.
16. Mulliken, R. S. (1928) Interpretation of the Atmospheric Oxygen Bands; Electronic Levels of the Oxygen Molecule. , *Nature* 122, 505-505.
17. Ellis, J. W., et Kneser, H. O. (1933) Kombinationsbeziehungen im Absorptionsspektrum des flüssigen Sauerstoffs. , *Zeitschrift für Physik* 86, 583-591.
18. Khan, A. U., et Kasha, M. (1970) Chemiluminescence arising from simultaneous transitions in pairs of singlet oxygen molecules. , *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3293-3300.
19. Schmidt, R., et Bodesheim, M. (1998) Radiationless Deactivation of the Second Excited Singlet State $1\Sigma_g^+$ of O₂ in Solution. , *J. Phys. Chem. A* 102, 4769-4774.
20. Jensen, R. L., Arnbjerg, J., et Ogilby, P. R. (2010) Temperature Effects on the Solvent-Dependent Deactivation of Singlet Oxygen. , *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8098-8105.
21. Krasnovsky Jr., A. A. (1979) Photoluminescence of Singlet Oxygen in Pigment Solutions. , *Photochemistry and Photobiology* 29, 29-36.
22. Wilkinson, F., Helman, W. P., et Ross, A. B. (1995) Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. , *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 24, 663.
23. Schmidt, R. (1989) Influence of heavy atoms on the deactivation of singlet oxygen (1.DELTA.g) in solution. , *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6983-6987.
24. Ogilby, P. R., et Foote, C. S. (1983) Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g). , *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3423-3430.

25. Turro, N. J., Ramamurthy, V., Liu, K.-C., Krebs, A., et Kemper, R. (1976) Reaction of Strained Acetylenes with Molecular Oxygen. A Novel Chemiluminescent Reaction, Evidence for a Dioxetene, and a Mechanism for Thermal Generation of Singlet Oxygen. , *J. Am. Chem. Soc.* 98, 6758-6761.
26. Peters, J. W., Pitts, J. N., Rosenthal, I., et Fuhr, H. (1972) New and unique chemical source of singlet molecular oxygen. Potassium perchromate. , *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4348-4350.
27. Arneson, R. M. (1970) Substrate-induced chemiluminescence of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. , *Archives of Biochemistry and Biophysics* 136, 352-360.
28. Corey, E. J., Mehrotra, M. M., et Khan, A. U. (1987) Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 842-846.
29. Khan, A. U., et Kasha, M. (1994) Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. , *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12365-12367.
30. Martinez, G. R., Di Mascio, P., Bonini, M. G., Augusto, O., Briviba, K., Sies, H., Maurer, P., R othlisberger, U., Herold, S., et Koppenol, W. H. (2000) Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($^1\Delta gO_2$) and nitroxyl (NO⁻). , *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 10307 - 10312.
31. Chow, C. K. (1976) Biochemical responses in lungs of ozone-tolerant rats. , *Nature* 260, 721-722.
32. Murray, R. W., et Kaplan, M. (1968) Singlet oxygen sources in ozone chemistry. , *J. Am. Chem. Soc.* 90, 537-538.
33. Kanofsky, J. R., et Sima, P. (1991) Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. , *Journal of Biological Chemistry* 266, 9039 -9042.
34. Kanofsky, J. R. (1983) Singlet oxygen production by lactoperoxidase. , *Journal of Biological Chemistry* 258, 5991 -5993.
35. Allen, R. C. (1975) The role of pH in the chemiluminescent response of the myeloperoxidase-halide-HOOH antimicrobial system. , *Biochemical and Biophysical Research Communications* 63, 684-691.
36. Khan, A. U., Gebauer, P., et Hager, L. P. (1983) Chloroperoxidase generation of singlet Delta molecular oxygen observed directly by spectroscopy in the 1- to 1.6-mum region. , *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 5195-5197.
37. Kanofsky, J. R. (1984) Singlet oxygen production by chloroperoxidase-hydrogen peroxide-halide systems. , *J. Biol. Chem.* 259, 5596-5600.
38. Khan, A. U. (1984) Myeloperoxidase singlet molecular oxygen generation detected by direct infrared electronic emission. , *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122, 668-675.
39. Krinsky, N. I. (1974) Singlet Excited Oxygen as a Mediator of the Antibacterial Action of Leukocytes. , *Science* 186, 363 -365.
40. Rosen, H., et Klebanoff, S. J. (1977) Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. , *J. Biol. Chem.* 252, 4803-4810.
41. Cheson, B. D., Christensen, R. L., Sperling, R., Kohler, B. E., et Babior, B. M. (1976) The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. , *Journal of Clinical Investigation* 58, 789-796.
42. Kanofsky, J. R., Wright, J., Miles-Richardson, G. E., et Tauber, A. I. (1984) Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. , *J Clin Invest* 74, 1489-1495.
43. Kanofsky, J. R., Wright, J., et Tauber, A. I. (1985) Effect of ascorbic acid on the production of singlet oxygen by purified human myeloperoxidase. , *FEBS Lett.* 187, 299-301.
44. Tatsuzawa, H., Maruyama, T., Hori, K., Sano, Y., et Nakano, M. (1999) Singlet oxygen ($^1\Delta(g)O_2$) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 647-650.
45. Kiryu, C., Makiuchi, M., Miyazaki, J., Fujinaga, T., et Kakinuma, K. Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. , *FEBS Letters* 443, 154-158.
46. Razumovitch, J. A., Fuchs, D., Semenkova, G. N., et Cherenkevich, S. N. (2004) Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils. , *Biochimica et Biophysica Acta* 1672, 46-50.
47. Kasha, M., et Khan, A. U. (1970) The Physics, Chemistry, and Biology, of Singlet Molecular Oxygen. , *Annals of the New York Academy of Sciences* 171, 5-23.

48. Porter, D. J. T., et Ingraham, L. L. (1974) Concerning the formation of singlet molecular oxygen during the decomposition of hydrogen peroxyde by catalase. , *Biochim. Biophys. Acta* 334, 97-102.
49. Abdel-Shafi, A. A., et Wilkinson, F. (2000) Charge Transfer Effects on the Efficiency of Singlet Oxygen Production Following Oxygen Quenching of Excited Singlet and Triplet States of Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile. , *J. Phys. Chem. A* 104, 5747-5757.
50. Wilkinson, F., McGarvey, D. J., et Olea, A. F. (1993) Factors governing the efficiency of singlet oxygen production during oxygen quenching of singlet and triplet states of anthracene derivatives in cyclohexane solution. , *J. Am. Chem. Soc.* 115, 12144-12151.
51. Boch, R., Mehta, B., Connolly, T., Durst, T., Arnason, J. T., Redmond, R. W., et Scaiano, J. C. (1996) Singlet oxygen photosensitizing properties of bithiophene and terthiophene derivatives. , *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 93, 39-47.
52. Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., et Wolff, C. (1994) Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂(¹Δ_g) sensitization. , *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 79, 11-17.
53. Bonnett, R. (2000) Chemical aspects of photodynamic therapy. Gordon and Breach Science Publishers.
54. Min, D. B., et Boff, J. M. (2002) Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. , *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1, 58-72.
55. Michaeli, A., et Feitelson, J. (1994) Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. , *Photochem. Photobiol.* 59, 284-289.
56. Matheson, I. B. C., et Lee, J. (1979) Chemical Reaction Rates of Amino Acids with Singlet Oxygen. , *Photochemistry and Photobiology* 29, 879-881.
57. Hallett, F. R., Hallett, B. P., et Snipes, W. (1970) Reactions between Singlet Oxygen and the Constituents of Nucleic Acids. , *Biophys J* 10, 305-315.
58. Rosenthal, I., et Pitts, J. N. (1971) Reactivity of purine and pyrimidine bases toward singlet oxygen. , *Biophys J* 11, 963-966.
59. Van Dyck, S. (2007) The impact of singlet oxygen on lipid oxidation. , *Lipid Technology* 19, 278-280.
60. Watabe, N., Ishida, Y., Ochiai, A., Tokuoka, Y., et Kawashima, N. (2007) Oxidation decomposition of unsaturated fatty acids by singlet oxygen in phospholipid bilayer membranes. , *Journal of oleo science* 56, 73-80.
61. Korytowski, W., et Girotti, A. W. (1999) Singlet oxygen adducts of cholesterol: photogeneration and reductive turnover in membrane systems. , *Photochem. Photobiol.* 70, 484-489.
62. Bodannes, R. S., et Chan, P. C. (1979) Ascorbic acid as a scavenger of singlet oxygen. , *FEBS Lett.* 105, 195-196.
63. Kwon, B. M., et Foote, C. S. (1988) Chemistry of singlet oxygen. 50. Hydroperoxide intermediates in the photooxygenation of ascorbic acid. , *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6582-6583.
64. Schenck, G. O. (1948) Zur Theorie der photosensibilisierten Reaktion mit molekularem Sauerstoff. , *Die Naturwissenschaften* 35, 28-29.
65. Frimer, A. A. (1979) The reaction of singlet oxygen with olefins: the question of mechanism. , *Chem. Rev.* 79, 359-387.
66. Brinkhorst, J., Nara, S. J., et Pratt, D. A. (2008) Hock Cleavage of Cholesterol 5 α -Hydroperoxide: An Ozone-Free Pathway to the Cholesterol Ozonolysis Products Identified in Arterial Plaque and Brain Tissue. , *Journal of the American Chemical Society* 130, 12224-12225.
67. Maskos, Z., Rush, J. D., et Koppenol, W. H. (1992) The hydroxylation of tryptophan. , *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 514-520.
68. Schneider, C., Boeglin, W. E., Yin, H., Ste, D. F., Hachey, D. L., Porter, N. A., et Brash, A. R. (2005) Synthesis of dihydroperoxides of linoleic and linolenic acids and studies on their transformation to 4-hydroperoxynonenal. , *Lipids* 40, 1155-1162.
69. Clennan, E. L. (2000) New Mechanistic and Synthetic Aspects of Singlet Oxygen Chemistry. , *Tetrahedron* 56, 9151-9179.
70. Clennan, E. L., et Pace, A. (2005) Advances in singlet oxygen chemistry. , *Tetrahedron* 61, 6665-6691.
71. Nicolaou, K. C., Snyder, S. A., Montagnon, T., et Vassilikogiannakis, G. (2002) The Diels--Alder reaction in total synthesis. , *Angewandte Chemie International Edition* 41, 1668-98.

72. Jin, F., Leitich, J., et von Sonntag, C. (1995) The photolysis ($\lambda = 254$ nm) of tyrosine in aqueous solutions in the absence and presence of oxygen. The reaction of tyrosine with singlet oxygen. , *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 92, 147-153.
73. Ravanat, J. L., et Cadet, J. (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. , *Chem. Res. Toxicol.* 8, 379-388.
74. Davis, K. M., et Carpenter, B. K. (1996) Unusual Facial Selectivity in the Cycloaddition of Singlet Oxygen to a Simple Cyclic Diene1. , *J. Org. Chem.* 61, 4617-4622.
75. Montagnon, T., Tofi, M., et Vassilikogiannakis, G. (2008) Using Singlet Oxygen to Synthesize Polyoxygenated Natural Products from Furans. , *Acc. Chem. Res.* 41, 1001-1011.
76. Baciocchi, E., Del Giacco, T., Lanzalunga, O., et Lapi, A. (2007) Singlet Oxygen Promoted Carbon-Heteroatom Bond Cleavage in Dibenzyl Sulfides and Tertiary Dibenzylamines. Structural Effects and the Role of Exciplexes. , *J. Org. Chem.* 72, 9582-9589.
77. Foote, C. S., Denny, R. W., Weaver, L., Chang D., Y., et Peters B., J. (1970) Quenching of Singlet Oxygen. , *Annals of the New York Academy of Sciences* 171, 139-148.
78. Foote, C. S., et Denny, R. W. (1968) Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta-carotene. , *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6233-6235.
79. Foote, C. S., Chang, Y. C., et Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans isomerization of carotenoids by single oxygen and a probable quenching mechanism. , *Journal of the American Chemical Society* 92, 5218-5219.
80. Foote, C. S., Chang, Y. C., et Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. , *Journal of the American Chemical Society* 92, 5216-5218.
81. Straub, O. (1976) Key to Carotenoids, Lists of Natural Carotenoids.
82. Nilsson, R., et Kearns, D. R. (1973) A Remarkable Deuterium Effect on the Rate of Photosensitized Oxidation of Alcohol Dehydrogenase and Trypsin. , *Photochemistry and Photobiology* 17, 65-68.
83. Nultsch, W., Schuchart, H., et Koenig, F. (1983) Effects of sodium azide on phototaxis of the blue-green alga *Anabaena variabilis* and consequences to the two-photoreceptor systems-hypothesis. , *Archives of Microbiology* 134, 33-37.
84. Fahrenholtz, S. R., Doleiden, F. H., Trozzolo, A. M., et Lamola, A. A. (1974) ON THE QUENCHING OF SINGLET OXYGEN BY α -TOCOPHEROL. , *Photochemistry and Photobiology* 20, 505-509.
85. Foote, C. S., Ching, T. Y., et Geller, G. G. (1974) Chemistry of singlet oxygen. XVIII. Rates of reaction and quenching of alpha-tocopherol and singlet oxygen. , *Photochem. Photobiol.* 20, 511-513.
86. Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E., et Sies, H. (1990) Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. , *Archives of Biochemistry and Biophysics* 277, 101-108.
87. Yanishlieva, N. V., Marinova, E., et Pokorný, J. (2006) Natural antioxidants from herbs and spices. , *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 776-793.
88. Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerathanassis, I. P., Troganis, A., et Boskou, D. (2002) Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. , *J. Agric. Food Chem.* 50, 5294-5299.
89. Ozcan, M. (2003) Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. , *J Med Food* 6, 267-270.
90. Hinneburg, I., Damien Dorman, H. J., et Hiltunen, R. (2006) Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. , *Food Chemistry* 97, 122-129.
91. Tsai, T., Tsai, P., et Ho, S. (2005) Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Several Commonly Used Spices. , *Journal of Food Science* 70, C93-C97.
92. Nakatani, N. (2000) Phenolic antioxidants from herbs and spices. , *BioFactors* 13, 141-146.
93. Burda, S., et Oleszek, W. (2001) Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. , *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774-2779.
94. Nagai, S., Ohara, K., et Mukai, K. (2005) Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. , *J. Phys. Chem. B* 109, 4234-4240.
95. Huvaere, K., Olsen, K., et Skibsted, L. H. (2009) Quenching of Triplet-Excited Flavins by Flavonoids. Structural Assessment of Antioxidative Activity. , *J. Org. Chem.* 74, 7283-7293.

96. Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Hernández Blanco, I., Hoffmann, T., Martin, H., Mayer, B., Noack, P., Ruck, C., Schmidt, M., Schülke, I., Sell, S., Ernst, H., Haremza, S., Seybold, G., Sies, H., Stahl, W., et Walsh, R. (2001) Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. , *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 559-568.
97. Matheson, I. B. C., Etheridge, R. D., Kratowich, N. R., et Lee, J. (1975) The Quenching of Singlet Oxygen by Amino Acids and Proteins. , *Photochemistry and Photobiology* 21, 165-171.
98. Bisby, R. H., Morgan, C. G., Hamblett, I., et Gorman, A. A. (1999) Quenching of Singlet Oxygen by Trolox C, Ascorbate, and Amino Acids: Effects of pH and Temperature. , *J. Phys. Chem. A* 103, 7454-7459.
99. Palumbo, M. C., García, N. A., et Argüello, G. A. (1990) The interaction of singlet molecular oxygen $O_2(^1\Delta_g)$ with indolic derivatives. Distinction between physical and reactive quenching. , *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 7, 33-42.
100. Gorman, A. A., Hamblett, I., Smith, K., et Standen, M. C. (1984) Strychnine : A fast physical quencher of singlet oxygen ($^1\Delta_g$). , *Tetrahedron Letters* 25, 581-584.
101. Beutner, S., Bloedorn, B., Hoffmann, T., et Martin, H.-D. (2000) [22] Synthetic singlet oxygen quenchers. *Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone*, p 226-241. Academic Press.
102. Ouannes, C., et Wilson, T. (1968) Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines. Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane). , *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6527-6528.
103. Anderson, S. M., Krinsky, N. I., Stone, M. J., et Clagett, D. C. (1974) Effect of Singlet Oxygen Quenchers on Oxidative Damage to Liposomes Initiated by Photosensitization or by Radiofrequency Discharge. , *Photochemistry and Photobiology* 20, 65-69.
104. Jefford, C. W., Boschung, A. F., Bolsman, T. A., Moriarty, R. M., et Melnick, B. (1976) Reaction of singlet oxygen with alpha-ketocarboxylic acids. Oxidative decarboxylation and peroxyacid formation. , *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1017-1018.
105. Hawco, F. J., O'Brien, C. R., et O'Brien, P. J. (1977) Singlet oxygen formation during hemoprotein catalyzed lipid peroxide decomposition. , *Biochemical and Biophysical Research Communications* 76, 354-361.
106. Lengfelder, E., Cadenas, E., et Sies, H. (1983) Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octane) on singlet oxygen monomol (1270 nm) and dimol (634 and 703 nm) emission. , *FEBS Letters* 164, 366-370.
107. Rodgers, M. A. J., et Snowden, P. T. (1982) Lifetime of oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) in liquid water as determined by time-resolved infrared luminescence measurements. , *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5541-5543.
108. Egorov, S. Y., Kamalov, V. F., Koroteev, N. I., Krasnovsky Jr., A. A., Toleutaev, B. N., et Zinukov, S. V. (1989) Rise and decay kinetics of photosensitized singlet oxygen luminescence in water. Measurements with nanosecond time-correlated single photon counting technique. , *Chemical Physics Letters* 163, 421-424.
109. Kuimova, M. K., Yahioglu, G., et Ogilby, P. R. (2008) Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. , *J. Am. Chem. Soc.* 131, 332-340.
110. Kuimova, M. K., Botchway, S. W., Parker, A. W., Balaz, M., Collins, H. A., Anderson, H. L., Suhling, K., et Ogilby, P. R. (2009) Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. , *Nat Chem* 1, 69-73.
111. Niedre, M., Patterson, M. S., et Wilson, B. C. (2002) Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. , *Photochemistry and Photobiology* 75, 382-391.
112. Niedre, M. J., Secord, A. J., Patterson, M. S., et Wilson, B. C. (2003) In Vitro Tests of the Validity of Singlet Oxygen Luminescence Measurements as a Dose Metric in Photodynamic Therapy. , *Cancer Research* 63, 7986 -7994.
113. Zhao, B., Yin, J.-J., Bilski, P. J., Chignell, C. F., Roberts, J. E., et He, Y.-Y. (2009) Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. , *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 163-172.

114. Lindig, B. A., Rodgers, M. A. J., et Schaap, A. P. (1980) Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d₂ using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. , *J. Am. Chem. Soc.* *102*, 5590-5593.
115. Tsay, J. M., Trzoss, M., Shi, L., Kong, X., Selke, M., Jung, M. E., et Weiss, S. (2007) Singlet Oxygen Production by Peptide-coated Quantum Dot-Photosensitizer Conjugates. , *J Am Chem Soc* *129*, 6865-6871.
116. Spiller, W., Kliesch, H., Wöhrle, D., Hackbarth, S., Röder, B., et Schnurpfeil, G. (1998) Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. , *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* *2*, 145-158.
117. Uemi, M., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Motta, F. D., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G., et Di Mascio, P. (2011) Cholesterol hydroperoxides generate singlet molecular oxygen [O(2) ((1)Δ(g))]: near-IR emission, (18)O-labeled hydroperoxides, and mass spectrometry. , *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 887-895.
118. Zhang, P., Steelant, W., Kumar, M., et Scholfield, M. (2007) Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation. , *J Am Chem Soc* *129*, 4526-4527.
119. Price, M., Reiners, J. J., Santiago, A. M., et Kessel, D. (2009) Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. , *Photochem. Photobiol.* *85*, 1177-1181.
120. Tromberg, B. J. (1991) Indirect spectroscopic detection of singlet oxygen during photodynamic therapy, p 101-108. SPIE.
121. Gomes, A., Fernandes, E., et Lima, J. L. F. C. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. , *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* *65*, 45-80.
122. Wei, Y. chun, Yang, L. yong, et Song, J. xing. (2008) Real-time monitoring of singlet oxygen in photodynamic therapy with chemiluminescence, p 728020-728020-9. SPIE.
123. Sakai, H., Oppelaar, H., Baas, P., Van Zandwijk, N., et Stewart, F. A. (1994) Detection of singlet oxygen yield from new photosensitizers using luminol, p 264-267.
124. Posner, G. H., Lever, J. R., Miura, K., Lisek, C., Seliger, H. H., et Thompson, A. (1984) A chemiluminescent probe specific for singlet oxygen. , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *123*, 869-873.
125. Thompson, A., Biggley, W. H., Posner, G. H., Lever, J. R., et Seliger, H. H. (1986) Microsomal chemiluminescence of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and its synthetic analogues trans- and cis-1-methoxyvinylpyrene. , *Biochim. Biophys. Acta* *882*, 210-219.
126. Thompson, A., Seliger, H. H., et Posner, G. H. (1986) Chemiluminescent probes for singlet oxygen in biological reactions. , *Meth. Enzymol.* *133*, 569-584.
127. Gollmer, A., Arnbjerg, J., Blaikie, F. H., Pedersen, B. W., Breitenbach, T., Daasbjerg, K., Glasius, M., et Ogilby, P. R. (2011) Singlet Oxygen Sensor Green®: Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell. , *Photochemistry and Photobiology* *87*, 671-679.
128. Lavi, R., Sinyakov, M., Samuni, A., Shatz, S., Friedman, H., Shainberg, A., Breitbart, H., Melamed, O., et Lubart, R. (2004) ESR Detection of 102 Reveals Enhanced Redox Activity in illuminated Cell Cultures. , *Free Radic. Res.* *38*, 893-902.
129. Hideg, É., Vass, I., Kálai, T., et Hideg, K. (2000) [8] Singlet oxygen detection with sterically hindered amine derivatives in plants under light stress. *Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone*, p 77-85. Academic Press.
130. Tyagi, S., et Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. , *Nat. Biotechnol.* *14*, 303-308.
131. Tyagi, S., Bratu, D. P., et Kramer, F. R. (1998) Multicolor molecular beacons for allele discrimination. , *Nat. Biotechnol.* *16*, 49-53.
132. Kostrikis, L. G., Tyagi, S., Mhlanga, M. M., Ho, D. D., et Kramer, F. R. (1998) Spectral genotyping of human alleles. , *Science* *279*, 1228-1229.
133. Marras, S. A. E., Russell Kramer, F., et Tyagi, S. (1999) Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. , *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* *14*, 151-156.
134. Liu, X., et Tan, W. (1999) A Fiber-Optic Evanescent Wave DNA Biosensor Based on Novel Molecular Beacons. , *Anal. Chem.* *71*, 5054-5059.
135. Liu, X., Farmerie, W., Schuster, S., et Tan, W. (2000) Molecular beacons for DNA biosensors with micrometer to submicrometer dimensions. , *Anal. Biochem.* *283*, 56-63.

136. Brown, L. J., Cummins, J., Hamilton, A., et Brown, T. (2000) Molecular beacons attached to glass beads fluoresce upon hybridisation to target DNA. , *Chem. Commun.* 621-622.
137. Steemers, F. J., Ferguson, J. A., et Walt, D. R. (2000) Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays. , *Nat Biotech* 18, 91-94.
138. Li, J. J., Fang, X., Schuster, S. M., et Tan, W. (2000) Molecular Beacons: A Novel Approach to Detect Protein – DNA Interactions. , *Angewandte Chemie* 112, 1091-1094.
139. Heyduk, T., et Heyduk, E. (2002) Molecular beacons for detecting DNA binding proteins. , *Nat Biotech* 20, 171-176.
140. Matsuo, T. (1998) In situ visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells. , *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 178-184.
141. Giesendorf, B. A., Vet, J. A., Tyagi, S., Mensink, E. J., Trijbels, F. J., et Blom, H. J. (1998) Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. , *Clin. Chem.* 44, 482-486.
142. Bratu, D. P., Cha, B.-J., Mhlanga, M. M., Kramer, F. R., et Tyagi, S. (2003) Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. , *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 13308 - 13313.
143. Bremer, C., Bredow, S., Mahmood, U., Weissleder, R., et Tung, C. H. (2001) Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. , *Radiology* 221, 523-529.
144. Chen, J., Tung, C.-H., Allport, J. R., Chen, S., Weissleder, R., et Huang, P. L. (2005) Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. , *Circulation* 111, 1800-1805.
145. Zhu, L., Xie, J., Swierczewska, M., Zhang, F., Quan, Q., Ma, Y., Fang, X., Kim, K., Lee, S., et Chen, X. (2011) Real-time video imaging of protease expression in vivo. , *Theranostics* 1, 18-27.
146. Zhu, L., Xie, J., Swierczewska, M., Zhang, F., Lin, X., Fang, X., Niu, G., Lee, S., et Chen, X. (2011) Dual-Functional, Receptor-Targeted Fluorogenic Probe for In Vivo Imaging of Extracellular Protease Expressions. , *Bioconjugate Chemistry* 22, 1001-1005.
147. Ryu, J. H., Lee, A., Lee, S., Ahn, C.-H., Park, J. W., Leary, J. F., Park, S., Kim, K., Kwon, I. C., Youn, I.-C., et Choi, K. (2010) « One-Step » Detection of Matrix Metalloproteinase Activity Using a Fluorogenic Peptide Probe-Immobilized Diagnostic Kit. , *Bioconjugate Chem.* 21, 1378-1384.
148. Seltzer, J. L., Akers, K. T., Weingarten, H., Grant, G. A., McCourt, D. W., et Eisen, A. Z. (1990) Cleavage specificity of human skin type IV collagenase (gelatinase). Identification of cleavage sites in type I gelatin, with confirmation using synthetic peptides. , *Journal of Biological Chemistry* 265, 20409 -20413.
149. Kridel, S. J., Chen, E., Kotra, L. P., Howard, E. W., Mobashery, S., et Smith, J. W. (2001) Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. , *J. Biol. Chem.* 276, 20572-20578.
150. Lee, S., Ryu, J. H., Park, K., Lee, A., Lee, S.-Y., Youn, I.-C., Ahn, C.-H., Yoon, S. M., Myung, S.-J., Moon, D. H., Chen, X., Choi, K., Kwon, I. C., et Kim, K. (2009) Polymeric Nanoparticle-Based Activatable Near-Infrared Nanosensor for Protease Determination In Vivo. , *Nano Lett.* 9, 4412-4416.
151. Liu, T. W., Akens, M. K., Chen, J., Wise-Milestone, L., Wilson, B. C., et Zheng, G. (2011) Imaging of specific activation of photodynamic molecular beacons in breast cancer vertebral metastases. , *Bioconjug. Chem.* 22, 1021-1030.
152. Dexter, D. L. (1953) A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. , *The Journal of Chemical Physics* 21, 836.
153. Anslyn, E. V., et Dougherty, D. A. (2006) Modern physical organic chemistry. University Science Books.
154. Förster, T. (1949) Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Uebergangs von Elektronenanregungsenergie. , *Z. Naturforsch* 4a, 321.
155. Verhille, M., Couleaud, P., Vanderesse, R., Brault, D., Barberi-Heyob, M., et Frochot, C. (2010) Modulation of Photosensitization Processes for an Improved Targeted Photodynamic Therapy. , *Curr. Med. Chem.* 17, 497-522.
156. Koo, H., Lee, H., Lee, S., Min, K. H., Kim, M. S., Lee, D. S., Choi, Y., Kwon, I. C., Kim, K., et Jeong, S. Y. (2010) In vivo tumor diagnosis and photodynamic therapy via tumoral pH-responsive polymeric micelles. , *Chem. Commun. (Camb.)* 46, 5668-5670.

157. Ko, J., Park, K., Kim, Y.-S., Kim, M. S., Han, J. K., Kim, K., Park, R.-W., Kim, I.-S., Song, H. K., Lee, D. S., et Kwon, I. C. (2007) Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly(beta-amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy. , *J Control Release* 123, 109-115.
158. Wu, X. L., Kim, J. H., Koo, H., Bae, S. M., Shin, H., Kim, M. S., Lee, B.-H., Park, R.-W., Kim, I.-S., Choi, K., Kwon, I. C., Kim, K., et Lee, D. S. (2010) Tumor-Targeting Peptide Conjugated pH-Responsive Micelles as a Potential Drug Carrier for Cancer Therapy. , *Bioconjugate Chem.* 21, 208-213.
159. Lee, S. J., Koo, H., Lee, D.-E., Min, S., Lee, S., Chen, X., Choi, Y., Leary, J. F., Park, K., Jeong, S. Y., Kwon, I. C., Kim, K., et Choi, K. (2011) Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. , *Biomaterials* 32, 4021-4029.
160. Li, F., et Na, K. (2011) Self-assembled chlorin e6 conjugated chondroitin sulfate nanodrug for photodynamic therapy. , *Biomacromolecules* 12, 1724-1730.
161. Chen, J., Lovell, J. F., Lo, P.-C., Stefflova, K., Niedre, M., Wilson, B. C., et Zheng, G. (2008) A tumor mRNA-triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotide hairpin control of singlet oxygen production. , *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 775-781.
162. Gao, Y., Qiao, G., Zhuo, L., Li, N., Liu, Y., et Tang, B. (2011) A tumor mRNA-mediated bi-photosensitizer molecular beacon as an efficient imaging and photosensitizing agent. , *Chem. Commun.* 47, 5316-5318.
163. Jang, B., and Choi, Y. (2012) Photosensitizer-Conjugated Gold Nanorods for Enzyme-Activatable Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy. , *Theranostics* 2, 190-197.

Chapitre III : Vers la conception d'un nouveau PMB ciblant les MMP-2 et MMP-9

Chapitre III : Vers la conception d'un nouveau PMB ciblant les MMP-2 et MMP-9

I. Stratégie de synthèse

Un PMB est, comme il a été spécifié précédemment, composé de deux entités : une partie photosensible et une partie inhibitrice, reliées entre elles par une séquence peptidique assurant une proximité spatiale. Comme base pour ce PMB, nous avons décidé de cibler les MMP-2 et MMP-9, qui sont des marqueurs importants de l'angiogenèse. Ce ciblage se fait par utilisation d'un peptide substrat : H-GPLGIAGQ-OH, décrit par Mansour *et al.* en 2003. A ce peptide est ajouté un résidu lysine en C-terminal afin de pouvoir greffer l'une des deux entités (PS ou *quencher*) sur l'amine en ϵ ; cette lysine ne devrait pas perturber la reconnaissance des enzymes pour le peptide. En effet, de nombreux groupes ont déjà eu recours à cette technique pour attacher leur molécule d'intérêt (voir chapitre II).

La synthèse de ce peptide est réalisée sur support solide afin d'assurer un rendement optimal et minimiser les phases de purification. La stratégie adoptée pour la synthèse est la stratégie Fmoc sur résine Wang. Les détails de la synthèse en phase solide sont donnés dans la suite de ce chapitre.

Afin d'optimiser la synthèse, nous avons couplé le photosensibilisateur sur le peptide en croissance en phase solide. En effet, les couplages en phase solide ont le double avantage de présenter des rendements supérieurs à ceux en phase liquide, ainsi que de récupérer aisément la fraction n'ayant pas réagi. Le PS est greffé sur l'extrémité N-terminale du peptide, puis le conjugué est clivé afin de permettre le greffage du *quencher* (figure 3-1).

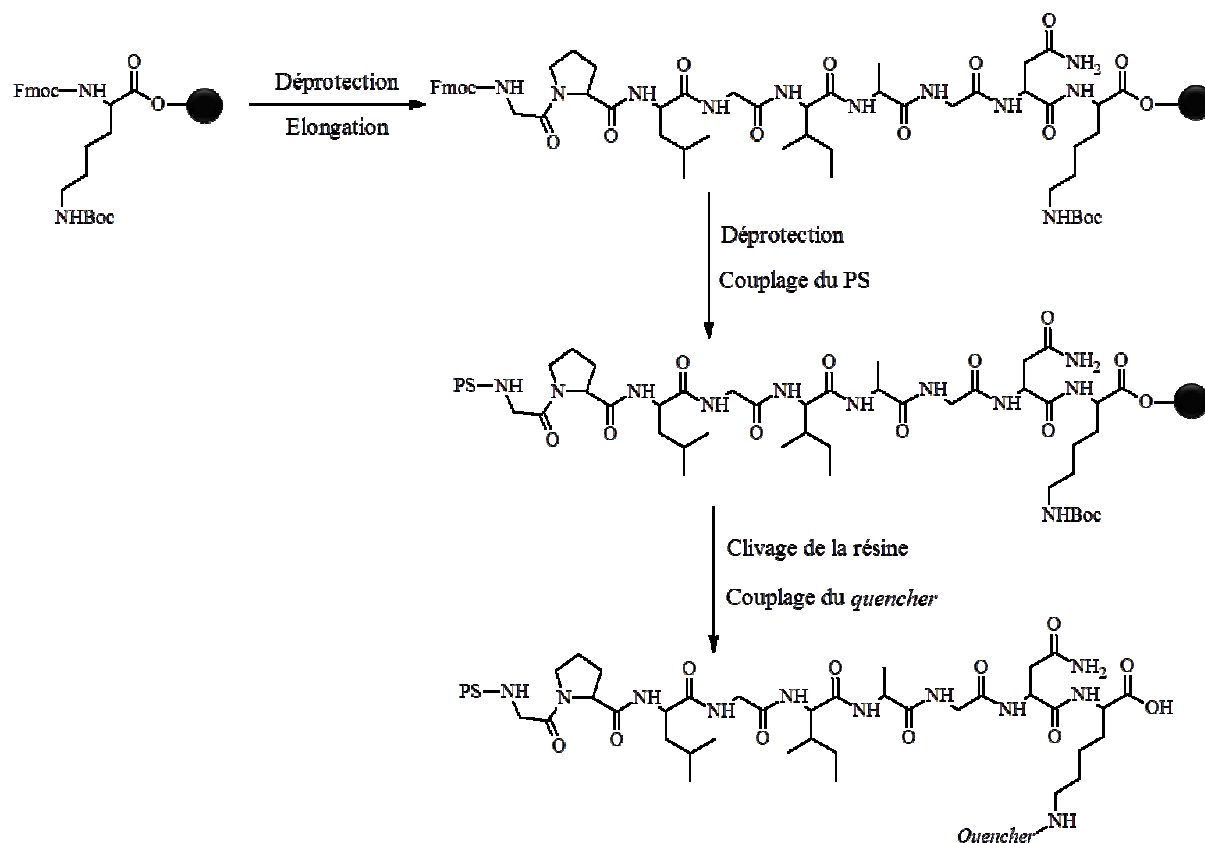


Figure 3-1 : Schéma de la stratégie de synthèse pour la conception du PMB.

Les parties suivantes seront consacrées à la synthèse individuelle de chaque partie du PMB et aux stratégies de couplage. Notre équipe, interdisciplinaire, intervient dans le processus de synthèse et de caractérisation comme suit :

- Synthèse des photosensibilisateurs : LRGP et LCPM.
- Synthèse organique : LRGP et LCPM.
- Synthèse peptidique : LCPM.
- Caractérisations photophysiques : LRGP.
- Caractérisations biologiques : CRAN/CAV.
- Synthèse enzymatique et spectrométrie de masse haute résolution : LRGP (ENSAIA).

II. Détermination et synthèse du photosensibilisateur

L'équipe PDT de Nancy est spécialisée depuis 2005 dans le ciblage de PS pour la PDT. Les PS principalement développés sont des porphyrines et des chlorines asymétriques carboxylées dérivant de la TPP. Le groupement acide carboxylique est nécessaire pour greffer la molécule photosensible à l'unité d'adressage (sucre, acide folique, etc.), en l'occurrence les peptides. L'utilisation d'une chlorine a été retenue pour la partie photosensibilisante de ce PMB en raison de ses capacités d'absorption à 650 nm supérieures à celles des porphyrines.

Dans une thèse précédente, Julien Gravier (1) a synthétisé un conjugué chlorine – acide folique, dans lequel la chlorine est un dérivé de la *m*-THPC. Cette molécule, dite « *m*-THPC-like », ou « pseudo-Foscan », est un analogue asymétrique du Foscan® comportant une fonction acide carboxylique comme point d'ancrage de la partie vecteur de la molécule. Cette molécule est très intéressante car le Foscan® est un PS caractérisé par un rendement quantique de production d'oxygène singulet important ($\Phi_{\Delta} = 0,7$ dans l'éthanol), il a reçu l'AMM et est très largement utilisé en PDT clinique (2–5), comme il a été précisé dans le chapitre I. De plus, la présence de ses fonctions hydroxyles confère à la *m*-THPC un caractère plus hydrophile que son analogue TPC.

Ces deux molécules ont donc été retenues pour composer la partie photoactivable du PMB (figure 3-2).

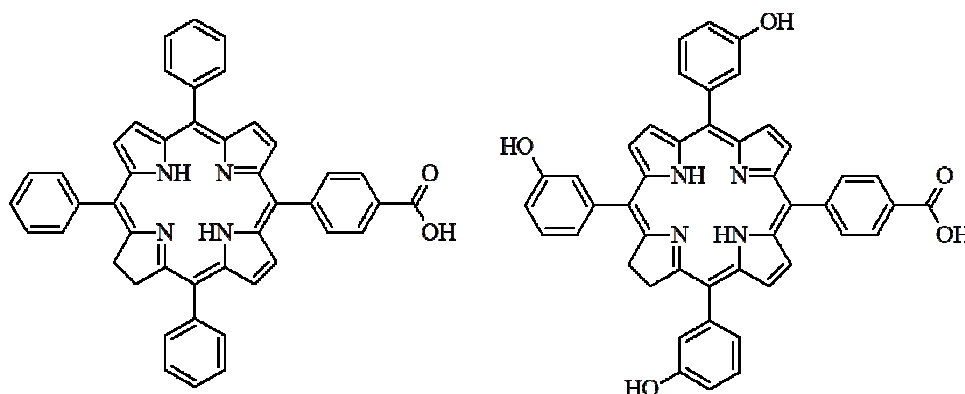


Figure 3-2 : Structures chimiques de la TPC (à gauche) et du pseudo-Foscan (à droite).

II.1. Synthèse de la TPC

La stratégie de notre équipe concernant la synthèse de photosensibilisateurs est de synthétiser la porphyrine dans un premier temps, puis de la réduire en chlorine. Par cette méthode, nous obtenons un mélange d'isomères de chlorines dû aux deux positions possibles pour la réduction (figure 3-3). Néanmoins, ces deux isomères possèdent les mêmes caractéristiques photophysiques (6) et seront toujours utilisés en mélange dans la suite de ce travail.

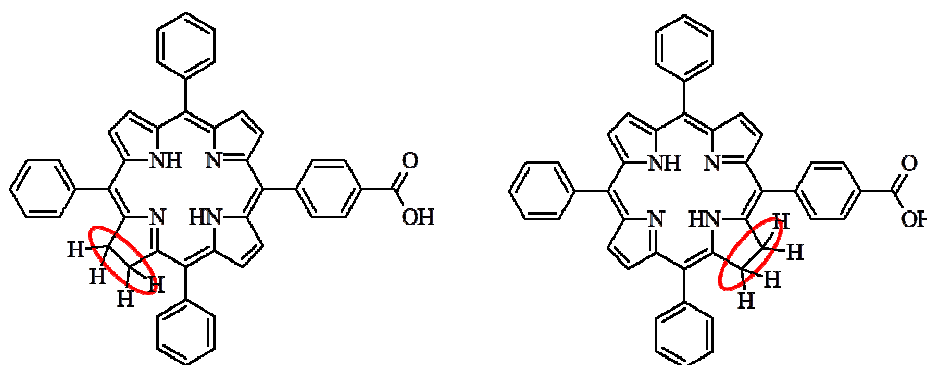


Figure 3-3 : Structures chimiques des isomères de la TPC monocarboxylée.

II.1.1. Synthèse de la porphyrine

La synthèse de la porphyrine monocarboxylée, notée P₁COOH, se fait par la méthode de Lindsey qui consiste à faire réagir quatre équivalents de pyrrole avec un équivalent de 4-carboxybenzaldéhyde et trois équivalents de benzaldéhyde, dans le DCM et en présence de BF₃-éthérate. L'intermédiaire porphyrinogène est ensuite oxydé en porphyrine par action d'un agent oxydant, le *p*-chloranile (figure 3-4).

Le mélange est filtré une première fois sur de la silice afin d'éliminer les goudrons et autres polymères du pyrrole formés pendant la réaction, puis le filtrat est purifié par colonnes chromatographiques sur gel de silice jusqu'à obtention d'un produit pur. Les rendements de cette synthèse sont variables en raison des nombreuses pertes possibles pendant les phases de purification, mais la porphyrine est obtenue en moyenne avec 7% de rendement.

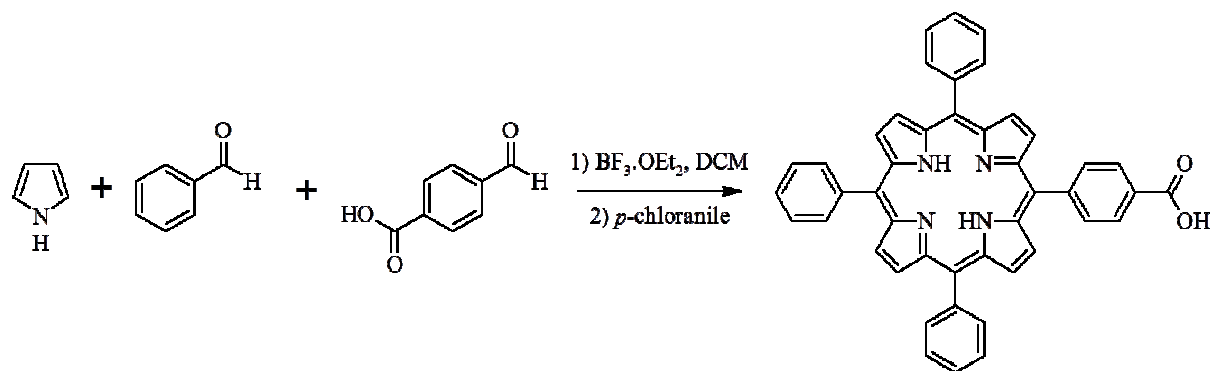


Figure 3-4 : Schéma de synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P₁COOH).

II.1.2. Synthèse de la chlorine

La synthèse de la chlorine monocarboxylée, notée C₁COOH, se fait par la méthode de Whitlock : la porphyrine, anhydre, est réduite à l'aide de *para*-toluènesulfonylhydrazine (*p*-TSH), en présence de K₂CO₃, à reflux de la pyridine et sous atmosphère inerte. Au laboratoire, nous réduisons complètement la porphyrine en bactériochlorine avec 30 équivalents de *p*-TSH, puis réoxydons la bactériochlorine en chlorine par ajouts progressifs d'*o*-chloranile (figure 3-5). Les ajouts de *p*-TSH se font en plusieurs fois ; chaque heure, après analyse du brut réactionnel en spectrométrie UV-visible, des réactifs frais et du solvant sont ajoutés. La dernière étape de réoxydation est délicate car il s'agit de s'arrêter au premier état d'oxydation de la bactériochlorine et de ne pas oxyder une chlorine en porphyrine. C'est pourquoi les ajouts se font progressivement, par des quantités de l'ordre de quelques milligrammes, toutes les 15 min, et un contrôle UV-visible est effectué avant chaque ajout. La réaction est immédiatement stoppée lorsque le spectre UV-visible correspond à celui de la chlorine seule par ajout d'eau qui solubilise l'*o*-chloranile et ainsi évite toute réduction ultérieure.

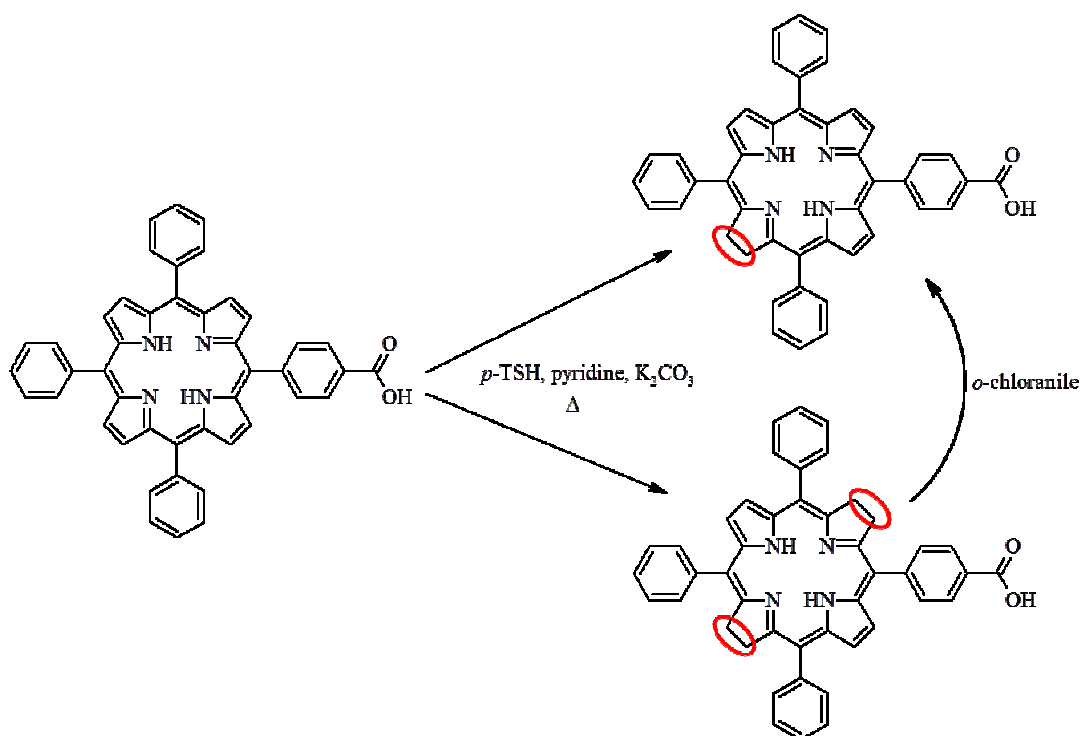


Figure 3-5 : Schéma de synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine (C_1COOH).

La purification de la chlorine se fait par colonne chromatographique sur gel de silice ou par HPLC préparative (conditions données dans la partie expérimentale). Cette dernière méthode permet de visualiser les deux isomères, de proportion équivalente, de la chlorine grâce à un suivi en temps réel du spectre d'absorption et de la fluorescence en sortie de colonne et ainsi de séparer l'éventuel résidu de porphyrine formé.

Cette étape donne également des rendements variables, généralement autour de 40%. Néanmoins, certaines synthèses de chlorine ont donné des rendements supérieurs à 90%. L'explication des variations des rendements de synthèse n'a pas encore été trouvée, mais nous pouvons conjecturer que des pertes interviennent lors des traitements après la réoxydation à l'aide d'*o*-chloranile, ainsi qu'une réoxydation partielle de la chlorine en porphyrine peut se produire avant l'étape de purification. De plus, cette dernière étape de synthèse est très sensible à la présence de l'humidité, ainsi qu'à la qualité des solvants et des réactifs, et nécessite des précautions particulières pour garantir des conditions parfaitement anhydres.

II.2. Caractérisations photophysiques

Les propriétés photophysiques pour chaque échantillon sont déterminées dans l'éthanol à 25°C. Les instruments utilisés pour les mesures sont détaillés dans la partie expérimentale.

II.2.1. Propriétés photophysiques de la $P_1\text{COOH}$

II.2.1.a. Propriétés d'absorption ($S_0 \rightarrow S_{n<2}$)

Le spectre d'absorption de la $P_1\text{COOH}$ est de type *éthio*. Il est caractérisé par une bande de Soret fine et intense à 415 nm, ainsi que par quatre bandes Q (deux Q_x ($S_0 \rightarrow S_1$) et deux Q_y ($S_0 \rightarrow S_2$)) de moindre intensité entre 512 nm et 650 nm (figure 3-6). Les valeurs des coefficients d'extinction molaire ϵ pour chaque bande sont données dans le tableau 3-1.

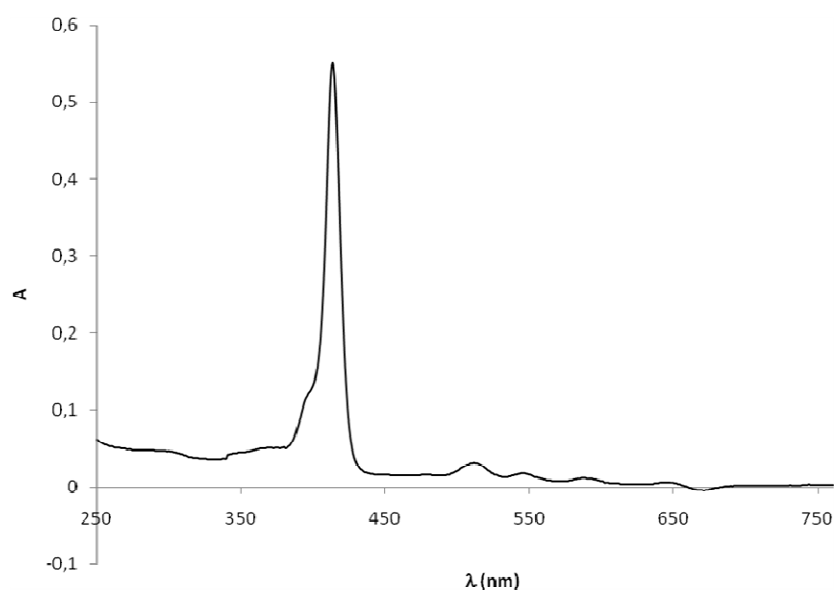


Figure 3-6 : Spectre UV-visible de la $P_1\text{COOH}$ dans l'éthanol.

Les coefficients d'extinction molaire sont calculés grâce à la formule de Beer-Lambert (1) :

$$(1) \quad A(\lambda) = \epsilon.l.c$$

où A est l'absorbance à une longueur d'onde donnée (sans unité), ϵ le coefficient d'extinction molaire (en mol.L⁻¹.cm⁻¹), l la longueur du trajet optique (en cm) et c la concentration de la molécule étudiée (en mol.L⁻¹).

Les composés sont analysés à faible concentration (de l'ordre de 10⁻⁷ mol.L⁻¹) en raison du coefficient d'absorption molaire élevé de la bande de Soret (tableau 3-1).

Tableau 3-1 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la P₁COOH dans l'éthanol.

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Bande de Soret	415	187000
Q _{IV}	512	9000
Q _{III}	545	4500
Q _{II}	588	3000
Q _I	650	1500

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

Le spectre d'émission de fluorescence de la P₁COOH est obtenu par excitation sur sa bande de Soret à 415 nm. Il se compose d'une double bande dont la plus intense se trouve à 650 nm et la moins intense à 720 nm (figure 3-7). Cette double bande est caractéristique du spectre de fluorescence des méso-tétraphénylporphyrines.

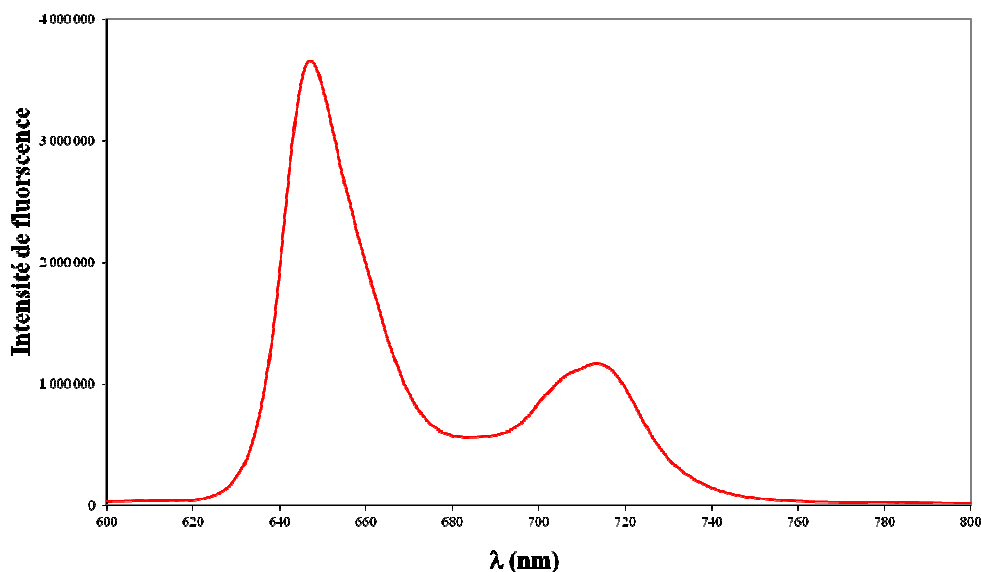


Figure 3-7 : Spectre d'émission de fluorescence de la P₁COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415 \text{ nm}$).

Le spectre de fluorescence permet de calculer le rendement quantique de fluorescence grâce à l'utilisation d'une référence dont le rendement quantique est connu. L'équation (2) permet ainsi de déterminer ce rendement quantique en utilisant comme référence la TPP dans le toluène, dont les propriétés d'émission sont connues (7).

$$(2) \quad \Phi_f = \Phi_{f0} \cdot \frac{I_f}{I_{f0}} \cdot \frac{A_0}{A} \cdot \left(\frac{n}{n_0} \right)^2$$

Cette équation, déjà présentée au chapitre II, fait donc intervenir le rendement quantique, l'intensité de fluorescence, l'absorption et l'indice de réfraction du solvant de la référence (signalée avec un « 0 ») et de l'échantillon à analyser. La référence utilisée est la TPP, dont le rendement quantique de fluorescence est de 0,11 dans le toluène ; les intensités de fluorescence sont prises comme étant l'aire sous les courbes des spectres obtenus et les indices de réfraction sont : $n_{EtOH} = 1,360$ et $n_{toluène} = 1,496$.

