HAL
open science

Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique

Aurélie Stallivieri

To cite this version:

Aurélie Stallivieri. Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0128 . tel-01751833

HAL Id: tel-01751833

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751833v1

Submitted on 15 Jan 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

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

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Génie des Procédés et des Produits (Chimie organique)

Présentée et soutenue par

Aurélie STALLIVIERI

Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique

Soutenue le 16 Octobre 2015 devant la Commission d'Examen :

Jean-François BRIERE, *CR CNRS, COBRA, Rouen*	Rapporteur
Vincent SOL, *Pr, LCSN, Limoges*	Rapporteur
Norbert LANGE, *Pr*, *Université de Genève*	Président du jury
Claude GROS, *Pr*, *ICMUB, Dijon*	Examinateur
Stéphanie BONNEAU, *MdC, Laboratoire Jean Perrin, Paris 6*	Examinateur
Jérôme DEVY, *MdC, SiRMa, Reims*	Examinateur
Régis VANDERESSE, *CR CNRS, LCPM, Nancy*	Invité
Céline FROCHOT, *DR CNRS, LRGP, Nancy*	Directrice de Thèse
Isabelle CHEVALOT, *Pr*, *LRGP, Vandœuvre-lès-Nancy*	Co-directrice de Thèse

A l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue que tout ce que j'ai pu accomplir est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à mon égard m'ont permis de progresser.

Je vous remercie.

Je dédie ce travail à ma famille.
Merci Maman,
Merci Papa.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du Jury : le Professeur Vincent Sol, le Docteur Jean-François Brière pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Professeur Norbert Lange et le Professeur Claude Gros pour leur participation à ce jury.

Je voudrais remercier ma directrice de thèse, **Céline Frochot**. Je te remercie de m'avoir encadré et conseillé durant ces trois années, pour ton soutien et ta confiance tout au long de cette thèse.

J'aimerais remercier **Isabelle Chevalot**, ma co-directrice de thèse. Malgré que l'on fût sur deux sites différents, tu as très bien réussi à m'encadrer et tu as toujours été présente pour moi quand j'en avais besoin sachant toujours répondre à mes questions. Tu as toujours été positive, optimiste, souriante… Le « fléau » te dit merci !

Régis, merci. Tu as toujours été là pour me conseiller et me guider malgré toutes les difficultés rencontrées. Merci également pour toutes les connaissances que tu as partagé avec moi.

Jérôme Devy et Nicolas Etique, je vous remercie pour le travail, l'énergie et la bonne humeur que vous avez apportés à ma thèse.

Stéphanie Bonneau et son équipe, je vous remercie pour votre accueil et votre bonne humeur, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour tout ce que vous m'avez appris. Merci infiniment Stéphanie pour tout, j'ai adoré travailler avec toi ! Au plaisir de se revoir !

Cédric Boura, merci pour ta précieuse aide. Ravie d'avoir travaillé avec toi.

Un grand merci également à toute l'**équipe BioProMo** : Fabrice, Arnaud, Ludovic, Karim, Yann, Khalil, Céline, Léna, Aline, Xavier, Marco, Bauyrzhan, Alice, Julien, Nadia, Pierrick, Felipe. Merci à l'ensemble du personnel du **LRGP**. Merci Alexandra, Florence, Florian, Hatem, Oleksii, Anna, Martina et Ophélie. Mes remerciements s'adressent également aux stagiaires que j'ai pu encadrer : Esme, Mathilde, le « petit » Florent et Gulim. J'aimerais remercier également « l'adopté » de BioProMo pour son travail et sa bonne humeur, **Cédric Paris**.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres du **LCPM**, Amirah, Mohamed, Rudy et Mathilde, pour leur chaleureux soutien et leur aide. Je tiens à remercier particulièrement, **Samir Acherar** pour toutes nos discussions et ses conseils, merci infiniment, j'ai apprécié travailler avec toi !

Je te remercie **Fabien Lachaud**. Merci pour ta réactivité, tes conseils, ton aide… Un grand merci !

Enfin, je tiens à dédier ce travail à toute ma famille. **Mon frère** avec qui je me « chamaille » encore de temps en temps et qui malgré ne comprenant pourquoi je me suis embêtée à faire une thèse, ne m'a jamais laissé tomber. Tout particulièrement merci à vous, **papa et maman**, sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui et je ne serais pas grand-chose non plus. Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements durant toutes ces années.