Nous obtenons : $\Phi_F = 0,14 \pm 0,02$.

Ce rendement quantique de fluorescence est proche de celle de la TPP utilisée comme référence en raison de leur analogie structurale.

Le temps de vie de fluorescence est mesuré par TCSPC (de l'anglais *Time Correlated Single Photon Counting*), utilisant un laser à 408 nm pour l'excitation et un filtre passe-haut à 650 nm afin de ne récupérer que les photons de l'émission de fluorescence. Le spectre est montré en figure 3-8 ; le déclin est monoexponentiel et la valeur trouvée est de $10,0 \pm 0,5$ ns.

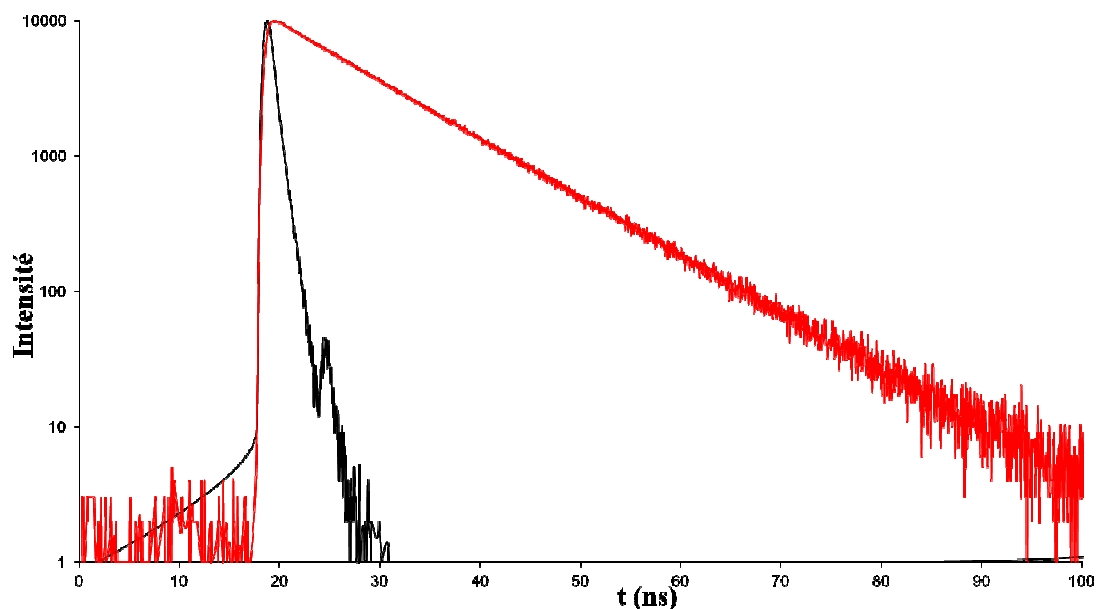


Figure 3-8 : Spectre de temps de vie de fluorescence de la P₁COOH obtenu par TCSPC dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 408$ nm).

Cette valeur est classique des photosensibilisateurs de type porphyrinique, les temps de vie de fluorescence étant généralement de l'ordre de la dizaine de nanoseconde. Le détail de l'instrumentation de TCSPC est abordé en partie expérimentale.

II.2.1.c. Formation d'oxygène singulet

La formation d'oxygène singulet est détectée par enregistrement de sa luminescence, dont le maximum est vers 1275 nm, par un détecteur proche-infrarouge, après excitation à 415 nm. Le spectre obtenu est montré en figure 3-9.

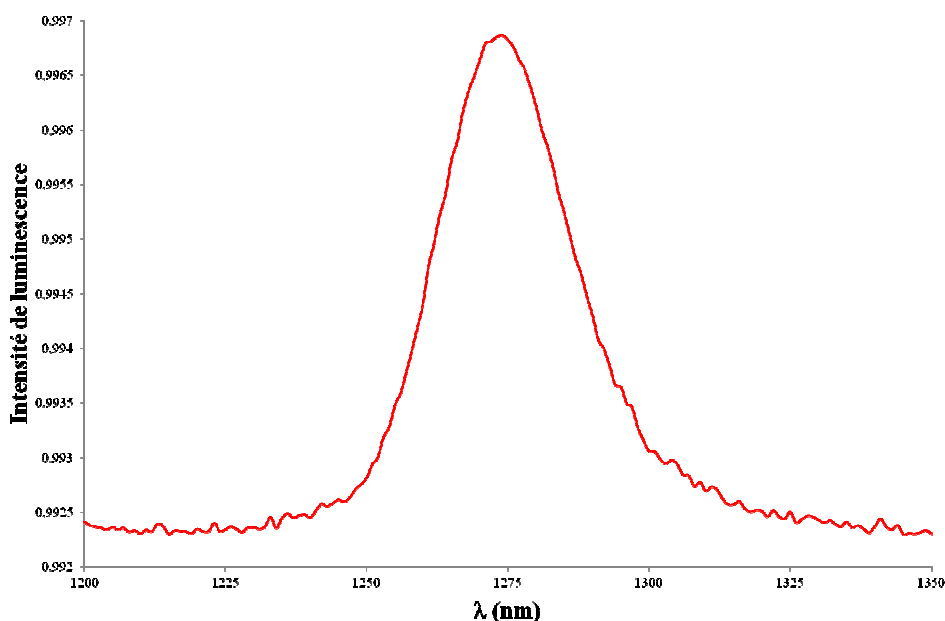


Figure 3-9 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet produit par la P₁COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).

De la même manière, nous pouvons calculer un rendement quantique de production d'oxygène singulet par comparaison avec une référence. Cette référence est le rose de Bengale dans l'éthanol, dont le rendement quantique de production d'oxygène singulet est de $0,69 \pm 0,05$ (8).

Nous obtenons : $\Phi_{\Delta} = 0,50 \pm 0,05$.

II.2.2. Propriétés photophysiques de la C₁COOH

II.2.2.a. Propriétés d'absorption

Le spectre d'absorption de la chlorine est également caractérisé par une bande de Soret vers 415 nm dans l'éthanol, ainsi que quatre bandes Q entre 512 nm et 650 nm (figure 3-10). Néanmoins, par rapport à la porphyrine, la bande de Soret est dédoublée, plus large et moins intense, et la bande Q_I l'est beaucoup plus. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 3-2.

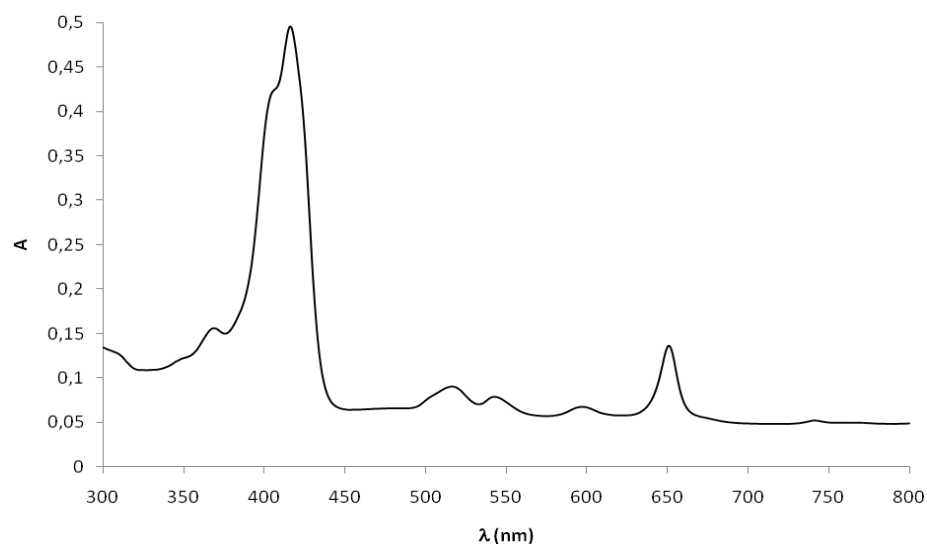


Figure 3-10 : Spectre d'absorption de la C₁COOH dans l'éthanol.

Tableau 3-2 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la C₁COOH dans l'éthanol.

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Bande de Soret	415	85000
Q _{IV}	512	9800
Q _{III}	545	6500
Q _{II}	588	5000
Q _I	650	21000

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

Le spectre d'émission de fluorescence est similaire à celui de la porphyrine, la seule différence est la disparition de la bande moins intense située à 720 nm (figure 3-11).

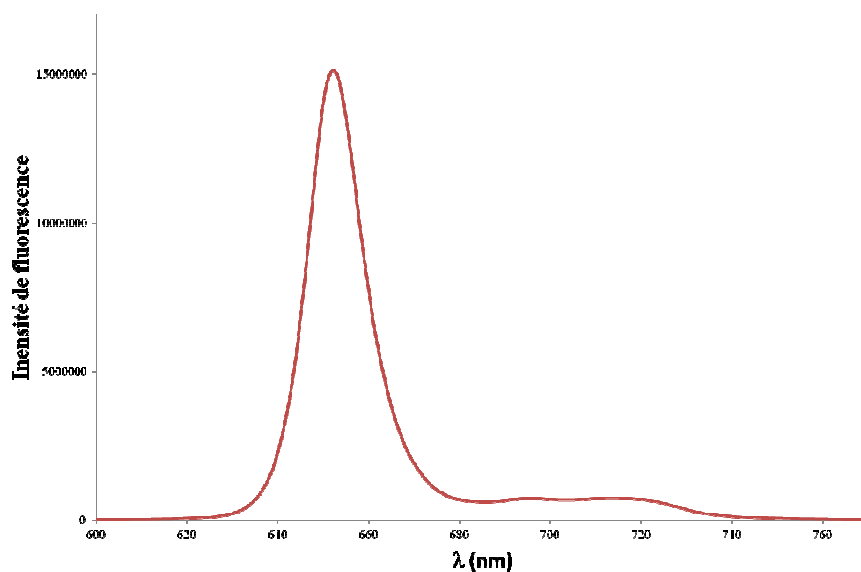


Figure 3-11 : Spectre d'émission de fluorescence de la C₁COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).

Le rendement quantique de fluorescence est de **0,23 ± 0,02** dans l'éthanol.

Le déclin de fluorescence de la C₁COOH dans l'éthanol est mesuré de la même manière que précédemment, le déclin est également monoexponentiel et le temps de vie obtenu est de **9,1 ± 0,5** ns (figure 3-12).

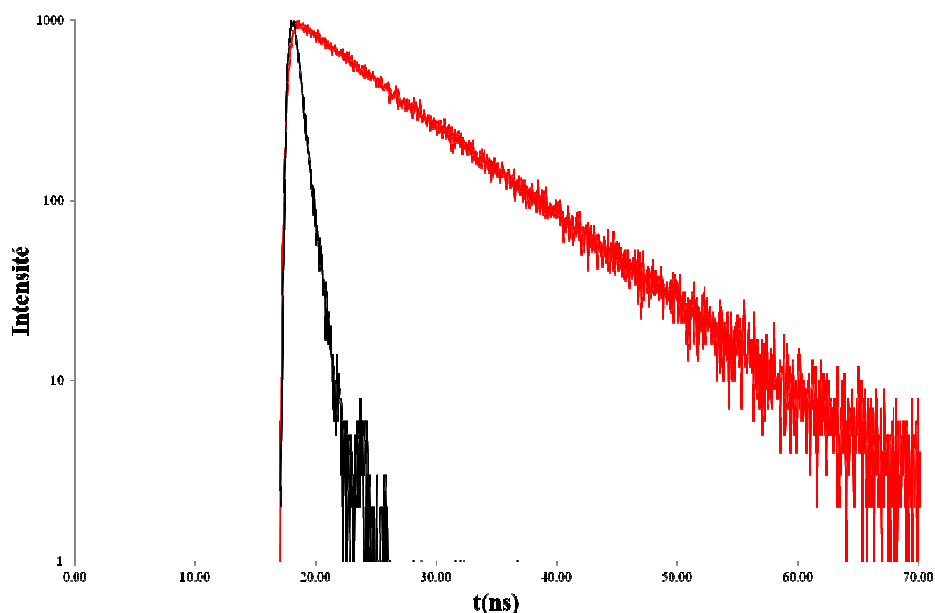


Figure 3-12 : Déclin de fluorescence de la C₁COOH obtenu par TCSPC dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).

II.2.2.c. Formation d'oxygène singulet

Le spectre de luminescence de l'oxygène singulet est enregistré comme décrit précédemment. Le spectre obtenu est montré en figure 3-13.

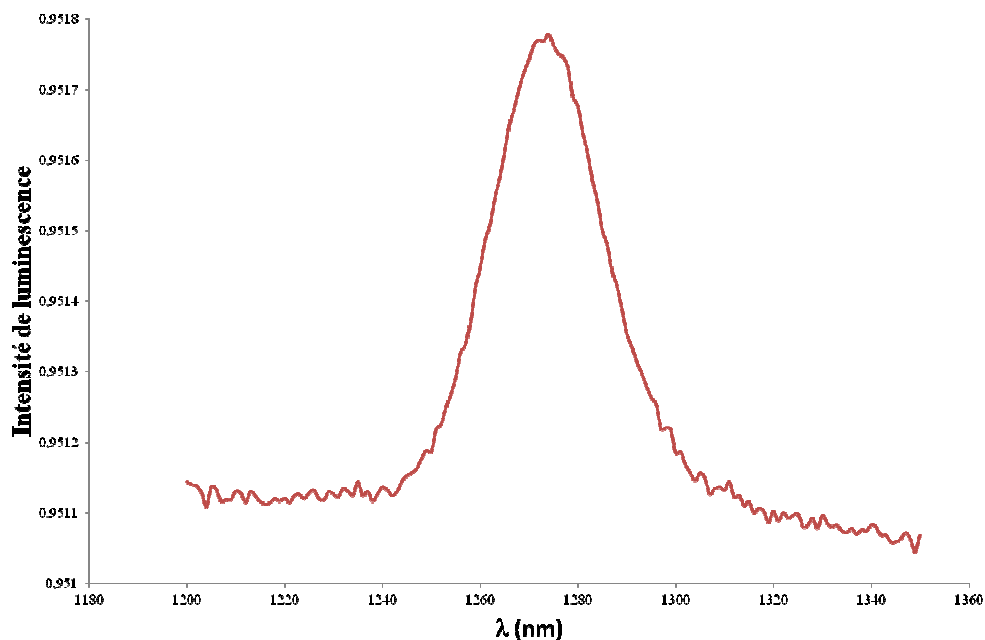


Figure 3-13 : Spectre de luminescence de l'oxygène singulet produit par la C₁COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).

De la même manière, nous pouvons calculer un rendement quantique de production d'oxygène singulet, la valeur calculée étant de **0,70 ± 0,05**.

Cette valeur nous indique que ce type de composé est parfaitement adapté à des applications en PDT en raison de son rendement quantique en production d'oxygène singulet élevé.

II.3. Synthèse du pseudo-Foscan

L'autre chlorure envisagée est le pseudo-Foscan, dont la stratégie de synthèse est identique à celle retenue pour la C₁COOH. Par commodité, nous appellerons la porphyrine P₂COOH et la chlorure C₂COOH.

II.3.1. Synthèse de la P₂COOH

La voie de synthèse de la P₂COOH, issue de la thèse de Julien Gravier (9), passe par la protection des groupements hydroxyles présents sur les phényles. La protection utilisée est un groupe méthyle dont les conditions de déprotection se révèlent être compliquées. L'utilisation de Ph₂S₂ en présence d'un hydrure (CaH₂) est en effet préconisée (10, 11). Cette déprotection se fait dans la NMP, à 200°C, avec un rendement de 90%.

Afin de rendre cette étape moins contraignante (temps de réaction, élimination de la NMP, utilisation de CaH₂), nous avons testé d'autres groupements protecteurs (figure 3-14).

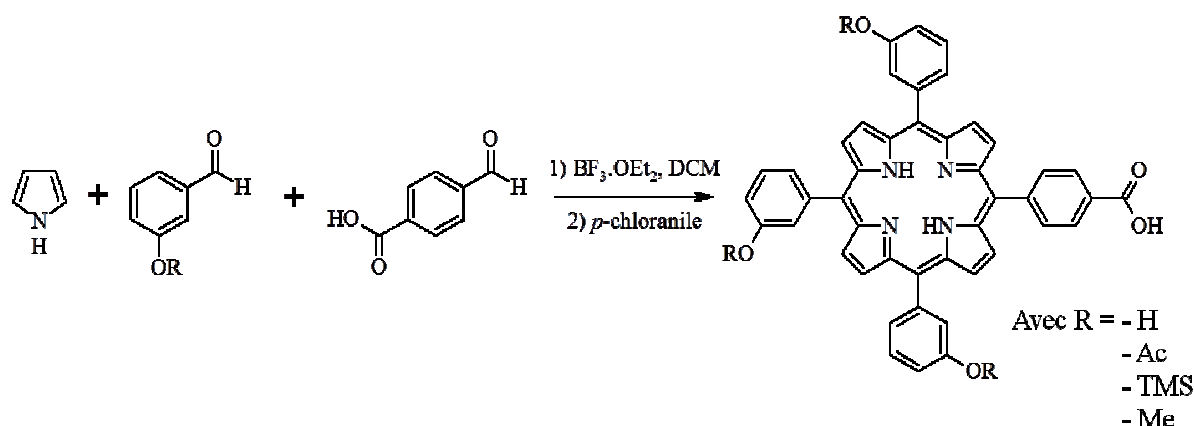


Figure 3-14 : Schéma de synthèse de la P₂COOH protégée.

Le protocole de synthèse est le même que pour la synthèse de la P₁COOH, à savoir la synthèse de Lindsey dans un grand volume de DCM et l'utilisation d'un acide de Lewis, le BF₃-éthérate.

II.3.1.a. Sans groupement protecteur (R = H)

La synthèse a été réalisée sans groupement protecteur (R = H), mais des problèmes de solubilité ont été observés assez rapidement ; en effet, le 3-hydroxybenzaldéhyde est un produit très hydrophile et donc relativement peu soluble dans le DCM. Une solubilisation préalable dans le DMF a été nécessaire. Malgré cela, le produit, s'il est formé, est extrêmement difficile à purifier. La présence de trois groupements -OH libres sur la molécule augmente son affinité avec la silice.

Dans la littérature, une réaction similaire a été décrite par Guo *et al.* (12), qui utilise les réactifs sans groupement protecteur, de l'acide propionique afin de produire la *m*-THPP, et

aucune purification sur colonne de silice. Nous avons adopté ce protocole. Le mélange est chauffé à reflux de l'acide propionique (140°C). Le brut réactionnel est ensuite traité avec de l'éthanol absolu pour recristalliser la porphyrine et laissé toute la nuit à -5°C ; une huile noire est obtenue.

Comme pour la méthode de Lindsey, nous observons une multitude de taches en CCM. Le protocole a été abandonné.

II.3.1.b. Avec un groupement acétyl (R = Ac)

Ce groupement protecteur est bien connu des protections de fonctions hydroxyles en raison de sa déprotection aisée à l'aide d'une base faible.

Le 3-acétyloxybenzaldéhyde est un produit commercial. La réaction a été effectuée dans les conditions classiques de la synthèse de Lindsey et l'élimination des goudrons n'a pas présenté de difficulté particulière. Néanmoins, une grande quantité de sous-produits est observée sans aucune trace de la porphyrine désirée.

En effet, la présence d'un autre groupement carbonyle peut potentiellement entrer en compétition avec la fonction aldéhyde pour la complexation de l'acide de Lewis.

II.3.1.c. Avec un groupement triméthylsilane (R = TMS)

Cette fonction est également un bon groupement protecteur des fonctions -OH, sa déprotection est aisée en présence d'un ion fluorure.

Le produit n'étant pas commercial, il a dû être synthétisé en faisant réagir du TMSCl sur le 3-hydroxybenzaldéhyde en présence d'imidazole dans le DMF. Néanmoins, cette réaction semble peu favorable et l'intermédiaire n'a pas pu être obtenu de manière simple et rapide. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

II.3.1.d. Avec un groupement méthyle (R = Me)

Cette voie a donc été retenue pour être celle exploitée pour cette synthèse (figure 3-15). Le 3-méthoxybenzaldéhyde est mis à réagir dans les conditions de la synthèse de Lindsey et la porphyrine P₂(OMe)₃COOH est obtenue avec un rendement d'environ 15%.

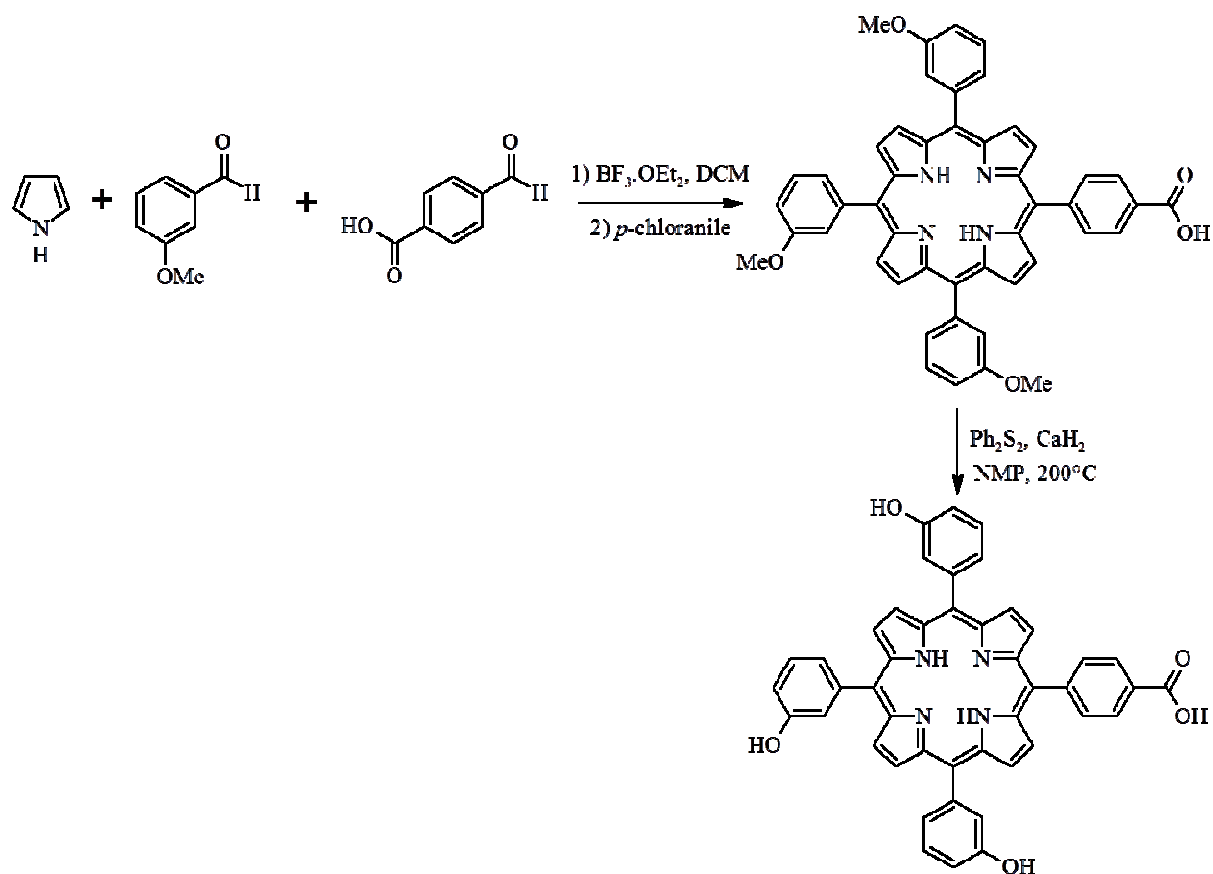


Figure 3-15 : Schéma de synthèse de la P₂COOH.

Les groupements méthyles sont éliminés en utilisant Ph₂S₂ en présence d'un hydrure à reflux dans la NMP. Le mécanisme de cette réaction fait intervenir la formation de PhS⁻ par action de l'hydrure sur la liaison disulfure et attaque de PhS⁻ sur le méthyle, libérant la fonction hydroxylate. Le produit est ensuite isolé grâce des extractions et des lavages puis une colonne chromatographique DCM/acétone. Le rendement de cette étape en produit entièrement déméthylé est de 70% à 80%, et le rendement global de synthèse de la P₂COOH est extrêmement faible : 4% en moyenne.

II.3.2. Synthèse de la C₂COOH

La réduction de Whitlock sur cette molécule est effectuée avec les conditions opératoires identiques à celles pour la C₁COOH. Néanmoins, cette étape reste délicate car la porphyrine obtenue est d'autant plus soluble dans l'eau ; or la synthèse de Whitlock est sensible à l'humidité et peut devenir très aléatoire.

Les nombreuses tentatives de synthèse de cette molécule ont malheureusement toutes échouées. En raison du manque de fiabilité de la synthèse du pseudo-Foscan, nous avons décidé d'abandonner l'utilisation de cette molécule et de poursuivre le travail de thèse sans perdre plus de temps, en nous consacrant exclusivement à la C₁COOH comme photosensibilisateur pour notre PMB.

III. Synthèse du conjugué PS-peptide

III.1. Synthèse du peptide

III.1.1. Généralités sur les peptides et protéines

Les peptides et protéines jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques, notamment en tant qu'hormones, neurotransmetteurs, neuromodulateurs... C'est pourquoi, cette famille de molécules bioactives représente un enjeu important au niveau chimique, biologique et surtout pharmaceutique. Certains médicaments d'origine peptidique sont d'ailleurs disponibles sur le marché : l'insuline (traitement du diabète), la calcitonine (traitement de l'ostéoporose), la vasopressine (traitement de l'hypertension artérielle), la *Thyrotropin-Releasing Hormone* (traitement de l'hypothyroïdie)... D'autres protéines dites " de structure " forment la trame de tous les tissus du corps (kératine, élastase...). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient un grand nombre d'acides aminés, et de peptide pour des assemblages de petite taille. La chimie peptidique a un énorme champ d'applications dans le domaine des sciences de la vie, notamment en ce qui concerne les molécules bioactives et les médicaments.

Les peptides sont des enchaînements d'acides aminés reliés entre eux par une liaison amide, aussi appelée liaison peptidique (figure 3-16). Un acide aminé est une molécule comprenant un carbone central tétraédrique (carbone α , en principe en configuration *D* ou *L*) relié à une fonction acide carboxylique, une fonction amine et une chaîne latérale, R (figure 3-16). Il existe 20 acides aminés naturels, dits protéinogéniques différenciés par la nature de ce groupement R qui confère à chacun leur spécificité et leur conformation. La liaison du carbone carbonyle avec l'azote dans la liaison peptidique (1,33 Å) est plus courte que la liaison simple C-N mais plus longue qu'une liaison double C=N classique. Le caractère partiellement double de la liaison peptidique empêche la rotation autour de la liaison C-N. En conséquence, le groupe peptidique est confiné dans un plan. Il existe cependant une liberté de rotation autour des liaisons C α -C et N-C α .

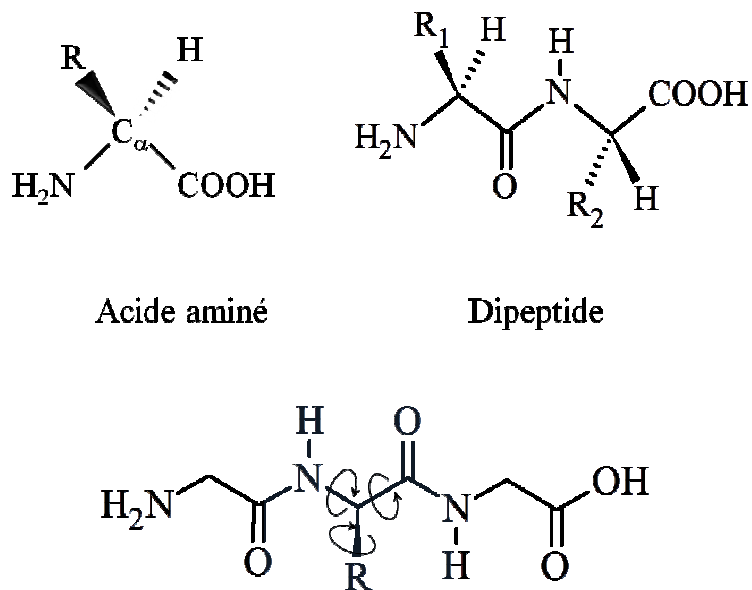


Figure 3-16 : Structures chimiques d'un acide aminé (à gauche) en représentation de Cram et d'un dipeptide (à droite) comportant des chaînes latérales R_1 et R_2 .

La liste des acides aminés naturels est donnée en figure 3-17. A chaque acide aminé est attribué un code monolettre ou trilettre. Ainsi, les peptides sont définis comme des enchaînements d'acides aminés représentés par leur lettre ou leur diminutif. La nomenclature prend également en compte le sens du peptide, il est représenté avec l'extrémité *N*-terminale à gauche et l'extrémité *C*-terminale à droite.

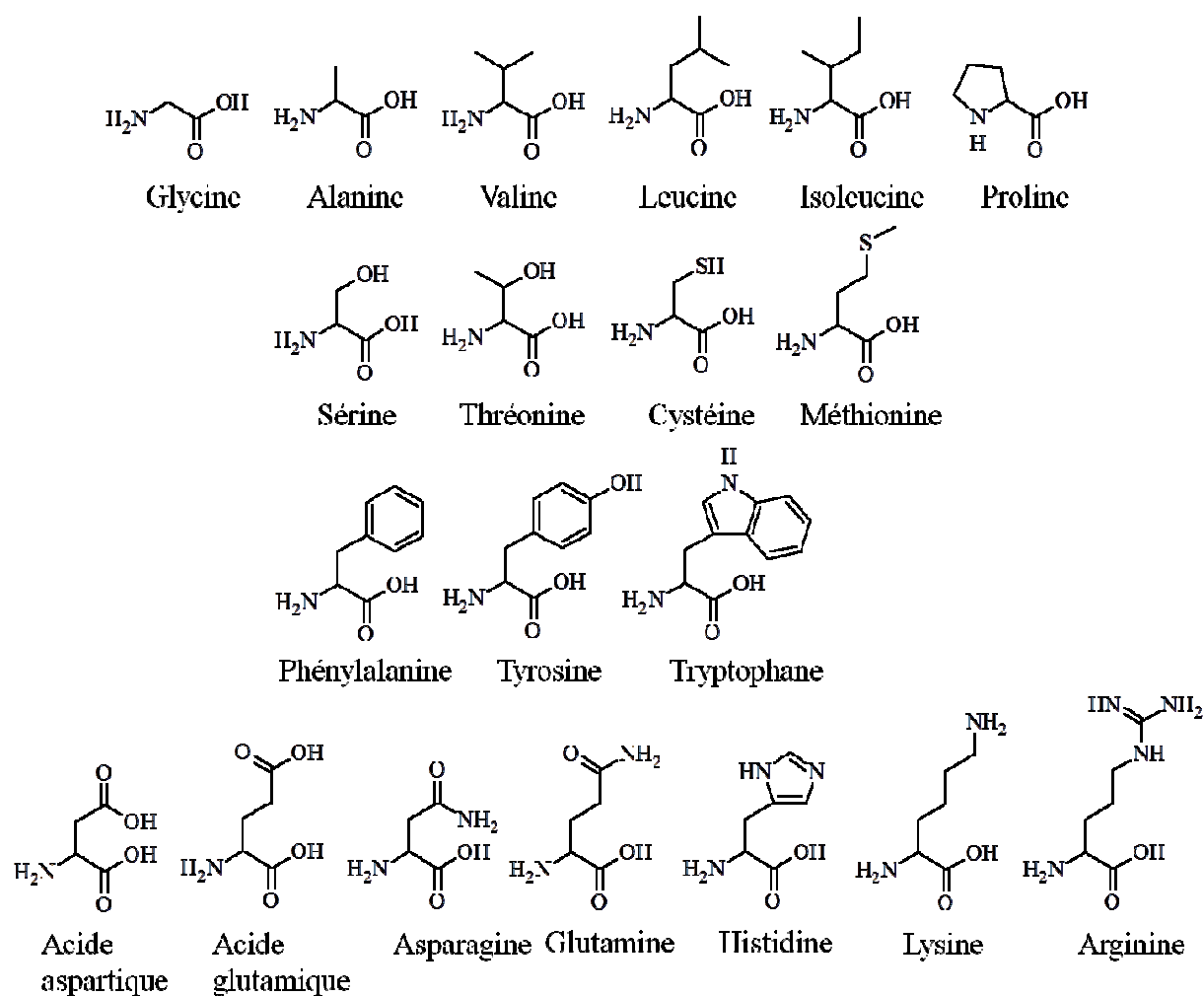


Figure 3-17 : Structure chimique des acides aminés naturels.

Les liaisons peptidiques se font par réaction entre la fonction amine d'un premier acide aminé et la fonction acide d'un second. Dans la nature, ces réactions sont catalysées par des enzymes. Au laboratoire, la fonction acide est activée par un groupe partant, comme le NHS (*N*-hydroxysuccinimide), HBTU (hexafluorophosphate de *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium) ou le HATU (hexafluorophosphate d'azabenzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium). L'agent activant utilisé que nous avons retenu est le HBTU, le mécanisme réactionnel associé à la synthèse peptidique est décrit en figure 3-18.

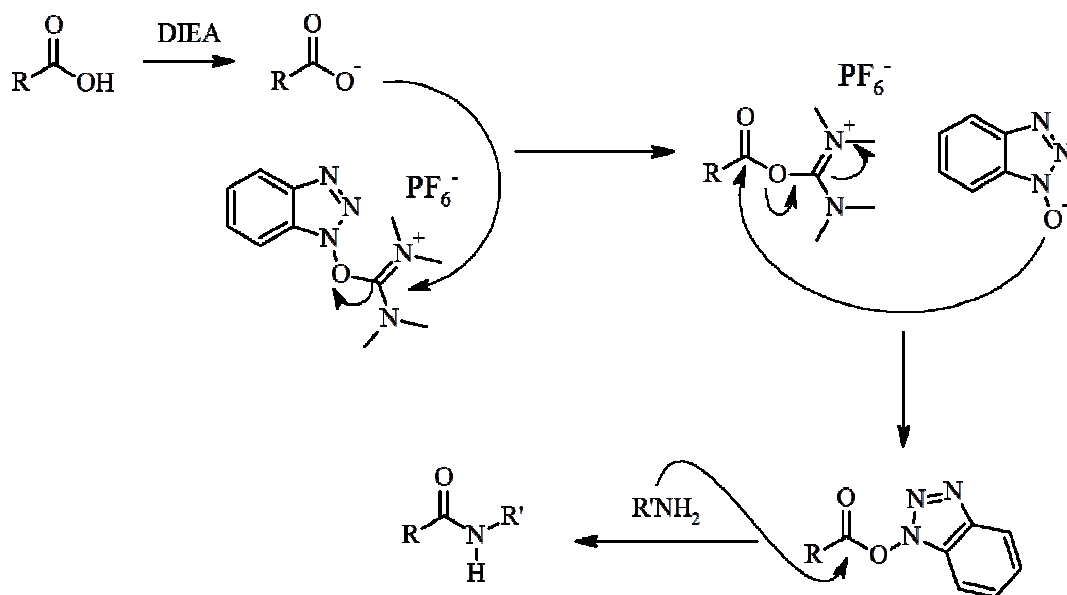


Figure 3-18 : Schéma réactionnel de synthèse peptidique utilisant l'HBTU comme agent de couplage.

Les acides aminés sont ainsi mis à réagir les uns avec les autres par activation de la partie acide carboxylique et couplage avec la fonction amine de l'autre acide aminé. Pour éviter que les mêmes acides aminés ne réagissent entre eux, la partie aminée qui n'est pas destinée à réagir est protégée. De même, les chaînes latérales potentiellement réactives sont protégées afin d'éviter la formation de produits secondaires non désirés. Il existe de nombreux groupements protecteurs afin d'éviter toute déprotection non voulue lors d'une réaction peptidique (figure 3-19). On parle alors d'orthogonalité des protections.

Les différentes protections diffèrent donc par leur mode de déprotection, une liste des principaux groupes protecteurs est donnée tableau 3-3. Les amines sont protégées *via* des fonctions carbamate alors que les acides carboxyliques peuvent être protégés par des esters ou des fonctions particulières.

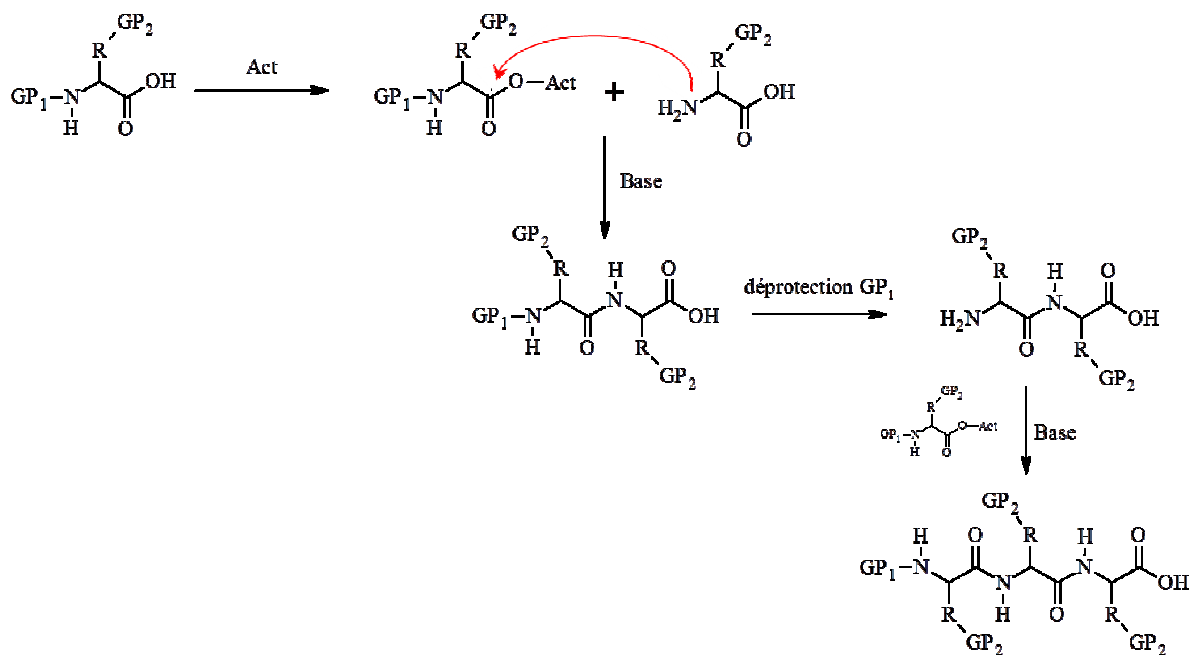
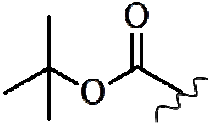
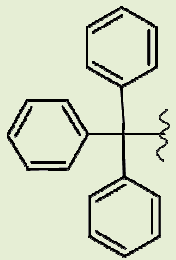
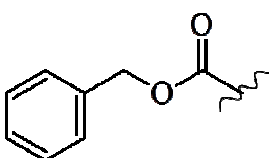
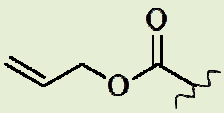
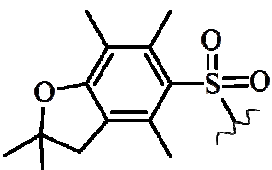


Figure 3-19 : Schéma de synthèse peptidique faisant intervenir un acide aminé comportant une protection latérale GP₂ et une protection du N-terminal GP₁. L'acide est activé par un agent activateur (Act).

Les peptides à longue chaîne peuvent ensuite se replier sur eux-mêmes et adopter des structures 3D particulières, à l'aide de liaisons hydrogène ou d'autres interactions faibles. Ces repliements sont appelés structures secondaires ; les protéines vont elles aussi se replier en structures particulières, appelées structures tertiaires. Ces structures secondaires et tertiaires sont également responsables de la reconnaissance et de l'activité biologique de ces molécules.

Tableau 3-3 : Structure chimique, nom et condition de déprotection des principaux groupements protecteurs utilisés en synthèse peptidique.

Structure chimique et nom	Fonction concernée	Déprotection
<p>9-Fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc)</p>	NH ₂	Base

<p><i>Tert-Butyloxycarbonyl (Boc)</i></p> 	<p>NH₂</p>	<p>Acide</p>
<p><i>Trityle (Trt)</i></p> 	<p>COOH NH₂</p>	<p>Acide</p>
<p><i>Benzyloxycarbonyl (Z)</i></p> 	<p>NH₂</p>	<p>H₂ catalytique Acide fort</p>
<p><i>Allyloxycarbonyl (Alloc)</i></p> 	<p>NH₂</p>	<p>Pd(PPh₃)₄</p>
<p><i>2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl (Pbf)</i></p> 	<p>NH₂</p>	<p>Acide fort</p>

III.1.2. La synthèse peptidique sur phase solide

La synthèse peptidique a connu un essor considérable avec les travaux de Bruce Merrifield (13), qui lui ont valu le Prix Nobel en 1984. La synthèse supportée sur phase solide

est basée sur l'utilisation de billes de polystyrène, insolubles dans le solvant de réaction, sur lesquels des réactifs sont fixés de manière covalente. Cette méthode permet de simplifier les étapes de purification puisqu'il s'agit dans ce cas de filtrer les billes de résine, éliminant ainsi les réactifs n'ayant pas réagi. Les phases de lavage sont donc aussi simplifiées.

L'utilisation de la phase solide dépasse de loin le cadre de la synthèse peptidique uniquement ; à la fin des années 70, Frechet et Leznoff ont transposé avec succès cette méthode à la synthèse de petites molécules, d'oligosaccharides et même de porphyrines (14–17). Néanmoins, la synthèse de peptides reste un domaine d'application majeur pour la phase solide, notamment en raison de la répétabilité des réactions et la possible automatisation des machines. Ainsi, après avoir défini sa stratégie de synthèse et la séquence d'acides aminés constituant le peptide, des peptides relativement longs peuvent être synthétisés de manière automatique en peu de temps.

Le principe de la SPPS (Synthèse Peptidique sur Phase Solide, ou en anglais *Solid-Phase Peptide Synthesis*) est illustré figure 3-20.

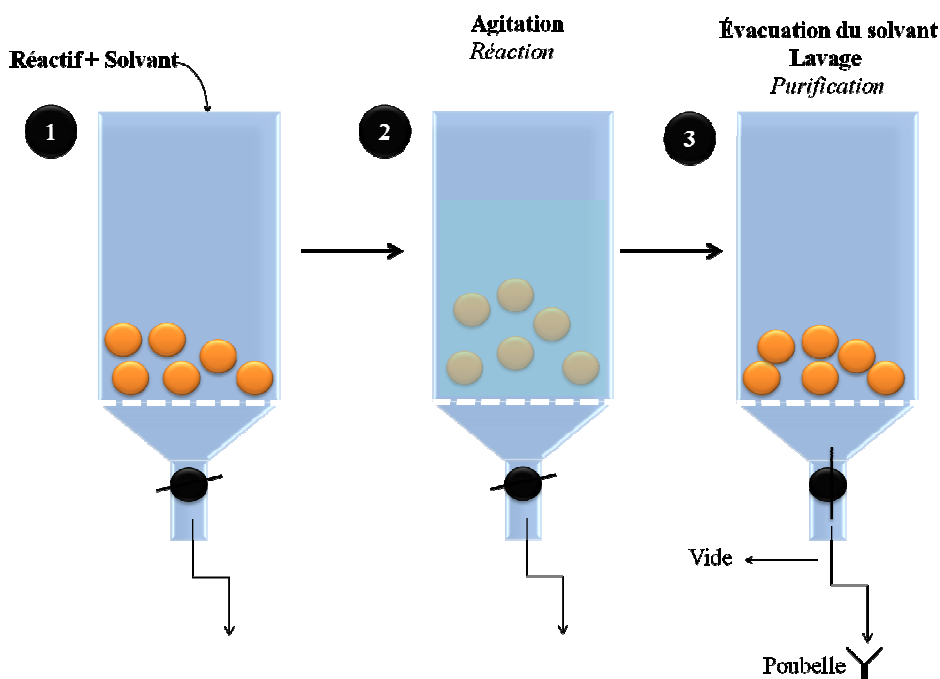


Figure 3-20 : Schéma de synthèse supportée sur phase solide. 1 : Introduction des réactifs en excès et du solvant sur les billes de résine préchargées en réactif de base. 2 : Réaction. 3 : Elimination du solvant et lavage de la phase solide.

La synthèse de peptides suit le même protocole : un acide aminé protégé est préchargé sur la résine, le plus souvent par son extrémité C-terminale, puis il est déprotégé et mis à réagir avec un autre acide aminé en excès, préalablement activé. Après réaction, le solvant contenant les réactifs n'ayant pas réagi est éliminé. Les billes de résine sont ensuite lavées pour éliminer les réactifs libres toujours potentiellement présents dans le milieu réactionnel. Le dipeptide sur la phase solide va de nouveau être déprotégé pour initier le second cycle de l'élongation, comme illustré dans la figure 3-21. Lorsque la séquence d'acides aminés est complète, le peptide est entièrement déprotégé et clivé de la résine (figure 3-21).

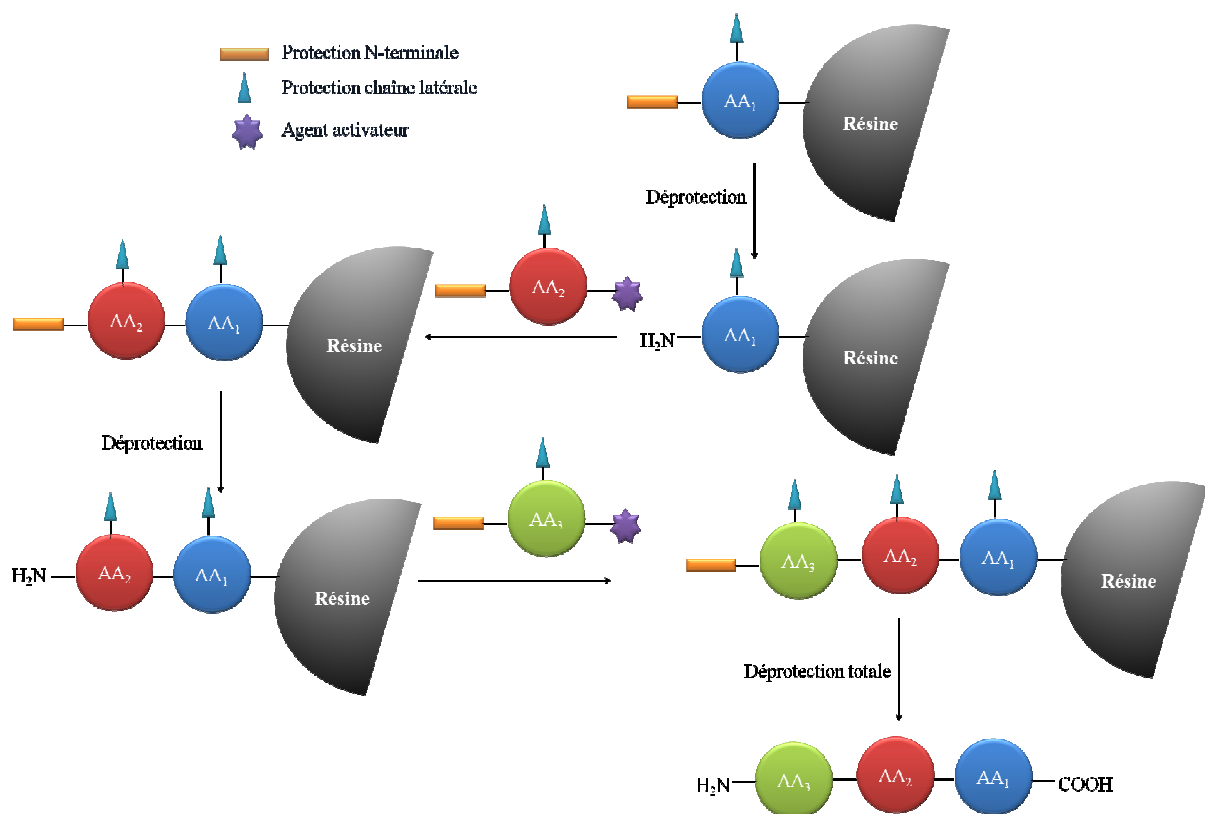


Figure 3-21 : Schéma général de SPPS d'un tripeptide.

Les peptides synthétisés sur phase solide peuvent comporter jusqu'à une quinzaine d'acides aminés environ. Les rendements à chaque étape dépendent de la nature de la liaison, de l'enchaînement des acides aminés. Pour la synthèse de peptides longs, les stratégies classiques de synthèse peptidique peuvent intervenir, à savoir synthétiser un peptide *via* plusieurs fragments.

Au LCPM, nous disposons d'un synthétiseur de peptides entièrement automatique Multiprep INTAVIS, où la programmation nous permet de régler le nombre d'équivalents de chaque acide aminé, le temps de réaction, les volumes de rinçage, etc.

III.1.3. Synthèse du peptide GPLGIAGQK

Le peptide que nous avons choisi de synthétiser est H-GPLGIAGQK-OH ; il est synthétisé sur phase solide Wang en utilisant une stratégie Fmoc. Les acides aminés protégés, utilisés pour la synthèse, sont :

Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH et Fmoc-Lys(Boc)-(Résine Wang). La figure 3-22 montre leurs structures chimiques.

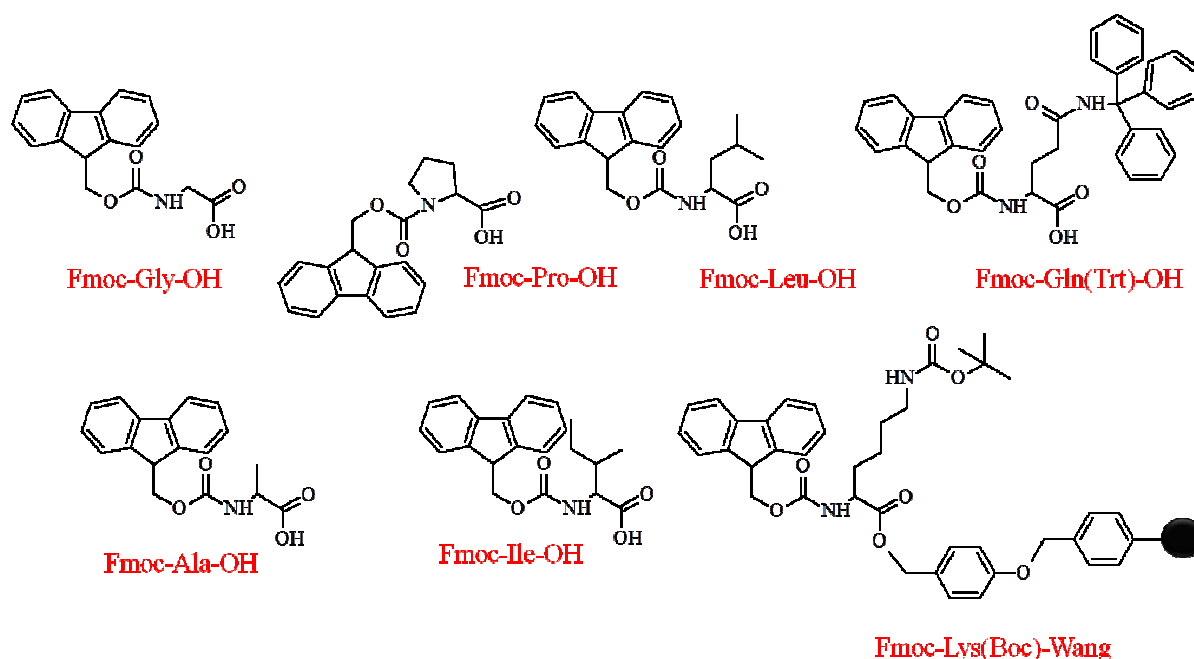


Figure 3-22 : Structures chimiques des acides aminés utilisés pour la synthèse du peptide H-GPLGIAGQK-OH.

Les protections des acides aminés sont orthogonales avec la stratégie employée. En effet, le trityle se déprotège avec un acide fort dilué (généralement 1% de TFA dans le DCM) et le Boc se déprotège avec 25 à 50% de TFA dans le DCM. Elles ne seront donc pas enlevées durant la synthèse. Le peptide ne sera déprotégé entièrement que pendant la phase de clivage de la résine (100% TFA).

Le protocole expérimental est le suivant :

La Fmoc-lysine, dont la chaîne latérale est bloquée par un Boc, est préchargée sur résine Wang (clivable avec 100% de TFA). Cette résine commerciale est introduite dans un réacteur de phase solide. Les billes de résine sont mises à gonfler en utilisant du DCM, puis sont lavées en utilisant du DMF et du DCM.

Le Fmoc est enlevé en utilisant un mélange pipéridine / DMF (20% volumique), la résine est lavée puis le premier acide aminé, la glutamine, préalablement activée par du HBTU, est introduite en excès avec de la *N*-Méthylmorpholine (NMM) dans le DMF. Ensuite, la résine est lavée plusieurs fois avec du DCM, du méthanol et du DMF afin d'éliminer les produits adsorbés dans la résine.

Une étape de *capping*, consistant à faire réagir de l'anhydride acétique sur les fonctions NH₂ n'ayant pas réagi, est réalisée. Cette étape est nécessaire, car elle permet d'éviter que d'autres peptides incomplets ne soient formés (délétion).

En fin de séquence, la protection Fmoc finale est éliminée pour ne laisser sur la phase solide que le peptide H-GPLGIAGQ(Trt)K(Boc)-(Résine Wang).

Lors d'une thèse précédente au laboratoire, il a été observé que la première glycine introduite se couplait avec beaucoup de difficultés. Cette observation a pu être faite par prélèvements de résine à chaque étape et test colorimétrique au TNBSA (acide trinitrobenzènesulfonique). Cette délétion est évitée en adoptant un protocole particulier : six couplages successifs permettent d'avoir un rendement optimal. Une partie de la résine est prélevée en fin de processus, le peptide est clivé de la résine et analysé en spectrométrie de masse afin de vérifier sa structure chimique.

Le protocole détaillé se trouve dans la publication du chapitre IV.

III.2. Synthèse et caractérisation du conjugué « PS-peptide »

III.2.1. Synthèse du conjugué

Le conjugué, noté TPC-peptide pour désigner le couplage entre la C₁COOH et H-GPLGIAGQK-OH, est synthétisé en deux étapes : activation du photosensibilisateur et couplage sur phase solide.

III.2.1.a. Activation du photosensibilisateur

La C₁COOH est activée par un groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS), à l'aide de dicyclohexylcarboxydiimide (DCC), présenté dans la figure 3-23.

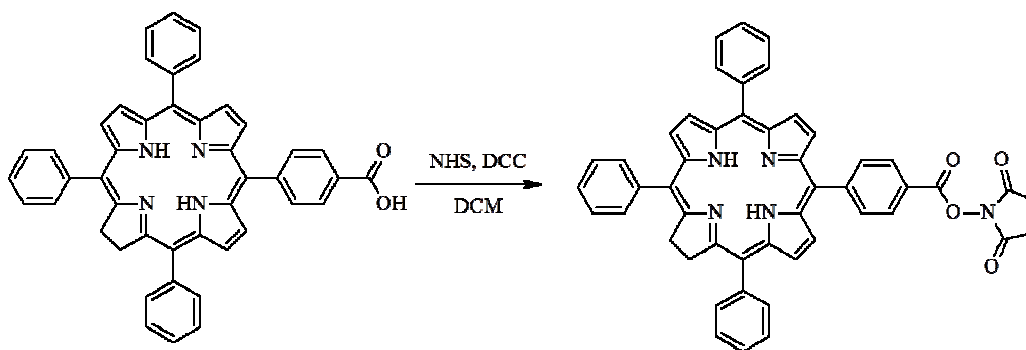


Figure 3-23 : Schéma de synthèse de l'activation de la C₁COOH.

Cette molécule est obtenue avec un rendement de 70%.

III.2.1.b. Couplage au peptide

Le photosensibilisateur activé est mis à réagir avec le peptide immobilisé sur phase solide, en présence de DIEA dans le DCM. Les billes de résine sont mises à agiter une nuit afin d'obtenir le conjugué immobilisé sur phase solide (figure 3-24). Ensuite, le peptide est clivé de sa résine à l'aide de TFA (pur) pendant 2h30, cette étape a aussi comme effet de déprotéger les chaînes latérales des acides aminés protégés, puis le produit obtenu est purifié par HPLC en phase inverse.

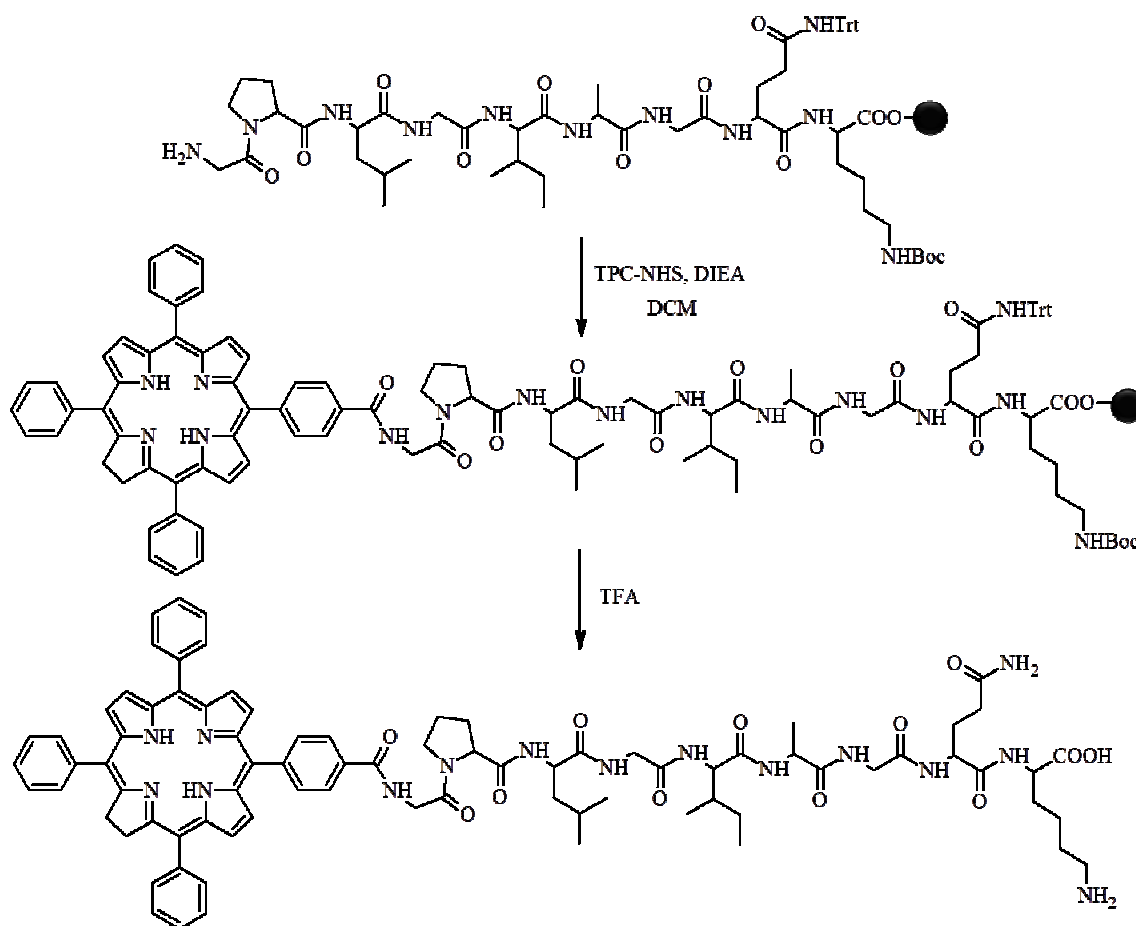


Figure 3-24 : Schéma de synthèse du conjugué TPC-peptide.

Le conjugué est purifié par HPLC préparative, sur colonne C₁₈, utilisant un gradient acétonitrile/eau [75:25] (0,1% TFA) jusqu'à 100 acétonitrile en 15 min, puis isocratique en acétonitrile pendant 15 min. Le conjugué possède un temps de rétention de 16 min, sous forme de double pic caractéristique dû au deux régioisomères de la chlorine.

Comme mode de détection HPLC, nous utilisons un détecteur à barrette de diode permettant de visualiser en direct le spectre UV-visible du composé, ainsi qu'un détecteur de fluorescence ($\lambda_{exc} = 415 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$).

Notons que dans les mêmes conditions de purification HPLC, la TPC seule est détectée au bout de 10 min, prouvant que le peptide apporte une hydrophobie supplémentaire au conjugué.

Le conjugué est analysé par spectrométrie de masse. Après purification, le rendement global de synthèse peptidique et de couplage du photosensibilisateur est de 40%.

III.2.2. Caractérisations photophysiques du conjugué

Afin de vérifier que les propriétés photophysiques de la TPC ne sont pas modifiées par l'ajout du peptide, les mesures d'absorption de fluorescence et de production d'oxygène singulet ont été réalisées. Ces mesures sont essentielles afin de vérifier que la partie photoactivable du PMB conserve ses propriétés phototoxiques.

Les mesures d'absorption, de fluorescence et de production d'oxygène singulet montrent que les propriétés de la TPC restent les mêmes après couplage du peptide. Les valeurs sont reportées dans le tableau 3-4.

Tableau 3-4 : Comparaison des propriétés photophysiques de la TPC et du conjugué TPC-peptide.

	Bande d'absorption	TPC		TPC-peptide	
		λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Absorption	Bande de Soret	415	85000	415	85000
	Q _{IV}	512	9800	512	9800
	Q _{III}	545	6500	545	6500
	Q _{II}	588	5000	588	5000
	Q _I	650	21000	650	21000
Fluorescence	Φ_F	0,23 ± 0,02		0,23 ± 0,02	
	τ_F (ns)	9,1 ± 0,5		9,1 ± 0,5	
Production d'oxygène singulet	Φ_Δ	0,70 ± 0,05		0,70 ± 0,05	

IV. Choix et synthèse du quencher

Le *quencher* est un élément important du PMB, c'est lui qui assure le rôle de protecteur des tissus sains. Il en existe de nombreux, et les principaux ont été présentés dans le chapitre II ; cette partie est donc destinée à la détermination du meilleur *quencher* à utiliser pour un PMB.

IV.1. Choix du *quencher*

IV.1.1. Les quenchers testés

La nature est un grand réservoir de molécules biologiquement et photophysiquement actives, nous avons donc sélectionné des molécules naturelles, connues pour leurs propriétés d'inhibition d'états excités. Par ailleurs, la publication de Jon Lovell portant sur l'utilisation de *Black Hole Quenchers* comme inhibiteurs d'états excités des PS pour une utilisation dans un PMB a également retenu notre attention (18). En plus de ces molécules, nous avons aussi décidé de tester le *quencher* préconisé dans cette publication pour une telle utilisation : le *BlackBerry Quencher 650* (BBQ650).

Les molécules retenues sont donc :

- Des composés phénoliques.
- Des flavonoïdes.
- Un caroténoïde.
- Le BBQ650.

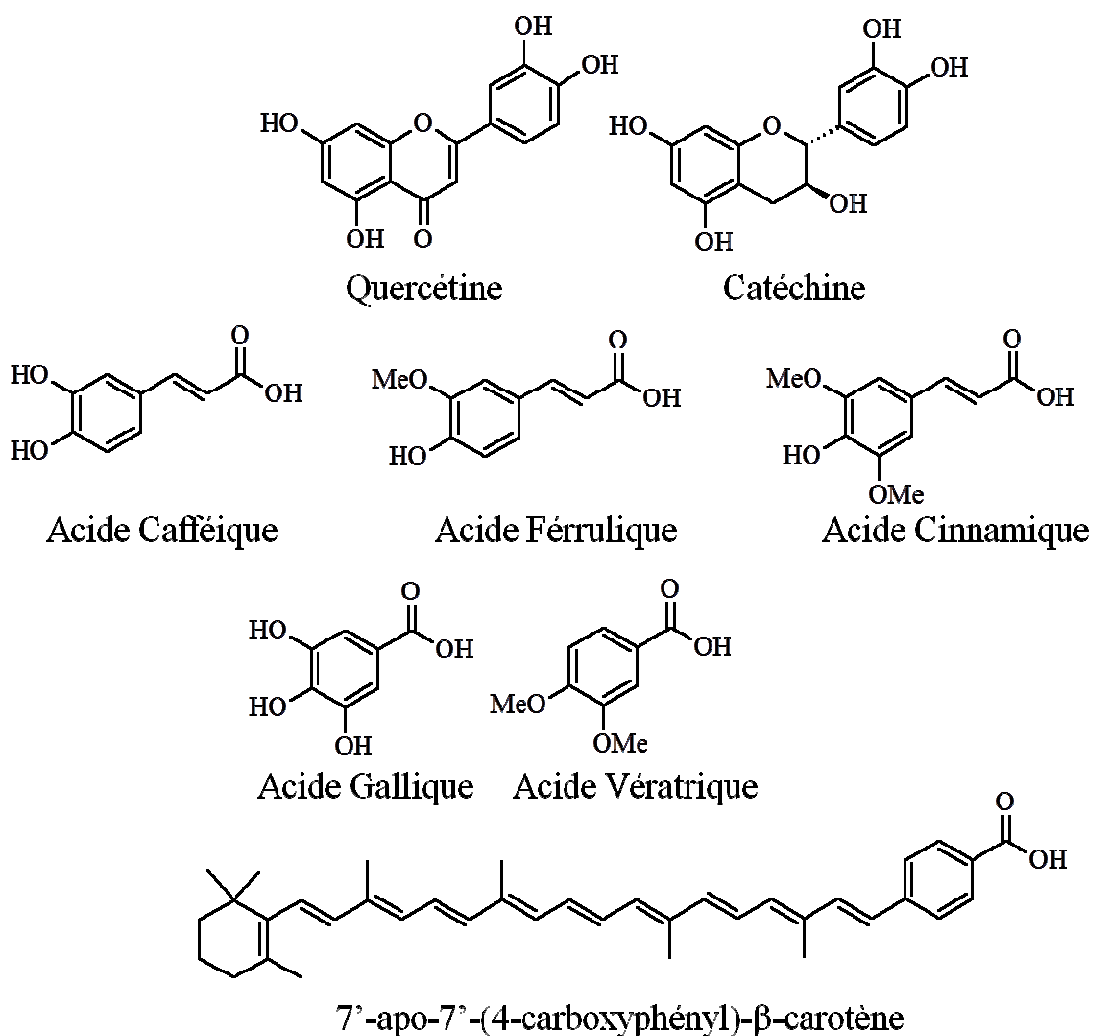
Le choix des molécules doit également prendre en compte une donnée structurale : elles doivent comporter une fonction acide carboxylique, ou être facilement fonctionnalisables pour pouvoir être accrochées au peptide. De ce fait, bien que le β -carotène soit une molécule extrêmement efficace en ce qui concerne l'inhibition de l'oxygène singulet, l'utilisation d'un dérivé comportant une fonction acide carboxylique a été choisie. La molécule utilisée par Gust *et al.* (19, 20) pour les études de transfert d'énergie entre une porphyrine et une entité

caroténoïde est une molécule asymétrique, comportant une fonction acide benzoïque à une extrémité (figure 3-25).

Les flavonoïdes choisis sont les deux flavonoïdes connus pour être les meilleurs antioxydants de leur famille : la catéchine et la quercétine (21–24). Même s'ils ne comportent pas de fonction –COOH, ils sont néanmoins facilement fonctionnalisables (25, 26).

Différents phénols et polyphénols ont été choisis en fonction de leur disponibilité (22).

La figure 3-25 présente les structures chimiques des molécules retenues.



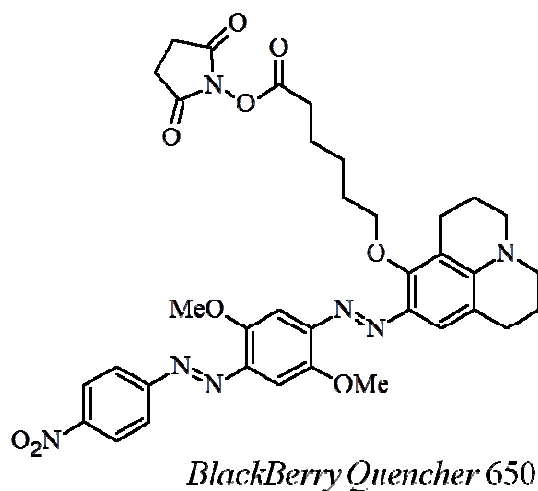


Figure 3-25 : Structures chimiques des molécules testées pour les essais de quenching.

IV.1.2. Les tests de quenching

IV.1.2.a. Protocole expérimental

Les tests sont effectués directement en solution, dans des cellules en quartz quatre faces placées dans un Fluorolog 3 thermostaté à 25°C. Le PS (la TPC) est solubilisée dans l'éthanol à une concentration de $6,5 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ afin d'obtenir une solution avec une absorbance de 0,2 à la longueur d'onde d'excitation : $\lambda_{exc} = 650$ nm. Les *quencher*s sont introduits directement en solution à hauteur de $1 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ environ chacun.

Les mesures de production d'oxygène singulet par la TPC sont réalisées en présence et en absence de *quencher*, en solution.

IV.1.2.b. Résultats

La production normalisée d'oxygène singulet par la TPC en présence des *quencher*s en solution est représentée en figure 3-26.

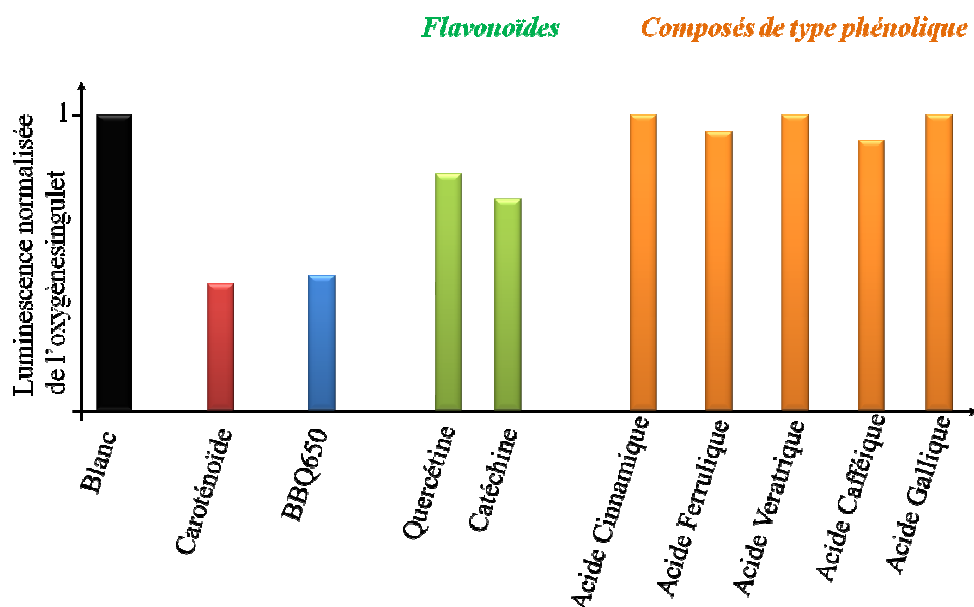


Figure 3-26 : Tests de quenching en solution entre la TPC et différentes molécules. Blanc : TPC seule en solution. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C. [Quenchers] = 10⁻³ mol.L⁻¹.

Ces résultats nous montrent que les composés de type phénolique « simple » (*i.e.* non flavonoïde) ont peu, voire pas d'effet sur la quantité d'oxygène singulet émis par la TPC ; en revanche, les flavonoïdes semblent avoir un effet sur la formation d'oxygène singulet. La figure 3-27 décrit l'évolution de la production d'oxygène singulet émis par la TPC en fonction de la quantité de flavonoïdes dans le milieu. Nous pouvons observer qu'une concentration croissante de flavonoïdes influence de manière significative la production d¹O₂, les valeurs de luminescence étant diminuées de 80% dans le cas de la catéchine et de 40% dans le cas de la quercétine.

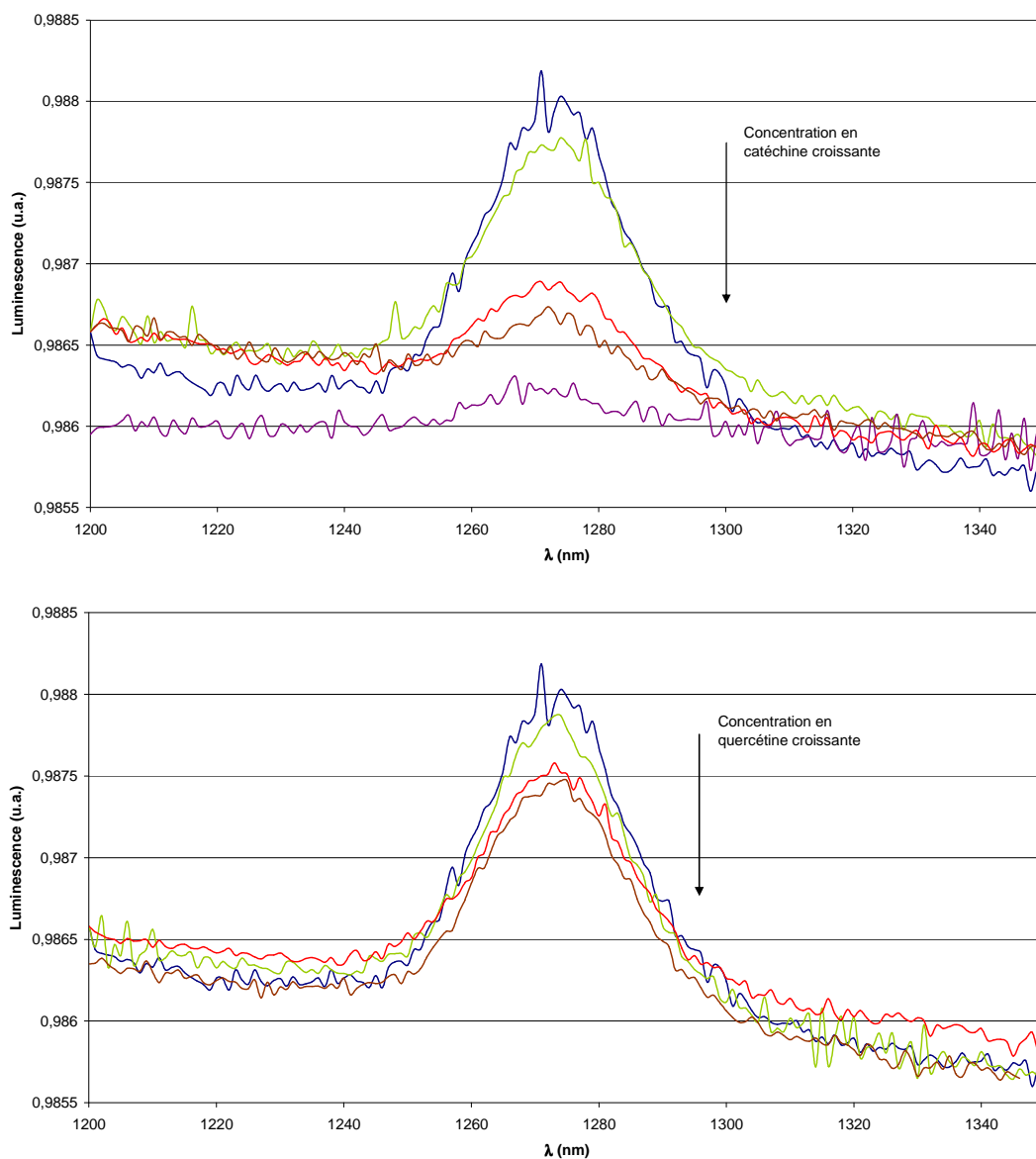


Figure 3-27 : Evolution de la production d'oxygène singulet en fonction de la concentration en flavonoïde dans le milieu. En haut : le quencher est la catéchine ; en bas : le quencher est la quercétine. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C. Concentrations de flavonoïdes : en bleu : 0 mol.L^{-1} ; en vert : $1.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; en rouge : $2.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; en marron : $3.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; en violet : $4.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Les *quenchers* présentant les meilleurs résultats sont le caroténoïde et le BBQ650. En effet, les spectres de luminescence de l'oxygène singulet permettent d'observer une nette diminution de la production d'oxygène singulet (figure 3-28) : 53% dans le cas du BBQ650 et 57% dans le cas du caroténoïde.

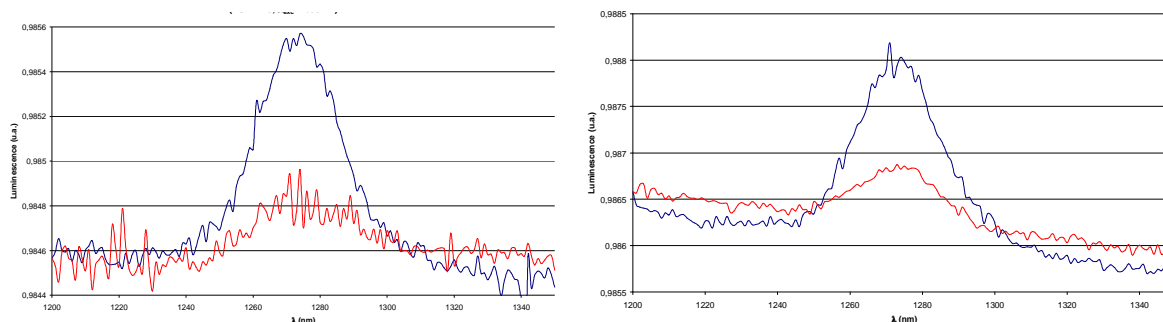


Figure 3-28 : Spectres de production d'oxygène singulet de la TPC en absence de quencher (en bleu) et en présence de quencher (en rouge). A gauche : caroténoïde. A droite : BBQ650. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C.

IV.1.3. Conclusion

Les *quenchers* de type phénolique ne donnent pas de résultats satisfaisants quant à leur capacité d'inhiber la production d'oxygène singulet généré par la TPC. Ils ne peuvent donc être envisagés pour la suite de ce travail. Les flavonoïdes, quant à eux, induisent une diminution dans la détection d' $^1\text{O}_2$ à concentration élevée en solution. Néanmoins, ces composés sont connus pour inhiber $^1\text{O}_2$ de manière physique et chimique, et il est relativement compliqué à ce stade de déterminer la proportion de chaque mécanisme intervenant dans l'inhibition. Des études en durée de vie de l'oxygène singulet pourraient nous permettre de quantifier cette proportion, mais au regard de la grande différence entre le taux d'inhibition des flavonoïdes et de celui du caroténoïde ou du BBQ650, une telle investigation n'est pas nécessaire.

En effet, le caroténoïde et le BBQ650 montrent une activité deux fois supérieure à celle des flavonoïdes ; ils sont donc retenus pour être utilisés comme candidats *quenchers* de notre PMB.

Etant donné la meilleure capacité d'inhibition du caroténoïde, ainsi que son utilisation dans les précédents travaux sur les PMB de l'équipe du professeur Zheng, précédemment cités, nous avons décidé de consacrer nos efforts à sa synthèse et à son couplage au PMB.

IV.2. Synthèse du caroténoïde

La synthèse du caroténoïde a été décrite dans la littérature par Gust *et al.* (20) et se compose de trois étapes de synthèse. La rétrosynthèse est présentée en figure 3-29.

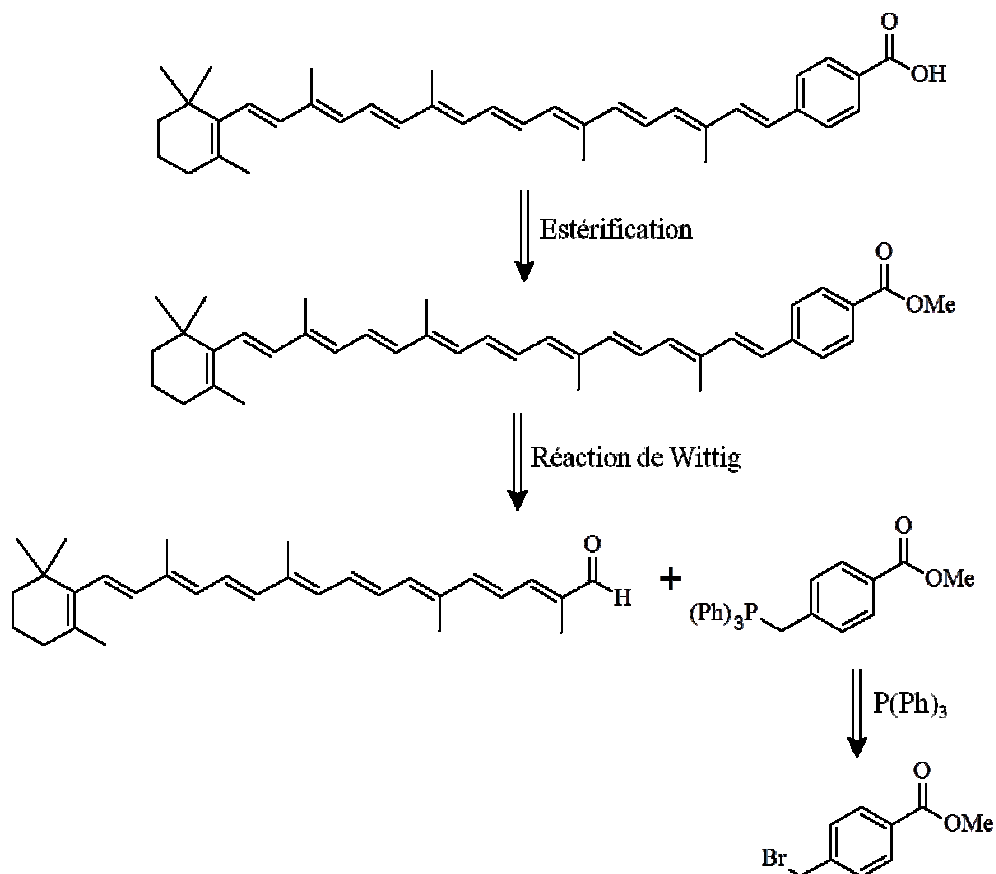


Figure 3-29 : Rétrosynthèse du caroténoïde.

IV.2.1. Synthèse du bromure de 4-carbométhoxybenzyltriphénylphosphonium

Ce précurseur est obtenu par substitution nucléophile de la triphénylphosphine sur le composé bromé dans le toluène (figure 3-30).

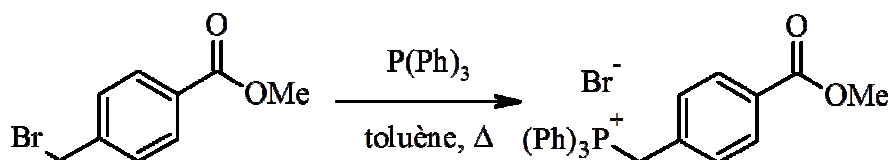


Figure 3-30 : Synthèse du 4-carbométhoxybenzyltriphénylphosphonium.

Cette réaction se fait avec un rendement de 81% et la purification procède par simple filtration, car le sel formé est insoluble dans le toluène.

IV.2.2. Réaction de Wittig – Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)- β -carotène

Cette réaction fait intervenir le sel de triphénylphosphonium et un aldéhyde en présence de méthanoate (figure 3-31). La réaction se déroule dans le DMSO à 80°C pendant 24h.

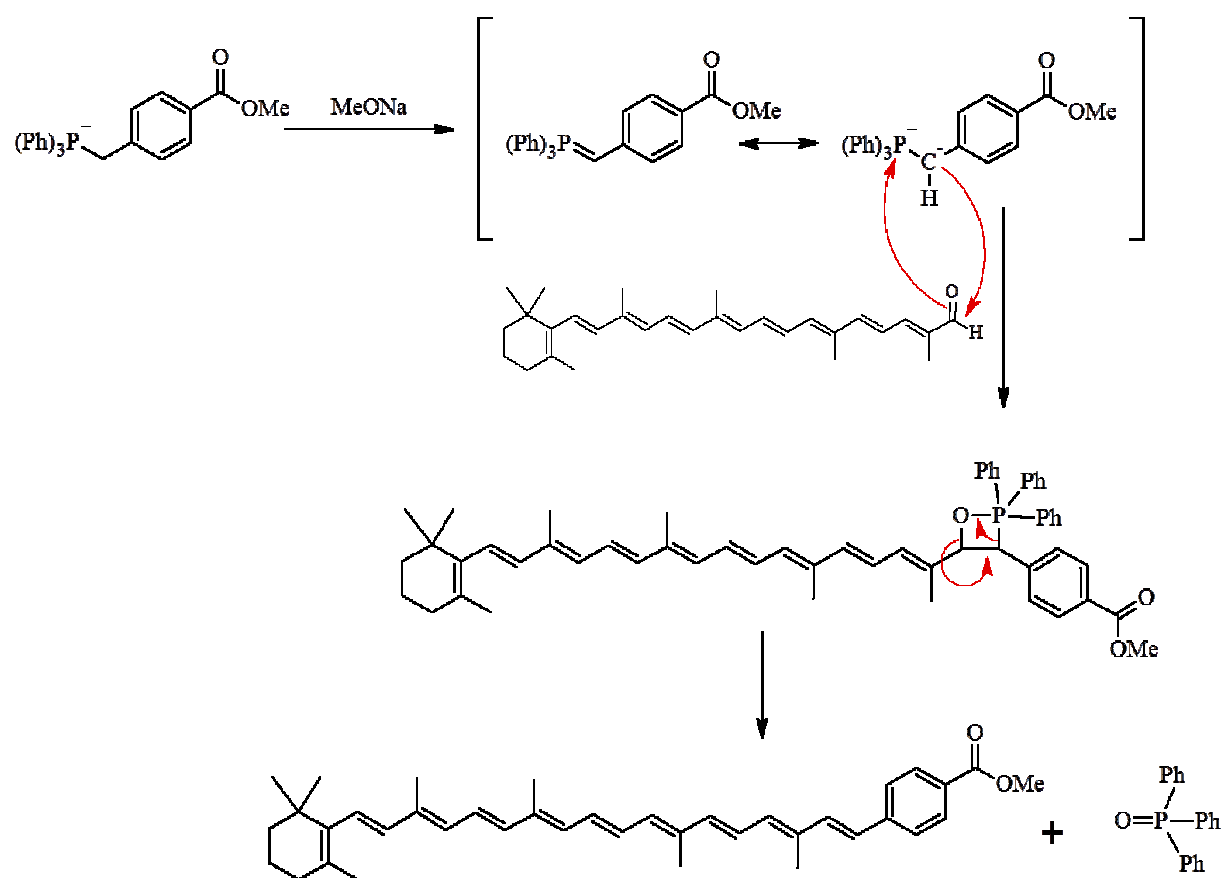


Figure 3-31 : Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)- β -carotène et mécanisme de formation.

Le produit final est obtenu après recristallisation dans un mélange DCM/MeOH, avec un rendement de 85%.

IV.2.3. Saponification – Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carboxyphényl)- β -carotène

Cette réaction se fait dans les conditions de la publication de Gust *et al.*, à savoir dans une solution aqueuse de potasse à 10%, avec comme co-solvant un mélange THF/MeOH. La réaction est agitée à température ambiante pendant une journée (figure 3-32).

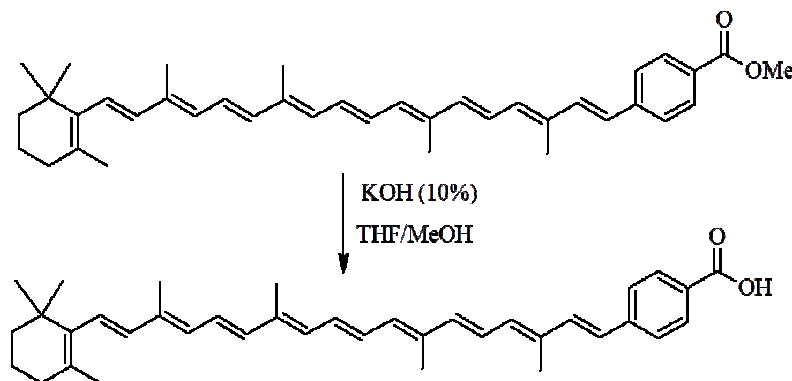


Figure 3-32 : Saponification de l'ester méthylique de caroténoïde.

Le produit obtenu est une huile qui est difficile à recristalliser. De nombreux solvants de recristallisation ont été testés, et les résultats obtenus sont peu satisfaisants. En effet, nous obtenons un mélange d'huile et de cristaux contenant différents produits de dégradation qui ne permet pas d'isoler le produit entièrement.

De plus, son état à moitié huileux ne permet pas d'envisager une étape supplémentaire d'activation à la *N*-hydroxysuccinimide (NHS), comme pour la TPC. Une autre méthode d'activation *in situ* et de couplage à une amine libre (comme l'utilisation de DCC en présence de DMAP) est peu conseillée en raison de la présence d'une fonction acide en *C*-terminal du peptide.

IV.3. Conclusion

Les tests de *quenching* réalisés en solution révèlent que les deux meilleurs candidats sont le caroténoïde et le *dark quencher* BBQ650. Les PMB synthétisés avec ces deux inhibiteurs présenteraient un mode d'inhibition différent. Le caroténoïde est connu pour inhiber d'une part l'état triplet des photosensibilisateurs, et d'autre part l'oxygène singulet,

signifiant que le PMB garderait ses propriétés de fluorescence. Le BBQ650, quant à lui, est un *black hole quencher*, catégorie de molécules connues pour agir par FRET avec les PS, signifiant que le PMB perdrait ses capacités de fluorescence.

V. Couplage enzymatique

Etant donné les difficultés de recristallisation du caroténoïde portant la fonction acide carboxylique, son couplage à la lysine du peptide s'avère être compromis par voie classique, c'est-à-dire activation de la fonction acide par un ester activé. Une alternative originale à cette synthèse chimique consisterait à synthétiser l'ester méthylique puis à utiliser le potentiel catalytique des enzymes hydrolytiques en milieu organique pour le coupler au peptide. En effet, l'exploitation des propriétés de spécificité et de sélectivité de ces enzymes devrait permettre de synthétiser le dérivé peptidique choisi, en une seule étape et en limitant le risque de formation de produits secondaires, facilitant ainsi la purification ultérieure de la molécule ciblée.

Afin de synthétiser de tels dérivés peptidiques, une étude préliminaire au LRGP a permis de déterminer les conditions de synthèse de liaison amide par voie enzymatique, en particulier par réaction d'acylation. Les fonctions potentiellement acylables sur un peptide sont des fonctions hydroxyles et / ou amines. Afin d'étudier la réactivité de ces fonctions ainsi que la sélectivité enzymatique de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, les travaux se sont focalisés, dans un premier temps, sur une molécule modèle possédant une fonction hydroxyle et une fonction amine primaire (le 6-amino-1-hexanol). Les résultats obtenus ont permis de préciser la spécificité de la lipase B de *Candida antarctica* vis-à-vis de la *N*- et *O*-acylation, ainsi que les performances de ces réactions dans différents milieux tels que des solvants organiques, des milieux fondus, des liquides ioniques et le CO₂ supercritique (27). Un modèle cinétique a été établi, basé sur un mécanisme enzymatique de type bi bi ping-pong séquencé, auquel a été couplée la désactivation du biocatalyseur au cours du procédé de synthèse. La fiabilité de ce modèle a été validée pour différents rapports molaires en substrats (28). Cette étude a permis de déterminer les conditions d'acylation d'un dipeptide Lys-Ser par l'acide oléique. Il a été notamment montré que la sélectivité et la performance de la réaction

d'acylation de ce dipeptide étaient influencées par la réactivité de ses groupements fonctionnels et de sa solubilité dans le milieu réactionnel. En milieu organique, un seul produit réactionnel est obtenu et son identification par spectrométrie de masse par fragmentation et par RMN mono et bi-dimensionnelle a confirmé qu'il s'agissait du *N*-ε oléyl Lys-Ser. Dans d'autres milieux réactionnels, tels que milieu fondu ou liquide ionique de type [Bmim]⁺[PF₆]⁻, la sélectivité est identique mais le taux de conversion du dipeptide à l'équilibre est supérieur et les vitesses initiales de réaction sont beaucoup plus élevées, probablement lié à la meilleure solubilité du dipeptide dans ces milieux réactionnels (29).

Ces travaux nous ont permis d'envisager le couplage du caroténoïde à la lysine du peptide *via* une liaison amide afin d'avoir une meilleure stabilité en milieu *in vivo*. Deux enzymes ont été sélectionnées comme étant de bons candidats pour cette réaction : la lipase B de *Candida antarctica* et *Pseudomonas cepacia* (30, 31). La formation de liaisons amides par ces deux enzymes est favorisée dans le cas où la fonction amine est présentée à une fonction ester méthylique (32, 33), c'est pourquoi nous allons utiliser l'ester méthylique du caroténoïde pour tenter ce couplage. De plus, ces enzymes immobilisées sont décrites pour travailler avec un rendement optimum dans des solvants comme la cyclohexanone ou le M₂B₂, solvants peu compatibles avec l'utilisation de caroténoïdes (34).

Cette partie va donc se diviser en deux études : choix du solvant le mieux adapté à la manipulation de notre caroténoïde, puis tests de couplage enzymatique.

V.1. Détermination du solvant de réaction

Les lipases immobilisées sont efficaces dans de nombreux solvants de réaction, tels que :

- la cyclohexanone,
- le M₂B₂,
- l'acétonitrile,
- l'acétone.

Or des solvants comme la cyclohexanone sont connus pour dégrader les caroténoïdes. Afin de vérifier la stabilité de notre composé dans ces différents solvants, des mesures de stabilité sont effectuées sur l'ester méthylique du caroténoïde (Car-COOME) dans les solvants à 65°C. La stabilité relative est mesurée qualitativement par CCM pendant 3 jours.

Les solutions de caroténoïde sont préparées à 1 mg/mL et sont chauffées à 65°C. Le caroténoïde est soluble dans la cyclohexanone, l'acétone et l'acétonitrile, alors qu'il est insoluble dans le M₂B₂. Après 24 h, nous observons que la solution dans la cyclohexanone a perdu sa couleur et est devenue limpide ; cette observation vient confirmer que ce solvant n'est pas compatible avec l'utilisation de caroténoïdes.

Une légère dégradation est également observée par CCM dans le M₂B₂ après 3 jours. L'acétone et l'acétonitrile ont finalement été retenus pour effectuer cette synthèse, solvants dans lesquels le *quencher* est stable et qui ont déjà été utilisés comme milieux réactionnels pour les enzymes choisies.

V.2. Réactions de couplage enzymatique

La réaction envisagée étant le couplage entre un Car-COOME et la fonction latérale amine libre de la lysine, dernier acide aminé du peptide H-GPLGIAGQK-OH, nous avons décidé de ne pas employer le peptide en entier mais de réaliser les essais avec la lysine seule. Pour ce faire, la lysine est protégée en *N*-terminal par un groupement Boc afin d'augmenter son caractère apolaire et ainsi être plus proche de l'hydrophobie du peptide (figure 3-33).

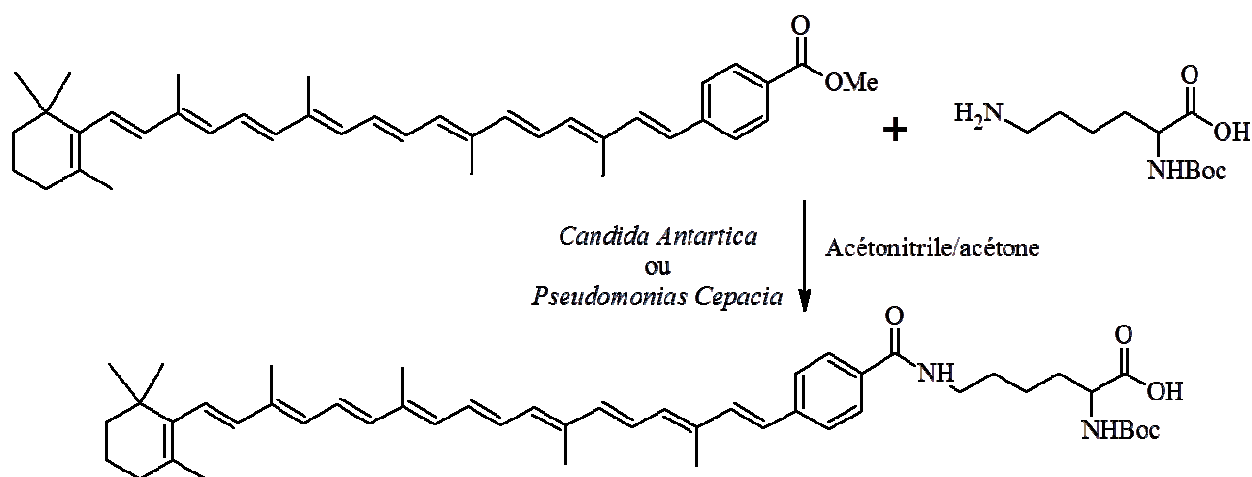


Figure 3-33 : Réaction de synthèse enzymatique entre l'ester méthylique du caroténoïde et la Boc-Lys-OH.

Les réactions se font dans des petits réacteurs en verre, chauffés à 50°C et agités, avec les solvants comme indiqué dans le tableau 3-5.

Tableau 3-5 : Conditions opératoires pour la synthèse enzymatique.

N°	m (Boc-Lys-OH) (mg)	m (Car-COOME) (mg)	Enzyme (et masse d'enzyme en mg)	Solvant
1	2,5	4,9	<i>Candida antarctica</i> (30,4)	Acétonitrile (1 mL) Acétone (0,2 mL)
2	2,7	4,9	<i>Candida antarctica</i> (21,3)	Acétone (1 mL)
3	2,5	4,9	<i>Candida antarctica</i> (21,1)	Acétonitrile (0,5 mL) Acétone (0,5 mL)
4	2,5	5,0	<i>Pseudomonas cepacia</i> (20,3)	Acétone (1 mL)
5	2,6	4,9	<i>Pseudomonas cepacia</i> (20,3)	Acétonitrile (0,5 mL) Acétone (0,5 mL)

La réaction est suivie par CCM avec comme solvant d'éluion : butanol/acide acétique/eau [60:20:20].

Le caroténoïde migre sur la plaque CCM avec un rapport frontal (Rf) de 0,80 mais aucune autre tache ne peut être détectée en CCM. Une révélation à la ninhydrine a été faite après 3 jours de réaction, sans résultat. Il semblerait que la réaction n'ait pas lieu dans ces conditions, ou alors qu'elle ne soit pas décelable. Après 4 jours de réaction, les différentes expériences sont analysées en LC-MS, mais il s'avère que le caroténoïde n'est pas stable dans les conditions de la spectrométrie de masse ; en effet, la longue chaîne carbonée conjuguée se fragmente en présence d'acide fort.

V.3. Conclusions sur l'emploi du caroténoïde comme *quencher*

Il semblerait que le couplage enzymatique entre le caroténoïde et la lysine ne soit pas favorable dans les conditions testées ou que la vitesse de dégradation du caroténoïde soit plus rapide que celle de la synthèse. Des travaux plus récents ont montré que d'autres enzymes telles que des acyltransférases pouvaient permettre la synthèse de dérivés acylés de peptides en milieu aqueux (35). D'autres études sont en cours pour identifier et purifier des enzymes adaptées à la *N*-acylation en milieu aqueux, en particulier des aminoacylases chez des microorganismes comme *Streptomyces ambofaciens*. Des réactions d'acylation de molécules sensibles seront alors envisageables, dans des conditions plus douces, sans solvant ou en quantité réduite.

Ainsi, il a été observé que le produit est d'une grande instabilité, tant dans les solvants de synthèse utilisés que dans son utilisation quotidienne au laboratoire. En effet, des coupures ont été observées en spectrométrie de masse le long de la chaîne conjuguée du caroténoïde. Cette molécule s'avère être très sensible en présence d'acides (le TFA est utilisé dans les purifications HPLC, dans les solvants de MS et de LC-MS, etc.), ainsi qu'à l'air libre. Ces contraintes font qu'en dépit de ses très bonnes qualités de *quencher*, il est un fort mauvais candidat pour une utilisation en PDT. Parallèlement, nous avons appris que l'équipe du professeur Zheng de Toronto, qui utilisait le caroténoïde dans ses premiers essais, a été contrainte d'arrêter son utilisation pour les mêmes raisons.

Nous avons donc décidé de mettre un terme à l'utilisation de dérivés caroténoïdes et de nous consacrer à l'autre *quencher* ayant démontré de bonnes propriétés de *quenching* de la TPC : le BBQ650.

Dans la suite de cette thèse, nous allons décrire la synthèse des PMB utilisant la TPC comme PS, le BBQ650 comme *quencher*, liés *via* le peptide H-GPLGIAGQK-OH et le peptide H-PLGLK-OH, décrit précédemment dans le chapitre II. Différents PMB seront synthétisés pour observer la relation entre la distance PS/*quencher* et l'effet PDT.

Références

1. Gravier, J. (2004, 2008) Photosensibilisateurs vectorisés par l'acide folique pour une thérapie photodynamique ciblée. Nancy, Nancy.
2. Baas, P., Saarnak, A. E., Oppelaar, H., Neering, H., and Stewart, F. A. (2001) Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. , *Br. J. Dermatol.* *145*, 75–78.
3. Kübler, A. C., de Carpentier, J., Hopper, C., Leonard, A. G., and Putnam, G. (2001) Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. , *Int J Oral Maxillofac Surg* *30*, 504–509.
4. Hopper, C., Kübler, A., Lewis, H., Tan, I. B., and Putnam, G. (2004) mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. , *Int. J. Cancer* *111*, 138–146.
5. Betz, C. S., Rauschnig, W., Stranadko, E. P., Riabov, M. V., Albrecht, V., Nifantiev, N. E., and Hopper, C. (2008) Optimization of treatment parameters for Foscan-PDT of basal cell carcinomas. , *Lasers Surg Med* *40*, 300–311.
6. Frochot, C., Di Stasio, B., Vanderesse, R., Belgy, M.-J., Dodeller, M., Guillemin, F., Viriot, M.-L., and Barberi-Heyob, M. (2007) Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. , *Bioorg. Chem.* *35*, 205–220.
7. Seybold, P. G., and Gouterman, M. (1969) Porphyrins: XIII: Fluorescence spectra and quantum yields. , *Journal of Molecular Spectroscopy* *31*, 1–13.
8. Redmond, R. W., and Gamlin, J. N. (1999) A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. , *Photochem. Photobiol.* *70*, 391–475.
9. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., Didelon, J., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M. (2008) Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. , *J. Med. Chem.* *51*, 3867–3877.
10. Chakraborti, A. K., Nayak, M. K., and Sharma, L. (2002) Diphenyl Disulfide and Sodium in NMP as an Efficient Protocol for in Situ Generation of Thiophenolate Anion: Selective Deprotection of Aryl Alkyl Ethers and Alkyl/Aryl Esters under Nonhydrolytic Conditions. , *J. Org. Chem.* *67*, 1776–1780.
11. Gavande, N. S., Kundu, S., Badgajar, N. S., Kaur, G., and Chakraborti, A. K. (2006) Ph₂S₂-CaH₂ in N-methyl-2-pyrrolidone as an efficient protocol for chemoselective cleavage of aryl alkyl ethers. , *Tetrahedron* *62*, 4201–4204.
12. Guo, X., An, W., Shuang, S., Cheng, F., and Dong, C. (2005) Study on spectroscopic characterization of meso-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin (THPP) in β-cyclodextrin and its derivatives. , *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* *173*, 258–263.
13. Merrifield, B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. , *J. Am. Chem. Soc.* *85*, 2149–2154.
14. Schuerch, C., and Frechet, J. M. (1971) Solid-phase synthesis of oligosaccharides. I. Preparation of the solid support. Poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]. , *J. Am. Chem. Soc.* *93*, 492–496.
15. Leznoff, C. C. (1978) The use of insoluble polymer supports in general organic synthesis. , *Acc. Chem. Res.* *11*, 327–333.
16. Leznoff, C. C. The use of insoluble polymer supports in organic chemical synthesis. , *Chem. Soc. Rev.* *3*, 65–85.
17. Leznoff, C. C., and Svirskaya, P. I. (1978) The Synthesis of Unsymmetrical Tetraarylporphyrins on Solid Phases. , *Angewandte Chemie International Edition in English* *17*, 947–947.
18. Lovell, J. F., Chen, J., Jarvi, M. T., Cao, W.-G., Allen, A. D., Liu, Y., Tidwell, T. T., Wilson, B. C., and Zheng, G. (2009) FRET Quenching of Photosensitizer Singlet Oxygen Generation. , *J. Phys. Chem. B* *113*, 3203–3211.

19. Gust, D., Moore, T. A., Moore, A. L., Devadoss, C., Liddell, P. A., Hermant, R., Nieman, R. A., Demanche, L. J., DeGraziano, J. M., and Gouni, I. (1992) Triplet and singlet energy transfer in carotene-porphyrin dyads: role of the linkage bonds. , *J. Am. Chem. Soc.* *114*, 3590–3603.
20. Gust, D., Mathis, P., Moore, A. L., Liddell, P. A., Nemeth, G. A., Lehman, W. R., Moore, T. A., Benasson, R. B., Land, E. J., and Chachaty, C. (1983) Energy Transfer and Charge Separation in Carotenoporphyrins. , *Photochem. Photobiol.* *37*, S46.
21. Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., and Simic, M. G. (1994) Flavonoids as Antioxidants. , *J. Am. Chem. Soc.* *116*, 4846–4851.
22. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. , *Free Radic. Biol. Med.* *20*, 933–956.
23. Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. , *J. Nat. Prod.* *63*, 1035–1042.
24. Nagai, S., Ohara, K., and Mukai, K. (2005) Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. , *J. Phys. Chem. B* *109*, 4234–4240.
25. Day, A. J., Bao, Y., Morgan, M. R. ., and Williamson, G. (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. , *Free Radical Biology and Medicine* *29*, 1234–1243.
26. NEEDS, P. W., and KROON, P. A. Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. , *Tetrahedron* *62*.
27. Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I. (2008) Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. , *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* *55*, 110–117.
28. Husson, E., Garcia-Matilla, V., Humeau, C., Chevalot, I., Fournier, F., and Marc, I. (2010) Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modelling. , *Enzyme and Microbial Technology* *46*, 338–346.
29. Husson, E., Humeau, C., Paris, C., Vanderesse, R., Framboisier, X., Marc, I., and Chevalot, I. (2009) Enzymatic acylation of polar dipeptides: Influence of reaction media and molecular environment of functional groups. , *Process Biochemistry* *44*, 428–434.
30. Lv, L.-X., Pan, Y., and Li, Y.-Q. (2007) Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties. , *Food Chemistry* *101*, 1626–1632.
31. Lv, L.-X., Chen, S.-Y., and Li, Y.-Q. (2008) Study of lipase-catalysed synthesis of ascorbyl benzoate in cyclohexanone using response surface methodology. , *Journal of the Science of Food and Agriculture* *88*, 659–666.
32. Gotor, V. (1999) Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. , *Bioorg. Med. Chem.* *7*, 2189–2197.
33. Alatorre-Santamaría, S., Rodríguez-Mata, M., Gotor-Fernández, V., de Mattos, M. C., Sayago, F. J., Jiménez, A. I., Cativiela, C., and Gotor, V. (2009) Efficient access to enantiomerically pure cyclic alpha-amino esters through a lipase-catalyzed kinetic resolution. , *Tetrahedron Asymmetry* *19*, 1714–1719.
34. Craft, N. E., and Soares, J. H. (1992) Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and .beta.-carotene in organic solvents. , *J. Agric. Food Chem.* *40*, 431–434.
35. Husson, E., Humeau, C., Harscoat, C., Framboisier, X., Paris, C., Dubreucq, E., Marc, I., and Chevalot, I. (2011) Enzymatic acylation of the polar dipeptide, carnosine: Reaction performances in organic and aqueous media. , *Process Biochemistry* *46*, 945–952.

**Chapitre IV : Elaboration et
caractérisation photophysique et
biologique d'une nouvelle famille
de PMB**

Chapitre IV : Elaboration et caractérisation photophysique et biologique d'une nouvelle famille de PMB

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons décidé de valider les paramètres suivants pour la conception de notre PMB :

- Le peptide H-GPLGIAGQK-OH comme peptide vecteur.
- La tétraphénylchlorine monocarboxylée comme photosensibilisateur.
- Le BBQ650 comme *quencher*.

La synthèse de ce composé se déroule en quatre étapes : 1) synthèse et activation du photosensibilisateur, 2) synthèse peptidique sur phase solide, 3) couplage du PS sur phase solide et 4) clivage du conjugué de la phase solide et couplage avec le BBQ650 en solution. La purification par HPLC permet d'obtenir des composés suffisamment purs pour être compatibles avec des expériences biologiques par la suite.

D'un point de vue photophysique, les propriétés du couple de fluorophores TPC et BBQ650 n'ont jamais été décrites. Les études menées par Lovell *et al.* révèlent que le mécanisme de transfert d'énergie ayant lieu entre le pyrophéophorbide a (une chlorine) et le BBQ650 est de type FRET. Ce mécanisme permet une inhibition efficace de la formation d'état triplet de la chlorine et donc de production d'oxygène singulet. Nous avons vu précédemment que le BBQ650 permettait en effet de diminuer la quantité d'oxygène singulet produite par la TPC en solution, mais des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le mécanisme et son efficacité.

Dans ce chapitre, il sera question de l'étude photophysique en détail du couple de fluorophores concernant les caractéristiques du transfert d'énergie. Puis, dans un deuxième temps, il sera question de l'élaboration des PMB résultants. Plusieurs PMB ont été synthétisés dans le but d'étudier la qualité du transfert d'énergie en fonction de la distance entre les

fluorophores ; pour cela, des bras espaceurs de différentes tailles ont été ajoutés entre le peptide et le PS. Un PMB supplémentaire, de plus petite taille, a été synthétisé afin d'étudier l'effet de ce transfert d'énergie avec une distance plus courte. Le peptide H-PLGL-OH est une séquence connue pour être substrat d'un grand nombre de MMPs ; le composé TPC-PLGLK-BBQ a donc été élaboré et ses propriétés photophysiques et biologiques ont été comparées à celles des autres PMB. De plus, cette séquence peptidique étant connue pour être bien reconnue par un grand nombre de protéases, ce PMB peut servir de « témoin ».

Toutes ces études ont fait l'objet d'une publication, acceptée dans le journal *Current Medicinal Chemistry* (2012), qui compose le corps de ce chapitre. La discussion et la conclusion sont traduites de l'anglais et sont données en fin de ce chapitre.

Journal : Current Medicinal Chemistry, 2012

Photodynamic Molecular Beacons triggered by MMP-2 and MMP-9: Influence of the distance between photosensitizer and quencher onto photophysical properties and enzymatic activation

Marc Verhille^{1,2,3,4}, Hamanou Benachour^{5,6}, Ahmad Ibrahim⁷, Mathilde Achard^{3,4}, Philippe Arnoux^{1,2}, Muriel Barberi-Heyob^{5,6,8}, Jean-Claude André^{1,2}, Xavier Allonas⁷, Francis Baros^{1,2}, Régis Vanderesse^{3,4,8}, Céline Frochot^{1,5,8}

¹ Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UPR 3349, Nancy, F-54000, France

² CNRS, LRGP, UPR 3349, Nancy, F-54000, France

³ Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR CNRS 7568, Nancy, F-54000, France

⁴ CNRS, LCPM, UMR CNRS 7568, Nancy, F-54000, France

⁵ Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR CNRS 7039, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France

⁶ CNRS, CRAN, UMR CNRS 7039, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France

⁷ Université de Haute Alsace, Département de Photochimie Générale, UMR CNRS 7525, Mulhouse, F-68100, France

⁸ GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

Correspondence to:

Céline Frochot

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

1 rue Grandville BP 20451

F-54001, Nancy, France

Telephone: +33 3 83 17 51 15

celine.frochot@ensic.inpl-nancy.fr

Keywords: Energy transfer, Molecular Beacon, Matrix metalloproteinases activities, Photodynamic Therapy, Photosensitizer, Targeting, Quenching.

ABSTRACT

Angiogenesis is a key step in the tumoral progression process. It is characterized by an over-expression of a number of matrix metalloproteinases (MMP). Among these MMPs, gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are known to play a critical role in tumor angiogenesis and the growth of many cancers. Photodynamic Molecular Beacons (PMB) can be designed for cancer treatment by associating a chlorin-like photosensitizer and a black hole quencher linked by a gelatinase substrate peptide with the aim of silencing photosensitizer toxicity in non-targeted cells and restore its toxicity only in surrounding gelatinases. This article provides a report on the synthesis and photophysical and biochemical studies of new families of PMB, using tetraphenylchlorin and a black hole quencher as a donor-acceptor pair, and an MMP specific sequence (H-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Lys-OH or H-Pro-Leu-Gly-Leu-OH) to keep them in close proximity. Different spacers were used to evaluate the influence of the distance between the photosensitizer and the quencher on the photophysical properties and enzymatic activation of the PMB. Time-resolved quenching experiments were performed and FRET energy transfer could be observed. Photosensitizers' triplet state band in transient absorption disappears in PMB. However, even if both MMP-2 and MMP-9 were found to efficiently cleave the peptide alone, no cleavage was observed for all PMB. Further studies would be required to assess the ability of the PMB constructs to retain the sensitivity of the peptide linker to be cleaved by matrix metalloproteinases.

INTRODUCTION

Photodynamic Therapy (PDT) is an emerging non-invasive technique for the treatment of a variety of cancer tumors, involving the light activation of a photoactivatable molecule called a photosensitizer in the presence of oxygen (1, 2). After light irradiation of the photosensitizer, the energy from the excited photosensitizer can be transferred to surrounding molecules, allowing the generation of reactive oxygen species (ROS) including singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which is believed to be the major cytotoxic agent (3, 4). Thus, delivering the photosensitizer into the cancer-associated cells means the tumor can be specifically destroyed.

Increase in protease expression and activity have been reported in many human cancers (5–7). Tumor-associated proteases are known to function at multiple steps of tumor progression,

affecting tumor establishment, growth, neovascularization, intravasation, extravasation, and metastasis. Moreover, proteolytic degradation of the extracellular matrix is crucial for cancer development, invasion and metastasis, all of them associated with increased activities of several different protease families (5, 8). Reports have shown that several proteases (*e.g.* cathepsins and MMP-2 and -9) are up-regulated in many cancer types (9–11) and potentially, these tumor-associated proteases could act as activators of the protease-mediated PDT agent.

Certain strategies have emerged aimed at enhancing PDT selectivity and efficiency and have mainly been based on active or passive cancer cells addressing. Among the existing strategies, targeting and destroying the neo-vasculature of tumors by PDT is thought to be promising. Indeed, by the destruction of the neo-vessels that supply the tumor with life-sustaining oxygen and nutrients (12), vascular targeted photodynamic therapy (VTP) can lead to the death of vascularized tumors (13–20). Regulation of ROS production is thus the key step in PDT selectivity and recent works have tended to increase targeted versus non-targeted cells damage (21).

Matrix metalloproteinases (MMP) are known to be over-expressed in many different kinds of cancer because of their major implication in neo-vascularization of tumors (11, 22, 23). Among MMPs, the MMP-2 and MMP-9 gelatinases are highly expressed for their role in extracellular matrix degradation (24). Gelatinases are able to recognize and cleave specific peptidic sequences and have already been used for prodrugs activation (7, 25, 26).

In our concept study phase, we designed a Photodynamic Molecular Beacon (PMB), made to silence the photoactive properties of photosensitizers until the tissue target. If no damage occurs before reaching its target, selective delivery is increased and non-triggered cells killing are limited. Molecular beacons are target-activatable probes based on energy transfer allowing fluorescence emission and $^1\text{O}_2$ production in response to a specific cancer target, such as tumor-associated endopeptidases. The photosensitizer is associated with a quencher leading to an energy transfer and thus $^1\text{O}_2$ quenching and kept in close proximity by using a peptidic link. The peptide, specifically cleaved by a certain type of protease, releases the two moieties which enables photoactivity to be restored. The development of “on/off” switchable probes for cancer imaging using fluorescence resonance energy transfer (FRET) activatable fluorescent pairs has been well described in literature on the subject (27), but surprisingly only few molecular beacons for treatment purposes have been designed. Zheng *et al.* reported on the first family of PMB using Pyropheophorbide a and carotenoid or Black Hole Quencher

3 (BHQ3) as the donor/acceptor pair, targeting different substrates (28–34). Only one type of photosensitizer (pyropheophorbide) was used for elaborating PMB for photodynamic therapy applications with two types of quencher (carotenoid and BHQ-3). Zheng's team used different types of peptides (GDEVDSGSK, GPLGLARK, TSGPNQEQK) or phospholipid (35) for the linker. In this latest study, the specificity of different phospholipases was modulated by the insertion of spacers (C_6 , C_{12}) between Pyropheophorbide and the lipid backbone. The study showed that the C_{12} -spaced Pyro C_{12} -PtdEtn-BHQ demonstrated a remarkable selectivity for phospholipase A_2 (PLA_2) and the best relative PLA_2/PLC sensitivity, significantly outperforming previously known probes. To our knowledge this is the only paper describing the use of different spacers in self-quenching constructs and no studies have been made concerning the photophysical properties.

Zheng *and al.* synthesized (29) MMP-7 triggered PMB with pyro as the PS, black hole quencher as a dual fluorescence and 1O_2 quencher and a short peptide GPLGLARK as the MMP-7 cleavage linker. Indeed, MMP-7 belongs to matrilysins family and has been a particularly important target because of its epithelial origin and its high expression in pancreatic, colon, breast and non-small-cell lung cancer. We chose MMP-2 and MMP-9 since in cancer research, much interest has been devoted recently to a gelatinase subgroup of MMPs that include MMP-2 (gelatinase A, type IV collagenase) and MMP-9 (gelatinase B, type IV collagenase). This is partly because of their ability to degrade type IV collagen and because of their assumed important role in cellular invasion. In numerous studies, expression of MMP-2 has been shown to be related to invasive phenotype and metastatic potential of tumor cells (36, 37). Moreover, based on impressive preclinical studies which showed an important role for MMPs in cancer, the pharmaceutical industry successfully developed several synthetic MMP inhibitors that could be readily administered orally to patients with cancer (lung, pancreas, prostate, stomach, breast) (38, 39). Even if the role of MMPs in early stage cancer *versus* initiation of metastasis and growth at secondary sites remains to be more clearly defined, MMP-2 and -9 capacity to degrade the extracellular matrix, resulting in, *e.g.* migration of endothelial cells, is known to play a role in angiogenesis, tumor growth and metastasis.

This study provides a report on the synthesis, photophysical properties and biological evaluation of a new family of PMB, triggering neo-vessels proteases. Our constructs aimed at using MMP-2 and MMP-9 peptidase activity to release the photosensitizer from its quencher

using the specific peptide sequence H-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Lys-OH (40–44). The photophysical properties of the photosensitizer / quencher pair (*i.e.* tetraphenylchlorin and a Black Hole Quencher: BBQ650) were investigated using different lengths of peptides and spacers to determine the type and efficiency of the energy transfer which occurred.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals: Peptide synthesis chemicals were purchased from Merck Novabiochem. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, NovaBioChem, Accros, Merck, Invitrogen. BBQ650-NHS ester was purchased from Berry & Associates (Dexter, USA). HPLC solvent was purchased from Sigma-Aldrich and spectroscopic solvent from Carlo Erba. MMP-2 pro-enzyme and the active MMP-9 were purchased from Calbiochem® (Darmstadt, Germany). The Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ [(7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-PLGL-N-3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl-AR-NH₂] fluorogenic peptide substrate was purchased from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom).

Chemistry

Synthesis of photosensitizers

Synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin (1) and tetraphenylporphyrin (2): 4-carboxybenzaldehyde (238 mg; 2.5 mmol) and freshly distilled pyrrole (0.69 mL; 10 mmol) and benzaldehyde (0.78 mL; 7.5 mmol) were dissolved in 700 mL dichloromethane and stirred for 15 minutes in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere. Trifluoroborate etherate (BF₃.OEt₂, 185 μL) was then added and the solution was stirred for another 2 hours. Then *p*-chloranil (1.845 g; 7.5 mmol) was added and the solution stirred for 2 hours at dichloromethane reflux. The solution was filtered off on silica and the crude mixture was purified by two column chromatographies (dichloromethane/ethanol [97:3] and dichloromethane/acetone [95:5]) to give first tetraphenylporphyrin **2** (320 mg; 0.52 mmol; 20%) as a purple solid (R_f = 0.9 (dichloromethane/ethanol [97:3])) and then 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin **1** (115 mg; 0.175 mmol; 7%) as a purple solid (R_f = 0.4 (dichloromethane/ethanol [97:3])). (**1**):

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -2.61 (s, 2 H); 7.72 (s, 9 H); 8.21 (m, 6 H); 8.37 (d, 4 H, $J = 8.2$ Hz); 8.80 (m, 8 H). MS (ESI) m/z calculated 658.7, found 659.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$. (2): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -2.79 (s, 2 H); 7.75 (d, 4 H); 7.89 (m, 8 H); 8.28 (m, 8 H); 8.84 (m, 8 H). MS (ESI) m/z calculated 614.7, found 615.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-21,23-H chlorin (TPC, 3): **1** (200 mg; 0.30 mmol), K_2CO_3 (1.26 g; 9 mmol) and *p*-toluenesulfonylhydrazide (1.70 g; 9 mmol) were dissolved in freshly distilled pyridine (20 mL) and stirred at pyridine reflux (110°C) in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere. New starting materials were added every hour until the analysis of UV-visible spectra revealed the complete formation of bacteriochlorin (appearance of an absorption peak at 730 nm). Then, 50 mL ethyl acetate and 50 mL water were added and the mixture was stirred for one hour at 80°C. After cooling at room temperature, the two layers were separated, the organic layer was washed with HCl (0.1 M) until the aqueous layer turned acidic and then washed with 2 \times 25 mL water. The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The red solid was dissolved in 30 mL dry toluene, and stirred in the dark in an inert atmosphere; *o*-chloranil was slowly added and UV-visible spectra were recorded every 15 minutes to monitor chlorin formation. Then 30 mL water was added, the layers were separated and the organic layer was washed with 3 \times 25 mL NaOH (0.1 M), 3 \times 25 mL Na_2CO_3 (0.1 M) and 3 \times 25 mL water, then filtered and concentrated. The crude product was purified by HPLC (preparative reverse phase HPLC Varian ProStar PrepStar 218, preparative column C18 (5 μm , 250 \times 21.2 mm, Varian Pursuit). Detection device: fluorescence detector ProStar 363 ($\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm) and diode bar ProStar 335 using a acetonitrile/water [75:25] to acetonitrile 100% gradient in 15 minutes, followed by 15 minutes of isocratic acetonitrile. $R_t = 10$ minutes. Yield in **3** (79 mg, 0.12 mmol, 40%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -1.56 (s, 1 H); -1.46 (s, 1 H); 4.10 (s, 4 H); 7.62 (s, 9 H); 8.02 (s, 6 H); 8.34 (m, 4 H); 8.84 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 660.7, found 661.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-(4-carboxyphenyl succinimide ester)-10,15,20-triphenyl-21,23-H chlorin (4): **3** (70 mg; 0.11 mmol), dicyclohexylcarboxydiimide (24.7 mg; 0.12 mmol) and *N*-hydroxysuccinimidine (13.8 mg; 0.12 mmol) were dissolved in 10 mL dichloromethane and stirred at room temperature for 4 hours in a round bottom flask isolated from light and under

inert atmosphere. The crude mixture was concentrated and purified by column chromatography (dichloromethane/ethanol [97:3]) to give a red solid ($R_f = 0.9$; 65 mg; 0.086 mmol; 78%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -1.56 (s, 1 H); -1.46 (s, 1 H); 2.93 (s, 4 H); 4.10 (s, 4 H); 7.63 (s, 9 H); 8.01 (s, 6 H); 8.34 (m, 4 H); 8.42 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 757.8, found 758.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin (5): **2** (200 mg; 0.30 mmol) was dissolved in 10 mL TFA in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere. NaNO_2 (44 mg; 0.6 mmol) was added carefully, the mixture was allowed to stir for 3 minutes and then poured into 200 mL of cold water. The mono-nitrated product was extracted with 6 \times 25 mL DCM, the solvent was removed and the compound was purified on column chromatography (dichloromethane/hexanes [80:20]) to give a purple solid ($R_f = 0.61$; 103 mg; 0.16 mmol; 62%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -2.76 (s, 2 H); 7.79 (s, 9 H); 8.21 (s, 6 H); 8.70 (m, 4 H); 8.86 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 659.7, found 660.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

The product was then dissolved in 10 mL HCl 37% and vigorously stirred. Slowly, SnCl_2 (240 mg; 1.2 mmol) was added and the reaction was stirred for another 90 minutes. The crude mixture was poured into 100 mL of cold water and Na_2CO_3 was slowly added until no more CO_2 was produced. Extraction with dichloromethane until clear aqueous phase was done and solvent removal gave a crude product, which was allowed to be purified by column chromatography (dichloromethane) to give a purple solid ($R_f = 0.8$; 62 mg; 0.1 mmol; 62%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -2.74 (s, 2 H); 4.07 (s, 2 H); 7.69 (s, 9 H); 8.13 (s, 6 H); 8.76 (m, 6 H); 8.86 (d, 4 H, $J = 4.8$ Hz). MS (ESI) m/z calculated 629.7, found 630.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-[[4-phenylcarbamoyl)methoxy]-acetic acid]-10,15,20-triphenyl porphyrin (6): Aminoporphyrin **5** (143 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 2 mL DMF in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere. Diglycolic anhydride (100 mg, 0.86 mmol) was then added and the solution was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was diluted in 10 mL CHCl_3 and hexane was added until precipitation occurred. The precipitate was filtered off and washed with water to remove residual anhydride and then dried under vacuum and purified on column chromatography (dichloromethane/ethanol [97:3]) to give a purple solid ($R_f = 0.8$; 102 mg; 0.16 mmol; 70%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -2.91 (s, 2 H); 4.22 (s, 2 H); 4.34 (s, 2 H); 7.82 (s, 9 H); 8.22 (m, 6 H); 8.70 (m, 4 H); 8.82 (m, 6 H); 11.10 (s, 1H). MS (ESI) m/z calculated 745.8, found 746.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-[[4-phenylcarbamoyl)methoxy]-acetic acid]-10,15,20-triphenyl-21,23-H chlorin (TPC-DGA, **7**): Same procedure as **3** was followed, using **6** (122 mg; 0.63 mmol), *p*-toluenesulfonylhydrazine (950 mg; 5.1 mmol) and K_2CO_3 (1.5 g; 10.8 mmol). The product was purified by HPLC using methanol/water [75:25] to methanol 100% gradient in 15 min, followed by 15 minutes of isocratic methanol flow. ($R_t = 12$ min) giving pure **7** (51 mg, 0.12 mmol, 41%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) -1.53 and -1.54 (s, 2 H); 3.87 (s, 4H); 4.14 (s, 2 H); 4.16 (s, 2 H); 7.72 (s, 9 H); 8.12 (m, 6 H); 8.29 (m, 4 H); 8.55 (m, 6 H); 10.21 (s, 1H). MS (ESI) m/z calculated 747.8, found 748.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Conjugate photosensitizer-peptide synthesis

Synthesis of TPC-GPLGIAGQK-OH (8a): The side chains of glutamine and lysine were respectively protected by trityl (Trt) and *N*-*tert*-butyloxy carbonyl (Boc) groups. H-GPLGIAGQK- and the peptide conjugated photosensitizer TPC-GPLGIAGQK- were synthesized on a multichannel peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology, using Fmoc-Lys(Boc)-Wang resin. Double coupling was performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid (except during the first glycine coupling stage: 2-fold excess and six times coupling) and activation reagents 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU) (3 eq.), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 eq.) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (9 eq.) in dimethylformamide (DMF).

On a 0.033 mmol scale, final Fmoc protection was removed and TPC-NHS (65 mg; 0.086 mmol) was then added with triethylamine (1 mL) in dichloromethane. During the photosensitizer coupling stage, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in aluminium foil to limit the occurrence of unwanted side reactions. The SPPS reactor was shaken for 15 hours and the resin was washed with NMP, DMF and dichloromethane. The red resin was dried under vacuum and then cleaved using TFA (2 mL) for 2 hours and 30 minutes. The acidic green resin was filtered, washed with another 1 mL TFA and *N*-methylpyrrolidone (NMP) and dichloromethane. The filtrate was dried under vacuum and lyophilised. The

crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1% TFA) [75:25] to 100% acetonitrile gradient in 15 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. $R_t = 16$ minutes. Pure product was isolated as a red powder (51 mg; 0.034 mmol; 40%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) -1.58 and -1.56 (s, 2 H); 0.77-0.90 (m, 9 H); 1.17-2.27 (m, 32 H); 2.72 (s, 2 H); 3.71 (m, 3 H); 4.07-4.70 (m, 6 H); 4.14 (s, 4 H); 6.71 and 7.28 (s, 2 H); 7.70-8.56 (m, 9 H); 7.73 (s, 9 H); 8.07 (s, 6 H); 8.31 (m, 4 H); 8.58 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 1482.7, found 1483.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of TPC-DGA-GPLGIAGQK-OH (9a): the peptide H-GPLGIAGQ(Trt)K(Boc) coupled on the Wang resin was synthesized as described previously on a 0.033 mmol scale. After resin swelling with dichloromethane and removal of the solvent, a solution of **7** (21 mg; 0.028 mmol), HATU (35 mg; 0.092 mmol) and DIEA (0.1 mL) in DMF was added and stirred overnight. The same procedure as for compound **8a** was used. $R_t = 6$ minutes. Pure product was isolated as a red powder (28 mg; 0.018 mmol; 65%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) -1.58 (s, 2 H); 0.80-0.87 (m, 9 H); 1.22-1.89 (m, 26 H); 2.10 (m, 6 H); 2.72 (s, 2 H); 3.72 (m, 3 H); 3.80-4.37 (m, 6 H); 4.12 (s, 4 H); 4.22 (s, 2 H); 6.76 and 7.2 (s, 2 H); 7.72-8.55 (m, 9 H); 7.76 (s, 9 H); 8.03 (s, 6 H); 8.29 (m, 4 H); 8.56 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 1569.8, found 785.3 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Synthesis of TPC-PEG₉-GPLGIAGQK-OH (10a): the peptide H-GPLGIAGQ(Trt)K(Boc) was synthesized as described previously on a 0.033 mmol scale. Then, after resin swelling with dichloromethane and removal of the solvent, a solution of Fmoc-O₂Oc-OH (Fmoc-PEG₉-COOH) (26.1 mg; 0.068 mmol), HATU (27.4 mg; 0.072 mmol) and DIEA (0.1 mL) in DMF was added and stirred overnight. The resin was washed with NMP, DMF and dichloromethane. Fmoc deprotection was undergone using piperidine/DMF [60:40]. The resin was washed and dried and **7** (28 mg; 0.042 mmol), HATU (27 mg; 0.071 mmol) and DIEA (0.1 mL) in DMF were added and stirred overnight. The same procedure as for compound **8a** was used. $R_t = 4$ minutes. Pure product was isolated as a red powder (14 mg; 0.009 mmol; 26%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) -1.59 (s, 2 H); 0.79-0.93 (m, 9 H); 1.17-1.97 (m, 26 H); 2.12 (m, 6 H); 2.73 (s, 2 H); 3.05 (d, 8 H); 3.46 (s, 2 H); 3.68 (m, 3 H); 3.73-4.13 (m, 6 H); 4.13 (s, 4 H); 6.76 and 6.79 (s, 2 H); 7.72-8.59 (m, 36 H). MS (ESI) m/z calculated 1627.9, found 814.7 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

Synthesis of TPC-PLGLK-OH (11a): the peptide Fmoc-PLGLK(Boc)-OH was synthesized by automatic SPPS using the same procedure; compound **4** (60 mg; 0,079 mmol) was then added using DIEA (0.1 mL) in dichloromethane. The SPPS reactor was shaken overnight and the resin was washed with NMP, DMF and dichloromethane. The same procedure as for compound **8a** was used. $R_t = 12$ minutes. Pure product was isolated as a red powder (16 mg; 0,014 mmol; 42%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO d_6): δ (ppm) -1.52 and -1.57 (s, 2 H); 0.73-0.87 (m, 12 H); 1.41-2.85 (m, 12 H); 2.30 (m, 2 H); 2.70 (m, 2 H); 2.90 (m, 2 H); 3.61 (m, 2 H); 3.8-4.70 (m, 6 H); 4.14 (s, 4 H); 7.70-8.61 (m, 29 H). MS (ESI) m/z calculated 1169.4, found 1170.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Molecular Beacons synthesis

Synthesis of compounds 8b, 9b, 10b and 11b: in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere, the adequate conjugate was dissolved in 2 mL DMF and 3 mL carbonate buffer pH = 9.3 and the solution was stirred for 15 minutes. Commercially available BBQ650-NHS ester (25 mg; 0.035 mmol) was added, completed with another 2 mL DMF and the solution was stirred from several days at 36°C. Reaction was monitored by analytical HPLC (conditions as follow). Quenching of the buffer was carried out using 2 mL HCL (0.5 M) and the solution was concentrated. Purification was done by HPLC:

8b: From **8a** (50 mg; 0.033 mmol). The same purification procedure as for compound **8a** was used. The pure product was isolated as a green/blue powder ($R_t = 16$ min; 34 mg; 0.017 mmol; 48%). MS (ESI) m/z calculated 2081.37, found 1041.42 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

9b: From **9a** (27 mg; 0.016 mmol). The same purification procedure as for compound **8a** was used. The pure product was isolated as a green/blue powder ($R_t = 11$ min; 17 mg; 0.008 mmol; 51%). MS (ESI) m/z calculated 2168.45, found 1085.37 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

10b: From **10a** (13 mg; 0.009 mmol). The same purification procedure as for compound **8a** was used. The pure product was isolated as a green/blue powder ($R_t = 8$ min; 12.5 mg; 0.006 mmol; 62%). MS (ESI) m/z calculated 2226.53, found 1114.42 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

11b: From **11a** (15 mg; 0.014 mmol). The same purification procedure as for compound **8a** was used. The pure product was isolated as a green/blue powder ($R_t = 10$ min; 16 mg; 0,009 mmol; 65%). MS (ESI) m/z calculated 1768.06, found 1768.75 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 885.00

$[M+2H]^{2+}$.

Photophysical properties

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda EZ 210) double beam UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 (FL3-222) spectrofluorimeter equipped with a 450 W Xenon lamp, a thermostated cell compartment (25°C), a R928 (HAMAMATSU Japan) UV-visible photomultiplier and a liquid nitrogen-cooled InGaAs infrared detector (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). The excitation spectrometer is a SPEX double grating monochromator (1200 grating/mm blazed 330 nm). The fluorescence was measured by the UV-Visible detector through a SPEX double grating monochromator (1200 grating/mm blazed 500 nm). The singlet oxygen production was measured by the IR detector through a SPEX double grating monochromator (600 grating/mm blazed 1 μ m). All spectra were recorded using 4 optical faces quartz cells. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using a tetraphenyl porphyrin (TPP) solution in toluene as a fluorescence standard ($\Phi_f = 0.11$ (45)). Rose Bengal was chosen as a reference solution thanks to its high 1O_2 production quantum yield in ethanol ($\Phi_\Delta = 0.68$ (46)). The absorbance value at the excitation wavelength (415 nm) of both the reference and the sample solutions were set to around 0.2.

The quantum yield of fluorescence is determined thanks to equation (1):

$$\phi_f = \phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \quad (1)$$

where Φ_f and Φ_{f_0} , I_f and I_{f_0} , DO and DO_0 , n and n_0 are the quantum yields, the intensities, the absorbances and the refraction indices of the sample and of the reference respectively.

The quantum yield of singlet oxygen production is determined thanks to equation (2):

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO} \quad (2)$$

where Φ_{Δ} and Φ_{Δ_0} , I and I_0 , DO and DO_0 are the luminescence quantum yields of singlet oxygen, the luminescence intensities, the absorbances of the sample and of the reference respectively.

Time-resolved experiments were performed using for excitation: a pulsed laser diode LDH-P-C-405 coupled with a driver PDL 800-D (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) emitting at 408 nm (FWHM < 70 ps, 1 MHz) and an avalanche photodiode SPCM-AQR-15 (EG & G, Vaudreuil CANADA) coupled with a 650 nm (± 10 nm) interference long-wave pass filter as detection system. The acquisition system was a PicoHarp 300 module with a 4 channels router PHR-800 (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Various fluorescence decays were recorded using the single photon counting method (4 optical faces quartz cells for pure products in ethanol and triangular quartz cells for FRET experiments in DMF). Data was collected up to 1000 counts accumulated in the maximum channel and analyzed using Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) software Fluofit (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) based on iterative reconvolution using a Levensberg-Marquandt algorithm, enabling the obtention of multi-exponential profiles (mainly one or two exponentials in our cases).

The theoretical calculation of Förster radius can be carried out using the following equation:

$$R_0 = 0.0021(\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J(\lambda))^{1/6} \quad (3)$$

where R_0 is the Förster radius expressed in nm, κ^2 is the orientation factor, taken as 2/3 (47), n is the refraction index of ethanol, taken as 1.3594. Φ_D is the fluorescence quantum yield of the donor (TPC). The overlap integral J is described as follows:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 \cdot d\lambda \quad (4)$$

where $F_D(\lambda)$ is the emission spectra of TPC, $\varepsilon_A(\lambda)$ is the extinction coefficient of the acceptor (BBQ) in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ and λ is the wavelength in nm.

The nanosecond transient absorption setup was based on a pulsed solid state Nd:Yag laser (Surelite II-10, Continuum, Santa Clara, USA) operating at 10 Hz. After amplification, the output frequency was doubled and then tripled. This laser can provide nanosecond pulses at 355 nm with an energy of about 160 mJ which can be used to pump an optical parametric oscillator (SL OPO, Continuum, Santa Clara, USA). Nanosecond pulses were then delivered with a tunable wavelength from 410 to 2200 nm and energy input reduced to about 6-7 mJ to excite the sample. The transient absorption analysis system (LKS 60, AppliedPhotophysics, UK) used a 150 W pulsed xenon arc lamp, a Czerny-Turner monochromator and a 5-stage based photomultiplier (1P28). The instrument response was about 20 ns using a transient digitizer (Infinium, Agilent). The observation wavelength is indicated in each case. Experiments were performed in acetonitrile under air, Ar or O₂ bubbling. The absorbance of the dyes was adjusted to values between 0.3-0.5 in order to prevent self quenching effects.

The fluorescence and triplet state quenching were calculated using Stern-Volmer's equation:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (5)$$

where τ_0 and τ stand for the lifetimes of the excited state in the absence and in the presence of quencher, respectively, K is the Stern-Volmer quenching constant, k_q is the bimolecular quenching constant and $[Q]$ the quencher concentration. In the case of steady-state fluorescence experiments, the Stern-Volmer quenching constant can be determined from F_0 and F which stand for the fluorescence intensities in the absence and in the presence of quencher, respectively.

Incubation studies with recombinant active MMP-2 / MMP-9

Before enzymatic cleavage assay, the enzyme activity of both MMP-2 and MMP-9 was confirmed by their ability to cleave the fluorogenic peptide substrate (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-PLGL-N-3-(2,4-Dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl-AR-NH₂ [Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂] (R&D Systems) (39) used as positive control substrate. The PMB compounds **8b**, **9b**, **10b**, **11b** and the **GPLGIAGQK** peptide were dissolved in dimethylsulfoxide and then diluted in the assay buffer (50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.05% Brij 35, pH 7.5). The ability of the H-GPLGIAGQK-OH peptide linker to be cleaved was analyzed first. The peptide samples at 10 or 50 μM were incubated without or with 1.5 or 1.2 nM (v:v) of active MMP-2 and MMP-9, respectively, for 1 and 2 hours at 37°C. The incubation products were analyzed by Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) using a Bruker micrOTO-Q system (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The same incubation conditions were then applied to compounds 8b, 9b, 10b and 11b. After each incubation period, the fluorescence of the incubation products samples was assessed by fluorescence spectroscopy with an excitation wavelength of 415 nm and emission between 450 and 800 nm.

RESULTS

Synthetic strategy

The aim of this study was to synthesize a family of Photodynamic Molecular Beacons (figure 1) using MMP-2 and MMP-9 substrate peptide –GPLGIAGQK–, described by Mansour *et al.* [31], using different lengths of spacer between the photosensitizer and the first amino acid.

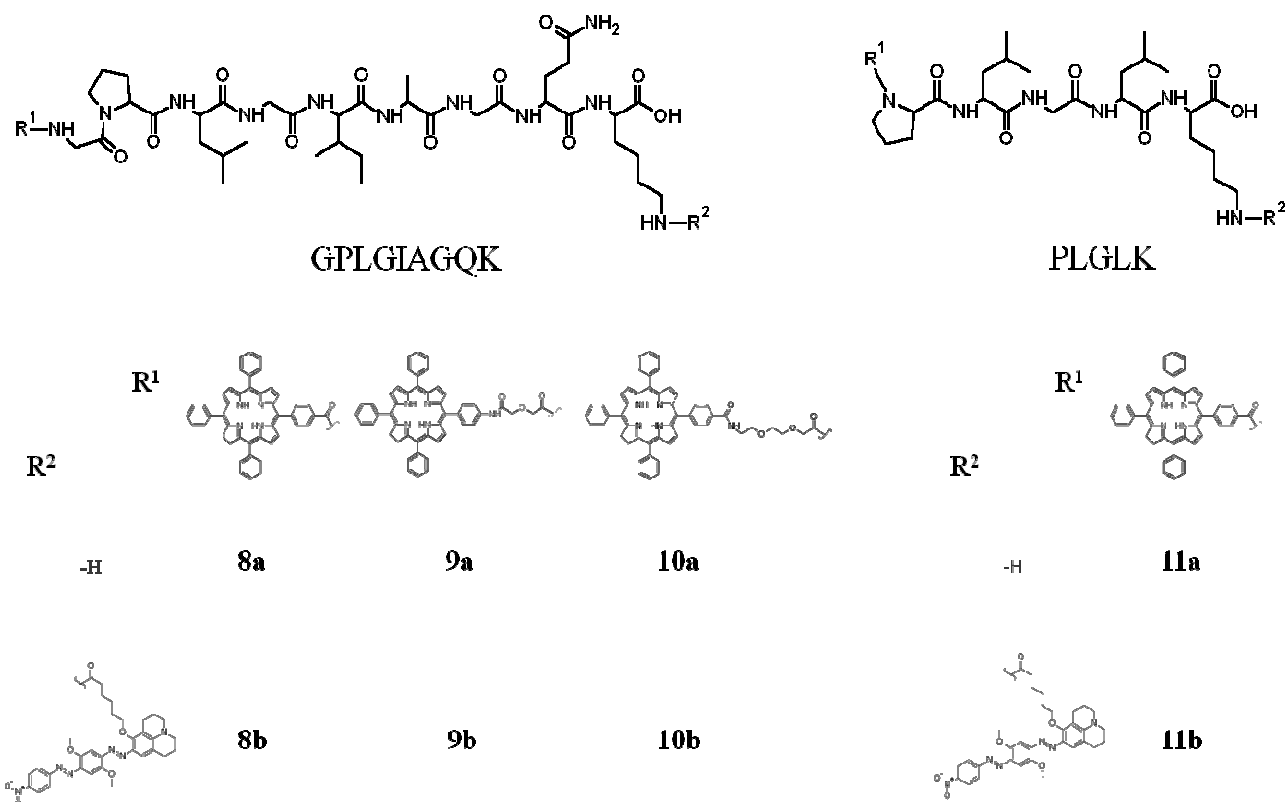


Figure 1: Conjugates and molecular beacons synthesized.

As our “control” molecular beacon, we chose the fluorogenic peptide substrate containing PLGL sequence, described by Knight *et al.* (26, 48). Synthesis was basically performed in three steps as shown in figure 2 namely: 1) Photosensitizer synthesis; 2) Coupling to the peptide on solid phase and cleavage; 3) Coupling to the quencher BBQ NHS-ester in solution.

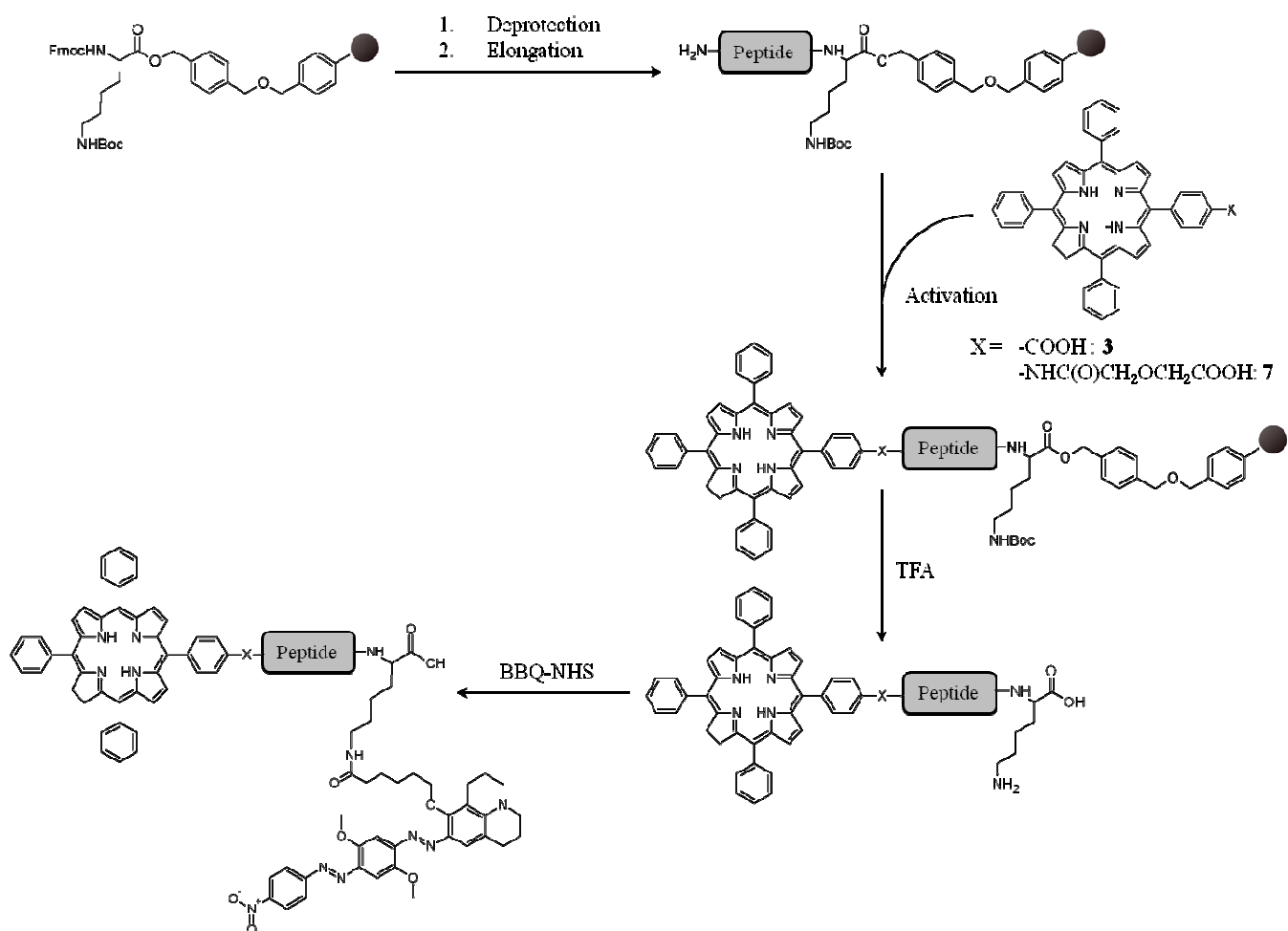
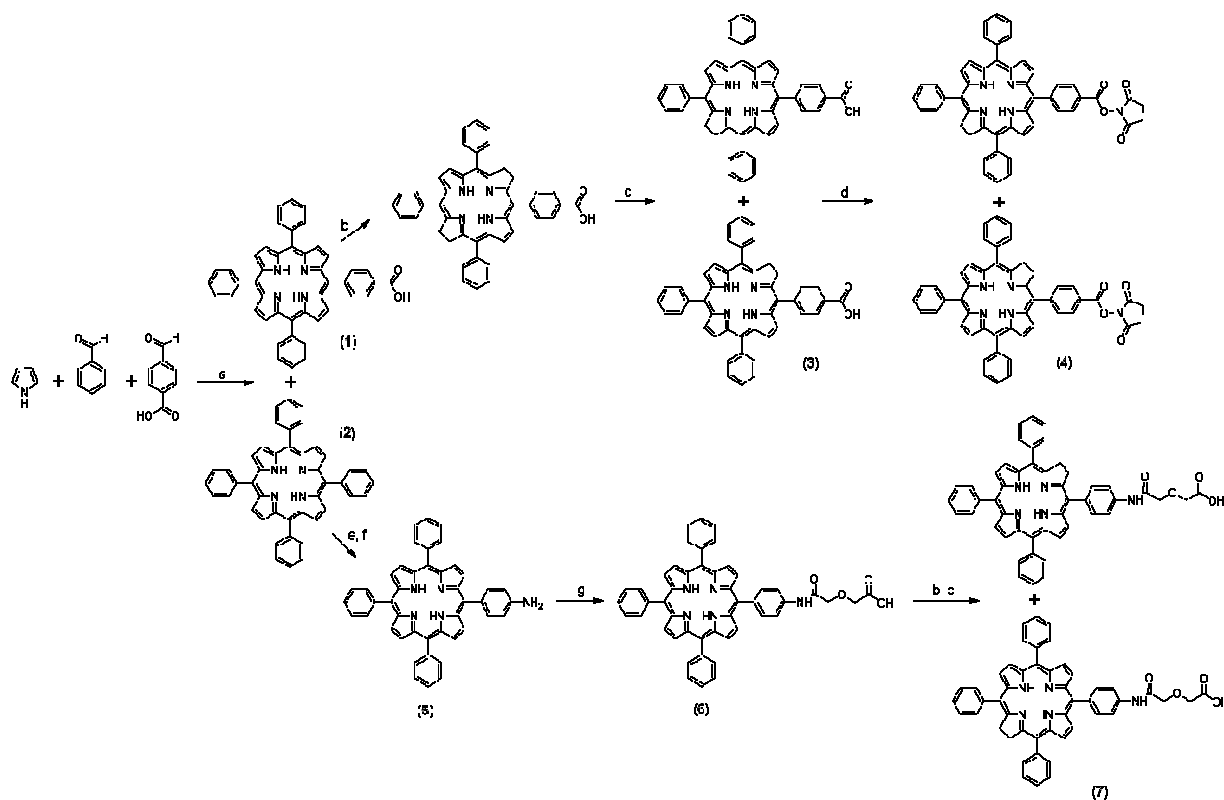


Figure 2: General procedure for PMB synthesis.

A variety of photosensitizers deriving from tetraphenylchlorin monocarboxylic acid (TPC) were synthesized by a commonly used method previously described by our team (49), using successively Lindsey method (50) to produce porphyrin **1** and Witlock reduction (51) to obtain the chlorin **3** (figure 3).



(a) BF₃·OEt₂, DCM, *p*-chloranil, 4h, (1) 7%, (2) 20%; (b) *p*-TSH, pyridine, K₂CO₃, 60%; (c) *o*-chloranil, AcOEt, 40%; (d) DCC, NHS, DCM, 78%; (e) NaNO₂, TFA, 3 min, 70%; (f) SnCl₂, HCl, 1 h, 60%; (g) diglycolic anhydrid, DMF, 15h, 70%.

Figure 3: Synthesis of photosensitizers.

First, a complete reduction of porphyrin and chlorin into bacteriochlorin was carried out, using 30 equivalents of *p*-toluenesulfonylhydrazide under pyridine reflux. Bacteriochlorin was then slowly converted into chlorin by carefully adding an oxidizing agent (*o*-chloranil). The reaction could be easily monitored by checking UV-visible spectra after each addition. Those reactions gave variable yields ranging from 30% to 90%. The conjugates were then synthesized by SPPS; successful synthesis of Fmoc-Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Wang Resin (for later compounds **8a**, **9a** and **10a**) and Fmoc-Pro-Leu-Gly-Leu-Lys(Boc)-Wang Resin (for later compound **11a**) were achieved by classical peptide synthesis on solid phase using Fmoc strategy and a six-times coupling of first glycine residue.

Compounds **8a** and **11a** were obtained by coupling NHS-activated photosensitizer (4) on deprotected *N*-terminus peptide in its solid phase, followed by a cleavage from the resin using TFA, also allowing complete side-chains deprotection (figure 2).

Compound **9a** was obtained by synthesizing first porphyrin **6** using Vicente *et al.* procedure (52), and then Whitlock reduction to give **7**. Coupling of **7** on peptide was performed with good yields using the HATU coupling reagent. **10a** was obtained after peptide synthesis, addition during the solid phase of {2-[Fmoc-ethoxy]-ethoxy}-acetic acid, noted Fmoc-NH-PEG₉-COOH (where 9 refers to the number of atoms of the chain), and then **3**, using HATU as coupling reagent for both.

For the synthesis of Photodynamic Molecular Beacons (figure 2), TPC-peptide conjugates were dissolved in a DMF/carbonate buffer (pH 9.3) mixture allowing a coupling in a solution of commercially available BBQ650-NHS ester on peptide lysine εNH₂, as described in literature in the field of study (53). The compounds were purified by reverse phase preparative HPLC using both UV-visible and fluorescence detections.

Photophysical properties

Photosensitizer derivates

As shown in figure 4, no significant change was observed between TPC and its derivates: UV-visible spectra remained unchanged with a maximum corresponding to the Soret band at 415 nm ($\epsilon = 85\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) and an intense Q_I band at 650 nm ($\epsilon = 21\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) in ethanol (figure 4a). Fluorescence emission and singlet oxygen production were similar. For all compounds, fluorescence lifetimes were 9.1 ns, and estimated fluorescence and singlet oxygen quantum yields were 0.3 and 0.7 respectively (figures 4a, 4b and 4c). Transient absorption spectra were detected at 440 – 450 nm which is typical for the triplet state of such chlorins as shown in figure 4d (31).

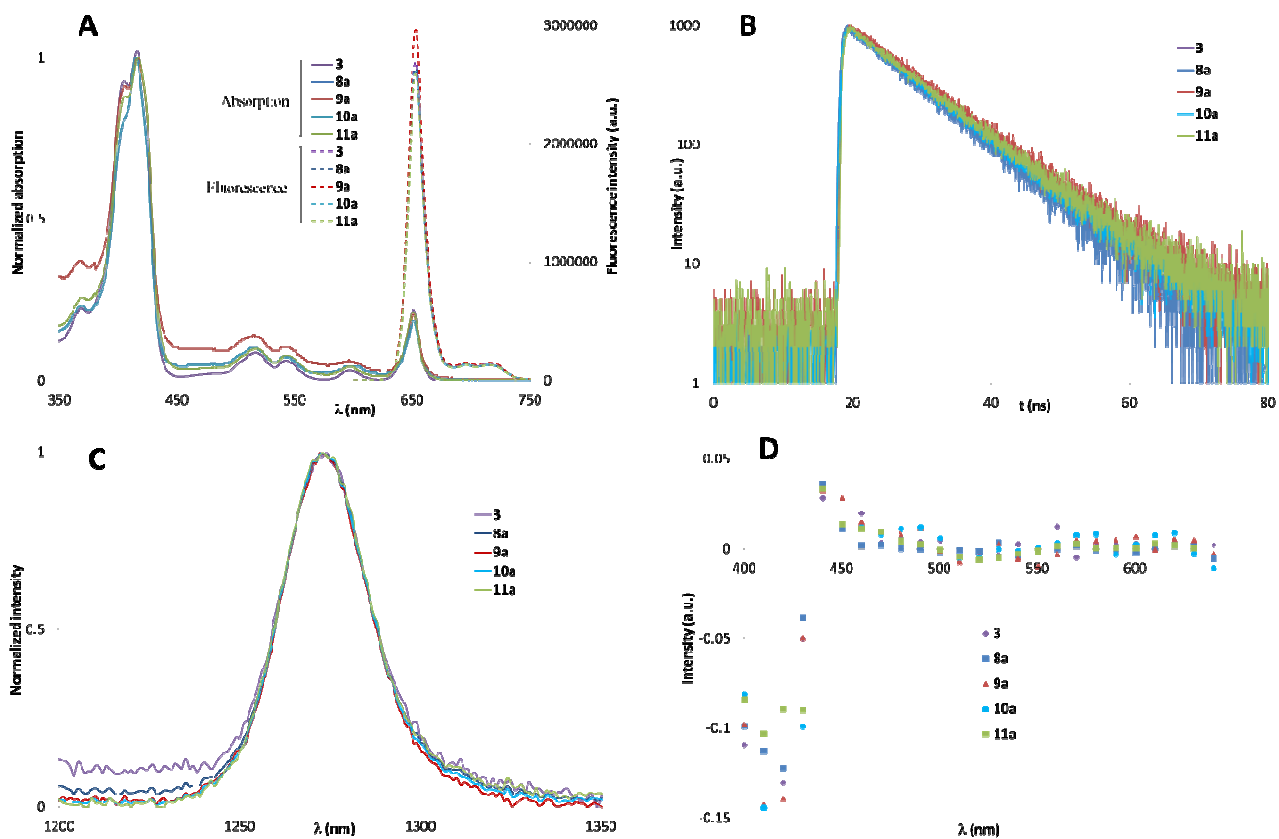


Figure 4: Photophysical properties of conjugates. (A) UV-visible absorption (full line) and fluorescence emission spectra (dash line, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm) of **3** (purple), **8a** (dark blue), **9a** (red), **10a** (white blue) and **11a** (green) in ethanol. (B) Fluorescence decay in ethanol, $\lambda_{\text{exc}} = 408$ nm. (C) Singlet oxygen luminescence spectra in ethanol, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm. (D) Transient absorption in ethanol, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm.

The quenching of the photosensitizers' triplet state by oxygen was investigated using time-resolved transient absorption. Figure 5 shows the general shape of all photosensitizers' transient absorption decays.

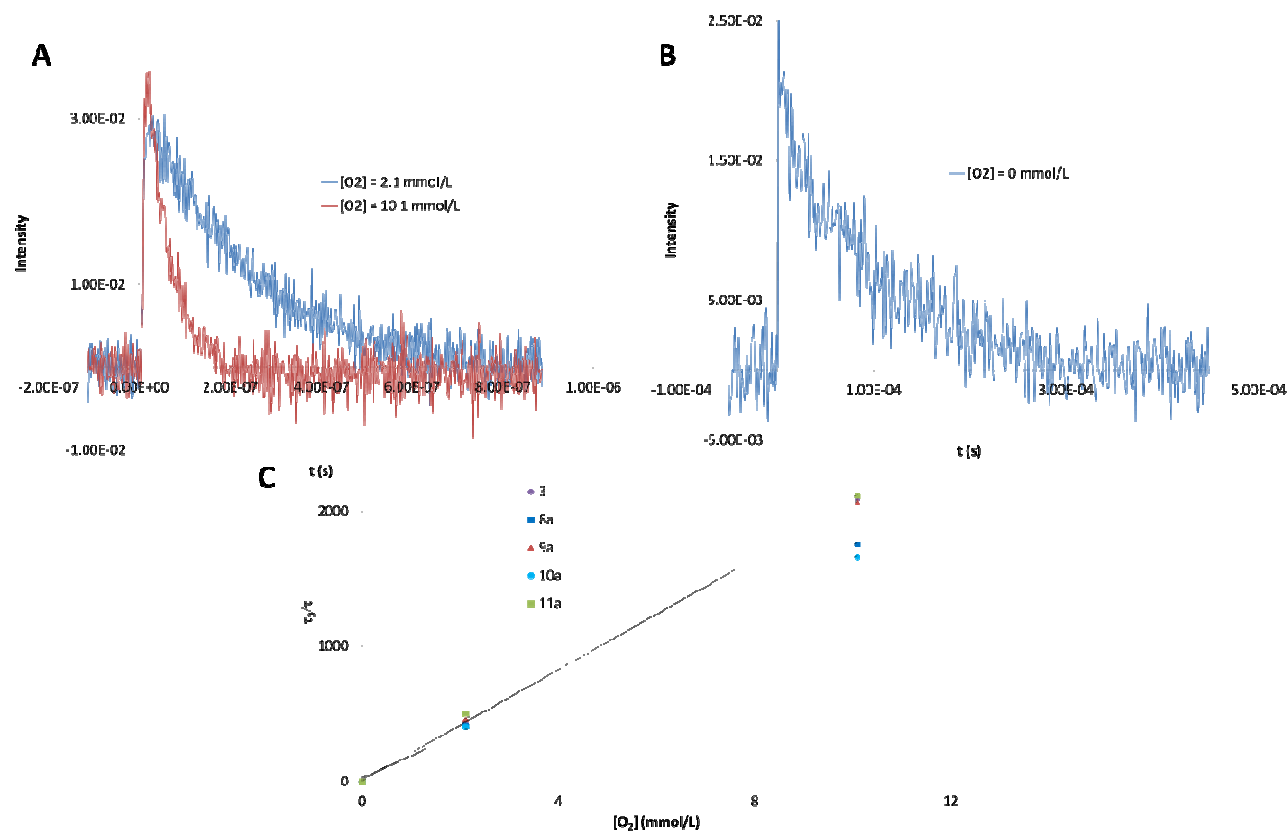


Figure 5: (A) Time-resolved transient absorption of **8a** monitored at 450 nm in ethanol saturated in oxygen (red line) and under atmospheric pressure (blue line), $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm. (B) Time-resolved transient absorption of **8a** monitored at 450 nm in ethanol saturated with argon), $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm. (C) Stern-Volmer plots of conjugates triplet state quenched by oxygen in ethanol.

As expected, triplet state lifetime depends on oxygen concentration in the media; the observed triplet lifetimes of TPC and TPC-peptide were around 55 ns in an oxygen saturated solution ($[\text{O}_2] = 10.1$ mmol/L [45]), 240 ns in a solution under atmospheric pressure ($[\text{O}_2] = 2.1$ mmol/L (54)) and 110 μs in an oxygen free solution. The Stern-Volmer plots (figure 5c) were linear and calculated oxygen quenching constants $k_q \text{O}_2$ were around $1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, which indicates that the quenching observed was due to a bimolecular diffusion-controlled process. All values are summarized in table 1.

Table 1. Summary of photosensitizers' conjugates photophysical properties in ethanol. ^a Oxygen saturated solution, [O₂] = 10.1 mmol/L. ^b Solution under atmospheric pressure, [O₂] = 2.1 mmol/L. ^c Argon saturated solution, [O₂] = 0 mmol/L.

Compound	λ_{Soret} (nm)	λ_{QI} (nm)	Φ_{F}	τ_{F} (ns)	Φ_{Δ}	$\tau_{\text{T}}^{\text{a}}$ (ns)	$\tau_{\text{T}}^{\text{b}}$ (ns)	$\tau_{\text{T}}^{\text{c}}$ (ns)	$k_{\text{q O}_2}$ (10 ⁹ M ⁻¹ .s ⁻¹)
3	415	650	0.23	9.1	0.70	50.4	238	105	1.97
8a	415	650	0.23	9.1	0.70	56.8	240	120	1.75
9a	415	650	0.27	9.7	0.68	53.0	240	109	1.87
10a	415	650	0.24	9.1	0.70	54.3	223	90	1.84
11a	415	650	0.23	9.1	0.70	59.7	256	105	1.67

FRET experiments

To determine if FRET could be involved in the energy transfer process between the photosensitizer and BBQ, the fluorescence quenching efficiency was investigated using compound **8a** and BBQ in DMF solution. As shown in figure 6a, BBQ UV-visible spectrum shows a good level of spectral overlap with TPC fluorescence emission spectrum.

The spectral overlap **J** of the pair TPC/BBQ was calculated using equation (3) and estimated to be: $\mathbf{J} = 4.9 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$. The Förster radius was calculated using equation (2) and we found $R_0 = 54 \text{ nm}$.

Experiments in time-resolved fluorescence spectroscopy using **8a** and BBQ in solution showed linear Stern-Volmer plots (figure 6b) and a quenching constant $k_{\text{q BBQ}} = 4.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, indicating that the energy transfer is limited by a diffusion process.

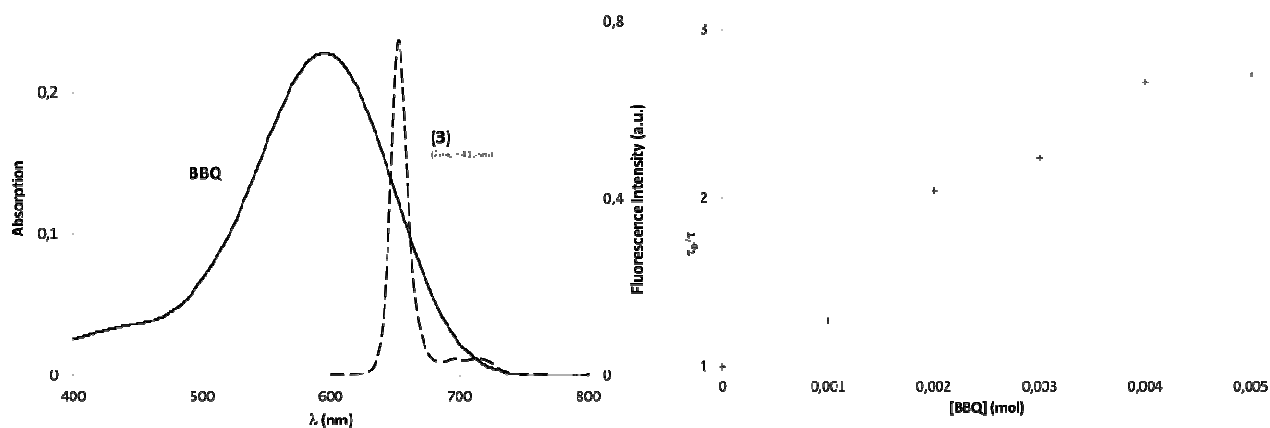


Figure 6: (A) Spectral overlap of **8a** emission (red line, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm) and BBQ650 absorption (blue line) in ethanol. (B) Quenching of **8a** by BBQ in DMF solution, $\lambda_{\text{exc}} = 408$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm, in ethanol.

PMB

The presence of the quencher can be directly detected on UV-visible spectra by adding BBQ spectrum onto the TPC spectrum. The light shift of the Soret band was observed leading to a maximum at 418 nm, as shown in figure 7a, representing the general shape of all PMB. Efficient quenching of fluorescence intensity and thus quantum yield was observed with values decreasing by 90% for all PMB (**8b**, **9b**, **10b** and **11b**) as compared to the corresponding photosensitizer derivatives (**8a**, **9a**, **10a** and **11a**, respectively) (figures 7b, 7c, 7d). However, fluorescence decay was found to show a double decay corresponding to both quenched construct and residual photosensitizer expression, decay time being respectively of 2 ns and 9.1 ns (figure 7b).

Photosensitizers' triplet state band in transient absorption ($\lambda = 440 - 450$ nm) disappears in PMB.

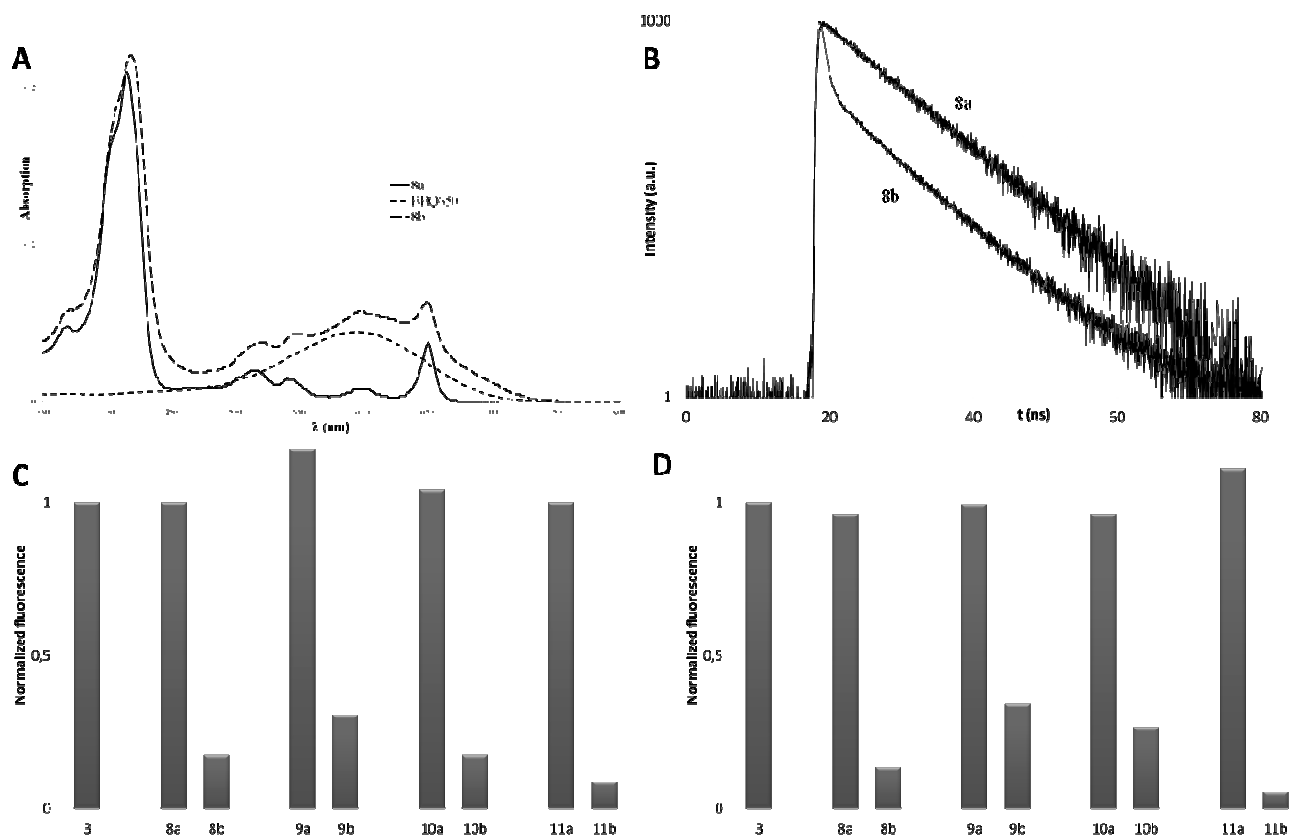


Figure 7: (A) UV-visible spectra of TPC (red line), Black Berry Quencher (dark blue line) and PMB (light blue line) in ethanol. (B) Fluorescence decays of TPC (red line) and PMB (blue line), $\lambda_{exc} = 415$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm, in ethanol. (C) Normalized fluorescence of conjugates and their associated PMB. In ethanol, $\lambda_{exc} = 415$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm, in ethanol. (D) Normalized singlet oxygen luminescence from conjugates and their associated PMB. In ethanol, $\lambda_{exc} = 415$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm, in ethanol.

Generation of singlet oxygen dramatically decreased, quantum yields were observed from $\Phi_{\Delta} = 0$ to $\Phi_{\Delta} = 0.06$ (Table 2).

Table 2. Summary of molecular beacons' photophysical properties in ethanol.

Compound	λ_{Soret} (nm)	λ_{QI} (nm)	Φ_{F}	% F quenching	t_{F} (ns)	Φ_{Δ}	% $^1\text{O}_2$ quenching
3	415	650	0.23	/	9.1	0.70	/
8b	418	651	0.04	83		0.06	91
9b	416	651	0.07	70		0.17	77
10b	416	652	0.04	83		0.08	88
11b	419	652	0.02	91		0.00	100

Enzymatic cleavage

As shown in figures 8-9, both MMP-2 and MMP-9 was found to efficiently cleave the H-GPLGIAGQK-OH peptide. Following the 2 hour incubation of the peptide at 50 μM with active MMP-2 or MMP-9, a significant reduction of the mass spectrometry peak intensity of the native peptide at 8.3-8.9 minutes was observed and a new distinct mass spectrometry peak was detected at 9.2-9.8 minutes. The new peak displayed a mass of 343 corresponding to the cleaved tetrapeptide H-GPLG-OH (Figures 8-9). Since BBQ650 efficiently quenches TPC fluorescence in the intact PMB molecules, we tested to find out whether active MMP-2 and/or MMP-9 were able to specifically cleave the peptide linkers in the different PMB constructs (**8b**, **9b**, **10b** and **11b**) and to restore the fluorescence. However, no increase of the fluorescence intensity for **8b**, **9b**, **10b** and **11b** compounds was observed after incubation with MMP-2 or MM-9 (data not shown), suggesting that any cleavage occurred. Additional incubation conditions were tested (see supplementary material) but no restoration of the fluorescence intensity was observed for any construct.

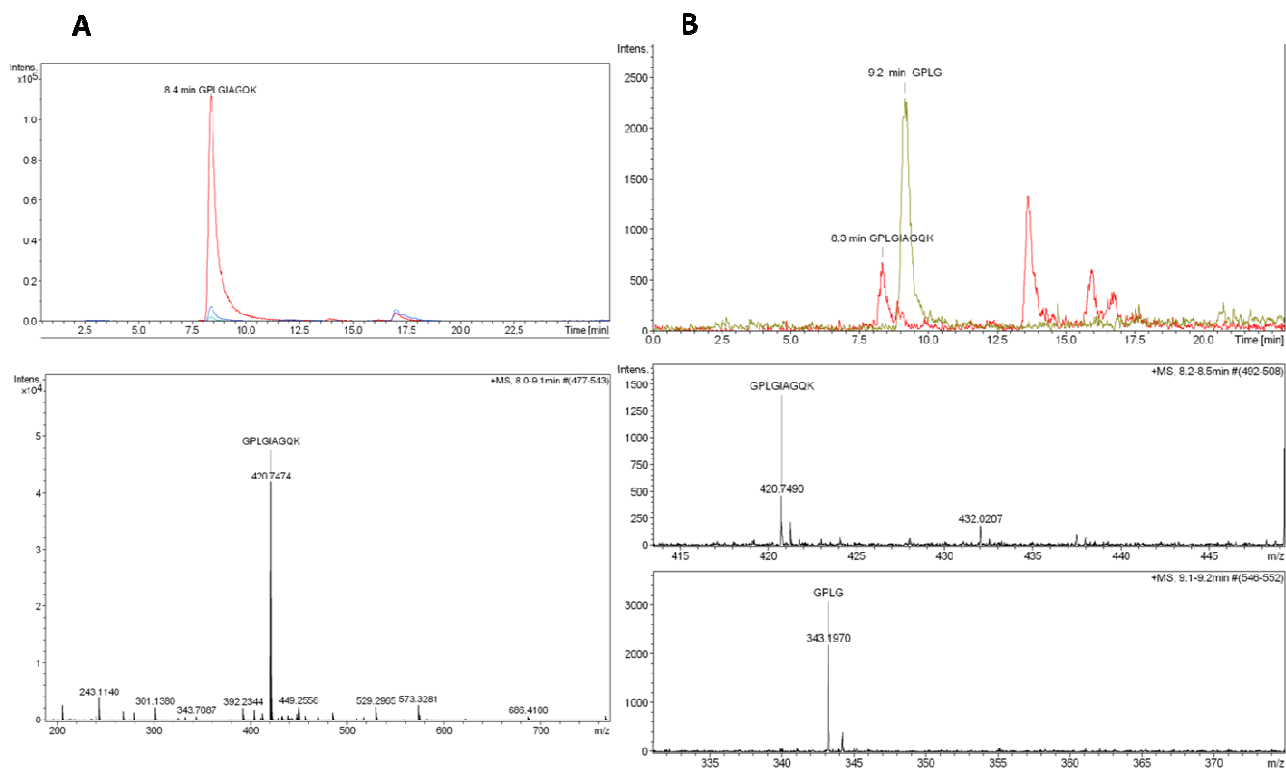


Figure 8: LC-MS spectra of peptide GPLGIAGQK (50 μ M) incubated in the absence (A) or presence (B) of 1.5 nM active MMP-2 for 2 hours at 37°C.

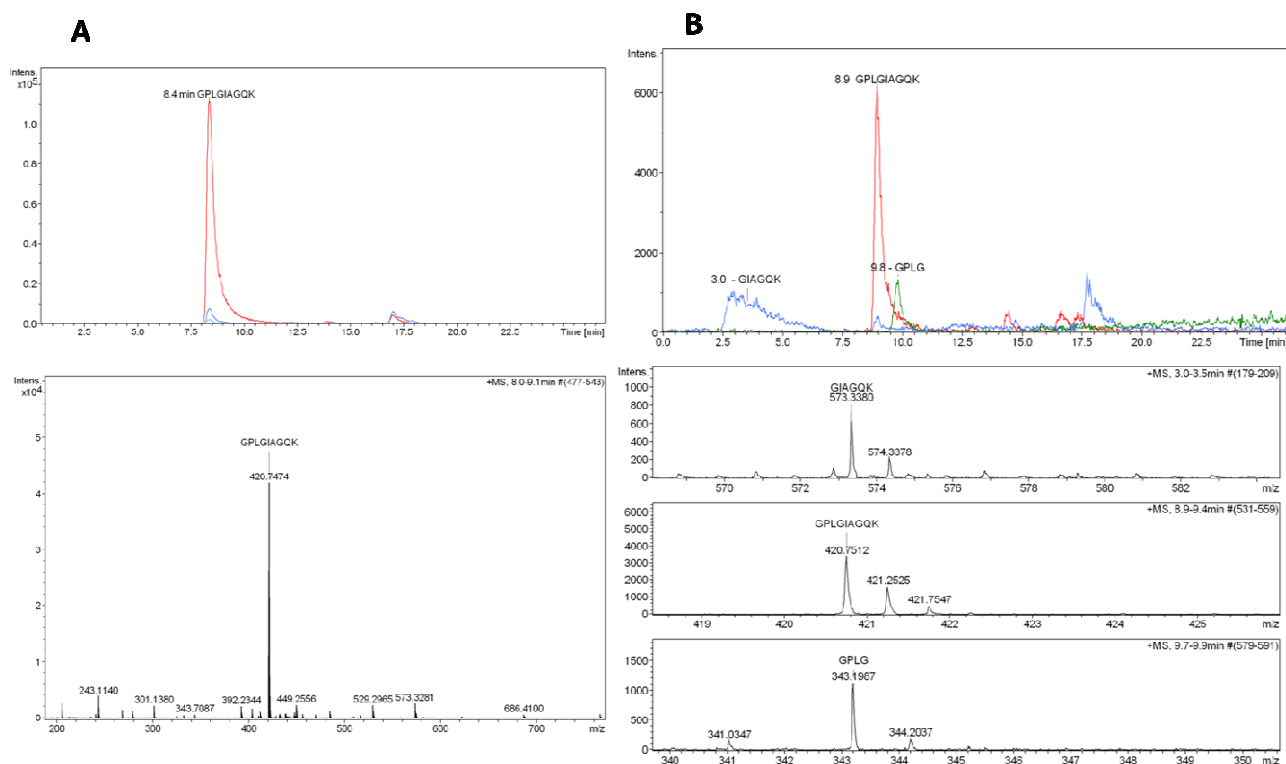


Figure 9: LC-MS spectra of peptide GPLGIAGQK (50 μ M) incubated in the absence (A) or presence (B) of 1.2 nM active MMP-9 for 2 hours at 37°C.

DISCUSSION

The control of singlet oxygen production is a key step for PDT applications, and protease-mediated activatable probes are of great interest. Several studies involving photosensitizer aggregation as quenching process were realized by Weissleder team (55–57) and Lange team (58–60). Zheng *et al.* developed the first photosensitizer-quencher and enzyme-active targeting probes (28–34) where a photosensitizer was linked to a quencher *via* a disease targeted biomolecule. Recently, phospholipases activatable probes comprising different spacer lengths between pyropheophorbide-a and BHQ3 were synthesized and their biological activity reported (35).

The aim of this study was to synthesize a family of PMB using peptidase activity of gelatinases MMP-2 and MMP-9, with a substrate peptide H-GPLGIAGQK-OH, first described by Mansour *et al.* (40) and to evaluate the influence of the length of the linker on the photophysical properties and enzymatic cleavage sensitivity. The peptide H-GPLGIAGQK-OH has been used as gelatinases substrate for drug release by many studies (41–44). As a “control” molecular beacon, we chose H-PLGL-OH peptide sequence, described by Knight *et al.* (48), known to be cleaved by numerous MMPs and other proteases (26, 43). Since gelatinases are normally over-expressed in the neo-vasculature of many cancers such as malignant gliomas (61), the use of PMB could provide another way of controlling toxic species generation in order to prevent non targeted cells destruction.

An ideal PMB should be composed of a photosensitizer with a high singlet oxygen production that can be efficiently quenched. Zheng’s team used pheophorbide-a as a photosensitizer. This is a chlorophyll analogue with a long wavelength at 667 nm which is also an efficient $^1\text{O}_2$ producer with a quantum yield > 50% (28). Our team specializes in the synthesis of porphyrin and chlorin and therefore we decided to use a monocarboxylic tetraphenyl chlorin (62). The choice of photosensitizer was made because of its high singlet oxygen quantum yield value (0.69 in ethanol) and its absorption in the red part of the spectrum (650 nm) (63). The quenching of singlet oxygen is of major interest in the construction of such compounds so the Black Berry quencher, previously analyzed by Lovell *et al.* (31), was chosen for its good (high) quenching properties. The synthesis of different PMB comprising several spacers was carried out along with those made up of a short peptide to illustrate the relationship between the distance of the acceptor/donor pairs and quenching efficiencies. Different spacers were

tested in order to change the length between the first amino acid of the peptide and the photosensitizer, and to establish a structure/enzyme activity relationship. The spacers were also chosen according to their hydrophilic properties.

PMBs were obtained with poor overall yields due both to porphyrin asymmetry and variable yields of chlorin synthesis. The Lindsey reaction for porphyrins was preferred to other routes because of its easy one-step procedure although a great deal of purification was required. Nevertheless, TPC was found to be characterized by a good singlet oxygen quantum yield ($\Phi_{\Delta} = 0.69$) and a strong absorption in the red part of the spectrum, which is important from the photodynamic therapy standpoint.

As expected, compounds **10a** and **10b** with the PEG₉ spacer were found to be more hydrophilic ($R_t = 4$ and 8 min) than with a short spacer (**9a**, **9b**; 6 and 11 min) and than compounds with no spacer (**11a**, **11b**; 12 and 10 minutes. **8a**, **8b**; 14 and 16 min) (table 3). Increasingly less accessibility to the ϵNH_2 of lysine was observed proportionally to water solubility. Indeed, compounds **8b** and **11b**, were synthesized within 24 hours from **8a** and **11a** respectively, whereas **9b** was synthesized within a week and the reaction time of **10b** exceeded a month. ¹H NMR showed a temperature-dependant massif in labile proton domain (4 – 7 ppm) which may indicate that water can be caged by the molecule. Special peptide conformation may be involved in this reactivity issue.

Table 3. Retention times of compounds **3**, **8a**, **9a**, **10a**, **11a**, **8b**, **9b**, **10b**, **11b** in HPLC using [75:25] acetonitrile/water (0.1% TFA) to 100% acetonitrile gradient in 15 min, and then isocratic acetonitrile for 15 minutes.

Compound	Retention time (min)	Compound	Retention time (min)
3	10		/
8a	14	8b	16
9a	6	9b	11
10a	4	10b	8
11a	12	11b	10

From a photophysical point of view, our investigations showed that the coupling of peptides

to TPC did not modify its photophysical properties, or its fluorescence and $^1\text{O}_2$ quantum yields. As illustrated in Table 1, fluorescence quantum yield and lifetime of products **3** and **7** were unchanged after functionalization (compounds **8a**, **9a**, **10a** and **11a**). If we compare **8a** and **11a**, no significant changes can be observed, meaning that the type of peptide linked does not influence the photophysical properties of TPC. Moreover, the same analysis can be made for **8a**, **9a** and **10a** meaning that the size of the spacer does not influence the photophysical properties of TPC. Similar observations were made concerning the triplet state of those chlorins. The band at 440 – 450 nm in transient absorption remained the same and the quenching of this triplet state by oxygen to produce singlet oxygen was still controlled by a diffusion process, as can be deduced from the $k_q \text{O}_2$ constants. TPC and its derivatives thus was found to have a high Inter System Crossing rate and a good singlet oxygen formation efficiency which was not disturbed by the presence of a peptide moiety since $k_q \text{O}_2$ constants were around $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Singlet oxygen production was thus found to be unchanged, $\Phi_{\Delta} = 0.7$ for all compounds.

To determine whether the FRET energy transfer process occurred in our system, quenching experiments were performed in solution with compound **8a** and increasing amounts of BBQ. Although there are few studies describing energy transfer processes involving black hole quenchers, Lovell *et al.* investigated the FRET efficiency between a pyropheophorbide-a (Pyro) and several black hole quenchers (31). In this study, the quenchers were attached to the photosensitizer using a lysine linker. Förster radii, fluorescence and singlet oxygen quenching rates were calculated, showing that quenchers absorbing in the red part of the spectrum were the most efficient. Those Pyro-quenchers, linked together by a simple lysine, resulted in 95% to 99% of fluorescence quenching and 91% to 99% of singlet oxygen quenching. Among them, Black Berry Quencher 650 (BBQ650) showed particularly good properties, quenching 99% of Pyro fluorescence and 97% of Pyro production of singlet oxygen.

On the basis of this study, the photophysical properties of the tetraphenylchlorin and BBQ650 pair was investigated. BBQ650 was found to have broad absorption spectra with a maximum in ethanol at 596 nm, which presents an overlap with TPC fluorescence emission, as shown in figure 6a. Using equations (2) and (3), the spectral overlap \mathbf{J} was calculated to be $4.9 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$ and the Förster radius $R_0 = 54 \text{ nm}$. This appears large enough for a spatial separation that, in our case, was that of a 9 amino acids long peptide and a 9 atoms long polyethylene glycol moiety. Given that peptide folding can bring both ends closer, we thus

conclude that PMB constructs can have an efficient energy transfer.






Due to the strong BBQ absorption at 415 nm (wavelength of excitation), it was not possible to carry out a FRET experiment in fluorescence intensity as most of the light is absorbed directly by the high concentration of BBQ. Time-resolved quenching experiments were then performed in the DMF solution and the Stern-Volmer plots are shown in figure 6b. From the value of quenching constant K and the fluorescence lifetime the bimolecular quenching constant, $k_q_{BBQ} = 4.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ can be calculated. This is the value expected for the diffusion-controlled bimolecular rate constant between TPC and BBQ.

As expected, photophysical properties of conjugates **8b**, **9b**, **10b**, **11b** showed great differences with their homologues **8a**, **9a**, **10a**, **11a** after coupling of BBQ650. Dramatic decreases of fluorescence and singlet oxygen quantum yields, as well as fluorescence lifetimes were observed in accordance with quenching. Quenching rate values were between 77 and 100%, indicating that a singlet-singlet energy transfer occurs between chlorin and BBQ650. This result was confirmed by transient absorption measurements. Indeed, the triplet state band at 440 – 450 nm previously observed in TPC disappears in PMB. Values for all PMB are shown in table 2. If we compare the results obtained with **8b** (peptide GPLGIAGQK) and **11b** (peptide GLGLK), it seems that the shortest peptide length induces better fluorescence and $^1\text{O}_2$ quenching, respectively 91% and 100%. Compounds **9b** (short spacer) and **10b** (long spacer) present the less $^1\text{O}_2$ quenching respectively 77% and 88%. The introduction of a spacer does not seem to induce a diminution of $^1\text{O}_2$ quenching. This might be due to an increase of the flexibility of the molecules which prevents close proximity of the photosensitizer and BBQ650. Further modeling will be carried out in order to better understand this phenomenon.

Fluorescence lifetimes showed complex fluorescence decays. A first short decay was observed in the range 1 to 2 ns corresponding to the complex quenched construct (diffusion controlled reaction or long distance energy transfer, etc.) and a second mono-exponential decay corresponding to the long-lived fluorescence of the free TPC alone. “Double” decays were observed for compounds **8b** (peptide GPLGIAGQK, no spacer) and **11b** (peptide GLGLK, no spacer), while compounds **9b** (peptide GPLGIAGQK, small spacer) and **10b** (peptide GPLGIAGQK, long spacer) showed very little signal amplitude of quenched construct. Since compounds **9b** and **10b** had additional spacers compared to compounds **8b** and **11b**, it can be hypothesized that the longer the spacer, the less energy transfer that occurs. This can be

observed by both static spectroscopy (fluorescence quantum yields are lower for **9b** and **10b** than for **8b** and **11b**) and fluorescence decays (more residual TPC expression observed). The presence of a long lifetime may hide the real signal linked with the quenching process and the signal processing associated is not able to robustly eliminate this component in order to calculate the “pure” decay of the fluorophore. Work on this point is in progress along with a simulation of the reaction kinetics (to be published).

We investigated whether active MMP-2 and/or MMP-9 were able first to cleave peptide linkers in the different PMB constructs and secondly, to restore the fluorescence of the conjugated photosensitizer. Although, as expected, both active enzymes efficiently cleaved the free GPLGIAGQK peptide, no cleavage was measured for compounds **8b**, **9b**, **10b** and **11b** (figure 10). Different incubation times and substrate concentrations were tested using MMP-2 and MMP-9 active enzymes, but unfortunately no restoration of the fluorescence intensity was observed whatever the incubation conditions.

Compound	% fluorescence quenching	% ¹ O ₂ quenching	MMP-2 MMP-9 cleavage
 GPLGIAGQK	-	-	yes
 GPLGIAGQK	83	91	no
 GPLGIAGQK	70	77	no
 GPLGIAGQK	83	88	no
 PLGLK	91	100	no



 5-(4-carboxyphenyl), 10,15,20-triphenyl chlorin
 BBQ650

Figure 10: summary of the photophysical and biochemical studies.

A cleavage test was also performed with compound **8a** (quencher-free construct) to determine whether cleavage was prevented by the photosensitizer molecule or by the quencher compound. No cleavage was evidenced with MMP-2, as showed by HPLC analysis (data not shown). This lack of recognition could hypothetically be explained by a constrained peptide conformation in the PMB constructs or at least a non-natural peptide conformation due to the presence of TPC since the free H-GPLGIAGQK-OH peptide is efficiently cleaved by both MMP-2 and MMP-9. Although different lengths of the linker were tested in different constructs in the absence or presence of the quencher without any response towards MMP-2 and MMP-9, the problem may come from a steric hindrance being too high because of the TPC molecule itself. We could also speculate that the peptide substrate in the PMB constructs adopts a conformation adapted for interaction only with non-catalytic domains of the gelatinases, thus impeding their enzymatic cleavage. Interactions with cell surface integral membrane proteins (CD44, $\alpha_v\beta/\alpha\beta_1/\alpha\beta_2$ integrins and Ku protein,...) can occur through the gelatinases active site but also *via* their non-catalytic domain known as exosite or allosteric region, such as hemopexin-like C-terminal domain (64). The non-enzymatic, signal transduction roles of surface-bound gelatinases (*e.g.* MMP-2 and MMP-9) and their subsequent effects on cell survival, migration and angiogenesis were recently reported (64, 65). Moreover, beside control of MMPs' enzymatic activity, recent study described the conjugation of gelatinase-binding peptides, identified by phage display, to liposome by covalent peptide-PEG-PE anchor creating an efficient targeted drug delivery vehicle (66). Kratz *et al.* used a maleimide moiety right after the first glycine to attach a doxorubicin (41) and Terada *et al.* functionalized this same glycine with a PEG (42), in both cases cleavage of -GPLGIAGQ- occurred. It must also be remembered that enzymatic cleavage activity in the buffer solution may be significantly different when compared to biologic tissues. Jang and Choi (2012) recently demonstrated enzymatic activation of pyropheophorbide-a photosensitizer-conjugated gold nanorod, linked through a GPLGVRG MMP-2 specific sequence, after incubation with MMP-2-positive HT1080 cells (67). Targeting MMPs was also recently used for several targeted drug delivery approaches (68, 69). Singh and colleagues reported the synthesis of bovine serum albumin nanoparticles stabilized with coatings formed using peptide domains of varying sensitivity to MMP-2. It was found that cleavage domain type influenced the release of the model drug from the nanoparticles (69). In Zheng's work, no spacer has been added between the photosensitizer and the peptide. They

could observed an effective $^1\text{O}_2$ quenching (94%) as well as a cleavage by MMP-7 that restored the quenched $^1\text{O}_2$. Unfortunately, we could not observe any cleavage of our peptide by MMP-2 and MMP-9. We used a related quencher (BBQ650) and the peptides are of similar size (8 or 9 amino acids). Different explanations could be envisaged:

- conformational structure of the two peptides are different and in our case, prevent the photosensitizer and the quencher to be in close proximity,
- phenyl groups of the chlorin bring a steric hindrance.

Further modelling will be carried out in order to better understand this phenomenon. Other peptides and photosensitizers could also be used.

CONCLUSION

New photodynamic molecular beacons were developed to achieve multi-level control of $^1\text{O}_2$ production by targeting over-expressed matrix metalloproteinases activity in malignant tissues in order to provide a higher degree of PDT selectivity. These PMBs were based on a chlorin singlet excited state quenched by a Black Berry quencher when the two moieties are connected through peptide sequences specific to the target enzymes. Two peptides have been chosen: GPLGIAGQK, used as gelatinases substrate for drug release, and PLGLK as control peptide, known to be cleaved by numerous MMPs and other proteases. Two different lengths were selected for the spacers. In total, 4 PMBs were synthesized. We demonstrated that both fluorescence intensity and $^1\text{O}_2$ production were efficiently quenched in the native PMBs. Quenching rate values were between 77 and 100 % indicating that a singlet-singlet energy transfer occurs between the chlorin and BBQ650. The introduction of a spacer, whichever length, does not seem to induce a diminution of $^1\text{O}_2$ quenching; this maybe due to an increased flexibility of the molecules. To date, this is the first distance-related photophysical study concerning PMB and more specifically gelatinases-targeted probes involving TPC and BBQ650. Whereas MMP-2 and MMP-9 efficiently cleaved GPLGIAGQK peptide as revealed by LC-HRMS, none of the elaborated PMBs were cleaved by these enzymes, which was probably due to a constrained peptide conformation in the PMB constructs. Further modelling should be carried out in order to achieve a better understanding of the phenomena. In the near future we plan to elaborate new PMBs with others photosensitizers and/or peptides linkage to help understand the structure/function relationship of MMP-2 and MMP-9.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank François Dupire and Cédric Paris for their expert assistance in mass spectroscopy analysis, and Aurélie Stallivieri for her assistance in molecular beacons synthesis.

REFERENCES

- (1) Dougherty, T. J.; Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* **1998**, *90*, 889–905.
- (2) Macdonald, I. J.; Dougherty, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105–129.
- (3) Weishaup, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326–2329.
- (4) Mitchell, J. B.; McPherson, S.; DeGraff, W.; Gamson, J.; Zabell, A.; Russo, A. Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2008–2011.
- (5) Berdowska, I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *342*, 41–69.
- (6) Duffy, M. J.; Duggan, C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 541–548.
- (7) Overall, C. M.; Kleinfeld, O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 227–239.
- (8) van Kempen, L. C. L.; de Visser, K. E.; Coussens, L. M. Inflammation, proteases and cancer. *European Journal of Cancer* **2006**, *42*, 728–734.
- (9) DeClerck, Y. A.; Mercurio, A. M.; Stack, M. S.; Chapman, H. A.; Zutter, M. M.; Muschel, R. J.; Raz, A.; Matrisian, L. M.; Sloane, B. F.; Noel, A.; Hendrix, M. J.; Coussens, L.; Padarathsingh, M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 1131–1139.
- (10) Koblinski, J. E.; Ahrm, M.; Sloane, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 113–135.
- (11) Lynch, C. C.; Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* **2002**, *70*, 561–573.
- (12) Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* **1995**, *1*, 27–30.
- (13) Kurohane, K.; Tominaga, A.; Sato, K.; North, J. R.; Namba, Y.; Oku, N. Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Letters* *167*, 49–56.
- (14) Chen, B.; Pogue, B. W.; Luna, J. M.; Hardman, R. L.; Hoopes, P. J.; Hasan, T. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 917–923.
- (15) Fingar, V. H.; Taber, S. W.; Haydon, P. S.; Harrison, L. T.; Kempf, S. J.; Wieman, T. J. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo* **2000**, *14*, 93–100.
- (16) Fingar, V. H.; Wieman, T. J.; Wiehle, S. A.; Cerrito, P. B. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4914–4921.
- (17) Frochot, C.; Di Stasio, B.; Vanderesse, R.; Belgy, M.-J.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Viriot, M.-L.; Barberi-Heyob, M. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg. Chem.* **2007**, *35*, 205–220.

- (18) Huang, Z.; Chen, Q.; Luck, D.; Beckers, J.; Wilson, B. C.; Trncic, N.; Larue, S. M.; Blanc, D.; Hetzel, F. W. Studies of a vascular-acting photosensitizer, Pd-bacteriopheophorbide (Tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer. *Lasers Surg Med* **2005**, *36*, 390–397.
- (19) McMahon, K. S.; Wieman, T. J.; Moore, P. H.; Fingar, V. H. Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5374–5379.
- (20) Wieman, T. J.; Mang, T. S.; Fingar, V. H.; Hill, T. G.; Reed, M. W.; Corey, T. S.; Nguyen, V. Q.; Render, E. R., Jr Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery* **1988**, *104*, 512–517.
- (21) Verhille, M.; Couleaud, P.; Vanderesse, R.; Brault, D.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C. Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3925–3943.
- (22) Verma, R. P.; Hansch, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2223–2268.
- (23) Berthelot, T.; Lasne, M.-C.; Déléris, G. New trends in molecular imaging of tumor angiogenesis. *Anticancer Agents Med Chem* **2008**, *8*, 497–522.
- (24) Brown, S.; Bernardo, M. M.; Li, Z.-H.; Kotra, L. P.; Tanaka, Y.; Fridman, R.; Mobashery, S. Potent and Selective Mechanism-Based Inhibition of Gelatinases. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6799–6800.
- (25) Mook, O. R. F.; Frederiks, W. M.; Van Noorden, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1705*, 69–89.
- (26) Kline, T.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cerveny, C. G.; Senter, P. D. Novel antitumor prodrugs designed for activation by matrix metalloproteinases-2 and -9. *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 9–22.
- (27) Stefflova, K.; Chen, J.; Zheng, G. Using molecular beacons for cancer imaging and treatment. *Front. Biosci.* **2007**, *12*, 4709–4721.
- (28) Chen, J.; Stefflova, K.; Niedre, M. J.; Wilson, B. C.; Chance, B.; Glickson, J. D.; Zheng, G. Protease-Triggered Photosensitizing Beacon Based on Singlet Oxygen Quenching and Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11450–11451.
- (29) Zheng, G.; Chen, J.; Stefflova, K.; Jarvi, M.; Li, H.; Wilson, B. C. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 8989–8994.
- (30) Chen, J.; Jarvi, M.; Lo, P.-C.; Stefflova, K.; Wilson, B. C.; Zheng, G. Using the singlet oxygen scavenging property of carotenoid in photodynamic molecular beacons to minimize photodamage to non-targeted cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 1311–1317.
- (31) Lovell, J. F.; Chen, J.; Jarvi, M. T.; Cao, W.-G.; Allen, A. D.; Liu, Y.; Tidwell, T. T.; Wilson, B. C.; Zheng, G. FRET Quenching of Photosensitizer Singlet Oxygen Generation. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3203–3211.
- (32) Lo, P.-C.; Chen, J.; Stefflova, K.; Warren, M. S.; Navab, R.; Bandarchi, B.; Mullins, S.; Tsao, M.; Cheng, J. D.; Zheng, G. Photodynamic molecular beacon triggered by fibroblast activation protein on cancer-associated fibroblasts for diagnosis and treatment of epithelial cancers. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 358–368.
- (33) Chen, J.; Liu, T. W. B.; Lo, P.-C.; Wilson, B. C.; Zheng, G. “Zipper” molecular beacons: a generalized strategy to optimize the performance of activatable protease probes. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 1836–1842.
- (34) Lovell, J. F.; Chen, J.; Huynh, E.; Jarvi, M. T.; Wilson, B. C.; Zheng, G. Facile synthesis of advanced photodynamic molecular beacon architectures. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1023–1025.
- (35) Popov, A. V.; Mawn, T. M.; Kim, S.; Zheng, G.; Delikatny, E. J. Design and Synthesis of Phospholipase C and A2-Activatable Near-Infrared Fluorescent Smart Probes. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1724–1727.
- (36) Nakajima, M.; Welch, D. R.; Belloni, P. N.; Nicolson, G. L. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 4869–4876.
- (37) Sreenath, T.; Matrisian, L. M.; Stetler-Stevenson, W.; Gattioni-Celli, S.; Pozzatti, R. O. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4942–4947.
- (38) Nikkola, J.; Vihinen, P.; Vuoristo, M.-S.; Kellokumpu-Lehtinen, P.; Kähäri, V.-M.; Pyrhönen, S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 5158–5166.

- (39) Coussens, L. M.; Fingleton, B.; Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **2002**, *295*, 2387–2392.
- (40) Mansour, A. M.; Dreves, J.; Esser, N.; Hamada, F. M.; Badary, O. A.; Unger, C.; Fichtner, I.; Kratz, F. A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4062–4066.
- (41) Kratz, F.; Dreves, J.; Bing, G.; Stockmar, C.; Scheuermann, K.; Lazar, P.; Unger, C. Development and in vitro efficacy of novel MMP2 and MMP9 specific doxorubicin albumin conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2001–2006.
- (42) Terada, T.; Iwai, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Novel PEG-matrix metalloproteinase-2 cleavable peptide-lipid containing galactosylated liposomes for hepatocellular carcinoma-selective targeting. *J Control Release* **2006**, *111*, 333–342.
- (43) Netzel-Arnett, S.; Sang, Q. X.; Moore, W. G.; Navre, M.; Birkedal-Hansen, H.; Van Wart, H. E. Comparative sequence specificities of human 72- and 92-kDa gelatinases (type IV collagenases) and PUMP (matrilysin). *Biochemistry* **1993**, *32*, 6427–6432.
- (44) Jang, J. H.; Kim, M. Y.; Lee, J.-W.; Kim, S. C.; Cho, J. H. Enhancement of the cancer targeting specificity of buforin IIb by fusion with an anionic peptide via a matrix metalloproteinases-cleavable linker. *Peptides* **2011**, *32*, 895–899.
- (45) Seybold, P. G.; Gouterman, M. Porphyrins: XIII: Fluorescence spectra and quantum yields. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1969**, *31*, 1–13.
- (46) Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391–475.
- (47) Dale, R. E.; Eisinger, J.; Blumberg, W. E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys. J.* **1979**, *26*, 161–193.
- (48) Knight, C. G.; Willenbrock, F.; Murphy, G. A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* **1992**, *296*, 263–266.
- (49) Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Viriot, M.-L.; Barberi-Heyob, M. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* **2005**, *40*, 1111–1122.
- (50) Lindsey, J. S.; Hsu, H. C.; Schreiman, I. C. Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 4969–4970.
- (51) Whitlock, H. W.; Hanauer, R.; Oester, M. Y.; Bower, B. K. Diimide reduction of porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7485–7489.
- (52) Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T. J.; Hammer, R. P.; Vicente, M. G. H. Peptide-mediated cell transport of water soluble porphyrin conjugates. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1364–1372.
- (53) Valanne, A.; Malmi, P.; Appelblom, H.; Niemelä, P.; Soukka, T. A dual-step fluorescence resonance energy transfer-based quenching assay for screening of caspase-3 inhibitors. *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 71–81.
- (54) Murov, S. L.; Hug, G. L.; Carmichael, I. *Handbook Of Photochemistry*; M. Dekker, 1993.
- (55) Weissleder, R.; Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 375–378.
- (56) Tung, C. H.; Bredow, S.; Mahmood, U.; Weissleder, R. Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 892–896.
- (57) Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. In Vivo Imaging of Proteolytic Enzyme Activity Using a Novel Molecular Reporter. *Cancer Res* **2000**, *60*, 4953–4958.
- (58) Campo, M. A.; Gabriel, D.; Kucera, P.; Gurny, R.; Lange, N. Polymeric photosensitizer prodrugs for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 958–965.
- (59) Gabriel, D.; Campo, M. A.; Gurny, R.; Lange, N. Tailoring protease-sensitive photodynamic agents to specific disease-associated enzymes. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1070–1077.
- (60) Gabriel, D.; Zuluaga, M.-F.; Martinez, M.-N.; Campo, M. A.; Lange, N. Urokinase-plasminogen-activator sensitive polymeric photosensitizer prodrugs: Design, synthesis and in vitro evaluation. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2009**, *19*, 15–24.
- (61) Forsyth, P. A.; Wong, H.; Laing, T. D.; Rewcastle, N. B.; Morris, D. G.; Muzik, H.; Leco, K. J.; Johnston, R. N.; Brasher, P. M.; Sutherland, G.; Edwards, D. R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1828–1835.
- (62) Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.-L.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting

- of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **2006**, *111*, 153–164.
- (63) Couleaud, P.; Bechet, D.; Vandresse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A.-C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine (Lond)* **2011**, *6*, 995–1009.
- (64) Bauvois, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1825*, 29–36.
- (65) Redondo-Muñoz, J.; Ugarte-Berzal, E.; Terol, M. J.; Van den Steen, P. E.; Hernández del Cerro, M.; Roderfeld, M.; Roeb, E.; Opdenakker, G.; García-Marco, J. A.; García-Pardo, A. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 160–172.
- (66) Medina, O. P.; Pillarsetty, N.; Glekas, A.; Punzalan, B.; Longo, V.; Gönen, M.; Zanzonico, P.; Smith-Jones, P.; Larson, S. M. Optimizing tumor targeting of the lipophilic EGFR-binding radiotracer SKI 243 using a liposomal nanoparticle delivery system. *J Control Release* **2011**, *149*, 292–298.
- (67) Jang, B.; Choi, Y. Photosensitizer-Conjugated Gold Nanorods for Enzyme-Activatable Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2012**, *2*, 190–197.
- (68) Zhang, Y.; Gemeinhart, R. A. Improving matrix metalloproteinase-2 specific response of a hydrogel system using electrophoresis. *Int J Pharm* **2012**, *429*, 31–37.
- (69) Singh, H. D.; Bushnak, I.; Unsworth, L. D. Engineered peptides with enzymatically cleavable domains for controlling the release of model protein drug from “soft” nanoparticles. *Acta Biomater* **2012**, *8*, 636–645.

Discussion

Les références citées sont celles incluses dans la publication.

Introduction

Le contrôle de la production d'oxygène singulet est une étape essentielle pour des applications en PDT, et les constructions moléculaires activables par des protéases représentent un grand intérêt. Plusieurs études faisant intervenir l'agrégation des PS comme processus d'inhibition ont été réalisées par les équipes de Weissleder (55–57) et de Lange (58–60). Zheng *et al.* ont développé le premier conjugué photosensibilisateur-*quencher*, activé par ciblage actif de protéases (28–34) où un photosensibilisateur est covalamment lié à un *quencher* via une biomolécule spécifique d'une maladie. Récemment, des constructions moléculaires activées par des phospholipases, comprenant différentes tailles de bras espaceurs entre le pyrophéophorbide-a et le BHQ3 ont été synthétisées et leur activité biologique a été reportée (35).

Le but de cette étude est de synthétiser une famille de PMBs utilisant l'activité peptidase des gélatinases MMP-2 et MMP-9 avec le peptide substrat H-GPLGIAGQ-OH, décrit pour la première fois par Mansour *et al.* (31) et d'évaluer l'influence de la taille du lien sur les propriétés photophysiques et biologiques. Ce peptide a été par la suite utilisé dans de nombreux travaux de relargage de principe actif (41–44). Comme *molecular beacon* « témoin », nous avons choisi la séquence peptidique H-PLGL-OH, décrite par Knight *et al.* (48), connue pour être clivée par de nombreuses MMPs, ainsi que d'autres protéases (26, 43). Puisque les gélatinases sont normalement surexprimées dans la néo-vascularisation de plusieurs cancers tel que le gliome malin (61), l'utilisation d'un PMB pourrait permettre un contrôle supplémentaire quant à la génération d'espèces toxiques afin d'éviter la destruction de cellules saines non ciblées.

Un PMB idéal devrait être composé d'un photosensibilisateur caractérisé par une production d'oxygène singulet élevée, initialement inhibée par un *quencher*. L'équipe du professeur Zheng utilisait le pyrophéophorbide-a comme photosensibilisateur, qui est un analogue de la chlorophylle, caractérisé par une absorption à 667 nm et qui est un producteur efficace d'oxygène singulet avec un rendement quantique supérieur à 50% (28). Notre équipe est spécialisée dans la synthèse de porphyrines et de chlorines, c'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser la tétraphénylchlorine monocarboxylée (62). Le choix de ce

photosensibilisateur vient de son rendement quantique de production d'oxygène singulet élevé (0,70 dans l'éthanol) et de son absorption dans la partie rouge du spectre (650 nm) (63). Parce que l'inhibition de l'oxygène singulet a une importance majeure dans un tel type de composé, le *BlackBerry Quencher*, précédemment reporté par Lovell *et al.* (31), a été choisi pour ses bonnes qualités de *quenching*. La synthèse de plusieurs PMB, comprenant différentes tailles d'espaceurs, a été réalisée, ainsi que la synthèse d'un PMB comprenant une séquence peptidique courte, afin d'illustrer la relation entre la distance donneur/accepteur et ses conséquences sur la qualité du *quenching*. Les espaceurs ont été choisis en fonctions de leurs propriétés hydrophiles.

Stratégie synthétique

Les PMB ont été obtenus avec de faibles rendements globaux, d'une part à cause de l'asymétrie des porphyrines de par la présence d'une seule fonction carbonyle, et d'autre part à cause des rendements variables d'obtention de chlorines. La synthèse de Lindsey pour obtenir les porphyrines a été préférée aux autres voies de synthèse pour sa simplicité de réaction, bien que de nombreuses purifications soient nécessaires. Néanmoins, la TPC est caractérisée par un rendement quantique de production d'oxygène singulet important ($\Phi_{\Delta} = 0,70$ dans l'éthanol) et une forte absorption dans la partie rouge du spectre, ce qui peut s'avérer important d'un point de vue des applications en PDT.

Comme attendu, les composés **10a** et **10b**, avec des bras espaceurs PEG₉, sont plus hydrophiles ($t_r = 4$ et 8 min respectivement) que les composés avec des espaceurs plus courts (**9a** et **9b** : 6 et 11 min), ou que les autres composés sans bras espaceurs (**11a**, **11b** : 12 et 10 min. **8a**, **8b**; 14 et 16 min) (tableau 4-1).

Tableau 4-1 : Temps de rétention des composés 3, 8a, 9a, 10a, 11a, 8b, 9b, 10b, 11b par HPLC utilisant le gradient [75:25] acétonitrile/eau (0,1% TFA) à 100% acétonitrile en 15 min, puis isocratique acétonitrile pendant 15 min.

Compound	Retention time (min)	Compound	Retention time (min)
3	10		/
8a	14	8b	16
9a	6	9b	11
10a	4	10b	8
11a	12	11b	10

Parallèlement à la solubilité dans l'eau, il a été observé que la fonction ϵNH_2 de la lysine est de moins en moins accessible. En effet, les composés **8b** et **11b** ont été synthétisés en 24 h à partir des composés **8a** et **11a** respectivement, alors que le composé **9b** a été synthétisé en une semaine et que le temps de réaction du composé **10b** a dépassé le mois. Les études en ^1H RMN de ces deux dernières molécules (non montrées) ont montré un domaine de protons labiles (entre 4 et 7 ppm) dépendant de la température, ce qui pourrait indiquer que de l'eau se fasse piéger dans les molécules. Une conformation spéciale du peptide pourrait donc être impliquée dans ces problèmes de réactivité.

Propriétés photophysiques

D'un point de vue photophysique, nos études ont montré que le couplage du peptide au PS ne modifie en rien les propriétés photophysiques de ce dernier. Comme illustré dans le table 1 (voir publication), le rendement quantique de fluorescence et de production d'oxygène singulet, ainsi que le temps de vie de fluorescence restent inchangés après fonctionnalisation (composés **8a**, **9a**, **10a** et **11a**).

Si l'on compare **8a** et **11a**, aucun changement significatif ne peut être observé,

signifiant que le type de lien peptidique utilisé n'influence pas les propriétés photophysiques de la TPC. De plus, la même observation peut être faite avec les composés **8a**, **9a** et **10a**, signifiant que la taille du bras espaceur n'influence pas non plus les propriétés photophysiques de la TPC.

Une observation similaire peut être faite concernant l'état triplet de ces chlorines : la bande à 440 – 450 nm en absorption transitoire reste la même et le *quenching* de cet état triplet par l'oxygène pour former $^1\text{O}_2$ est toujours limité par un processus diffusionnel, comme nous pouvons le déduire de la valeur des constantes $k_{q\text{O}_2}$. Les dérivés de la TPC ont donc un Croisement Inter Système (CIS) important et une bonne efficacité de production d'oxygène singulet, et ce dernier n'est en rien perturbé par la présence d'un peptide, puisque les constantes $k_{q\text{O}_2}$ sont de l'ordre de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La production d' $^1\text{O}_2$ reste donc inchangée, Φ_Δ de l'ordre de 0,7 pour tous les composés.

Dans le but de déterminer si le FRET est le processus de transfert d'énergie ayant lieu dans notre système, des tests en solution ont été réalisés, en utilisant la TPC et une quantité croissante de BBQ650. Même si peu de d'études sont décrites dans la littérature concernant les processus de transfert d'énergie ayant lieu avec les *black hole quenchers*, Lovell *et al.* ont étudié l'efficacité de FRET entre le pyrophéophorbide a (Pyro) et plusieurs autres *black hole quenchers* (26). Dans cette étude, les *quenchers* sont attachés au PS *via* une lysine ; les rayons de Förster, le *quenching* de la fluorescence et la production d'oxygène singulet ont été calculés. Dans ces conjugués Pyro-*quenchers*, séparés par une simple lysine, 95% à 99% d'inhibition de la fluorescence a été observé, ainsi que 91% à 99% d'inhibition de la production d'oxygène singulet. Parmi eux, le BBQ650 a montré des propriétés de *quenching* particulièrement intéressantes (99% d'inhibition de la fluorescence et 97% d'inhibition d' $^1\text{O}_2$). Sur la base de cette étude, les propriétés photophysiques de la paire TPC/BBQ650 ont été étudiées. Le BBQ650 a un large spectre d'absorption avec un maximum à 596 nm dans l'éthanol qui présente un recouvrement spectral avec l'émission de fluorescence de la TPC ($\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$), comme illustré dans la figure 4-3(A).

En utilisant les équations (2) et (3), le recouvrement spectral **J** a été calculé : $\mathbf{J} = 4.9 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$ et le rayon de Förster $R_0 = 54 \text{ nm}$. Ce rayon de Förster, à première approche, semble assez grand dans notre cas. En effet, la distance séparant le donneur de

l'accepteur est, au plus long, une séquence peptidique de neuf acides aminés et un bras espaceur polyéthylène glycol de neuf atomes. De plus, une possible structure secondaire du peptide pourrait rapprocher les deux extrémités, permettant un meilleur transfert d'énergie dans le PMB.

En raison de la forte absorption du BBQ650 à la longueur d'onde d'excitation de la TPC (415 nm), les mesures de FRET en intensité de fluorescence ne sont pas possibles, la plupart de la lumière étant directement absorbée par les grandes concentrations de BBQ. Nous avons donc opté pour des expériences de *quenching* de fluorescence en temps résolu dans la DMF (en raison de la faible solubilité du BBQ dans l'éthanol). La droite de Stern-Volmer est montrée en figure 6b. Les valeurs de la constante de *quenching* K et du temps de vie de la TPC nous permettent de calculer la constante de *quenching* bimoléculaire, $k_{q\text{ BBQ}} = 4,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est celle attendue pour un processus uniquement contrôlé par la diffusion.

Comme attendu, les propriétés photophysiques des conjugués **8b**, **9b**, **10b** et **11b** montrent des grandes différences avec leurs homologues **8a**, **9a**, **10a** et **11a** après couplage avec le BBQ650. Une diminution importante dans les rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet est observée, ainsi que dans le temps de vie de fluorescence des composés couplés au BBQ650. Des valeurs de *quenching* entre 77% et 100% ont été observées pour tous les composés ; ces valeurs indiquent qu'un transfert d'énergie important a lieu entre les états singulet de la chlorine et du BBQ. Ce résultat a été confirmé par les mesures en absorption transitoire : la bande à 440 – 450 nm, précédemment observée pour la TPC et ses dérivés a disparu dans les PMB. Les valeurs des mesures photophysiques pour tous les PMB sont montrées dans le tableau 2.

Si nous comparons les résultats obtenus avec **8b** (peptide GPLGIAGQK) et avec **11b** (peptide PLGLK), il semble que la plus petite taille de peptide induise une meilleure inhibition de la fluorescence et de la production d'oxygène singulet (respectivement de 91% et 100%). Les composés **9b** (bras espaceur court) et **10b** (bras espaceur long) présentent le moins de *quenching* de $^1\text{O}_2$, respectivement 77% et 88%. Il semblerait donc que l'introduction d'un bras espaceur induise une diminution dans la capacité à inhiber l'oxygène singulet qui doit être due à une augmentation de la flexibilité des molécules qui ne permet pas une grande proximité entre la TPC et le BBQ650. Des analyses de modélisation vont être faites afin de mieux comprendre ce phénomène.

Les temps de vie de fluorescence montrent des déclin de fluorescence complexes. Deux déclin sont observés : un premier déclin, court, d'environ 1 à 2 ns, correspondant au PMB (réaction contrôlée par la diffusion ou transfert d'énergie à longue distance, etc.) et un second déclin mono-exponentiel correspondant à la fluorescence longue de la TPC seule. Les « doubles » déclin sont nettement observés pour les composés **8b** (peptide GPLGIAGQK, sans bras espaceur) et **11b** (peptide PLGLK, sans bras espaceur), alors que les composés **9b** (peptide GPLGIAGQK, avec bras espaceur court) et **10b** (peptide GPLGIAGQK, avec bras espaceur long) montrent peu d'amplitude quant au signal du PMB. Puisque ces derniers composés contiennent un bras espaceur en plus par rapport aux composés plus courts (**8b** et **11b**), nous pouvons avancer l'hypothèse que moins de transfert d'énergie a lieu dans les composés les plus longs. Cette hypothèse peut être vérifiée à la fois par la spectroscopie statique (les rendements quantiques de fluorescence sont plus faibles pour **9b** et **10b** que pour **8b** et **11b**) et par analyse des déclin de fluorescence (plus d'expression résiduelle de la TPC est observée). La présence d'un signal long, peut-être issue de la présence d'impuretés, peut avoir pour effet de masquer le « vrai » signal lié au processus de *quenching* ; le système de traitement des données ne permet pas encore de pouvoir efficacement s'affranchir de la présence de ce déclin résiduel, trop important, et empêche l'accès au déclin du PMB. Néanmoins, ces études sont toujours en cours avec, en association, une simulation des réactions cinétiques.

Caractérisation biochimique

Nous avons étudié la capacité des MMP-2 et/ou MMP-9 actives à cliver les liens peptidiques dans les différents PMB, puis leur capacité à restaurer la fluorescence du PS. Même si, comme attendu, les enzymes actives clivent le peptide libre H-GPLGIAGQK-OH, aucun clivage n'a été mesuré pour les composés **8b**, **9b**, **10b** et **11b**. Différents temps d'incubation et de concentrations d'enzymes ont été testés avec les MMP-2 et -9 activées, mais malheureusement aucune restauration de fluorescence n'a été observée, quelles que soient les conditions. La même expérience a été réalisée avec le composé **8a** pour savoir si ce manque de réactivité est dû à la présence du photosensibilisateur ou du *quencher*. Aucun clivage n'a été observé lorsque ce composé a été incubé avec la MMP-2 activée. Le suivi de cette réaction a été fait par HPLC analytique (données non communiquées) et les profils chromatographiques sont identiques avec ou sans présence d'enzyme. Ce manque de reconnaissance peut être hypothétiquement expliqué par une conformation forcée du peptide

dans la construction moléculaire du PMB, ou tout du moins une conformation non naturelle due à la présence de la TPC. En effet, le peptide libre H-GPLGIAGQK-OH est, quant à lui, effectivement clivé par les MMP-2 et 9, alors que le conjugué TPC-GPLGIAGQK-OH (composé **8a**) ne l'est pas. Le peptide libre est clivé entre la glycine et l'isoleucine, relarguant les peptides H-GPLG-OH et H-IAGQK-OH, comme décrit dans la littérature (31).

Puisque les métalloprotéinases matricielles sont des endopeptidases zinc-dépendantes et que leur domaine catalytique contient un ion Zn^{2+} responsable des propriétés de clivage des MMPs (55), nous pouvons émettre l'hypothèse que la chlorine se lie à cet ion. En effet, les composés tétrapyrroliques sont de bons ligands des ions métalliques, généralement portant une charge +2 ou +4, il se pourrait alors qu'une interaction ait lieu entre la TPC et le zinc du domaine catalytique des gélatinases. Si une telle hypothèse s'avérait exacte, l'activité peptidase des MMPs devrait être affectée par la présence de TPC libre en solution, empêchant ainsi le clivage de substrats normalement reconnus.

Afin de vérifier cette hypothèse, 10 μ M d'un substrat contrôle fluorogénique a été incubé avec la MMP-2 activée en présence ou en absence de TPC libre en solution. L'échantillon témoin est un substrat contrôle de R&D Systems (Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂), où le fluorophore (Mca) est lié à un inhibiteur de fluorescence (Dpa) *via* le peptide substrat des MMPs : H-PLGL-OH. La fluorescence est détectée entre 350 nm et 600 nm après irradiation à $\lambda_{exc} = 320$ nm. 5 min après incubation, la fluorescence du substrat contrôle a été restaurée en présence et en absence de TPC, indiquant que même s'il y a interaction entre la TPC et la gélatinase, elle n'a aucun effet sur ses propriétés de clivage.

Bien que différentes tailles de bras espaceurs aient été testés dans différentes constructions moléculaires, en présence ou en absence de *quencher*, sans réponse des MMP-2 et -9, le problème viendrait d'un trop grand encombrement stérique dû à la molécule de TPC elle-même. Nous pouvons aussi spéculer que le peptide substrat dans les PMB adopte une conformation adaptée pour une interaction seulement avec le domaine non catalytique des gélatinases, empêchant ainsi leur clivage enzymatique. Des interactions avec des protéines membranaires sur la surface des cellules (CD44, intégrines $\alpha V\beta/\alpha\beta 1/\alpha\beta 2$ et protéine Ku,...) peuvent également arriver à travers le site actif des gélatinases mais aussi *via* leur domaine non catalytique, connu pour être une région exosite ou allostérique, tel que le domaine C-terminal du domaine « *hemopexin-like* » (64). Les rôles de transduction de signal, non

enzymatique, des gélatinases liées à la surface, et leurs effets sur la survie cellulaire ont été récemment reportés (64, 65).

Kratz *et al.* utilisent une entité maléimide directement sur la première glycine afin d'y attacher la doxorubicine (41), et Terada *et al.* fonctionnalisent cette même glycine avec un motif PEG (42). Dans les deux cas, le peptide –GPLGIAGQ- a été clivé par les MMP-2. Il est aussi important de souligner que l'activité de clivage enzymatique en milieu tampon est sensiblement différente de celle dans les tissus biologiques. Jang et Choi (2012) ont récemment démontré l'activation enzymatique d'un *nanorod* d'or avec le pyrophosphoribide-a comme PS, liés par la séquence peptidique –GPLGVRG-, après incubation avec les cellules HT1080, exprimant MMP-2 (67). Les MMPs ont également récemment été utilisées dans différentes stratégies de ciblage médicamenteuses (68, 69). Singh *et al.* ont reporté la synthèse de nanoparticules de sérum albumine bovin, stabilisées avec un enrobage utilisant des domaines de peptides de sensibilité variante à la MMP-2. Il a été démontré que le type de domaine de clivage influençait la libération de la molécule d'intérêt de la nanoparticule (69).

Dans les travaux de Zheng, aucun bras espaceur n'a été ajouté entre le PS et le peptide. Le quenching de $^1\text{O}_2$ pouvait être observé (94%), ainsi que la restauration de la génération de $^1\text{O}_2$ après clivage de MMP-7. Malheureusement, nous n'avons pas pu observer de clivage de notre peptide par MMP-2 ou MMP-9. Nous avons utilisé un *quencher* de la même famille (BBQ650) et les peptides sont de tailles similaires (8 à 9 acides aminés). Différentes explications peuvent être avancées :

- la conformation structurale des deux peptides est différente, et dans notre cas elle empêche le PS et le quencher d'être proches,
- les groupements phényles de la chlorine apportent un encombrement stérique.

Des modélisations vont être faites afin de mieux comprendre ce phénomène. D'autres peptides et d'autres PS peuvent également être utilisés.

Conclusion

En conclusion, de nouveaux *Photodynamic Molecular Beacons* ont été développés afin de permettre le contrôle de la production d'oxygène singulet par ciblage des métalloprotéinases matricielles, protéases surexprimées dans les tissus malins afin d'obtenir un plus grand degré de sélectivité PDT. Ces PMB sont basés sur l'inhibition de l'état singulet excité d'une chlorine par un *black hole quencher* : le BlackBerry Quencher (BBQ650). Ces deux entités sont reliées l'une à l'autre *via* des peptides substrats, spécifiques de ces enzymes.

Dans cette étude, deux peptides ont été choisis : GPLGIAGQK, utilisé comme peptide substrat des gélatinases pour le ciblage, et PLGLK comme peptide control, connu pour être clivé par les MMPs et de nombreuses autres protéases. Deux tailles différentes de bras espaceurs ont été sélectionnées. En total, 4 PMBs ont été synthétisés.

Nous avons démontré que la fluorescence et la production d'oxygène singulet sont effectivement inhibées dans la construction moléculaire. Les taux de *quenching* sont entre 77% et 100%, indiquant qu'un transfert d'énergie singulet-singulet a lieu entre la chlorine et le BBQ650. L'introduction d'un bras espaceur, quelqu'en soit la longueur, ne semble pas induire une diminution dans le *quenching* de $^1\text{O}_2$; ceci est certainement dû à une flexibilité accrue des molécules. A ce jour, ceci est la première étude sur l'influence de la distance dans des PMBs, ou plus spécifiquement : des constructions moléculaires ciblant les gélatinases utilisant le couple de fluorophores TPC et BBQ650. Alors que les MMP-2 et 9 clivent le peptide substrat H-GPLGIAGQK-OH, comme notre étude par LC-HRMS le prouve, aucun des PMBs synthétisés ne sont activés par ces enzymes, ceci est certainement dû à une conformation peptidique forcée. Nous devons néanmoins prendre en compte le fait que les clivages enzymatiques réalisés dans des tampons sont significativement différents que ceux réalisés en milieu biologique. Des modelisations sont prévues pour mieux comprendre ce phénomène.

Il est prévu, dans un futur proche, d'élaborer de nouveaux PMBs avec d'autres photosensibilisateurs et/ou de nouveaux liens peptidiques, afin de comprendre la relation structure-activité des gélatinases.

Conclusions et perspectives

Avec l'objectif du développement d'une stratégie anticancéreuse en *Vascular Targeted Photodynamic Therapy*, cette thèse est la première étude de l'équipe PDT de Nancy utilisant un *Photodynamic Molecular Beacon*. Les travaux réalisés nous ont permis de définir plus précisément les entités constitutives d'un PMB, ainsi que les propriétés photophysiques, physico-chimiques et biologiques attendues pour une telle construction moléculaire. Il s'agit ici du premier PMB ciblant les gélatinases utilisant conjointement la paire de fluorophores tétraphénylchlorine monocarboxylique et le *black hole quencher* BBQ650. Bien que l'objectif final de ce projet, à savoir l'utilisation biologique de la molécule pour le traitement du cancer, n'a pu être atteint, de nombreuses hypothèses mécanistiques ont été soulevées, permettant ainsi de poursuivre l'étude sur une solide base de connaissance dans ce domaine.

Dans un premier temps, la définition de la cible thérapeutique a un rôle prédominant. L'emploi des gélatinases, les MMP-2 et -9 comme protéases activatrices du PMB semble représenter une stratégie compatible avec un grand nombre de cancers. Le tableau 1-2 (chapitre I) donne un aperçu de la représentativité des gélatinases dans les différents cancers. De plus, les gélatinases étant certainement les MMPs les mieux caractérisées, bon nombre de séquences peptidiques, substrats de ces enzymes, peuvent être trouvées dans la littérature. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes essentiellement concentrés sur la séquence H-GPLGIAGQ-OH, décrite par Mansour *et al.*, ainsi que sur la séquence H-PLGL-OH, substrat non spécifique des gélatinases. Néanmoins, nous avons pu remarquer que l'emploi de ces peptides en présence de la tétraphénylchlorine ne permettait pas la reconnaissance enzymatique, il semble que la présence de la chlorine empêche le clivage par les gélatinases. En effet, la séquence peptidique H-GPLGIAGQK-OH seule est reconnue et clivée par les MMP-2 et 9, les études menées en HR-LCMS confirment le clivage entre les résidus glycine et isoleucine, mais l'introduction du macrocycle annihile cette reconnaissance. Des hypothèses avancées, nous avons démontré que :

- L'introduction de chlore libre en solution ne change en rien les propriétés peptidase des MMPs ; le zinc du site actif des gélatinases n'est donc pas complexé par le chlore.
- L'encombrement stérique du photosensibilisateur envers les premiers acides aminés n'est pas la cause du manque de reconnaissance ; en effet, les PMB comprenant différentes tailles de bras espaceurs ont été synthétisés et aucun n'est clivé par les protéases. De plus, le PMB « témoin », comprenant la séquence peptidique H-PLGLK-OH, n'est pas clivé non plus.

Ces expériences mènent à penser que c'est la présence du photosensibilisateur employé, la tétraphénylchlorine, qui est responsable de l'absence de clivage observé. Dans des études précédentes, la même séquence peptidique a été clivée par les MMP-2, prouvant qu'une fonctionnalisation de ce peptide est possible. La présence des groupements phényle de la chlore est sans doute à mettre en cause. Des études complémentaires visant à changer la nature du PS et/ou la séquence peptidique sont donc à envisager pour vérifier cette hypothèse.

Nous pouvons également souligner la complexité de manipulation du peptide en fonction du caractère hydrophile des bras espaceurs employés, ainsi que sa réactivité. En effet, plus le bras espaceur est hydrophile, plus le composé est proche d'une huile contenant des traces d'eau, observées par RMN du proton, et plus la réactivité du ϵNH_2 de la lysine est faible envers les acides carboxyliques activés. Ceci peut être expliqué par le fait que la tétraphénylchlorine monocarboxylique et le peptide H-GPLGIAGQK-OH sont tous deux relativement hydrophobes et que la présence d'un groupement hydrophile puisse favoriser l'emprisonnement de molécules d'eau. Ceci aurait donc des répercussions sur la structure secondaire du peptide lors de la réaction en solution avec le *quencher* : la lysine, seul acide aminé polaire de cette séquence, étant d'autant moins accessible que le bras espaceur est hydrophile, d'où les temps de réactions observés pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines.

Dans un deuxième temps, la connaissance précise des propriétés photophysiques du couple de fluorophores employé est fondamentale pour une application dans un PMB. Nos études ont démontré que la TPC est un photosensibilisateur caractérisé par un rendement de production d'oxygène singulet élevé ($\Phi_{\Delta} = 0,7$ dans l'éthanol) qui est effectivement inhibé par la présence du BBQ650. Les expériences réalisées en spectroscopie résolue dans le temps

(fluorescence et absorption transitoire) ont démontré que l'inhibition est due à un mécanisme de FRET. Le BBQ650 permet un transfert d'énergie de l'état singulet excité de la chlorine vers son état singulet, suivi d'une désactivation non-radiative puisque n'ont été observées ni fluorescence, ni formation d'état triplet du BBQ650. Ceci a pour conséquence une inhibition de la fluorescence et de la production d'oxygène singulet du PS.

Le couplage entre le PS et les différents groupements (peptides et bras espaceurs) n'a aucune incidence sur ses propriétés photophysiques, seules les propriétés physico-chimiques sont affectées. En effet, les rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet sont toujours de 0,3 et de 0,7 respectivement dans l'éthanol, mais nous avons observé une très nette différence dans le caractère hydrophile des composés, avec des temps de rétention par HPLC nettement différents grâce à l'ajout des bras espaceurs.

Nous avons également démontré que le transfert d'énergie au sein d'un PMB est aussi bien assuré aux petites (quatre acides aminés) qu'aux grandes distances (neuf acides aminés et un bras espaceur de neuf atomes). Dans sa structure intègre, le PMB a une diminution du rendement quantique de production d'oxygène singulet par rapport à la chlorine seule de 77% à 100%. Néanmoins, nous avons observé que la qualité du transfert d'énergie est dépendante de la distance entre le PS et le *quencher*, caractéristique des transferts d'énergie de type FRET, les PMBs produisant le moins d'oxygène singulet étant ceux qui comportent le lien le plus court. Des analyses plus poussées concernant le traitement des déclin de fluorescence des PMB restent encore à faire. En effet, nous avons observé des déclin complexes pour les molécules les plus longues ; ces déclin semblent être composés d'une partie courte « appartenant » au PMB et d'une autre partie correspondant à l'expression de la chlorine seule. Un traitement des données permettant de s'affranchir complètement de l'expression de la chlorine dans le déclin obtenu permettrait une quantification supplémentaire et plus précise de la qualité du transfert d'énergie.

Cette étude a donc permis de prouver la faisabilité de l'association entre la TPC et le BBQ650 comme couple donneur/accepteur pour des applications en thérapie photodynamique, la chlorine étant un PS caractérisé par un Φ_{Δ} élevé et le BBQ650 un *quencher* efficace, inhibant totalement la production d'oxygène singulet à des distances relativement courtes. Néanmoins, la stratégie de ciblage adoptée, visant à utiliser les

gélatinases pour dégrader le lien peptidique unissant les deux fluorophores, n'a pas abouti ; ceci est certainement dû à la présence du PS utilisé. Pour des études futures, il est à envisager d'étudier le comportement biologique d'un PMB utilisant d'autres PSs, comme la chlorine e6 ou le pyrophéophorbide, PSs utilisés par de nombreux groupes impliqués dans la PDT. Ceci permettrait de plus de s'affranchir du facteur limitant dans cette stratégie de synthèse : la quantité de PS. La chlorine monocarboxylique est synthétisée avec des rendements variables et relativement faibles, ce qui est un frein à l'élaboration de nombreux PMB en quantité suffisante pour les analyses spectroscopiques et biologiques. Une modulation dans la nature du lien peptidique est aussi à envisager afin de pouvoir jouer sur les caractéristiques de vitesse de clivage enzymatique, hydrophilie et réactivité de l'amine de la chaîne latérale de la lysine envers le *quencher*. En effet, cette dernière étape est également cruciale : c'est elle qui détermine le rendement final de la molécule. L'alternative envisagée dans cette thèse, à savoir de permettre un couplage enzymatique entre le *quencher* et le résidu lysine ajouté au peptide, permettrait une stratégie originale et potentiellement très efficace et sélective. Un couplage préalable entre le *quencher* et la lysine permettrait, après greffage sur des billes de résine, une synthèse entière sur support solide.

La recherche vers de nouveaux *quenchers* est également une tâche importante ; des composés faciles d'accès et efficaces représentent un intérêt considérable pour les PMB ou pour toute autre application visant à inhiber les propriétés photophysiques des PS. La nature présente un énorme réservoir de molécules à activités antioxydantes ou acceptrices d'énergie. Cette étude a permis un premier pas dans ce vaste domaine, mais des recherches plus poussées pourraient conduire à l'élaboration de paires PS/*quenchers* plus efficaces en terme de transfert d'énergie et ainsi plus adaptées au développement de nouveaux PMB.

Annexes : Matériels, méthodes, publication

Matériel

Produits chimiques

Les solvants et les réactifs ont été achetés chez différents fournisseurs (Novabiochem, Accros, Merck, Invitrogen, SpectraPor, Carlo Erba, Sigma Aldrich).

Les solvants de qualité HPLC viennent de chez Sigma Aldrich et les solvants de qualité spectroscopique proviennent de chez Carlo Erba.

Le BBQ650 a été acheté chez Berry & Associates.

Pour la chlorine, tous les réactifs et les solvants sont préalablement distillés : pyrrole, benzaldéhyde, pyridine, DCM.

Synthèse peptidique sur support solide

Les synthèses de peptide sur support solide ont été effectuées au LCPM sur un synthétiseur automatique ResPepXL (Intavis AG) en stratégie Fmoc.

Propriétés photophysiques

Spectroscopie statique

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre UV-visible Perkin-Elmer (Lambda 2). Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3 (Jobin-Yvon), équipé d'un compartiment thermostaté à 25°C et d'une lampe Xénon 450 W. Tous les spectres ont été réalisés en utilisant des cuves en quartz à quatre faces. Les rendements quantiques de fluorescence (Φ_F) ont été déterminés en utilisant la tétraphénylporphyrine (TPP) comme référence ($\Phi_F = 0,11$ dans le toluène).

Pour la détermination directe du rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_Δ) : l'excitation est produite par une lampe à arc de xénon basse pression (450 W) et la détection à 1270 nm a été effectuée à l'aide d'un monochromateur double réseau PTI S/N 1565 et d'un détecteur IR InGaAs, refroidi à l'azote liquide. Le Rose de Bengal a été choisi comme référence en raison de son rendement quantique de production d'oxygène singulet important dans l'éthanol (0,68).

La valeur de l'absorbance des échantillons à la longueur d'onde d'excitation est fixée autour de 0,2 et les rendements quantiques sont calculés grâce à l'équation suivante :

$$\Phi = \Phi_{ref} \times \frac{A_{ref}}{A} \times \frac{I}{I_{ref}} \times \left(\frac{n}{n_{ref}} \right)^2$$

où « Φ » est le rendement quantique, « A » l'absorbance, « I » l'intensité de fluorescence ou de luminescence de l'oxygène singulet et « n » l'indice de réfraction du solvant utilisé. « ref » renvoie à la référence utilisée.

Spectroscopie dynamique

Les expériences réalisées en temps résolu ont été effectuées en utilisant comme système d'excitation une diode laser pulsée LDH-P-C-405 (PicoQuant GmbH) couplée à un

driver PDL 800-D (PicoQuant GmbH) émettant à 408 nm (FWHM < 70 ps, 1 MHz) et un système de détection composée d'une photodiode à avalanche SPCM-AQR-15 (EGaG) couplée à un filtre interférentiel à 650 nm (± 10 nm). Le système d'acquisition est un module PicoHarp 300 avec un *router* 4 canaux PHR-800. Les déclins de fluorescence sont enregistrés en utilisant la méthode de comptage de photon unique. Les données sont collectées jusqu'à 1000 coups dans le canal maximum, puis elles sont analysées en utilisant le logiciel de comptage de photon unique corrélé dans le temps (TCSPC, pour l'anglais *Time Correlated Single Photon Counting*) FluoFit, basé sur une reconvolution itérative utilisant l'algorithme de Levensberg-Marquandt, permettant d'obtenir des profils multi-exponentiels (souvent un ou deux dans notre cas).

Les expériences sont réalisées dans l'éthanol avec des cuves en quartz 4 faces pour les produits purs et dans la DMF avec des cuves triangulaires pour les expériences de FRET.

Les calculs théoriques de rayon de Förster ont été réalisés en utilisant l'équation :

$$R_0 = 0,0021(\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J(\lambda))^{1/6}$$

où « R_0 » est le rayon de Förster, « κ^2 » est le facteur d'orientation pris à 2/3, « n » est l'indice de réfraction de l'éthanol, pris à 1,3594 et « Φ_D » est le rendement quantique de fluorescence du donneur. L'intégrale de recouvrement « J » est calculée selon l'équation :

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 . d\lambda$$

où « $F_D(\lambda)$ » est l'émission de fluorescence du donneur, « $\epsilon_A(\lambda)$ » est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur et « λ » est la longueur d'onde.

L'instrumentation de l'absorption transitoire nanoseconde est basée sur un laser Nd:Yag solide (Surelite II-10, Continuum) fonctionnant à 10 Hz. Après amplification, la fréquence en sortie est doublée et triplée. Ce laser peut fournir des pulsations nanosecondes à 355 nm avec une énergie d'environ 160 mJ qui peut être utilisée pour pomper un oscillateur paramétrique optique (SL OPO, Continuum). Les pulsations nanoseconde sont alors délivrées à une longueur modulable de 410 nm à 2200 nm et une énergie réduite d'environ 6-7 mJ pour exciter l'échantillon.

Le système d'analyse d'absorption transitoire (LKS 60, AppliedPhotophysics) utilise une lampe à arc de xénon 150 W, un monochromateur Czerny-Turner et un photomultiplicateur 5 étages (1P28). La réponse de l'instrument est d'environ 20 ns utilisant un enregistreur (*digitizer*) transitoire (Infinuum, Agilent). La longueur d'onde d'observation est indiquée dans chaque cas. Les expériences sont réalisées dans l'éthanol sous bullement d'air, d'argon ou de dioxygène. La valeur de l'absorption des échantillons est ajusté entre 0,3 et 0,5 afin de s'affranchir des effets d'*auto-quenching*.

L'inhibition de la fluorescence et de l'état triplet des molécules est calculée en utilisant l'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

où « τ_0 » et « τ » sont les temps de vie des états excités respectivement en absence et en présence d'inhibiteur, « K » est la constante de *quenching* de Stern-Volmer, « k_q » est la constante de quenching bimoléculaire et « $[Q]$ » est la concentration en inhibiteur. Dans le cas des expériences en mesure de fluorescence statique, « F_0 » et « F » sont les intensités de fluorescence respectivement en absence et en présence d'inhibiteur.

Analyses

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été effectués à l'aide d'un Bruker 300 MHz par Olivier Fabre du LCPM, au service commun de RMN.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques CCM qui ont été employées sont à gel de silice 60 F254 (Merck Chimie S.A.S.).

Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

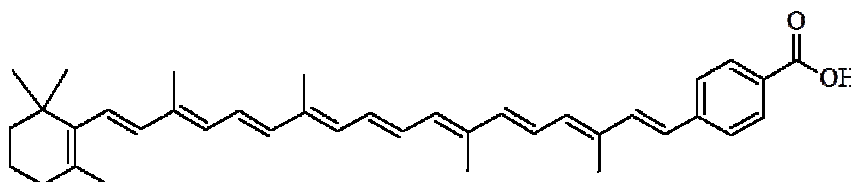
Les séparations par HPLC ont été effectuées sur une HPLC préparative Varian ProStar PrepStar 218 en phase inverse, colonne C₁₈, 5 µm, 250 x 21,2 mm, (Varian Pursuit). La détection est assurée à la fois par un détecteur de fluorescence ProStar 363 et une barrette de diode ProStar 335.

Analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses LC-MS ont été faites au LCPM par Mathilde Achard à l'aide d'un système Shimadzu composé d'un module de chromatographie liquide haute-performance LC-20AB, un module 241 de détection par barrette de diode SPD-M20A et d'un spectromètre de masse LCMS 2010-EV. La source d'ionisation employée est une source ESI (*Electron Spray Ionization*).

triphénylphosphonium (2,9 mmol) et 0,17 de NaOMe (3,1 mmol). La suspension est chauffée à 80°C sous N₂. Après 16 h, une quantité supplémentaire de bromure de 4-carbométhoxybenzyl-triphénylphosphonium (1,18 g, 2,4 mmol) et de NaOMe (0,13 g, 2,4 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est de nouveau agité à 80°C pendant 16 h. Le mélange réactionnel est jeté dans 800 mL de diéthyléther. La phase organique est lavée 6 fois avec 150 mL d'eau pour enlever le DMSO, puis séchée sur MgSO₄, concentrée sous vide pour fournir le produit pur sous forme d'une poudre orangée-rouge après recristallisation dans un mélange DCM/méthanol. Le produit est obtenu avec un rendement de 85%. ¹H_RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) 1,03 (s, 6 H, CH₃), 1,10-1,80 (m, 6 H, CH₂), 1,72 (s, 3 H, CH₃), 1,98 (s, 9 H, CH₃), 2,06 (s, 3 H, CH₃), 6,10-7,00 (m, 14 H, H_{vinyl}), 7,05 et 8,05 (d, 4 H, H_{aryl}).

Synthèse du 7'-Apo-7'-(4-carboxy)-β-carotène



Dans un réacteur de Schlenk inerté sous N₂, à l'abri de la lumière, 110 mg de l'ester précédemment synthétisé (0,2 mmol) est dissous dans 16 mL d'un mélange THF/MeOH 3:1. 2 mL d'une solution aqueuse de KOH 10% sont ajoutés et le mélange réactionnel est placé et agité pendant 18 h à température ambiante. 10 mL d'un mélange chloroforme/eau (pH 1-2) est ajouté. La phase aqueuse est extraite au chloroforme jusqu'à extraction complète du carotène. Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄ et concentrées sous vide pour fournir le produit pur sous forme d'une poudre huileuse orangée-rouge après recristallisation dans un mélange DCM/éther de pétrole.

En raison de son caractère huileux, il n'est possible ni de calculer un rendement de synthèse, ni d'effectuer une RMN.

Synthèse de couplage enzymatique :

Dans un microréacteur muni d'un capuchon et isolé de la lumière, de la Boc-Lys-OH, du 7'-Apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)- β -carotène et l'enzyme immobilisée sur bille de résine sont introduits et dissous dans un solvant (acétone et/ou acétonitrile). Les quantités de chaque réactif sont indiquées dans le tableau au chapitre III.

Le mélange est agité à 50°C à l'aide d'un barreau magnétique. Des échantillons sont prélevés chaque jour pendant une semaine et analysés à la fois par CCM avec comme solvant d'éluion : butanol/acide acétique/eau [60:20:20] et par MS électrospray. Après 4 jours, les échantillons sont étudiés par CCM et révélés à la ninhydrine.

Aucun produit de réaction n'est détecté par ces méthodes.

Propriétés biologiques

Avant chaque étude de clivage enzymatique, la pro-enzyme MMP-2 a été activée avec du 4-aminophénylmercuric acétate (AMPA) pendant 3h à 37°C, et l'activité enzymatique des MMP-2 et 9 a été confirmée au préalable par leur capacité à cliver le substrat fluorogénique (7-Méthoxycoumarin-4-yl)acétyl-PLGL-N-3-(2,4-Dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionyl-AR-NH₂ [Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂] selon les recommandations du fournisseur (R&D Systems). Le tampon utilisé pour ces tests de clivage contient 50 mM de Tris, 10 mM de CaCl₂, 150 mM de NaCl, 0,05% de Brij 35, pH 5,5 et a été filtré à travers une membrane de 0,2 μ m de pores. Pour les études d'incubation, les composés **8a**, **8b**, **9b**, **10b** et **11b** (se référer à la publication pour la notation), ainsi que le peptide H-GPLGIAGQK-OH ont d'abord été dissous dans le DMSO, puis dilués dans le tampon.

Etudes de l'incubation des échantillons 8b, 9b, 10b, 11b et H-GPLGIAGQK-OH

Pour chaque composé, 10 ou 50 μ M de l'échantillon a été incubé avec ou sans 1,5 nM de MMP-2 activée (v:v) pendant une ou deux heures à 37°C. De la même manière, 10 ou 50 μ M des échantillons **9b**, **10b**, **11b** ou H-GPLGIAGQK-OH a été incubé avec ou sans 1,2 nM de MMP-2 activée (v:v) pendant une ou deux heures à 37°C. De plus, 10, 50 ou 100 μ M de l'échantillon **8b** a été incubé avec ou sans une concentration élevée de MMP-2 activée (10

nM) pour 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 4 h ou 8 h à 37°C. 100 µM de l'échantillon **10b** a également été incubé avec des concentrations croissantes de MMP-9 activée (1,5, 3, 6, 12, 20 ou 40 nM) pour une ou deux heures à 37°C. Après chaque période d'incubation, la fluorescence de la solution contenant les composés **8b**, **9b**, **10b** ou **11b** a été vérifiée par spectroscopie de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 415 nm et d'émission entre 415 nm et 800 nm. La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse haute résolution (LC-HRMS) a été effectuée avec un système Bruker microOTO (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Allemagne) pour l'analyse du peptide H-GPLGIAGQK-OH en solution et les produits de clivage respectifs.

Etudes de l'incubation de 8a avec la MMP-2 activée

50 ou 100 µM du composé **8a** (100 µL) a été incubé en présence ou en absence de 7 nM de MMP-2 activée (v:v) pendant 1 h, 1,5 h, 2 h, 5h ou 16 h à 37°C. A chaque temps d'incubation, un échantillon de 50 µL a été analysé par détection de fluorescence en utilisant une HPLC en phase inverse par élution isocratique avec méthanol/eau (95:5) à 1 mL/min.

Publication

Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy

Marc Verhille^{1,2}, Pierre Couleaud¹, Régis Vanderesse^{2,5}, Daniel Brault^{3,5}, Muriel Barberi-Heyob^{4,5}, Céline Frochot^{*1,5}

¹Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Nancy-Université, CNRS, 1 rue Grandville BP 20451, 54001, Nancy, France

²Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Nancy-Université, CNRS, 1 rue Grandville BP 20451, 54001 Nancy, France

³Laboratoire Acides Nucléiques & Biophotonique (ANBIOL) CNRS FRE 3207, Génopole Campus 1, Bât. Genavenir 8, 5, rue Henri Desbruères, 91030 EVRY cedex, France

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-Université, CNRS, Centre

Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁵GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

Requests for reprints:

Celine Frochot

LRGP, Nancy-University

1, rue Grandville

BP 20451, 54001 Nancy, France

Tel : +33 3 83 17 51 15

E-mail: Celine.frochot@ensic.inpl-nancy.fr

Keywords (5 keywords): Reactive Oxygen species, Photodynamic therapy, molecular beacon, targeting

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment modality involving the combination of light, a photosensitizer (PS) and molecular oxygen, which results in the production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS). Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is one of the most important of these ROS. Because the lifetime and diffusion of $^1\text{O}_2$ is very limited, a controllable singlet oxygen generation with high selectivity and localization would lead to more efficient and reliable PDT. The lack of selective accumulation of the PS within tumour tissue is a major problem in PDT. Targeted PDT would offer the advantage to enhance photodynamic efficiency by directly targeting diseased cells or tissues. Many attempts have been made to either selectively deliver light to diseased tissues or increase the uptake of the photoactive compounds by the target cells. The review will survey the literature regarding the multi-level control of $^1\text{O}_2$ production for PDT applications. The mechanisms of ROS formation are described. The different strategies leading to targeted formation of $^1\text{O}_2$ are developed. Some activatable PDT agents have been based on energy transfer between PS by control of the

aggregation/disaggregation. The concept of molecular beacon based on quenching–dequenching upon protease cleavage is capable of precise control of $^1\text{O}_2$ by responding to specific cancer-associated biomarkers.

1. INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is an innovative modality for the treatment of localized tumours as an alternative or adjuvant to classical therapies, such as radiotherapy, surgery and chemotherapy; several non-oncological applications are also emerging for the treatment of a variety of dermatological, ophthalmic, cardiovascular and infective diseases [1]. PDT relies on the selective uptake of a photosensitizing molecule in a tumour relative to the surrounding normal parenchyma followed by exposure to the appropriate wavelength of light to activate the PS [2]. When activated by light irradiation, the PS interacts with molecular oxygen to produce various reactive oxygen species (ROS) that destroy the cells. Among these ROS, a cytotoxic, short-lived species known as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) represents the primary photochemical active factor in PDT [1]. The lifetime of $^1\text{O}_2$ in the cytoplasm is very low (1.10^{-7} s) and limits its diffusion range in cellular media (around 20 nm) [3]. As a consequence, the intracellular localization of the PS determines the site of damage. Moreover, it has been demonstrated that $^1\text{O}_2$ luminescence is related to treatment response *in vitro* and *in vivo* [4-6]. These results suggest that by controlling the photosensitized production of oxygen, the selectivity of the damage will be improved and thus, the eradication of the tumour more accurate.

It is important to make a real distinction between selective accumulation and selective retention. Indeed, the tumour site localizing ability of the PS with the faster pharmacokinetics is probably due to selective accumulation in the tumour tissue, while the localization of PS with slower acting pharmacokinetics is more likely due to selective retention. In the selective accumulation model it is thought that the increased vascular permeability to macromolecules typical of tumour neovasculature is chiefly responsible for the preferential extravasation of the PS. The selective retention of PS in tumour has been the subject of much discussion and speculation. One is that tumours have poorly developed lymphatic drainage, and that macromolecules, which extravasate from the hyperpermeable tumour neovasculature, are retained in the extravascular space. Another involved the macrophages, which infiltrate solid

tumours to varying extents. Another theory suggested that the low pH commonly found in tumours has the effect of trapping some of the anionic PS, which are ionized at normal physiological pH [7]. When the tumour grows beyond the limits of simple oxygen diffusion, an intratumoural hypoxic state is generated. Thus, glucose is partially metabolised by an anaerobic pathway with formation of lactic acid which is rejected by the cells. The interstitial liquid in tumours is therefore more acidic than in normal tissues, with a difference that can attain 0.6 pH [8]. *Via* acid-base balance, the lipophilic characteristic of PS with carboxylic groups such as Photofrin® is increased, improving their incorporation in tumour cells by diffusion through the cytoplasmic membrane [9]. However, this passive targeting allows only a limited selectivity for PS accumulation. Active targeting of markers over-expressed by tumour cells themselves [10] represents an obvious improvement. Several new strategies have emerged to improve the performances of PDT agents including conjugation with monoclonal antibodies [11, 12], epidermal growth factor [13], peptides [14], carbohydrates [15, 16], folic acid [17, 18] or hydrophilic polymers for selective delivery of the agents into tumour tissues. Targeting strategies improving PS selectivity for tumour vasculature is also of great interest. A first approach has been used by Kurohane *et al.* [19] and suppressed tumour growth more efficiently than conventional PDT. The second method involves the use of “vascular-targeting” agents that aim at destroying the neovasculature already formed, and which have to be distinguished from anti-angiogenic agents acting on the angiogenic process itself. One targeting strategy links a type II receptor to vascular endothelial growth factor and its coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) [20-23]. It is known that endothelial cells that make up the tumoural neo-vascularisation, as well as certain cancerous cells, overexpress integrin $\alpha_v\beta_3$. This transmembranar glycoprotein can link itself to proteins of the extracellular matrix *via* the tripeptide H-Arg-Gly-Asp-OH. Synthesizing PS with these linear or cyclic motifs has also been considered [24, 25].

The second approach to increase the selectivity is the control of light delivery into the tissue. It proves to be especially challenging in certain clinical scenarios (e.g. cancer in pelvic, abdominal or thoracic cavities) and can lead to considerable secondary damage of healthy tissue structures within the irradiated area. The judicious use of advanced optical fibers is of great interest and researches are under way on new ones as well as applicators for cavities such as uterus and the oesophagus. For example, new diffusers with thin outer diameter and long length [26] or new flexible luminous textile using plastic optical fibers as a light

distributor for complex surface topologies [27] have been recently proposed. Another relatively recent development is two-photon PDT [28]. The PS in its ground state, after exposure to a short pulse of near-infrared light can absorb simultaneously two photons. The advantages are that in the part of the spectrum, there are less absorption of the tissue, and scattering, leading to a better penetration of the light. Moreover the quadratic dependence of the two-photon absorption probability leads to a spatial confinement of the PDT effect [29]. Two-photon activation of a number of photodynamic agents has been reported, including m-THPC [30, 31], 5-ALA [32], Photofrin® and visudyne [33]. Porphyrins are centrosymmetrical molecules and have low two-photon absorption cross sections. This is especially true for PpIX (10 GM) and benzoporphyrin (50 GM) [34]. For that reason, some teams develop new PS with higher two-photon absorption cross sections (see for example [35-40]). Experiments *in vivo* have been performed [33, 41, 42]. A recent review described all the recent advances in two-photon PDT [43].

Passive and active targeting strategies have been shown to enhance the specific delivery of PS to the site of disease. Nevertheless, limited tumour selectivity of PDT agents has remained major obstacles. None of these strategies has led to the development of a clinically relevant compound and controlling the PS ability to produce $^1\text{O}_2$ or others ROS is still a challenge. In the current review, we describe the different strategies that could lead to a precise control of $^1\text{O}_2$ formation. In a first part, the mechanisms of ROS formation, energy transfer and quenching will be resumed. In a second part, we will describe the different strategies that have been used to control $^1\text{O}_2$ formation: Activatable PDT agents have been developed that respond to pH and to nanoparticle delivery as well as based on energy transfer between PS by the control of the aggregation/disaggregation through the use of specific cancer-associated biomarkers.

1. ROS, ENERGY TRANSFER AND QUENCHING

1.1 Photosensitization mechanisms

1.1.1 Light-induced generation of active species

An overview of the photophysical and photochemical events arising upon absorption of

light by a photosensitizer (PS) is depicted in Fig. (1).

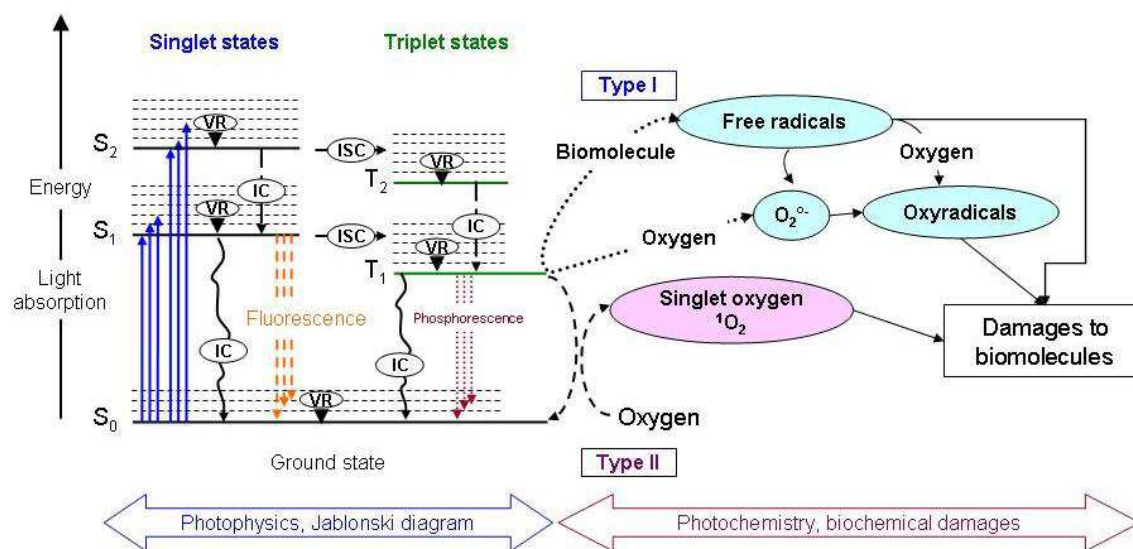


Fig. (1). Jablonski diagram for ROS generation (VR: Vibrational relaxation; IC: internal conversion; ISC: intersystem crossing)

The left part of the figure known as the Jablonski diagram is not specific to PS. With few exceptions, the lower energy state - the ground state - of organic molecules is a singlet state (S₀) characterized by a multiplicity of 1, i.e. with balance of all the electronic spins. The electrons are paired in the orbitals of lowest energy. Upon absorption of a photon of appropriate wavelength, the molecule is excited, without change of multiplicity, to some vibrational level of one of the higher energy states (S₁, S₂, ...). Vibrational relaxation (VR) and internal conversion (IC) within 10⁻¹³ to 10⁻¹¹ s lead the molecule to the first excited singlet state (S₁). This state possesses a longer lifetime, of the order of 10⁻⁸ s for the molecules considered in this review. It can deactivate to the ground state by IC or through the emission of fluorescence. All these processes do not involve change in multiplicity and are “spin allowed”. Another type of excited states is constituted by triplet states. They are characterized by an overall spin of 1 (multiplicity of 3), two electrons in different orbitals possessing the same spin. Transitions from the ground state S₀ to triplet states are “spin forbidden”. The same should be true for excited singlet states, but excited singlet and triplet states may possess isoenergetic levels. Then, triplet states can be populated from the corresponding singlet states with a certain probability owing to spin-orbit coupling. For PS, this intersystem crossing (ISC) process is prominent and the quantum yield for the first excited triplet state (T₁), which

ultimately results from ISC, IC and VR, usually ranges between 0.7 and 0.9 in solution. The first excited triplet state lifetime is much longer than that of S₁. In deoxygenated solutions, it can reach 10⁻⁴ – 10⁻³ s when not quenched.

Due to its relatively long lifetime, the T₁ state can be at the origin of various chemical reactions. In type I processes, the PS undergoes electron or hydrogen atom transfer to (or abstraction from) biomolecules (or eventually exogenous molecules) in its vicinity leading to a radical pair. Depending on the direction of the exchange, the PS is either reduced or oxidized and the biomolecule oxidized or reduced. Oxygen may intervene in a second step by combining with radicals to form reactive oxyradicals. It can be also reduced by the PS radical anion to the superoxide anion O₂^{•-}. Alternatively, in type II reactions, the PS triplet transfers its energy to molecular oxygen, to form excited ¹O₂. This process is spin-allowed because the molecular oxygen ground state is a triplet. Direct electron transfer from the T₁ state to oxygen leading to the superoxide anion and the PS radical cation may also occur. Based on the fact that oxygen is primarily involved, this reaction has been ranked among type II processes [44] although it appears preferable to consider it as a type I process and keep the type II definition for energy transfer [45]. It is worth noting that energy transfer processes are characterized by an unique property: the PS returns to its ground state and is able to collect light again. Oxygen being involved in most of these processes, the common term “reactive oxygen species (ROS)” is generally retained for all the species formed. It must be pointed out that in type II mechanism, oxygen intervenes in the initial step while its action is delayed in type I mechanism. As a consequence these processes have different requirements on oxygen concentration. When oxygen concentration is lowered, photosensitization may switch from type II to type I mechanisms [46].

1.1.2 Energy consideration

Energy requirements for these two types of mechanisms should be also considered. The lower excited state ¹Δ_g of ¹O₂ is 94 kJ/mole above that of the ground state, which corresponds to the characteristic weak emission of this species at 1270 nm. As a minimum, the energy of the PS triplet state (E_T) should match this value in order to allow energy transfer [47]. As shown in Fig. (1), energy is lost upon ISC and VR, which gives a lower limit to the energy of the S₁ state, i.e. the higher limit for the wavelength of the last absorption band in the red. This limit

has been estimated to be around 800-850 nm for the classes of PS used in PDT. In the lowest energy excited state, one electron of the higher occupied molecular orbital (HOMO) is promoted to the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO). A lower energy is required to drive this electron to the zero energy level, which makes the excited PS more reducing. In the reverse way, the vacancy in the HOMO created by the excitation makes it possible to gain more energy when an electron is added to this orbital making the PS more oxidizing. The redox potentials (E_0) of the excited state can be calculated from the corresponding values for the ground state (P) and the energy of the first excited state. Considering the triplet state, we have:

$E_0 (*T_1/P^{\circ-}) = E_0 (P/P^{\circ-}) + E_T$, for the PS acting as an oxidizing agent

$E_0 (*T_1/P^{\circ+}) = E_0 (P/P^{\circ+}) - E_T$, for the PS acting as a reducing agent. E_0 and E_T are expressed in volt and eV/mol. The oxidation is more pertinent to biological damages [48].

The expression of $E_0 (*T_1/P^{\circ-})$ as the sum of $E_0 (P/P^{\circ-})$ and E_T suggests that molecules with absorption less shifted to the red would be better type I PS. Hence, the higher wavelength limit for type II and type I processes is likely to be significantly different.

1.1.3 Biological targets

Various biological components can be the target of 1O_2 . Attack of unsaturated fatty acids is a major cause of biological membrane degradation [49]. Various amino acids including histidine, tryptophan, methionine, cysteine are oxidized by 1O_2 leading to protein damages as reviewed elsewhere [50]. Among nucleic acid bases, guanine is the most reactive [51]. For oxidative type I mechanisms, the potential $E_0 (*T_1/P^{\circ-})$ should be higher than the one-electron oxidation potential of the target. However, the reaction could be driven to some extent by further reactions of the oxidized target, which gives some flexibility to this rule. As expected, the reactivity of amino acids and nucleic bases is related to redox potential differences, which constitute the driving force of the reaction. However, some steric or/and electrostatic effects could come into play in agreement with the fact that electron exchange involves close contact between the PS and its target [52].

1.1.4 ROS lifetime and photodamage quantum yields

As pointed out in the introduction, the $^1\text{O}_2$ lifetime and diffusion through the space is very limited in a biological environment. In addition to chemical reaction with various substrates, $^1\text{O}_2$ can be physically deactivated through vibrational coupling involving adjacent molecules [53]. Hence, the effective photodamage quantum yields [54] (proportion of photodamages per absorbed photon) are low even in the absence of specific quencher as discussed below. Energy dissipation also occurs in type I mechanism through electron back transfer. A quantum yield as low as 10^{-3} was determined for damages to guanines in experiments with a PS conjugated to an oligonucleotide targeted to a complementary nucleic strand [55]. Hopefully, these low quantum yields are balanced by the ability of the PS to undergo many excitation cycles. The superoxide anion produced as mentioned above can initiate the formation of several oxidative species such as H_2O_2 and the hydroxyl radical $\text{OH}\cdot$ via the Haber-Weiss reaction. The $\text{OH}\cdot$ radical is the most reactive ROS. The overall mechanism of photosensitization is discussed in a comprehensive review by Ochsner [56].

1.1.5 Modulation of the generation of ROS

One can figure out from Fig. (1) that the generation of ROS can be modulated in several ways. As there is little possibility to modulate the production of ROS to upper values, the objective is more their reduction except at the tumour locus. First, the PS excited states can be physically quenched. This process can be due to PS aggregation or through conjugation of the PS with an energy acceptor molecule. This choice is valid for type I or II mechanisms. The specific deactivation of ROS is more difficult to achieve. Indeed, the process should not involve chemical degradation of the quencher in order to take into account the possibility for the PS to undergo many excitation cycles. An elegant solution to this problem is found by coupling PS with carotenoids, which not only quench the PS excited states but also physically quench $^1\text{O}_2$ with a very high efficiency [57]. The various strategies developed to quench ROS and to allow their production in the specific environment of tumours are detailed in the following.

1.2 Quenchers

Several quenchers are described in the literature; among them, carotenoids and black-hole quenchers are the most widely used in PDT. Carotenoids were the very first ones to be described according to their wide range of application in the nature; they play an important role in biological systems. Carotenoids can be found as pro-vitamin A, antioxidant in animals and as a pigment and photoprotective agent in the photosynthetic system of plants [58, 59]. Indeed, chlorophyll is among the most effective sensitizers for dye-sensitized photooxygenations of organic substrates. Photosynthetic organisms, however, are protected from the lethal effects of their own chlorophyll by carotenoids; mutants lacking certain carotenoids are readily killed by light and oxygen; carotenoids also protect organisms against the effects of exogenous PS such as methylene blue. The mechanism of this protective action has not been established, although it is known that carotenes quench triplet sensitizers efficiently [60]. These important biofunctions can be rationally adapted to PDT considering the ability of carotenoids to quench the triplet state of many porphyrin-based molecules (chlorophyll for instance), inhibiting the production of harmful $^1\text{O}_2$ and to directly scavenge $^1\text{O}_2$, protecting the photosynthetic apparatus [61, 62]. Its ability to absorb light around 500 nm and to transfer this excitation energy to the chlorophyll or quench the chlorophyll fluorescence (depending on the energy of the singlet states of chlorophyll and that particular carotenoid) [63] makes it remarkable for its protection function ; it also acts as antioxidants, quenching radical species that could potentially react with various biomolecules [58]. Both the number of conjugated double bonds in carotenoids [64], and the PS-carotenoid distance dictate the ability of carotenoid to quench the triplet state of the PS, scavenge $^1\text{O}_2$, and quench PS fluorescence [63] and can therefore be fine-tuned for different purposes. Carotenoids are therefore perfect candidates for a biocompatible and efficient quencher of PS $^1\text{O}_2$ production and this concept was already explored using a carotenoid analogue covalently bound to *meso*-tetraphenyl-substituted porphyrins [65]. Considering that PS singlet state quenching (also called fluorescence quenching) has an influence on singlet oxygen production due to the fact that triplet state results from Internal Conversion (see above) from singlet state of one molecule, one can assume that luminescence can be affected. Further studies have been done by Lovell *et al.* [66] showing that there is a relevant correlation between fluorescence and luminescence quenching. Thus some fluorescence quenchers have been used to inhibit singlet oxygen generation, particularly “Black Hole Quencher 3” (BHQ3) which showed the best

efficiency.

Other compounds have been studied for their photophysical properties, and can be either $^1\text{O}_2$ scavengers (*via* chemical quenching) such as natural antioxidants (tocopherols [67], thioredoxin [68]), synthetic antioxidants (e.g. highly conjugated stilbene quinones, azomethine dyes, amines like DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) and lidocaine [69], or physical quenchers (*via* physical quenching) such as metal complexes (out of which the Ni (II) chelates are the best quenchers, but not biocompatible [70]). Using the chemical quenching properties of scavengers, some ROS and/or $^1\text{O}_2$ chemical probes have been developed in order to monitor the production of those active species. Such probes react chemically with oxidative species which affects their photophysical properties that can be monitored. For example, disodium 9,10-anthracenedipropionic acid (ADPA) [71] and 9,10-anthracenediyl-bis-(methylene)dimalonic acid (ABDM) [72] are water-soluble anthracenes used as chemical probes to measure $^1\text{O}_2$ production by photosensitization. By monitoring changes in fluorescence spectra of those chemical probes, $^1\text{O}_2$ produced can be quantified. Another way to monitor $^1\text{O}_2$ production is the use of the mix N,N dimethyl-4-nitrosoaniline (RNO) and imidazole that behave as a specific chemical trap of $^1\text{O}_2$ [73]. 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) is also a chemical probe for oxidative species production but is not specific to $^1\text{O}_2$. Indeed, Ohyashiki *et al.* showed that O_2^{\ominus} also reacts with DPBF [74] but with $^1\text{O}_2$ produced chemically as well [75]. We can also cite a commercial chemical probe for $^1\text{O}_2$, Singlet Oxygen Sensor Green Reagent sold by Invitrogen.

2 REGULATION OF SINGLET OXYGEN GENERATION

2.1 Passive targeting of the singlet oxygen formation

The biological activity of prodrugs for passive targeting drug delivery depends on the anatomical characteristics of tumour tissues and on the physicochemical properties of the drug conjugate in biological systems. Some works have used the biological environment of tumours to passively target PDT agents, i.e. without using the tumour-specific protease activity.

2.1.1 Using the acidic pH of the tumour

The lower pH of the interstitial fluid of tumours is likely to play a role in the passive retention of some PS, as those bearing carboxylic chains. Indeed, the interstitial fluid of tumours cancer cells have an acidic pH (6.5 – 6.8) whereas the extracellular pH of healthy cells have is slightly alkaline [76-81]. Lower pH brings on the neutralisation of these chains favouring their interactions with lipid membranes. By using membrane models systems, it was demonstrated that a pH gradient mimicking that found between the extracellular space and the intracellular value for tumour cells strongly accelerates the transfer from the lipid hemi leaflet facing the acidic phase to the other hemi leaflet [82, 83]. Consistent data obtained with carboxylic PS on cultured cells [82, 84] and animals [85] have confirmed this effect. Activatable PDT agents have been developed that respond to pH. McDonnell *et al.* [76] described a series of supramolecular photonic therapeutic agent analogues with pH-responsive amine receptors that could produce $^1\text{O}_2$ in response to one exogenous stimulus (light) and one endogenous stimulus e.g. the microenvironment pH (Fig. (2)). In solution, all the compounds presented a significant enhanced $^1\text{O}_2$ generation in acidic conditions. Moreover, the $^1\text{O}_2$ generation can be switched off by removing the acid substrate. In MRC5-SV40 transformed fibroblast cell line, one of the compounds has an half maximal inhibitory concentration (EC50) value as low as 5.8 nM.

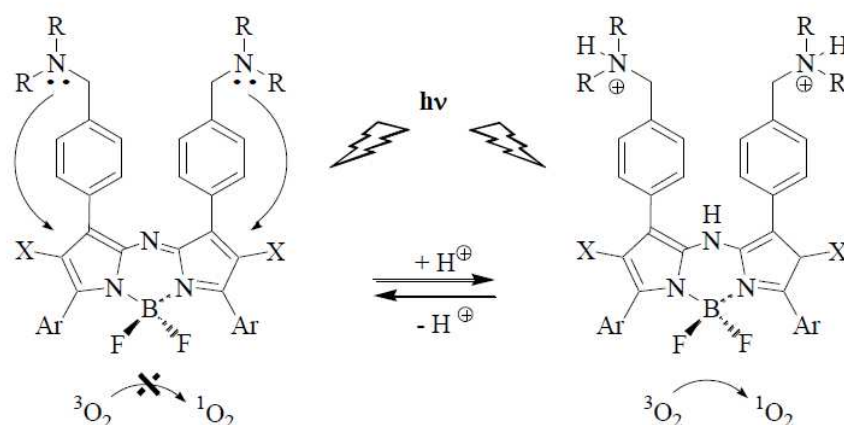


Fig. (2). Schematic diagram of pH-mediated PDT strategy.

2.1.2 Controlling of the aggregation/disaggregation of the PS

It has been shown that aggregation changes the photophysical properties of porphyrin, chlorin and phthalocyanine PS. Indeed, aggregation shortens the triplet-state lifetime and

decreases the singlet oxygen quantum yield by dissipating energy through internal conversion [86-90]. This property has been used by different teams to target singlet oxygen formation: aggregated PS are non toxic and become phototoxic when released in their monomeric form.

McCarthy *et al.* [91] showed that some aggregated PS loaded in biodegradable nanoparticles are stable and non-phototoxic upon systemic administration. Upon cellular internalization, the PS is released from the nanoparticle and becomes highly phototoxic. They hypothesized that nanoparticles could be designed in such a manner that the excited states of the PS would be quenched and thus be used as an activatable PDT nanoagent with improved therapeutic properties. For their study, they used two different PS, a chlorin, *meso*-tetraphenylporpholactol and a porphyrin, *meso*-tetraphenylporphyrin which are encapsulated in 50:50 poly(lactic-co-glycolic) and polylactic acids nanoparticles. The UV-vis absorption spectra (Soret band splitting in two) of the two different nanoparticles indicate the presence of aggregates within the particles. The intensity of the fluorescence emission from the PS within the nanoparticle is significantly lower than that in its free state, as is expected for aggregates. Only *meso*-tetraphenylporpholactol loaded nanoparticles, when dispersed in acetone or 0.5% lipid solution, showed an increasing fluorescence, due to the release of non-aggregated PS. They do not observed this for nanoparticles containing *meso*-tetraphenylporphyrin, due to the polarity difference of those two PS. Over the time course of the experiment (360 min), the fluorescence intensity increased 8-fold, corresponding to the release of 20% of the encapsulated *meso*-tetraphenylporpholactol. This specific lipid-induced release of *meso*- 16 - tetraphenylporpholactol was also observed when 9L glioblastoma, B16 melanoma, and BT breast carcinoma cells were incubated with nanoparticles containing *meso*-tetraphenylporpholactol. This fact was confirmed by fluorescence microscopy, showing clear intracellular accumulation of those nanoparticles, presumably in lysosomes [92]. The photodynamic efficacy of *meso*-tetraphenylporpholactol nanoparticles ([NPs] = 10 μ M) in cells irradiated after incubation for 16 h was compared to that of cells that were treated under the same conditions immediately prior to irradiation. The phototoxicity caused by the noninternalized nanoparticles is minimal (9% cell death), in contrast to the effect of internalized nanoparticles (95% cell death). As expected, no effect was observed when *meso*-tetraphenylporphyrin nanoparticles were incubated with cells for 16 h. This work shows that cellular mechanisms can control photodynamic effects. Nevertheless, the main drawback is that the degradation of the polymeric shell is not specific of cancer cells or other targeted

cells.

Other teams have developed smart and complex molecules that can be activated in the presence of enzymes that are specific to cancer cells, tumour medium or metastatic activity.

2.1.3 PS-PS quenching and proteases–active targeting

Proteases are responsible for enzymatic cleavage of peptide bonds [93], which is a basic requirement for completion of diverse biological processes. Examples of contributions made by proteases can be found in the processing of precursors related to the synthesis of collagen, immune functions, development and apoptosis. The proteolytic activity of proteases must be controlled to avoid inappropriate degradation of proteins. Imbalance in regulation of proteolytic activity was described in a wide range of diseases, including cancer, rheumatoid arthritis and osteoarthritis [94].

Proteases selectively hydrolyze a peptide bond in a polypeptide. Depending on the position of the peptide bond, proteases are referred to as exopeptidases or endopeptidases (Figure 3). Exopeptidases specifically cleave substrates at the amino-terminal or carboxyl-terminal termini of polypeptides, and therefore can be subdivided into aminopeptidases and carboxypeptidases. Endopeptidases (also called proteinases) break peptide bonds in the middle of the molecule. They can be subclassified based on their catalytic mechanism, which is related to the chemical group involved in the process of hydrolysis. There are approximately 560 human and 640 mouse proteases, which, on the basis of their catalytic mechanism, can be subdivided into five distinct classes: the aspartic-, cysteine-, threonine-, serine- and metallo- proteinases (Fig. (3)) [95]. Proteases have long been considered ideal therapeutic targets in many disease indications involving excessive proteolysis, including cancer. Indeed, increases in protease expression and activity have been reported in many human cancers [96-98].

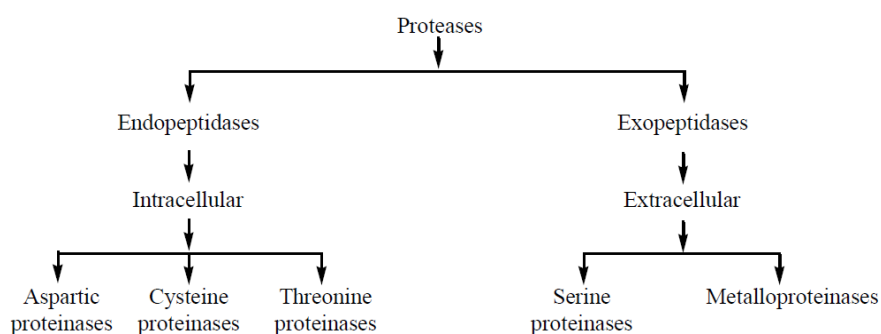


Fig. (3). Summary of different proteases.

Moreover, tumour-associated proteases are known to function at multiple steps of tumour progression, affecting tumour establishment, growth, neovascularization, intravasation, extravasation, and metastasis. Indeed, proteolytic degradation of the extracellular matrix is crucial for cancer development, invasion and metastasis, all of them associated with increased activities of several different protease families [96, 99]. Prior reports have shown that several proteases (*e.g.* cathepsins and matrix metalloproteinases, MMPs) are up-regulated in many cancer types [100-102] and potentially, these tumour-associated proteases could act as activators of the protease-mediated PDT agent.

Of particular interest in this context is the extracellular serine proteinase, urokinase plasminogen activator (uPA), which generates plasmin from the extracellular zymogen plasminogen [103]. Besides facilitating cancer cell migration and invasion through the extracellular matrix by plasmin activation, uPA also participates in directed tissue remodeling processes like angiogenesis, stimulation of fibroblast proliferation or extracellular matrix protein synthesis. Overexpression of uPA has been found in a number of epithelial cancers including breast [104, 105], colon [106], prostate [107], ovarian [108] or cervical carcinomas [109]. In this context, uPA as well as other proteases have raised interest not only as targets for small molecule inhibitors [110] but were also identified as candidates for controlled drug delivery *in vivo*, by exploiting their increased activity for the release of anticancer agents or cytotoxins from protease-sensitive prodrugs inhibitors [111].

Fibroblast activation protein (FAP), which is a cell surface glycoprotein belonging to the serine proteinase family, is a protease highly expressed on cancer-associated fibroblasts (over 90%) of human epithelial carcinomas but not on normal fibroblasts, normal tissues, and cancer cells. FAP exhibits both gelatinase and collagenase activities capable of degrading gelatin and unwound or denatured type I collagen respectively [112-114].

MMPs are tumour promoting enzyme playing an important role in angiogenesis [115-117] and thus are potential interesting target in PDT. MMPs are well known for their ability to cleave components of the extracellular matrix, but they also cleave other proteinases, latent growth factors and growth factor binding proteins, chemotactic molecules, cell surface receptors and cell-cell adhesion molecules. They are classified into at least five main groups according to their substrate specificity, primary structure and cellular localization

(collagenases, gelatinases, stromelysins, the matrilysins and membrane-type MMPs). MMPs are also regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). It is likely that distinct MMPs play a role at different stages of tumour development; a growing number of studies provide strong evidence that MMP-2 (gelatinase-A) and MMP-9 play important roles in the process of tumour growth and angiogenesis, making them interesting targets to trigger tumour environment. In addition, gelatinases are responsible for the final degradation of collagens after initial cleavage by collagenases.

Consequently, protease-sensitive macromolecular prodrugs have attracted interest for bio-responsive drug delivery to sites with up-regulated proteolytic activities. Among them, proteases are of a great interest because of their unique ability to cleave selectively amide bonds in peptides. Prodrugs activated by proteases are not recent but applied to PDT, proteases become attractive biological triggers in drug development to control $^1\text{O}_2$ production; many strategies emerged from protease targeting to convert pharmacological inert prodrug into active pharmacophore when activated *in vivo* [118]. Before being an interesting field in PDT, protease activity has been used for bio-imaging [119-121].

Based on the observation that aggregated PS exhibit reduced $^1\text{O}_2$ generation, Choi *et al.* [122] coupled multiple chlorin e6 (Ce6) PS onto a biodegradable poly-lysine grafted with monomethoxy-polyethylene glycol to induce aggregation and self-quenching (Fig. (4)) while still representing a biocompatible agent with favourable tumour accumulating properties [123]. This concept of Polymeric PS Prodrugs (PPP), defined as « first-generation » PPP was first developed by Tung *et al.* [124, 125] for the *in vivo* imaging of tumours.

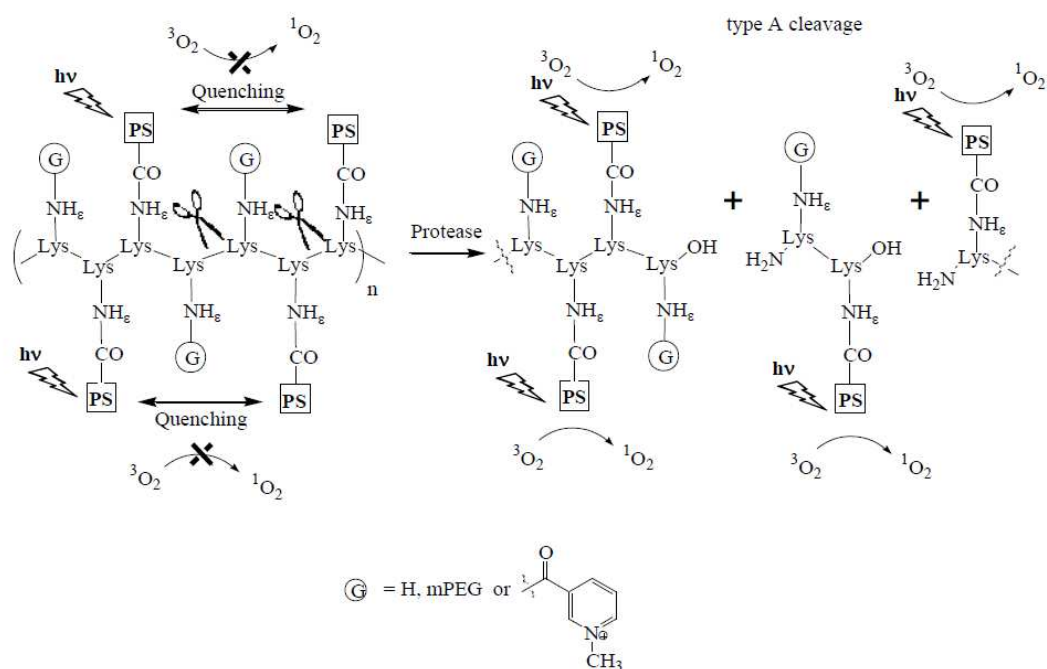


Fig. (4). Schematic representation of PPP architecture.

Fluorescence and $^1\text{O}_2$ generation are quenched due to energy transfer between Ce6 PS. Following proteolytic cleavage of the peptide backbone, released Ce6 regains its fluorescent properties and $^1\text{O}_2$ generation on light excitation. The poly-*L*-Lysine conjugate showed an 86% decrease in fluorescence compared with that of free Ce6. This homopolymer is a known substrate for cysteine protease [123]. Therefore, the conjugate was tested cathepsins B, L, and S, at pH 5.0. Among these three proteases, cathepsin B induced the highest fluorescence. The addition of cathepsin B inhibitor CA-074 [126] completely inhibited fluorescence recovery on cathepsin B addition.

A poly-*D*-lysine-based conjugate with similar substitution ratio was also prepared and tested under identical conditions. Similar fluorescence quenching effect (86% quenching) was observed with the *D*-backbone; however, no noticeable fluorescence activation occurred on cathepsin B addition. The above results thus confirmed that proteolytic degradation is indeed the primary mechanism of fluorescence activation.

$^1\text{O}_2$ generation of the *L* and *D* conjugates was subsequently assayed using similar cathepsin B incubation experiments. In the native state, $^1\text{O}_2$ generation of the *L*-conjugate was only 13% compared with that of free Ce6 at the same concentrations. In the absence of cathepsin B, the buffer containing the *L*-conjugates remained quenched. On cathepsin B treatment, $^1\text{O}_2$ generation increased up to 79%, a 6-fold increase. As with the fluorescence

experiment, inhibitory effects were observed with the cathepsin B inhibitor CA-074. As expected, addition of cathepsin B to the *D*-conjugate showed no enhancement in $^1\text{O}_2$ generation. These results support the hypothesis that not only fluorescence but also $^1\text{O}_2$ generation can be quenched and selectively recovered on specific protease treatments. The protease-mediated PDT strategy was examined *in vivo* using a xenographic tumour model. HT1080 cell line was selected for the animal study because of its high-expressing level of cathepsin B. Only the combination of protease-degradable *L*-conjugate and light illumination resulted in reduced tumour growth rates.

In 2007, Campo *et al.* studied the parameters dictating PPP quenching/activation and solubility using a simpler model system of « first-generation » PPP [127]. These first-generation PPP can be assembled by directly tethering the PS to a poly-*L*-Lysine *via* epsilon amide functions (see Fig. (4)), thus providing a simple model to study the basic physicochemical parameters and quenching/activation phenomena of such macromolecular entities. The coupling of varying amounts of pheophorbide a-NHS ester to Poly-*L*-Lysine provided conjugates with an estimated average of 1, 6, 12, 18, 24 and 30 PS units per polymer chain. The activation of first generation PPP involves backbone degradation (type A cleavage, Fig. (4)).

Fluorescence quenching becomes highly efficient for PPP loaded with 18 PS or more quenching efficiency $\geq 99.2\%$). Unfortunately, due to limited water solubility, conjugates with higher than 30 PS per chain could not be tested. Enzymatic trypsin digestion of the PLL backbone was used to activate the PPP in aqueous media (phosphate buffered saline) and the fluorescence intensity of the PPP and trypsin mixture monitored over time. Thus, the activation of PPP carrying 12 PS per chain gave the highest activation increase, corresponding to a value of 19. Although higher PS loading leads to increasingly better quenching of the PPP in its native state, enzymatic digestion becomes progressively more difficult as the key lysine side chains of PLL required for enzyme recognition and cleavage have been extensively modified. The photodynamic activity of the conjugates decreased with increasing number of PS on the polymer chain. They tried to increase the water solubility by tethering PEG or highly hydrophilic and charged moieties such 1-methyl nicotinic acid or 2-(*N,N,N*-trimethylammonium) ethanoic acid. Indeed, modification of the polymer conjugate by tethering either one of these two small moieties through the respective carboxylic functions did not reduce but increased quenching efficiency of the corresponding PPP; although,

surprisingly, only the moiety derived from 1-methylnicotinic acid increased water solubility of the conjugate. The PPP carrying 18 PS units per chain and 101 units of 1-methylnicotinic acid salt (100% loaded) was completely resistant to enzymatic degradation by trypsin. Thus, this small moiety can be used to modify the polymer for two purposes, namely to (i) increase water solubility of the conjugate and (ii) protect the backbone from unspecific enzymatic degradation.

These results were used by the same group and in 2007. Gabriel *et al.* introduced the concept of second generation PPP [128]. In these prodrugs, multiple PS units are tethered to a polymeric backbone *via* protease cleavable peptide linkers. Photoactivity of the prodrug is efficiently impaired due to intramolecular interactions between the neighbouring PS units. These initially non-photoactive compounds become fluorescent and phototoxic after specific enzymatic cleavage of the peptide linkers and subsequent release of the PS moieties. The main difference between these two architectures is that activation of first generation PPP involves backbone degradation (type A cleavage, Fig. (4)), while that of the second generation involves site-specific cleavage of the peptidic linkers (type B cleavage, Fig. (5)).

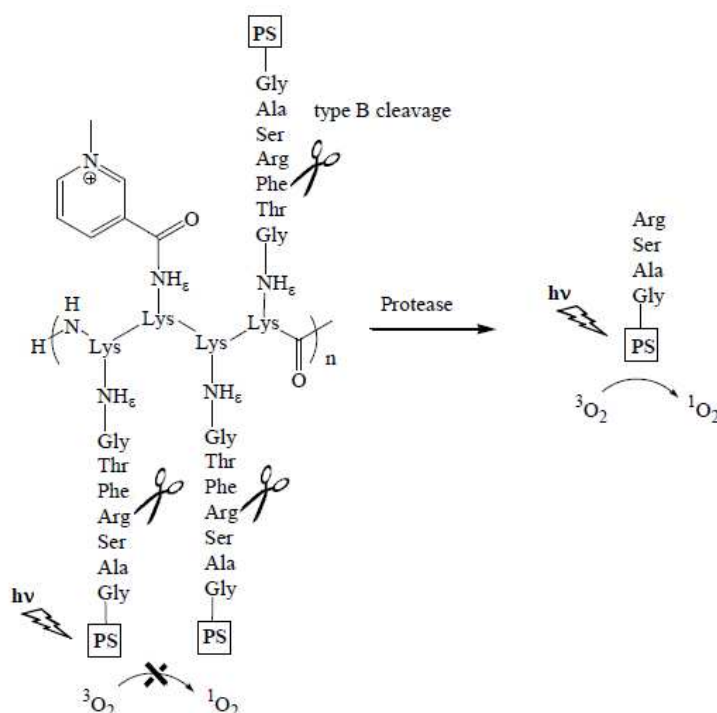


Fig. (5). Principle of probe activation and schematic structure.

They chose the peptidic sequence GTPRSAG derived from GALATPRSAAVST, a well-known substrate for trypsin and chymotrypsin. [129]. Trypsin-sensitive PPPs were assembled by chemoselective conjugation of the C-terminal carboxylic function of the

pheophorbide-peptide conjugates to the poly-lysine backbone. The remaining free side chains of the backbone were capped by reaction with 1-methylnicotinic acid NHS ester to yield the final conjugates. Covalent coupling of different amounts of pheophorbide-peptide moieties to ϵ -NH₂ functions of the polymer resulted in PPPs carrying 6, 18, and 30 PS per polymer chain. Photodynamic response and fluorescence emission decrease with increasing loading to a similar extent as for first-generation conjugates. Peptide linker imparted selectivity of PS activation was demonstrated by assaying PPP cleavage with different trypsin-like proteases. They showed the relative increase in fluorescence emission after *in vitro* digestion with trypsin, elastase, and thrombin. Furthermore, protease-mediated fluorescence activation was prevented by inhibiting trypsin activity with *p*-aminobenzamidine. Dark and phototoxicity of the PPP carrying 30 PS units per chain were evaluated on a human T-24 bladder epithelium cancer cell line. Within the studied concentration range, neither the activated PPP nor the nonactivated PPP showed significant dark toxicity. However, upon white light irradiation, the activated PPP showed a significantly higher phototoxicity than the nonactivated one in the 3.5-6.5 μ M concentration range. The subcellular localization of the PPP in its active and inactive forms within T24+ cells was visualized by confocal fluorescence microscopy. Cells treated with the activated PPP appeared brightly fluorescent when compared to those treated with the non activated PPP.

Recently, the same research team studied the design, synthesis and *in vitro* evaluation of Urokinase-plasminogen-activator (uPA) sensitive polymeric PS prodrugs [130]. In this study, they developed uPA-sensitive polymeric PS-prodrugs using an established minimal substrate serine-glycine-arginine-serine-alanine, which is reported to be cleaved by uPA [131]. The cellular activation studies on the two uPA-expressing cell lines, DU-145 and PC-3, showed prodrug activation in a time-dependent manner. Using a panel of protease inhibitors, the involvement of the different proteolytic enzymes was elucidated. Amiloride inhibition of prodrug activation was more important after relatively short incubation times (up to 8 h), which is related to the mainly extra-cellular or membrane-bound localization of uPA.

PS-PS quenching and proteases-active targeting may have inherent advantages in PDT since selectivity can be three-fold: (1) the use of polymer conjugates allows for passive targeting by the enhanced permeability and retention effect, (2) proteolytic activation enables for active targeting of metabolic differences, (3) enhanced PS penetration is modulated by enzymatic digestion.

2.2 PS-quencher energy transfer and enzyme-active targeting

The silencing of PS can be achieved either by PS aggregation (vide supra) or by PS-quencher association. In both cases, energy transfer from one moiety to one other is involved. However, the promising PS-quencher conjugates need a peculiar know-how due to either: 1) the synthesis of auto-structured molecules (with the establishment of a close PS/quencher neighbouring *via* a linker) or 2) the formation of a complex with a transient “squatter” which will bind and neutralize the PS until its biological target.

Among the linkers described in the literature, the ones which demonstrated the highest efficiency are the openable and cleavable linkers (Fig. 6).

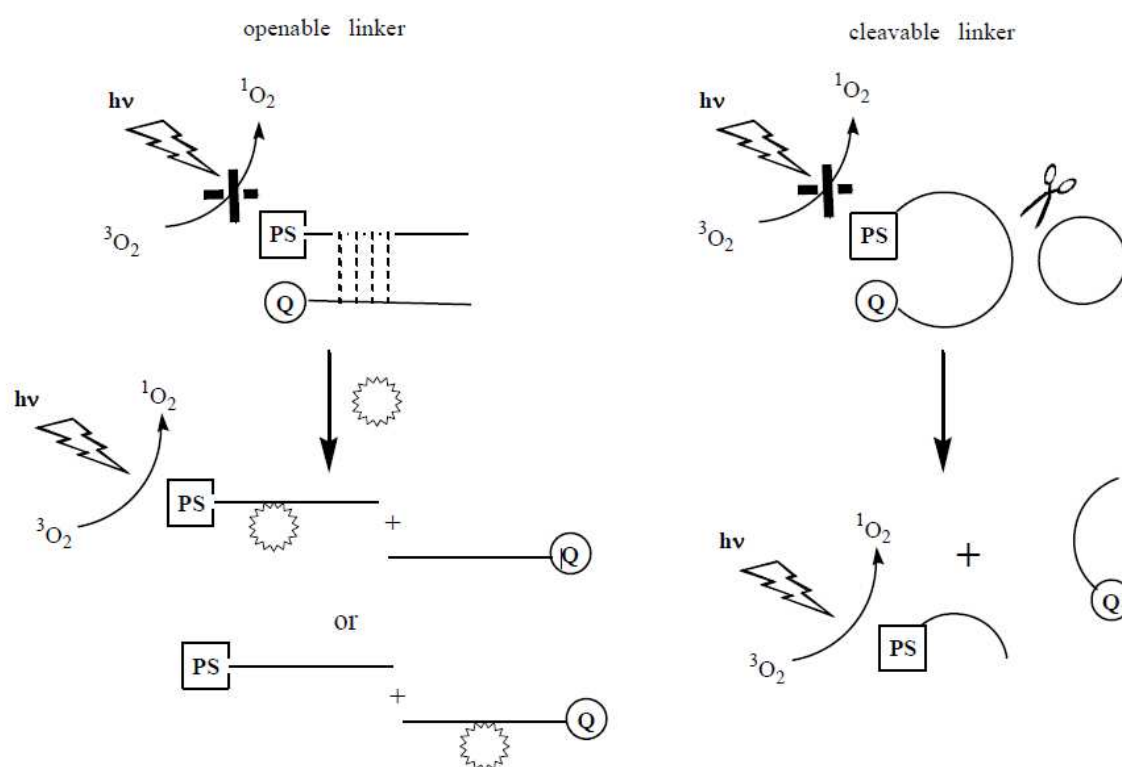


Fig. (6). PS-Quencher with openable or cleavable linker.

2.1.1 openable linkers

Openable linkers are designed in order to keep the PS and the 1O_2 quencher as close as possible until its biological target; then both moieties are expected to be separated using the better affinity of the linker moiety towards the triggered molecule. The linker keeps its entire

integrity but is bound to the targeted molecule which allows the restoration of $^1\text{O}_2$ generation.

Oligonucleotide strands competition

Clo *et al.* [132] have developed a DNA sequence-controlled on-and-off switchable $^1\text{O}_2$ sensitizer. In this approach, the PS and a quencher are kept in close contact in the “off state” by DNA-programmed assembly. They developed a molecular beacon based on DNA strands competition. To switch the PS “on”, its moiety was released after hybridization of the other strand with a more complementary strand. The PS pyropheophorbide-a (PS) was attached to the 5'-end of a 15-mer nucleotide sequence, whereas the $^1\text{O}_2$ quencher, Black Hole Quencher 3, was linked at the 3'-end of a complementary 21-mer DNA sequence. Hybridization of those two oligonucleotide sequences together led to close proximity between the PS and the quencher, allowing good energy transfer, turning the $^1\text{O}_2$ production off. $^1\text{O}_2$ production was switched on again by the addition of a “target” DNA sequence that is capable of forming a more stable 21-mer duplex between the target and Q-DNA, breaking out the PS-DNA/Q-DNA duplex (Fig. (7)). The competitive strand, 21-mer oligonucleotide sequence, exact complementary sequence than the Q-DNA strand, can release the PS-DNA moiety, allowing a restoration of the dye activity. Up to 85% of $^1\text{O}_2$ luminescence was recovered after addition of complementary DNA sequence.

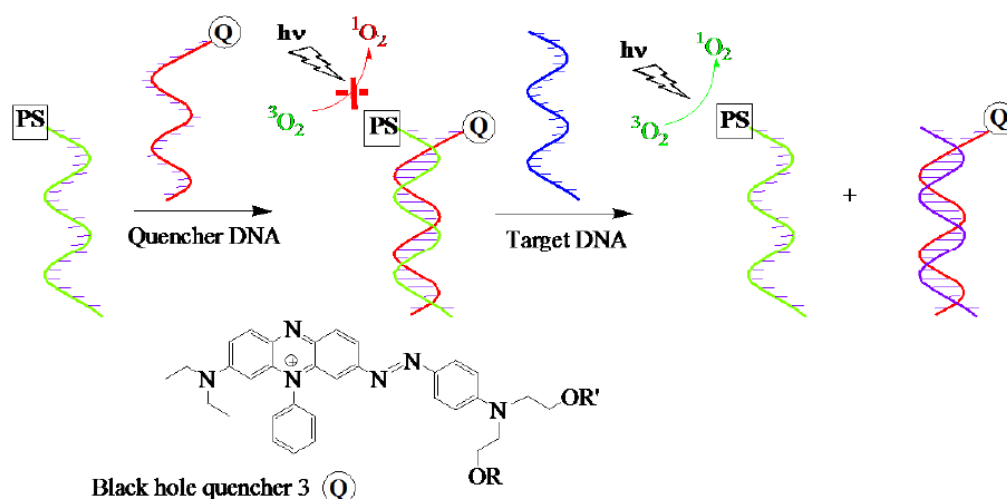


Fig. (7). DNA sequence-controlled on-off switchable PS.

Chen *et al.* reported another $^1\text{O}_2$ production regulation probe using the binding

properties of oligonucleotides [133]. They designed a tumour specific mRNA-triggered control of $^1\text{O}_2$ production containing a single-stranded oligonucleotide linker that forms a stem-loop structure (hairpin) in which the sequence is an antisense oligonucleotide complementary to a target mRNA (Fig. (8)). The natural conformation of hairpin stem from complementary base pairs sequences from the same molecule at each end, allowing the strand to form a double helix that ends in an unpaired loop. Using this stem-loop intramolecular base pairing, both ends are allowed to be close to each other; when a PS and a quencher are linked to each terminus, efficient quenching is thus expected. Once the loop sequence of the hairpin hybridizes with target complementary nucleic acid, it unfolds to restore the fluorescence; thus by targeting cancer specific mRNA, the probe is supposed to be cancer-triggered photodynamic molecular beacon.

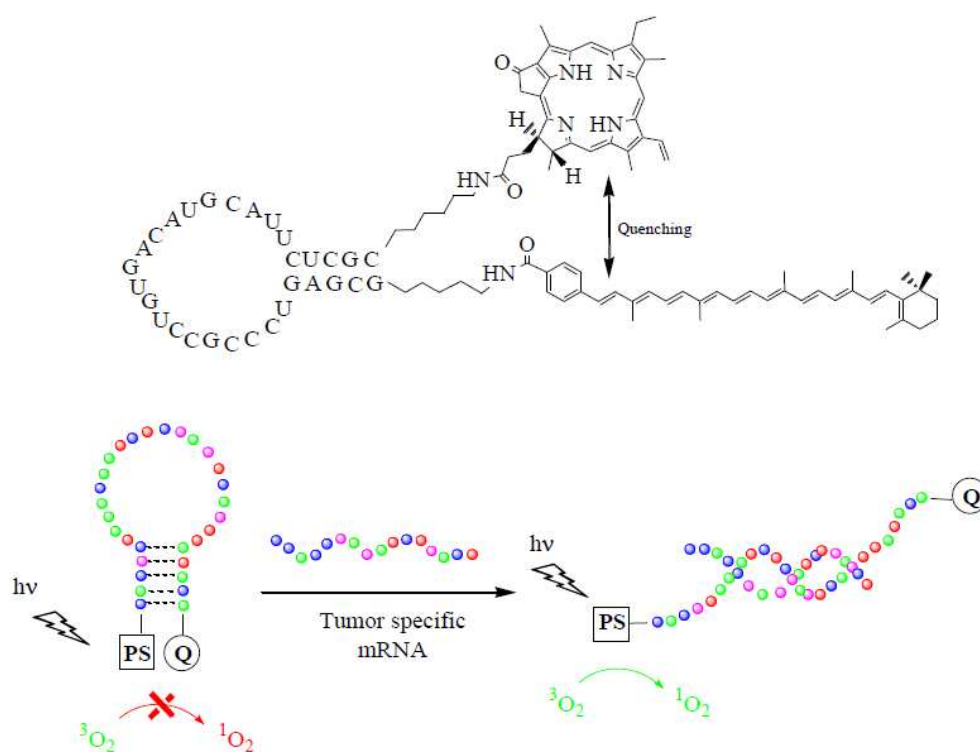


Fig. (8). A Tumour mRNA-triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotides hairpin control of $^1\text{O}_2$ production.

In this strategy, they designed a prototype mRNA-photomolecular beacon using *c-raf*-1 mRNA as the trigger, which is a well known antisense therapeutic target due to its role in the activation of mitogen activated protein kinase pathways and malignant transformation [134]. The 2'-*O*-methyl RNA backbone was selected because of its high affinity for RNA, its

faster hybridization, high nuclease resistance and good stability against RNase H digestion upon hybridization [135, 136]. A pyropheophorbide (Pyro) and a carotenoid were attached to each end of the nucleotidic sequence. This pair was previously used by Zheng *et al.* for $^1\text{O}_2$ quenching/activation [137]. 5-mer stem sequences were used to optimize the balance between the rate of target hybridization and the hybridization specificity.

They demonstrated that both specific and efficient activation were relevant with PDT application. Indeed, the hairpin-Molecular Beacon has shown maximum activation only with specific antisens oligonucleotide sequence and poor fluorescence restoration with RNA and a 1-basepair mismatch. Moreover, $^1\text{O}_2$ luminescence was quenched at 93% and restored at 63% upon activation, which is in accordance with PDT requirements for a molecular beacon. After *in vitro* studies on MDA-MB-231 cells, it was shown that their construct has a good cellular uptake and a quite good PDT efficacy (38% cell viability with 5 J.cm^{-2} light exposure).

Zhu *et al.* [138] have designed a new kind of $^1\text{O}_2$ production probe by linking non-covalently a ssDNA aptamer – PS moiety with a single-walled carbon nanotubes (SWNT). SWNT have been used as efficient fluorescence quenching probes [139-145] and Zhu *et al.* supposed they could be good $^1\text{O}_2$ quenchers. Meanwhile, interactions of SWNTs with biomolecules, such as proteins and DNA, have been intensively studied and applied to biosensing and as intracellular transporters. This indicates SWNTs may also protect DNA probes from digestion by nuclease. This notion is given further support by the recent demonstration that single-stranded DNA interacts non-covalently with SWNTs such that ssDNA wrap onto the SWNT surface by means of π -stacking interactions. Aptamers are synthetic DNA/RNA probes that can recognize and bind their targets with high affinity and specificity [146, 147]. Thrombin aptamers have been widely investigated for the past decade. Specifically, R-thrombin is a trypsin-like serine protease that has many effects in the coagulation cascade and relates to a multitude of diseases. For these reasons, human R-thrombin (Tmb) aptamer was chosen as the model probe construct.

The aptamer coupled to a chlorin e6 was able to perform $^1\text{O}_2$ production upon PS irradiation. Due to the π -stacking between the aptamer and SWNT, the energy transfer occurs between the PS and the SWNT, leading to 98 % $^1\text{O}_2$ quenching. DNA aptamers are good linkers to biological targets; they can bind biomolecules so strongly than the π -stacking occurring between the SWNT and the photodynamic probe breaks off, releasing the chlorin

from the $^1\text{O}_2$ quencher. This was illustrated by the Ce6 fluorescence which increased up to 20-fold after the addition of $2.0\ \mu\text{M}$ thrombin. $^1\text{O}_2$ production was restored when the construct probe was put in presence of thrombin and then irradiated at Ce6 maximum absorption wavelength (404nm). The high specificity of aptamers toward one biological target, and the quenching efficiency of the probe are many qualities to make out a relevant PDT agent.

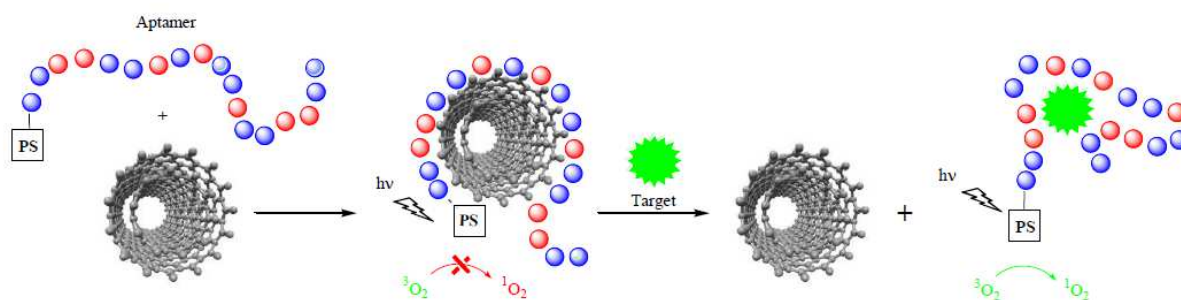


Fig. (9). Carbon nanotube DNA sensor

Thrombin aptamers have been widely investigated for the past decade. Specifically, R-thrombin is a trypsin-like serine protease that has many effects in the coagulation cascade and relates to a multitude of diseases. For these reasons, human R-thrombin (Tmb) aptamer was chosen as the model probe construct.

2.1.2 Cleavable linkers

Contrarily to openable linkers, those linkers are aimed to be cleaved to release its two moieties. Using the peculiar tumour biological systems, cleavable linkers trigger some specific cancer proteases to re-activate the molecular beacon. $^1\text{O}_2$ regulation by quenching can then be triggered in order to separate physically the two arms containing the two moieties.

Caspase-3 : proof of concept

In 2004, Chen *et al.* [137] combined the two concepts of type-II photosensitization and molecular beacons to design a photosensitizing beacon (PS-beacon) comprising a disease-specific linker, a PS, and a $^1\text{O}_2$ quencher. No photosensitization occurs until the linker interacts with a specific target molecule, such as a tumour-specific enzyme. As proof of

concept of this approach, they designed a protease-triggered PS-beacon; this molecule consists of a short peptide sequence specific to the caspase-3 that is over-expressed in cancer cells. A PS and a $^1\text{O}_2$ quencher (Q) are conjugated to the opposite ends of this sequence. In proximity of the PS, the carotenoid Q can quench $^1\text{O}_2$ generation through PS triplet-state energy transfer and/or $^1\text{O}_2$ scavenging. They hypothesized that, in the presence of tumour-specific enzyme, the substrate sequence could be cleaved and PS and Q could separate so that the PS could be photoactivated (Fig. (10)).

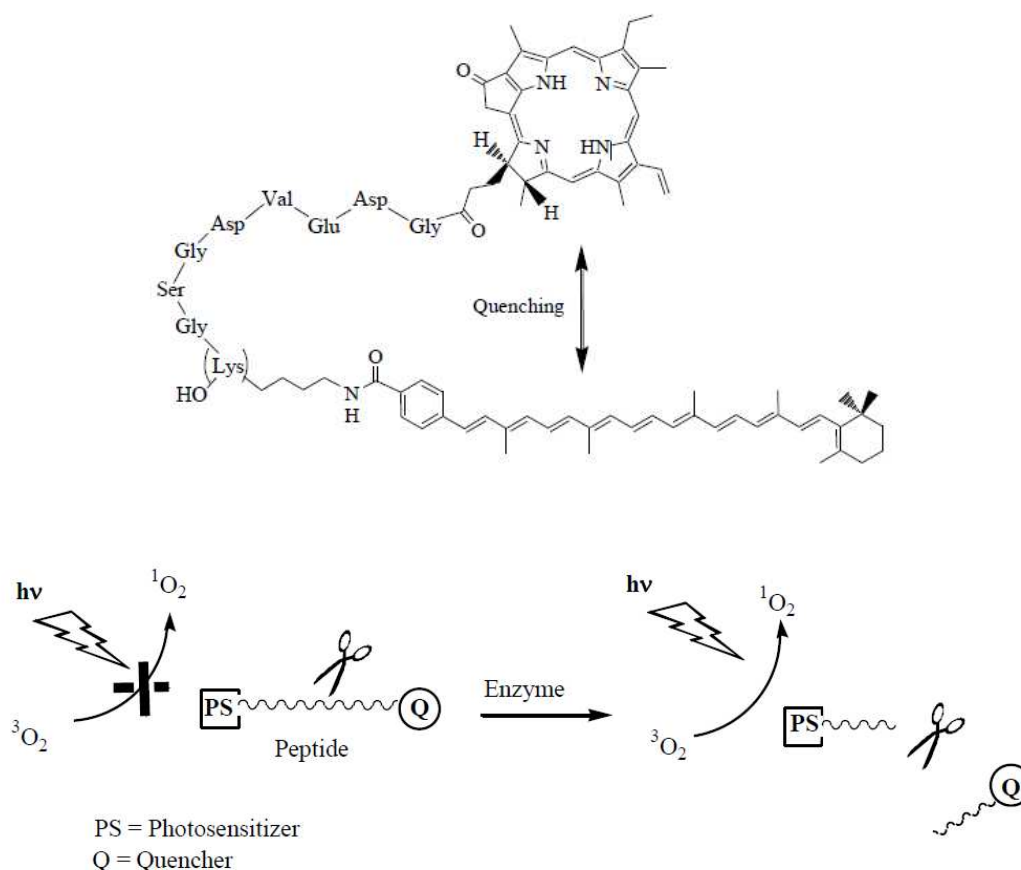


Fig. (10). Caspase-3-triggered photosensitizing molecular beacon.

They built a model conjugate made of a cleavable caspase-3 substrate, the pyropheophorbide and a carotenoid. GDEVDGSGK was chosen as the peptide sequence, for which there is a well-established assay for the caspase-3-specific fluorogenic substrate [148]. The conjugate (called PPC for pyro-peptide-carotenoid, see Fig. (10)) was then tested for caspase-3 cleavage using HPLC. Addition of caspase-3 clearly induced cleavage, as demonstrated by the diminishing PPC and the rise of Pyro and carotenoid residues. The

cleavage was proved to be caspase-3-specific by using a caspase-3-specific inhibitor (Ac-DEVD-CHO) that completely blocked the enzyme activity [148]. To test this concept, $^1\text{O}_2$ was measured directly in solutions of PPC alone, PPC incubated with caspase-3, and PPC incubated with caspase-3 plus a caspase-3 inhibitor. Pyro-peptide alone (PP), without the carotenoid moiety, was used as a positive control. Caspase-3 and its inhibitor have no effect on the $^1\text{O}_2$ production of PP, and PPC itself has 8-fold less $^1\text{O}_2$ production than the PP. Thus, the $^1\text{O}_2$ quenching in PPC is due to the presence of carotenoid. Moreover, addition of caspase-3 to the PPC (molar ratio 1:60; incubation time 1 h) resulted in a 4-fold increase in $^1\text{O}_2$ signal, an effect that was completely prevented by coinubation with the caspase-3 inhibitor.

MMP-7

Zheng *et al.* [149, 150] have reported a photodynamic molecular beacon triggering matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) *via* the peptide GPLGLARK. The expression of MMP-7 has been shown to correlate with the malignant potential of various tumors and can also influence tumor progression by regulating invasion and angiogenesis [151]. Using pyropheophorbide as a PS and BHQ-3 as a $^1\text{O}_2$ quencher, they developed a MMP-7 specific photodynamic molecular beacon to control harmful molecular oxygen within the direct environment of the tumour (Fig. (11)).

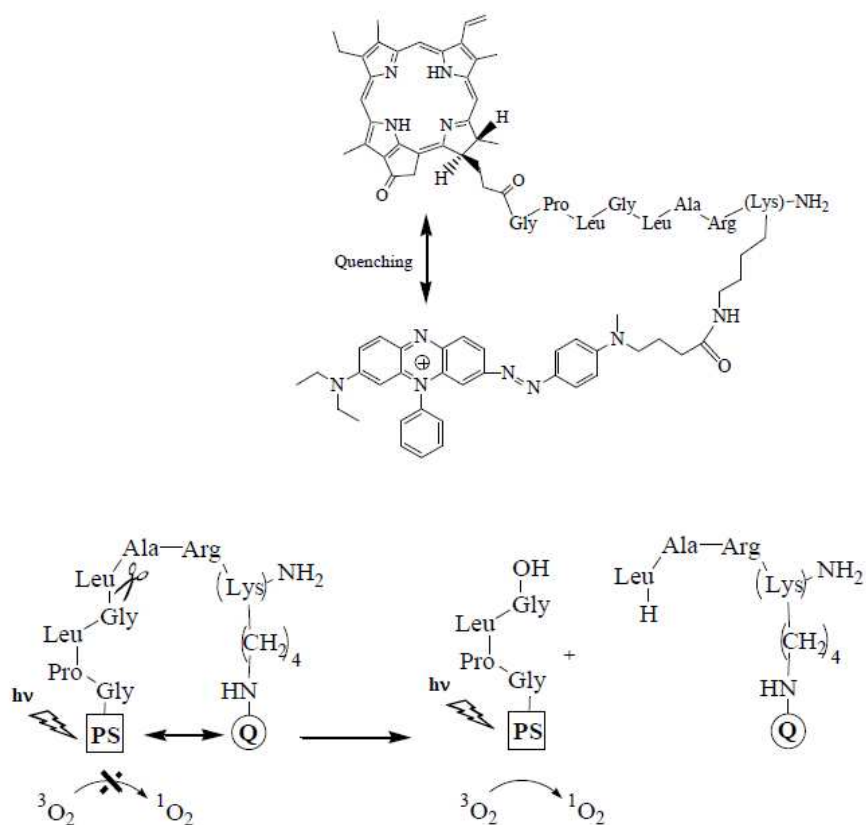


Fig. (11). MMP7-triggered photosensitizing molecular beacon

BHQ-3, as a fluorescence quencher, is an effective $^1\text{O}_2$ quencher [66] and show a good capacity to switch the PS off in the absence of MMP-7. The peptide sequence allows a tight conformation of Pyro and BHQ-3 for an efficient quenching efficiency. They report a 18-folds $^1\text{O}_2$ luminescence decrease when compared the Pyro alone and the entire PMB - 34 - construct, and then a restoration of the fluorescence and the $^1\text{O}_2$ after activation by targeted MMP-7. *In vitro* tests were performed on KB cells, over expressing MMP-7 (MMP7+), and BT20 cells (MMP7-) as a control. The effectiveness of the strategy was monitored by confocal microscopy showing that after cleavage by MMP-7, the Pyro fragment was internalized in the cells within or nearby mitochondria. Considering the fact that the latter is considered as an effective target for PDT, this MMP-7 triggering probe has been tested on mice *in vivo*. Their studies showed good activity of the construct by reducing the tumour's size and until complete regression with no signs of regrowth. Recently, Chen *et al.* have reported the concept of a new PMB based on both folate receptor driving to accumulate within cancer cells and the ability of PMB to be activated in presence of MMPs. This construct should benefit the advantages of both the folate molecule which acts as a delivery

vehicle, and the ability of photodynamic beacons to be cytotoxic only within the targeted area [150]. **Fibroblast activation protein** Lo *et al.* [152] have reported the synthesis of a photodynamic molecular beacon involving a fibroblast activation protein substrate molecule. The probe, constructed around the basic components of a protease mediated molecular beacon, is able to generate 1O_2 selectively in FAP containing cells throughout a PS (pyropheophorbid a), quenched by BHQ-3 *via* a peptide linker: TSGPNQEQK, specific fibroblast activation protein substrate, with the cleavage site between Proline and Asparagine. The final conjugate has been tested *in vitro* and *in vivo* to validate the concept (Fig. (12)).

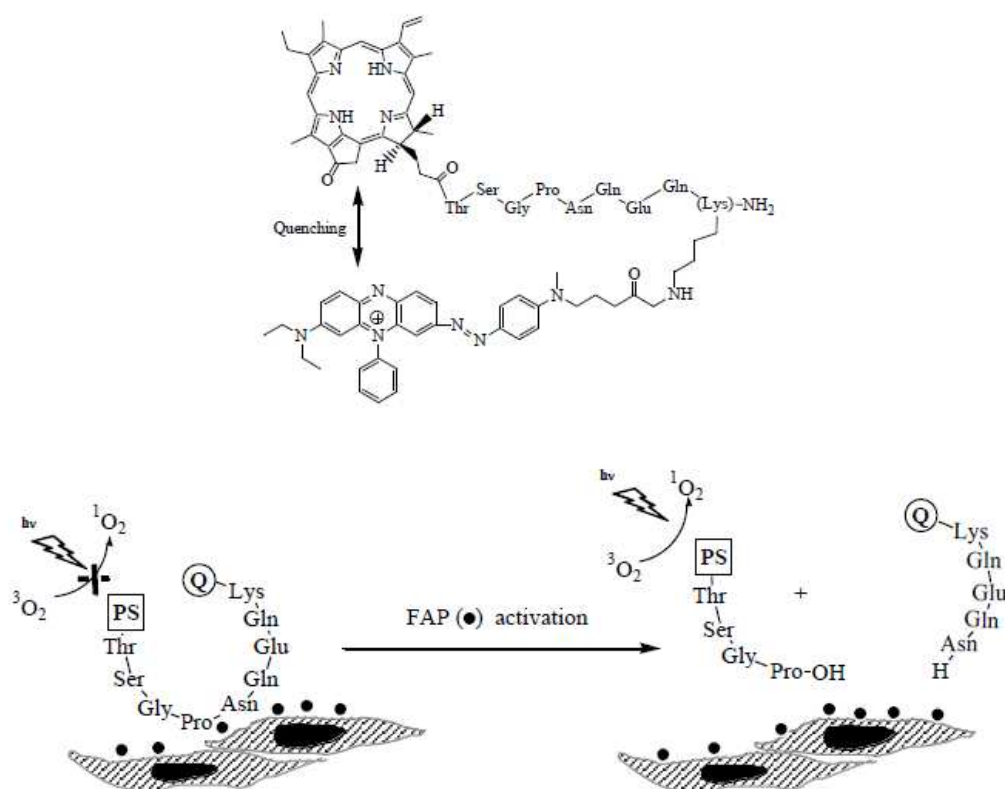


Fig. (12). Photodynamic molecular beacon triggered by fibroblast activation protein.

Covalent linkage of Pyro and its quencher, BHQ-3, resulted in a 98% quenching of 1O_2 generation, demonstrating the good ability of BHQ-3 to quench both fluorescence and PS triplet state. *In vitro* and *in vivo* trials have been made, monitoring the restoration of fluorescence to insure good peptide cleavage. After transfection of murine FAP in human embryonic kidney cells (HEK293), which were chosen for the study because of their modest tumour growth rate and their ability to readily express transfected mammalian proteins, and

24h of incubation, approximately 70% of FAP-PPB was cleaved giving a strong fluorescence signal. This result was confirmed *in vivo*, with nude mice bearing HEKmFAP tumours and a nude mouse bearing HT29 tumour (colorectal cancer). Restoration of fluorescence was observed in both cases, suggesting restoration of $^1\text{O}_2$ production, but no evidence was shown to monitor the tumour decay.

To summarize this strategy of cleavable linkers, some linkers bound to different pairs of PS-quencher have been tried, triggering different targets (Table 1). Quenching efficiency and quality of luminescence restoration are improving from beacon to beacon, showing the effectiveness of such strategy.

Table 1. Summary of the strategies involving cleavable linkers

PS	Quencher	Peptide	Target protease	Decrease in $^1\text{O}_2$ production	Increase of luminescence	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Reference
Pyro	Carotenoid	GDEVDSGSK	Caspase-3	8 folds	4 folds	Yes ^a	no	^b
Pyro	BHQ-3	GPLGLARK	MMP-7	15 folds	12 folds	KB cells	yes	^c
Pyro	BHQ-3	TTSGPNQEYK	FAP	98%	200 folds	HEK293	yes	^d

^a not specified; ^b ref137; ^c ref149; ^d ref152

3 CONCLUSION

PDT is a modality of cancer and other diseases treatment that is already used in clinics. The efficiency of such technique lies on the high reactivity of $^1\text{O}_2$ and ROS towards biological tissues, but nowadays the only medicines allowed for clinical treatments are based on passive accumulation within desired area. The latest developments to increase PDT efficiency are focused on improving the selectivity towards targeted cells compared to non-targeted cells. Substantial effort has been put into the development of PS which describe better tumour specificity, using ligands as delivering vehicles to bind specific receptors.

Another strategy to increase selectivity consists in controlling $^1\text{O}_2$ formation. Because PS just need light irradiation to be toxic, the specificity of those medicines is to be first inactivated by photophysical processes and then re-activated by endogenous stimuli proper to tumoural medium.

This review was focused on the different strategies employed to silence photodynamic effects of PS within non-targeted cells. Re-activation processes were also discussed depending on the quenching mode and the biological target. PS aggregation and energy transfer through acceptor moiety are the two main ways to perform this silencing, inducing the design of different chemical constructs such as nanoparticles, polymeric structure and molecular beacons. Exploiting the particularity of each disease, their biochemical arsenal can be an ideal trigger for a very selective delivering strategy.

Deeper and deeper knowledge in chemistry, photophysics and tumour biology allow us to imagine that newer concepts of molecular buildings will allow a total control of where and when the photodynamic effect will be provided.

ABBREVIATIONS

ABDM = 9,10 anthracenediyl-bis-(methylene)dimalonic acid

ADPA = Disodium 9,10-anthracenedipropionic acid

AS-ON = Antisense Oligonucleotide

BHQ-3 = Black Hole Quencher

Ce6 = Chlorin e6

DABCO = 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane

DNA = Deoxyribonucleic Acid

DPBF = 1,3-diphenylisobenzofuran

EC50 = Effective Concentration causing death of 50% of cells

FAP = Fibroblast Activation Protein

FRET = Förster Resonance Energy Transfer

GM = Goeppert-Mayer

HOMO = Highest Occupied Molecular Orbital

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

IC = Internal Conversion

ISC = Intersystem Crossing

LUMO = Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MMP = Matrix Metalloproteinase

m-RNA = Messenger Ribonucleic Acid

m-THPC = meta-Tetrahydroxyphenyl Chlorin

NP(s) = Nanoparticle(s)
NRP-1 = Neuropilin-1
PDT = Photodynamic Therapy
PEG = Polyethylene Glycol
PLL = Poly-L-Lysine
PMB = Photodynamic Molecular Beacon
PP = Pyro-Peptide
PPC = Pyro-Peptide-Carotenoid
PpIX = Protoporphyrin IX
PPP = Polymeric PS Prodrug
PS = Photosensitizer
Pyro = Pyropheophorbide a
Q = Quencher
RNO = *N,N*-dimethyl-4-nitrosoaniline
ROS = Reactive Oxygen Species
STPA = Supramolecular Photonic Therapeutic Agent
SWNT = Single-Walled Nanotube
TEMP = 2,2,6,6-tetraethyl-4-piperidone
TIMPs = Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
Tmb = R-thrombin
uPA = Urokinase Plasminogen Activator
UV-vis = Ultra-Violet Visible
VR = Vibrational Relaxation

REFERENCES

- [1] Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic therapy. *J. Natl Cancer Inst.*, **1998**, *90*(12), 889-905
- [2] Henderson, B.W.; Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, **1992**, *55*(1), 145-157
- [3] Moan, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol. B* **1990**, *6*(3), 343-344
- [4] Lee, S.; Vu, D.H.; Hinds, M.F.; Davis, S.J.; Liang, A.; Hasan, T. Pulsed diode laser-based singlet oxygen monitor for photodynamic therapy: in vivo studies of tumor-laden rats. *J. Biomed. Opt.*, **2008**, *13*(6), 064035
- [5] Niedre, M.J.; Secord, A.J.; Patterson, M.S.; Wilson, B.C. In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **2003**, *63*(22), 7986-7994
- [6] Niedre, M.J.; Yu, C.S.; Patterson, M.S.; Wilson, B.C. Singlet oxygen luminescence as an in vivo

- photodynamic therapy dose metric: Validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br. J. Cancer*, **2005**, 92(2), 298-304
- [7] Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005**, 2(2), 91-106
- [8] Martin, G.R.; Jain, R.K. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Research*, **1994**, 54(21), 5670-5674
- [9] Brault, D. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: The importance of pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **1990**, 6(1-2), 79-86
- [10] Sharman, W.M.; Van Lier, J.E.; Allen, C.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, 56(1), 53-76
- [11] Malatesti, N.; Smith, K.; Savoie, H.; Greenman, J.; Boyle, R.W. Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-monoclonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers. *Int. J. Oncol.*, **2006**, 28(6), 1561-1569
- [12] Van Dongen, G.A.M.S.; Visser, G.W.M.; Vrouenraets, M.B. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, 56(1), 31-52
- [13] Gijssens, A.; De Witte, P. Photocytotoxic action of EGF-PVA-Sn(IV)chlorin e6 and EGF-dextran-Sn(IV)chlorin e6 internalizable conjugates on A431 cells. *Int. J. Oncol.*, **1998**, 13(6), 1171-1177
- [14] Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2006**, 6(5), 469-488
- [15] Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O. Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, **2009**, (12), 1475-1477
- [16] Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40(11), 1111-1122
- [17] Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51(13), 3867-3877
- [18] Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Müller, J.F.; Barberi-Heyob, M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13(8), 2799-2808
- [19] Kurohane, K.; Tominaga, A.; Sato, K.; North, J.R.; Namba, Y.; Oku, N. Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Lett.*, **2001**, 167(1), 49-56
- [20] Thomas, N.; Tirand, L.; Chatelut, E.; Plénat, F.; Frochot, C.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7(4), 433-441
- [21] Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Controlled Release*, **2006**, 111(1-2), 153-164
- [22] Tirand, L.; Thomas, N.; Dodeller, M.; Dumas, D.; Frochot, C.; Maunit, B.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: An in vivo and in vitro study. *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, 35(5), 806-813
- [23] Thomas, N.; Bechet, D.; Becuwe, P.; Tirand, L.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *J. Photochem. Photobiol., B*, **2009**, 96(2), 101-108
- [24] Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olie, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Frochot, C. Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins. *Tetrahedron*, **2008**, 64(16), 3494-3504

- [25] Frochot, C.; Stasio, B.D.; Vanderesse, R.; Belgly, M.J.; Dodeller, M.; Guillemain, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg. Chem.*, **2007**, *35*(3), 205-220
- [26] Lilge, L.; Vesselov, L.; Whittington, W. Thin cylindrical diffusers in multimode Ge-doped silica fibers. *Lasers Surg. Med.*, **2005**, *36*(3), 245-251
- [27] Selm, B.; Rothmaier, M.; Camenzind, M.; Khan, T.; Walt, H. Novel flexible light diffuser and irradiation properties for photodynamic therapy. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(3), article n° 034024
- [28] Bhawalkar, J.D.; Kumar, N.D.; Zhao, C.F.; Prasad, P.N. Two-photon photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **1997**, *15*(5), 201-204
- [29] Wilson, B.C.; Patterson, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, **2008**, *53*(9), R61-R109
- [30] Atif, M.; Dyer, P.E.; Paget, T.A.; Snelling, H.V.; Stringer, M.R. Two-photon excitation studies of m-THPC photosensitizer and photodynamic activity in an epithelial cell line. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2007**, *4*(2), 106-111
- [31] Schneider, M.; Grasczew, G.; Roelofs, T.A.; Balanos, E.; Rakowsky, S.; Sinn, H.J.; Schlag, P.M. Multiphoton excitation and photodynamic activity of macromolecular derivatized mTHPC. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2000**, *3909*, 60-65
- [32] Beck, T.J.; Burkanas, M.; Bagdonas, S.; Krivickiene, Z.; Beyer, W.; Sroka, R.; Baumgartner, R.; Rotomskis, R. Two-photon photodynamic therapy of C6 cells by means of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *J. Photochem. Photobiol., B*, **2007**, *87*(3), 174-182
- [33] Khurana, M.; Collins, H.A.; Karotki, A.; Anderson, H.L.; Cramb, D.T.; Wilson, B.C. Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin® and Visudyne®. *Photochem. Photobiol.*, **2007**, *83*(6), 1441-1448
- [34] Karotki, A.; Khurana, M.; Lepock, J.R.; Wilson, B.C. Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*(2), 443-452
- [35] Balaz, M.; Collins, H.A.; Dahlstedt, E.; L., A.H. Synthesis of hydrophilic conjugated porphyrin dimers for one-photon and two-photon photodynamic therapy at NIR wavelengths. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*(5), 874-888
- [36] Dahlstedt, E.; Collins, H.A.; Balaz, M.; Kuimova, M.K.; Khurana, M.; Wilson, B.C.; Phillips, D.; Anderson, H.L. One- and two-photon activated phototoxicity of conjugated porphyrin dimers with high two-photon absorption cross sections. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*(5), 897-904
- [37] Kuimova, M.K.; Collins, H.A.; Balaz, M.; Dahlstedt, E.; Levitt, J.A.; Sergent, N.; Suhling, K.; Drobizhev, M.; Makarov, N.S.; Rebane, A.; Anderson, H.L.; Phillips, D. Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble porphyrin dimers for two-photon excited photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*(5), 889-896
- [38] Mir, Y.; van Lier, J.E.; Allard, J.F.; Morris, D.; Houde, D. Two-photon absorption cross section of excited phthalocyanines by a femtosecond Ti-sapphire laser. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, *8*(3), 391-395
- [39] Ogawa, K.; Kobuke, Y. Design of two-photon absorbing materials for molecular optical memory and photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*(11), 2241-2246
- [40] Pawlicki, M.; Collins, H.A.; Denning, R.G.; Anderson, H.L. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*(18), 3244-3266
- [41] Samkoe, K.S.; Clancy, A.A.; Karotki, A.; Wilson, B.C.; Cramb, D.T. Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(3), article n° 034025
- [42] Starkey, J.R.; Rebane, A.K.; Drobizhev, M.A.; Meng, F.; Gong, A.; Elliott, A.; McInnerney, K.; Spangler, C.W. New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*(20), 6564-6573
- [43] Ogawa, K.; Kobuke, Y. Recent advances in two-photon photodynamic therapy. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2008**, *8*(3), 269-279
- [44] Foote, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 659
- [45] Vidoczy, T. Type-I and type-II photosensitized reactions - reasons for dispute. *J. Photochem. Photobiol., B* **1992**, *14*, 139-150

- [46] Melnikova, V.O.; Bezdetnaya, L.N.; Brault, D.; Potapenko, A.Y.; Guillemin, F. Enhancement of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-sensitized photodynamic treatment on human tumor xenografts using a water-soluble vitamin E analogue, Trolox. *Int. J. Cancer* **2000**, *88*, 798-803
- [47] Ford, W.E.; Rihter, B.D.; Rodgers, M.A.J.; Kenney, M.E. Quenching of Naphthalocyanine Triplets by O₂: Application of the Sandros Equation *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 2362-2363
- [48] Rodgers, M.A.J. Reflections on type I photodynamic damages. *J. Photochem. Photobiol., B* **1983**, *18*, 296-298
- [49] Girotti, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B.* , **2001**, *63*, 103-113
- [50] Davies, M.J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 17-25
- [51] Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc. Chem. Res.* , **2008**, *41*, 1075-1083.
- [52] Davila, J.; Harriman, A. Photosensitized oxidation of biomaterials and related model compounds. *Photochem. Photobiol.*, **1989**, *50*(1), 29-35
- [53] Rodgers, M.A.J. Solvent-induced deactivation of singlet oxygen: Additivity relationships in nonaromatic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 6201-6205
- [54] Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Maillard, P.; Berg, K.; Brault, D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, *8*, 778-787
- [55] Boutorine, A.S.; Brault, D.; Takasugi, M.; Delgado, O.; Helene, C. Chlorin-oligonucleotide conjugates: Synthesis, properties, and red light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9469-9476
- [56] Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *39*, 1-18
- [57] Garavelli, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Robb, M.A. DFT study of the reactions between singlet-oxygen and a carotenoid model. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10210-10222
- [58] Edge, R.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G. The carotenoids as anti-oxidants - A review. *J. Photochem. Photobiol., B* **1997**, *41*(3), 189-200
- [59] Gust, D.; Moore, T.A.; Moore, A.L.; Jori, G.; Reddi, E. The photochemistry of carotenoids: some photosynthetic and photomedical aspects. *Ann. N. Y. Aca. Sci.*, **1993**, *691*, 32-47
- [60] Foote, C.S.; Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta-carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*(22), 6233-6235
- [61] Foote, C.S.; Chang, Y.C.; Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection [1]. *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*(17), 5216-5218
- [62] Telfer, A.; Bishop, S.M.; Phillips, D.; Barber, J. Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*(18), 13244-13253
- [63] Young, A.J.; Frank, H.A. Energy transfer reactions involving carotenoids: Quenching of chlorophyll fluorescence. *J. Photochem. Photobiol., B* **1996**, *36*(1), 3-15
- [64] Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher *Arch. Biochem. Biophys.* , **1989**, *274*(2), 532-538
- [65] Reddi, E.; Segalla, A.; Jori, G.; Kerrigan, P.K.; Liddell, P.A.; Moore, A.L.; Moore, T.A.; Gust, D. Carotenoporphyrins as selective photodiagnostic agents for tumours. *Br. J. Cancer*, **1994**, *69*(1), 40-45
- [66] Lovell, J.F.; Chen, J.; Jarvi, M.T.; Cao, W.G.; Allen, A.D.; Liu, Y.; Tidwell, T.T.; Wilson, B.C.; Zheng, G. FRET quenching of photosensitizer singlet oxygen generation. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*(10), 3203-3211
- [67] Foote, C.S.; Ta Yen, C.; Geller, G.G. Chemistry of singlet oxygen. XVIII. Rates of reaction and quenching of alpha-tocopherol and singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, **1974**, *20*(6), 511-513
- [68] Das, K.C.; Das, C.K. Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *277*(2), 443-447
- [69] Das, K.C.; Misra, H.P. Lidocaine: A hydroxyl radical scavenger and singlet oxygen quencher. *Mol. Cell. Biochem.* , **1992**, *115*(2), 179-185

- [70] Wennersten, G. Photodynamic aspects of some metal complexes. *Acta Derm.-Venereol.*, **1977**, 57(6), 519-524
- [71] Lindig, B.A.; Rodgers, M.A.J.; Schaap, A.P. Determination of the lifetime of singlet oxygen in D2O using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102(17), 5590-5593
- [72] Kuznetsova, N.A.; Gretsova, N.S.; Yuzhakova, O.A.; Negrimovskii, V.M.; Kaliya, O.L.; Luk'yanets, E.A. New reagents for determination of the quantum efficiency of singlet oxygen generation in aqueous media. *Russ. J. Gen. Chem.*, **2001**, 71(1), 36-41
- [73] Kraljić, L.; El Mohsni, S. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol.*, **1978**, 28(4-5), 577-581
- [74] Ohyashiki, T.; Nunomura, M.; Katoh, T. Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1999**, 1421(1), 131-139
- [75] Wozniak, M.; Tanfani, F.; Bertoli, E.; Zolese, G.; Antosiewicz, J. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.*, **1991**, 1082(1), 94-100
- [76] McDonnell, S.O.; Hall, M.J.; Allen, L.T.; Byrne, A.; Gallagher, W.M.; O'Shea, D.F. Supramolecular photonic therapeutic agents. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(47), 16360-16361
- [77] Stubbs, M.; McSheehy, P.M.J.; Griffiths, J.R.; Bashford, C.L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today*, **2000**, 6(1), 15-19
- [78] Mordon, S.; Devoisselle, J.M.; Maunoury, V.; Coustaut, D. A preliminary study of tumour detection by a pH-dependent fluorescent probe in vivo. *J. Photochem. Photobiol., B* **1991**, 9(2), 219-228
- [79] Mordon, S.; Devoisselle, J.M.; Maunoury, V. In vivo pH measurement and imaging of tumor tissue using a pH-sensitive fluorescent probe (5,6-carboxyfluorescein): instrumental and experimental studies. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1994**, 60(3), 274-279
- [80] Gullino, P.M.; Grantham, F.H.; Smith, S.H.; Haggerty, A.C. Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. *J. Natl Cancer Inst.*, **1965**, 34(6), 857-869
- [81] Tannock, I.F.; Rotin, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.*, **1989**, 49(16), 4373-4384
- [82] Čunderlíková, B.; Gangeskar, L.; Moan, J. Acid-base properties of chlorin e6: Relation to cellular uptake. *J. Photochem. Photobiol., B* **1999**, 53(1-3), 81-90
- [83] Maman, N.; Brault, D. Kinetics of the interactions of a dicarboxylic porphyrin with unilamellar lipidic vesicles: Interplay between bilayer thickness and pH in rate control. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1998**, 1414(1-2), 31-42
- [84] Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Vever-Bizet, C.; Brault, D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **2007**, 1768(11), 2748-2756
- [85] Thomas, J.P.; Girotti, A.W. Glucose administration augments in vivo uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.*, **1989**, 49(3), 241-247
- [86] Bennett, L.E.; Ghiggino, K.P.; Henderson, R.W. Singlet oxygen formation in monomeric and aggregated porphyrin c. *J. Photochem. Photobiol., B* **1989**, 3(1), 81-89
- [87] Damoiseau, X.; Schuitmaker, H.J.; Lagerberg, J.W.M.; Hoebeke, M. Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation. *J. Photochem. Photobiol., B* **2001**, 60(1), 50-60
- [88] Hamblin, M.R.; Miller, J.L.; Rizvi, I.; Ortel, B. Degree of substitution of chlorin e6 on charged poly-L-lysine chains affects their cellular uptake, localization and phototoxicity towards macrophages and cancer cells. *J. XRay Sci. Tech.*, **2002**, 10(3-4), 139-152
- [89] Redmond, R.W.; Land, E.J.; Truscott, T.G. Aggregation effects on the photophysical properties of porphyrins in relation to mechanisms involved in photodynamic therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1985**, 193, 293-302
- [90] Smith, G.K. The effects of aggregation on the fluorescence and triplet state yield of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol Sci.*, **1985**, 41, 123-126
- [91] McCarthy, J.R.; Perez, J.M.; Brückner, C.; Weissleder, R. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Lett.*, **2005**, 5(12), 2552-2556

- [92] anyam, J.; Zhou, W.Z.; Prabha, S.; Sahoo, S.K.; Labhasetwar, V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Implications for drug and gene delivery. *FASEB J.*, **2002**, *16*(10), 1217-1226
- [93] Turk, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2006**, *5*(9), 785-799
- [94] Turk, D.; Gunčar, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): Promising drug targets. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **2003**, *59*(2), 203-213
- [95] Cawston, T.E.; Wilson, A.J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best. Pract. Res. Cl. Rh.*, **2006**, *20*(5), 983-1002
- [96] Berdowska, I. Cysteine proteases as disease markers *Clin. Chim. Acta*, **2004**, *342*(1-2), 41-69
- [97] Duffy, M.J.; Duggan, C. The urokinase plasminogen activator system: A rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin. Biomech.*, **2004**, *37*(7), 541-548
- [98] Overall, C.M.; Kleinfeld, O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*(3), 227-239
- [99] van Kempen, L.C.L.; de Visser, K.E.; Coussens, L.M. Inflammation, proteases and cancer. *Eur. J. Cancer*, **2006**, *42*(6), 728-734
- [100] DeClerck, Y.A.; Mercurio, A.M.; Stack, M.S.; Chapman, H.A.; Zutter, M.M.; Muschel, R.J.; Raz, A.; Matrisian, L.M.; Sloane, B.F.; Noel, A.; Hendrix, M.J.; Coussens, L.; Padarathsingh, M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am. J. Pathol.*, **2004**, *164*(4), 1131-1139
- [101] Koblinski, J.E.; Ahram, M.; Sloane, B.F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta*, **2000**, *291*(2), 113-135
- [102] Lynch, C.C.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*, **2002**, *70*(9-10), 561-573
- [103] Andreasen, P.A.; Kjoller, L.; Christensen, L.; Duffy, M.J. Theurokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int. J. Cancer*, **1997**, *72*, 1-22
- [104] Han, B.; Nakamura, M.; Mori, I.; Nakamura, Y.; Kakudo, K. Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer. *Oncol. Rep.*, **2005**, *14*(1), 105-112
- [105] Harbeck, N.; Kates, R.E.; Gauger, K.; Willems, A.; Kiechle, M.; Magdolen, V.; Schmitt, M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: Novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemostasis*, **2004**, *91*(3), 450-456
- [106] Kim, T.D.; Song, K.S.; Li, G.; Choi, H.; Park, H.D.; Lim, K.; Hwang, B.D.; Yoon, W.H. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, **2006**, *6*, article n°211
- [107] Cozzi, P.J.; Wang, J.; Delprado, W.; Madigan, M.C.; Fairy, S.; Russell, P.J.; Li, Y. Evaluation of urokinase plasminogen activator and its receptor in different grades of human prostate cancer. *Hum. Pathol.*, **2006**, *37*(11), 1442-1451
- [108] Konecny, G.; Untch, M.; Pihan, A.; Kimmig, R.; Gropp, M.; Stieber, P.; Hepp, H.; Slamon, D.; Pegram, M. Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, *7*(6), 1743-1749
- [109] Daneri-Navarro, A.; Macias-Lopez, G.; Ocegüera-Villanueva, A.; Del-Arreola, S.; Bravo-Cuellar, A.; Perez-Montfort, R.; Orbach-Arbouys, S. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions. *Eur. J. Cancer*, **1998**, *34*(4), 566-569
- [110] Stutchbury, T.K.; Al-Ejeh, F.; Stillfried, G.E.; Croucher, D.R.; Andrews, J.; Irving, D.; Links, M.; Ranson, M. Preclinical evaluation of ²¹³Bi-labeled plasminogen activator inhibitor type 2 in an orthotopic murine xenogenic model of human breast carcinoma. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, *6*(1), 203-212
- [111] Graeser, R.; Chung, D.E.; Esser, N.; Moor, S.; Schächtele, C.; Unger, C.; Kratz, F. Synthesis and biological evaluation of an albumin-binding prodrug of doxorubicin that is cleaved by prostate-specific antigen (PSA) in a PSA-positive orthotopic prostate carcinoma model (LNCaP). *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*(5), 1145-1154
- [112] Christiansen, V.J.; Jackson, K.W.; Lee, K.N.; McKee, P.A. Effect of fibroblast activation protein and α 2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen Types I, III, and IV. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **2007**, *457*(2), 177-186

- [113] Niedermeyer, J.; Enenkel, B.; Park, J.E.; Lenter, M.; Rettig, W.J.; Damm, K.; Schnapp, A. Mouse fibroblast-activation protein - Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *254*(3), 650-654
- [114] Park, J.E.; Lenter, M.C.; Zimmermann, R.N.; Garin-Chesa, P.; Old, L.J.; Rettig, W.J. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*(51), 36505-36512
- [115] Ferrario, A.; Chantrain, C.F.; Von Tiehl, K.; Buckley, S.; Rucker, N.; Shalinsky, D.R.; Shimada, H.; DeClerck, Y.A.; Gomer, C.J. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. *Cancer Res.*, **2004**, *64*(7), 2328-2332
- [116] Sharwani, A.; Jerjes, W.; Hopper, C.; Lewis, M.P.; El-Maaytah, M.; Khalil, H.S.M.; MacRobert, A.J.; Upile, T.; Salih, V. Photodynamic therapy down-regulates the invasion promoting factors in human oral cancer. *Arch. Oral Biol.*, **2006**, *51*(12), 1104-1111
- [117] Vihinen, P.; Kähäri, V.M. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, **2002**, *99*(2), 157-166
- [118] Law, B.; Tung, C.H. Proteolysis: A biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging. *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*(9), 1683-1695
- [119] Funovics, M.; Weissleder, R.; Tung, C.H. Protease sensors for bioimaging. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, *377*(6), 956-963
- [120] Lovell, J.F.; Zheng, G. Activable smart probes for molecular optical imaging and therapy. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **2008**, *1*(1), 45-61
- [121] Pham, W.; Choi, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.H. Developing a peptide-based near-infrared molecular probe for protease sensing. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*(6), 1403-1407
- [122] Choi, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.H. Selective antitumor effect of novel protease-mediated photodynamic agent. *Cancer Res.*, **2006**, *66*(14), 7225-7229
- [123] Weissleder, R.; Tung, C.H.; Mahmood, U.; Bogdanov Jr, A. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat. Biotechnol.*, **1999**, *17*(4), 375-378
- [124] Tung, C.H.; Bredow, S.; Mahmood, U.; Weissleder, R. Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*(5), 892-896
- [125] Tung, C.H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. In vivo imaging of proteolytic enzyme activity using a novel molecular reporter. *Cancer Res.*, **2000**, *60*(17), 4953-4958
- [126] Yamamoto, A.; Kaji, T.; Tomoo, K.; Ishida, T.; Inoue, M.; Murata, M.; Kitamura, K. Crystallization and preliminary X-ray study of the cathepsin B complexed with CA074, a selective inhibitor. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *227*(3), 942-944
- [127] Campo, M.A.; Gabriel, D.; Kucera, P.; Gurny, R.; Lange, N. Polymeric photosensitizer prodrugs for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2007**, *83*(4), 958-965
- [128] Gabriel, D.; Campo, M.A.; Gurny, R.; Lange, N. Tailoring protease-sensitive photodynamic agents to specific disease-associated enzymes. *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*(4), 1070-1077
- [129] Felber, L.M.; Cloutier, S.M.; Kündig, C.; Kishi, T.; Brossard, V.; Jichlinski, P.; Leisinger, H.J.; Deperthes, D. Evaluation of the CFP-substrate-YFP system for protease studies: Advantages and limitations. *BioTechniques*, **2004**, *36*(5), 878-885
- [130] Gabriel, D.; Zuluaga, M.F.; Martinez, M.N.; Campo, M.A.; Lange, N. Urokinase-plasminogen-activator sensitive polymeric photosensitizer prodrugs: Design, synthesis and in vitro evaluation. *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, **2009**, *19*(1), 15-24
- [131] Coombs, G.S.; Bergstrom, R.C.; Madison, E.L.; Corey, D.R. Directing sequence-specific proteolysis to new targets. The influence of loop size and target sequence on selective proteolysis by tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*(8), 4323-4328
- [132] Clo, E.; Snyder, J.W.; Voigt, N.V.; Ogilby, P.R.; Gothelf, K.V. DNA-programmed control of photosensitized singlet oxygen production. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*(13), 4200-4201
- [133] Chen, J.; Lovell, J.F.; Lo, P.C.; Stefflova, K.; Niedre, M.; Wilson, B.C.; Zheng, G. A tumor mRNA-triggered photodynamic molecular beacon based on oligonucleotide hairpin control of singlet oxygen production. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*(7), 775-781
- [134] Monia, B.P.; Johnston, J.F.; Geiger, T.; Muller, M.; Fabbro, D. Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase. *Nat. Med.*, **1996**, *2*(6), 668-675

- [135] Tsourkas, A.; Behlke, M.A.; Bao, G. Erratum: Hybridization of 2'-O-methyl and 2'-deoxy molecular beacons to RNA and DNA targets. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*(6), 1803
- [136] Tsourkas, A.; Behlke, M.A.; Bao, G. Hybridization of 2'-O-methyl and 2-deoxy molecular beacons to RNA and DNA targets. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*(23), 5168-5174
- [137] Chen, J.; Stefflova, K.; Niedre, M.J.; Wilson, B.C.; Chance, B.; Glickson, J.D.; Zheng, G. Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(37), 11450-11451
- [138] Zhu, Z.; Tang, Z.; Phillips, J.A.; Yang, R.; Wang, H.; Tan, W. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(33), 10856-10857
- [139] Chen, R.J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K.A.; Kam, N.W.S.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P.J.; Dai, H. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*(9), 4984-4989
- [140] Kam, N.W.S.; Dai, H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*(16), 6021-6026
- [141] Kam, N.W.S.; Liu, Z.; Dai, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem.*, **2006**, *45*(4), 577-581
- [142] Kam, N.W.S.; O'Connell, M.; Wisdom, J.A.; Dai, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *P. Natl Acad. Sci-Biol.*, **2005**, *102*(33), 11600-11605
- [143] So, H.M.; Won, K.; Kim, Y.H.; Kim, B.K.; Ryu, B.H.; Na, P.S.; Kim, H.; Lee, J.O. Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*(34), 11906-11907
- [144] Tang, X.; Bansaruntip, S.; Nakayama, N.; Yenilmez, E.; Chang, Y.I.; Wang, Q. Carbon nanotube DNA sensor and sensing mechanism. *Nano Lett.*, **2006**, *6*(8), 1632-1636
- [145] Yang, R.; Jin, J.; Chen, Y.; Shao, N.; Kang, H.; Xiao, Z.; Tang, Z.; Wu, Y.; Zhu, Z.; Tan, W. Carbon nanotube-quenched fluorescent oligonucleotides: Probes that fluoresce upon hybridization. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(26), 8351-8358
- [146] Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **1990**, *346*, (6287), 818-822
- [147] Tuerk, C.; Gold, L. Systemic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **1990**, *249*(4968), 505-510
- [148] Nicholson, D.W.; Nicholson, D.W.; Ali, A.; Thornberry, N.A.; Vaillancourt, J.P.; Ding, C.K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P.R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y.A.; Munday, N.A.; Raju, S.M.; Smulson, M.E.; Yamin, T.; Yu, V.L.; Miller, D.K. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **1998**, *17*, 1295-1304
- [149] Zheng, G.; Chen, J.; Stefflova, K.; Jarvi, M.; Li, H.; Wilson, B.C. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *PNAS*, **2007**, *104*(21), 8989-8994
- [150] Chen, J.; Stefflova, K.; Warren, M.; Bu, J.; Wilson, B.C.; Zheng, G. Rational design of a receptor-targeted photodynamic molecular beacon for the multilevel control of singlet oxygen production and PDT activity in cancer cells. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2007**, *6449*, (Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV), 1-9
- [151] Miyata, Y.; Iwata, T.; Ohba, K. Expression of matrix metalloproteinase-7 on cancer cells and tissue endothelial cells in renal cell carcinoma: Prognostic implications and clinical significance for invasion and metastasis. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*(23), 6998-7003
- [152] Lo, P.-C.; Chen, J.; Stefflova, K.; Warren, M.S.; Navab, R.; Bandarchi, B.; Mullins, S.; Tsao, M.; Cheng, J.D.; Zheng, G. Photodynamic molecular beacon triggered by fibroblast activation protein on cancer-associated fibroblasts for diagnosis and treatment of epithelial cancers. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*(2), 358-368

Liste des figures

- Figure 1-1 : Carte du monde sur l'estimation du nombre de malades du cancer par pays (tous cancers, tous sexes, tous âges) sur 100000 habitants. Source : GLOBOCAN 2008 de l'OMS. 23
- Figure 1-2 : Schéma simplifié de la différenciation cellulaire entre une cellule saine et une cellule cancéreuse. Source : l'ARC..... 26
- Figure 1-3 : Schéma du processus de néo-vascularisation tumorale. Réf. : (12). 28
- Figure 1-4 : Etapes de l'angiogenèse tumorale. Réf. : (10). Annotations françaises tirées de la thèse de Loraine Tirand (14). 29
- Figure 1-5 : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale. PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor ; TNF- α : Tumor Necrosis Factor ; FGF : Fibroblast Growth Factor ; FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor ; PDGF : Platelet-Derived Growth Factor ; PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor ; uPA : urokinase-type Plasminogen Activator. 30
- Figure 1-6 : Structures des différentes MMPs. Pre : séquence signal. Pro : pro-peptide. Cat : domaine catalytique. Zn²⁺ : zinc. Fu : site de reconnaissance de furine. Vn : motifs de vitronectine. TM : domaine transmembranaire. CP : domaine cytoplasmique. GPI : glycosylphosphatidylinositol. CA : Cysteine array. Ig : immunoglobuline. Le domaine catalytique est lié au domaine « hemopexin-like » (en bleu foncé) par une région charnière (en rouge). 33
- Figure 1-7 : Rôle des gélatinases pendant l'angiogenèse. a) la gélatinase A est sécrétée par les cellules endothéliales. b) la thrombine, dont le taux est élevé pendant l'angiogenèse, active la protéine C. L'APC (Activated Protein C) résultante active rapidement la gélatinase A permettant aux cellules endothéliales de dégrader la membrane basale. La gélatinase B stockée dans des vésicules des cellules endothéliales est alors activée et relarguée pour

participer à la dégradation de la membrane basale. c) Le collagène de type I active les gélatinases A. Réf. : (55).	37
Figure 1-8 : A gauche : Hermann von Tappeiner. A droite : Formule chimique de l'acridine.	39
Figure 1-9 : Principaux composants de l'HpD. A gauche : ester de dihématoporphyrine. A droite : éther de dihématoporphyrine.	41
Figure 1-10 : Diagramme énergétique d'orbitales moléculaires à l'état fondamental. ΔE : différence énergétique entre l'état fondamental et l'état électroniquement excité.	43
Figure 1-11 : Configurations de spin des états singulet S_0 et S_1 , et de l'état triplet T_1 . CIS : croisement intersystème.	44
Figure 1-12 : Courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et des états excités d'une molécule. r : distance interatomique. A : absorption. F : fluorescence. P : phosphorescence. CI : conversion interne. CIS : croisement intersystème.	46
Figure 1-13 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié des processus photophysiques d'une molécule photosensible.	47
Figure 1-14 : Spectre d'absorption des composants du sang et définition de la « fenêtre thérapeutique ». HbO_2 : oxyhémoglobine.	50
Figure 1-15 : Propagation (en mm) de la lumière à différentes longueurs d'onde (en nm) dans un tissu.	50
Figure 1-16 : Différentiation structurale de vaisseaux normaux (vasa vasorum de carotide sinus rat, à gauche) et de vascularisation tumorale (tumeur humaine xenogreffée sur « nude mice », à droite) utilisant la microscopie SEM (112, 113).	53
Figure 1-17 : Structure chimique du Bleu de Méthylène.	55
Figure 1-18 : A gauche, structure chimique de l'hypéricine. A gauche, <i>Hypericum perforatum</i> .	56
Figure 1-19 : Structure chimique du Rose de Bengale.	56
Figure 1-20 : Structure chimique de l'éosine.	56

Figure 1-21 : Structure chimique de l'érythrosine.	57
Figure 1-22 : Structure chimique de la toluidine blue.....	57
Figure 1-23 : A gauche : structure chimique du noyau de base porphyrinique. A droite : représentation du système des 18 électrons π aromatiques (en rouge).	58
Figure 1-24 : A gauche : nomenclature selon Fischer. A droite : nomenclature IUPAC.....	59
Figure 1-25 : Structure 3D de la tétraphénylporphyrine.	59
Figure 1-26 : Structure chimique d'une métalloporphyrine.	60
Figure 1-27 : Spectres d'absorption d'une porphyrine. A droite sont représentés les quatre spectres possibles pour les bandes Q : éthio, rhodo, oxorhodo et phyllo.....	61
Figure 1-28 : Synthèse de la TPP par Rothemund en 1941.....	62
Figure 1-29 : Mécanisme de la synthèse de porphyrine.....	63
Figure 1-30 : Synthèse de porphyrines méso-tétrastituées par la méthode des « aldéhydes mixtes » de Little.....	64
Figure 1-31 : Distribution statistique des porphyrines synthétisées par la méthode des aldéhydes mixtes avec un mélange d'aldéhydes A et B en proportion 1:3. Réf. : (144).	65
Figure 1-32 : Synthèse d'une porphyrine asymétrique sur phase solide.....	65
Figure 1-33 : Schéma de synthèse de MacDonald et Woodward.....	66
Figure 1-34 : Schéma de synthèse « 2+2 » d'une porphyrine asymétrique.	67
Figure 1-35 : Schéma de synthèse d'une porphyrine asymétrique par la méthode « 2+2 », suivie d'une réaction de type Suzuki.....	67
Figure 1-36 : Biosynthèse de l'hème. UroIII : uroporphyrinogène III. CoproIII : coproporphyrinogène III. Proto IX : protoporphyrinogène IX. Réf. : (157).....	68
Figure 1-37 : De gauche à droite : structures chimiques du 5-ALA, de la PpIX et de l'hème.	69
Figure 1-38 : Structure chimique du Photofrin®.	69

Figure 1-39 : Structures chimiques des macrocycles porphyriniques. De gauche à droite : porphyrine, chlorine et bactériochlorine.	70
Figure 1-40 : Spectres d'absorption des composés tétrapyrroliques dans l'éthanol. En violet : porphyrine ; en rouge : chlorine ; en vert : bactériochlorine.	71
Figure 1-41 : Structure chimique d'une bactériochlorine stable.	72
Figure 1-42 : Synthèse sélective d'une chlorine.	73
Figure 1-42 : Synthèse sélective de 5,10,20-triarylechlorine.	73
Figure 1-43 : Synthèse « 2+2 » de 5,10,20-triarylechlorine.	74
Figure 1-44 : Synthèse de chlorine à l'aide d'OsO ₄	74
Figure 1-45 : Synthèse de la BPDMA.	75
Figure 1-46 : Structures chimiques des chlorophylles (à gauche) et de la phéophytine a (à droite).	76
Figure 1-47 : Structures chimiques du pyrophéophorbide a (à gauche) et de la chlorine e6 (à droite).	76
Figure 1-48 : Structure chimique d'une bactériochlorine isolée de Rhodobacter capsulatus. .	77
Figure 1-49 : Structure chimique des purpurines et benzochlorines.	77
Figure 1-50 : Structure chimique des purpurines synthétisées par Morgan et al.	78
Figure 1-51 : Structure chimique des benzochlorines synthétisées par Morgan et al.	78
Figure 1-52 : Schéma de synthèse d'une porphycène.	79
Figure 1-53 : Structures chimiques d'une phtalocyanine (à gauche) et d'une naphtalocyanine (à droite).	80
Figure 1-54 : Spectre d'absorption caractéristique d'une phtalocyanine zinguée.	80
Figure 1-55 : Structure chimique du Foscan®.	83

Figure 1-56 : Structures chimiques et coefficient de partage (log P) de l'ALA et de certains esters dérivés. Le comportement vis-à-vis d'une membrane cellulaire est symbolisé à droite par des flèches. Réf. : (157).....	84
Figure 1-57 : Structures chimiques de quelques PS ayant reçu l'AMM, utilisés en PDT.	86
Figure 1-58 : Structure chimique du conjugué porphyrine-œstradiol.....	87
Figure 1-59 : Structure chimique des conjugués « m-THPC-like » - acide folique synthétisés par Julien Gravier.	88
Figure 1-60 : Structures chimiques des dérivés glycosylés de macrocycles tétrapyrroliques. Réf. : (201).	89
Figure 1-61 : Structures chimiques des PS glycosylés synthétisés par Maillard et al. Réf. : (202).	90
Figure 1-62 : Structure chimique du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR.	92
Figure 1-63 : Représentation de la nanoparticule développée par notre équipe. Tiré de la thèse de Pierre Couleaud.	92
Figure 2-1 : En haut à gauche : Psoralea corylifolia. En haut à droite : Ammi Majus. En bas : structures chimiques de deux psoralènes.	107
Figure 2-2 : A gauche : Hans Tautsky. A droite : formule de la tryptaflavine.....	109
Figure 2-3 : Orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène.	110
Figure 2-4 : Structures électroniques des oxygènes triplet et singulet.	111
Figure 2-5 : Diagramme de Jablonski simplifié de l'oxygène (les désactivations non-radiatives ne sont pas montrées). A gauche : énergies d'excitation des états excités par rapport à l'état fondamental. A droite : longueurs d'onde de luminescence.	112
Figure 2-6 : Voies de désactivation de l'oxygène singulet. Q = quencher physique ; S = substrat ; nr = désactivation non-radiative ; P = phosphorescence.	113
Figure 2-7 : Constante de pseudo premier ordre de la désactivation de l'oxygène singulet en fonction du type de solvant. Réf. : (21).....	114

Figure 2-8 : Production d' $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) à partir d'endopéroxydes aromatiques.	115
Figure 2-9 : Diagramme de Jablonski simplifié du processus de sensibilisation de l'oxygène.	119
Figure 2-10 : Schéma de différents processus de formation et de désactivation d'un PS. F = fluorescence ; P = phosphorescence ; nr = désactivation non-radiative ; Q = quencher physique ; O_2 = dioxygène ; S = substrat. Réf. : (22).....	120
Figure 2-11 : Mécanisme de la réaction ène avec l'oxygène singulet.....	122
Figure 2-12 : Mécanisme du clivage de Hock (65).....	122
Figure 2-13 : Action de l'oxygène singulet sur le cholestérol (66).....	123
Figure 2-14 : Action de l'oxygène singulet sur le tryptophane (67).....	123
Figure 2-15 : Action de l'oxygène singulet sur l'acide linoléique.....	124
Figure 2-16 : Mécanisme de la cycloaddition [2+2].	124
Figure 2-17 : Action de l'oxygène singulet sur l'histidine (en haut) et le tryptophane (en bas).	125
Figure 2-18 : Action de l'oxygène singulet sur la vitamine D ₂	126
Figure 2-19 : Action de l'oxygène singulet sur la t-MVP.....	126
Figure 2-20 : Mécanisme de la cycloaddition [4+2].	127
Figure 2-21 : Synthèse d'endoperoxide de naphthalène et sa dismutation par voie thermique.	127
Figure 2-22 : Action de l'oxygène singulet sur la tyrosine.	127
Figure 2-23 : Action de l'oxygène singulet sur la guanosine (dG) et sur la 8-oxo-dG.....	128
Figure 2-24 : Quelques sondes utilisées pour détecter l'oxygène singulet.	129
Figure 2-25 : Quelques exemples de réactions de cycloaddition [4+2]. Réf : Handbook of Synthetic Photochemistry, p. 353.	130

Figure 2-26 : Compétition entre réaction ène et la cycloaddition [4+2].	130
Figure 2-27 : Schéma de réaction de l'oxygène singulet avec un thioester (76).	131
Figure 2-28 : Action de l'oxygène singulet sur les acides aminés soufrés : cystéine et méthionine.	132
Figure 2-29 : Schéma de réaction de l'oxygène singulet sur une amine tertiaire (76).	132
Figure 2-30 : Résumé des processus d'inhibition du β -carotène décrits par Foote et al. (79).	133
Figure 2-31 : Structures de quelques caroténoïdes naturels.	134
Figure 2-32 : Structures de quelques phénols.	135
Figure 2-33 : Structures de quelques flavonoïdes.	136
Figure 2-34 : Structures de quelques indigoïdes.	137
Figure 2-35 : Structure du DABCO.	137
Figure 2-36 : Réaction de la TEMP avec l'oxygène singulet.	141
Figure 2-37 : Schéma simplifié d'un molecular beacon, composé d'un donneur et d'un accepteur, à l'état initial.	143
Figure 2-38 : Cas général de l'activation d'un PMB linéaire en présence d'une cible thérapeutique.	144
Figure 2-39 : Cas général de l'activation d'un PMB en épingle à cheveux en présence d'une cible thérapeutique.	144
Figure 2-40 : Schéma du molecular beacon ciblant les MMP-2 et MMP-9. Sur le squelette de polylysine est attaché le peptide GPLGVRGKC (en vert). Sur la lysine du peptide est greffé le fluorophore FITC (en rouge).	146
Figure 2-41 : Schéma de la formation de l'oxygène singulet de manière sensibilisée et quenching des états excités. F = fluorescence ; P = phosphorescence ; nr = désactivation non-radiative ; Q = quencher physique ; O ₂ = dioxygène ; S = substrat.	149

Figure 2-42 : Schéma de quenching des états excités d'un photosensibilisateur par un quencher physique.....	150
Figure 2-43 : Schéma du quenching dynamique.....	150
Figure 2-44 : Schéma du quenching statique formé à l'état excité du PS.....	151
Figure 2-45 : Schéma du mécanisme concerté de Dexter.....	152
Figure 2-46 : Schéma du transfert d'électron photoinduit.....	152
Figure 2-47 : Recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.....	153
Figure 2-48 : Diagramme de Jablonski simplifié d'un transfert d'énergie par résonance.....	153
Figure 2-49 : Dépendance de l'efficacité du transfert d'énergie par rapport à la distance.....	154
Figure 2-50 : Schéma de comparaison entre l'efficacité η du FRET (en rouge) et du quenching collisionnel (en bleu) en fonction de la distance de Q_F et Q_C par rapport au PS..	156
Figure 2-51 : Schéma de la micelle polymère MPEG poly-(acides β -aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide.....	159
Figure 2-52 : Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables.....	160
Figure 2-53 : Schéma du PMB « super quencher linéaire » dans lequel le PS est le Pyrophosphoribide-a, les quenchers sont les Black Berry Quenchers (BBQ) phosphoramidites.....	161
Figure 2-54 : Schéma du PMB utilisant le pyrophosphoribide a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPLGVRGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique).....	162
Figure 3-1 : Schéma de la stratégie de synthèse pour la conception du PMB.....	173
Figure 3-2 : Structures chimiques de la TPC (à gauche) et du pseudo-Foscan (à droite).....	174

Figure 3-4 : Schéma de synthèse de la 5-(-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P ₁ COOH).	176
Figure 3-5 : Schéma de synthèse de la 5-(-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine (C ₁ COOH).	177
Figure 3-6 : Spectre UV-visible de la P ₁ COOH dans l'éthanol.	178
Figure 3-7 : Spectre d'émission de fluorescence de la P ₁ COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).	180
Figure 3-8 : Spectre de temps de vie de fluorescence de la P ₁ COOH obtenu par TCSPC dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 408$ nm).	181
Figure 3-9 : Spectre de luminescence de l'oxygène singlet produit par la P ₁ COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).	182
Figure 3-10 : Spectre d'absorption de la C ₁ COOH dans l'éthanol.	183
Figure 3-11 : Spectre d'émission de fluorescence de la C ₁ COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).	184
Figure 3-12 : Déclin de fluorescence de la C ₁ COOH obtenu par TCSPC dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).	184
Figure 3-13 : Spectre de luminescence de l'oxygène singlet produit par la C ₁ COOH dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 415$ nm).	185
Figure 3-14 : Schéma de synthèse de la P ₂ COOH protégée.....	186
Figure 3-15 : Schéma de synthèse de la P ₂ COOH.	188
Figure 3-16 : Structures chimiques d'un acide aminé (à gauche) en représentation de Cram et d'un dipeptide (à droite) comportant des chaînes latérales R ₁ et R ₂	191
Figure 3-17 : Structure chimique des acides aminés naturels.	192
Figure 3-18 : Schéma réactionnel de synthèse peptidique utilisant l'HBTU comme agent de couplage.	193

Figure 3-19 : Schéma de synthèse peptidique faisant intervenir un acide aminé comportant une protection latérale GP ₂ et une protection du N-terminal GP ₁ . L'acide est activé par un agent activateur (Act).	194
Figure 3-20 : Schéma de synthèse supportée sur phase solide. 1 : Introduction des réactifs en excès et du solvant sur les billes de résine préchargées en réactif de base. 2 : Réaction. 3 : Elimination du solvant et lavage de la phase solide.	196
Figure 3-21 : Schéma général de SPPS d'un tripeptide.	197
Figure 3-22 : Structures chimiques des acides aminés utilisés pour la synthèse du peptide H-GPLGIAGQK-OH.	198
Figure 3-23 : Schéma de synthèse de l'activation de la C ₁ COOH.	200
Figure 3-24 : Schéma de synthèse du conjugué TPC-peptide.	201
Figure 3-25 : Structures chimiques des molécules testées pour les essais de quenching.	205
Figure 3-26 : Tests de quenching en solution entre la TPC et différentes molécules. Blanc : TPC seule en solution. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C. [Quenchers] = 10 ⁻³ mol.L ⁻¹	206
Figure 3-27 : Evolution de la production d'oxygène singulet en fonction de la concentration en flavonoïde dans le milieu. En haut : le quencher est la catéchine ; en bas : le quencher est la quercétine. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C. Concentrations de flavonoïdes : en bleu : 0 mol.L ⁻¹ ; en vert : 1.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; en rouge : 2.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; en marron : 3.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; en violet : 4.10 ⁻³ mol.L ⁻¹	207
Figure 3-28 : Spectres de production d'oxygène singulet de la TPC en absence de quencher (en bleu) et en présence de quencher (en rouge). A gauche : caroténoïde. A droite : BBQ650. Mesures effectuées dans l'éthanol à 25°C.	208
Figure 3-29 : Rétrosynthèse du caroténoïde.	209
Figure 3-30 : Synthèse du 4-carbométhoxybenzyltriphénylphosphonium.	209
Figure 3-31 : Synthèse du 7'-apo-7'-(4-carbométhoxyphényl)-β-carotène et mécanisme de formation.	210

Figure 3-32 : Saponification de l'esther méthylique de caroténoïde.	211
Figure 3-33 : Réaction de synthèse enzymatique entre l'esther méthylique du caroténoïde et la Boc-Lys-OH.	215

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Classification des MMPs. Réf. : (17).	31
Tableau 1-2 : Exemples d'expressions de MMPs dans différents cancers.	34
Tableau 1-3 : Caractéristiques générales des gélatinases. Réf. : (14).	36
Tableau 1-4 : Liste des principaux PS en essais clinique ou préclinique en PDT (188).	85
Tableau 2-1 : Durée de vie de l'oxygène singulet (τ^{Δ}) dans différents solvants (22–24).	114
Tableau 3-1 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la P_1COOH dans l'éthanol.	179
Tableau 3-2 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la C_1COOH dans l'éthanol.	183
Tableau 3-3 : Structure chimique, nom et condition de déprotection des principaux groupements protecteurs utilisés en synthèse peptidique.	194
Tableau 3-4 : Comparaison des propriétés photophysiques de la TPC et du conjugué TPC-peptide.	202
Tableau 3-5 : Conditions opératoires pour la synthèse enzymatique.	215
Tableau 4-1 : Temps de rétention des composés 3, 8a, 9a, 10a, 11a, 8b, 9b, 10b, 11b par HPLC utilisant le gradient [75:25] acétonitrile/eau (0,1% TFA) à 100% acétonitrile en 15 min, puis isocratique acétonitrile pendant 15 min.	261