RESUME

La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement thérapeutique principalement anticancéreux basé sur l'association de la lumière, de l'oxygène et d'un photosensibilisateur (PS). L'action de la lumière de longueur d'onde appropriée sur le PS en présence d'oxygène entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène dont l'oxygène singulet $^1O_2$, conduisant à la nécrose ou l'apoptose des cellules cancéreuses. L'intérêt principal de la PDT est dû à sa sélectivité : seuls les tissus qui ont incorporé le PS et qui ont été ensuite exposés à la lumière subissent les réactions phototoxiques générées par ce traitement. Si des progrès considérables ont été faits pour apporter la lumière dans la zone à traiter (lasers, fibres, diffuseurs), une des limitations cliniques reste le manque de sélectivité des PS pour les cellules cancéreuses et le contrôle de la production de l'oxygène singulet au niveau des tissus cancéreux. Une nouvelle génération de photosensibilisateurs plus sélectifs est actuellement à l'étude.

Une première approche envisagée dans cette thèse a consisté à modifier les PS en les conjuguant à des molécules possédant une forte affinité pour des marqueurs spécifiques des cellules tumorales.

Souvent découvert à un stade avancé, le cancer de l'ovaire évolue vers la carcinose péritonéale. La chirurgie assure l'exérèse des lésions seulement visibles, et l'efficacité de la chimiothérapie est limitée par l'apparition de chimiorésistance. La fréquence des récidives péritonéales est alors élevée et impose de définir des stratégies thérapeutiques complémentaires pour le traitement des foyers microscopiques. Les carcinomes ovariens surexpriment le récepteur à l'acide folique, absent de la majorité des tissus sains. Le développement de PS couplés à l'acide folique est une solution prometteuse pour le traitement des cancers ovariens. Différents PS couplés directement à l'acide folique ou *via* un bras espaceur ont été synthétisés, caractérisés et leurs propriétés photophysiques étudiées.

Le médulloblastome est la première cause de tumeur cérébrale et de mort par cancer chez l'enfant. Malgré les avancées thérapeutiques, les risques de décès, récidive et séquelles après traitement restent importants. Pour traiter le médulloblastome, un PS (la tétraphénylporphyrine, P1-COOH) a été couplé à un peptide à l'aide d'une lysine. Le peptide sélectionné (DKPPR) est un ligand spécifique du récepteur neuropiline 1 (NRP-1) impliqué dans la progression tumorale et surexprimé au niveau des cellules tumorales de médulloblastome. Des modèles *in vitro* de cellules souches de médulloblastomes ont été établis à partir de trois lignées cellulaires (DAOY, D283 et D341). Ce nouveau composé K(P1)DKPPR a montré une meilleure affinité pour NRP-1 que DKPPR et engendre une diminution de la viabilité cellulaire sur ces mêmes lignées après excitation lumineuse.

La deuxième approche développée dans ce travail a été de contrôler la production d'oxygène singulet uniquement lorsque le PS a atteint la cible en utilisant l'action d'enzymes spécifiques de la zone tumorale. Le traitement actuel par neurochirurgie et/ou radiothérapie des tumeurs primaires malignes du cerveau, dont le glioblastome multiforme (GBM) est la forme la plus agressive, ne permet toutefois pas de dépasser 10% d'espérance de vie à 5 ans. Pour traiter le GBM, la stratégie adoptée est d'élaborer une molécule constituée d'un peptide substrat des métalloprotéinases membranaires MT1-MMP, enzymes surexprimées dans les cellules tumorales du GBM, d'un PS, et d'un *quencher* de fluorescence et/ou d'$^1O_2$: il s'agit d'un *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB). Ce composé est inactif sauf en présence d'enzymes où sa phototoxicité est alors restaurée. La synthèse, la caractérisation, les propriétés photophysiques et l'activation enzymatique de différents dérivés PS-peptide et de nouveaux PMBs activables ou non en présence de MT1-MMPs sont décrites. Une alternative originale à la synthèse chimique des PMBs a été envisagée consistant à utiliser le potentiel catalytique d'enzymes telles que les lipases pour coupler le *quencher* à un résidu lysine qui compose le peptide. L'influence de la nature du PS, de la nature du *quencher*, de la distance entre le peptide et le PS et de la position du PS sur le clivage enzymatique ont été étudiées. Le peptide substrat choisi GRIGFLRTAKGG est clivé entre la phénylalanine (F) et la leucine (L). L'étude des interactions de type non spécifique de la partie du PMB clivé contenant le PS, soit PS-GRIGF-OH, avec un modèle de membrane cellulaire a permis de conclure sur l'internalisation à travers les membranes de ces composés.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic cancer treatment based on the combination of light, oxygen and a photosensitizer (PS). The action of the light with an appropriate wavelength on the PS in the presence of oxygen leads to the formation of reactive oxygen species, including singlet oxygen $^1O_2$, leading to necrosis or apoptosis of cancer cells. The main advantage of PDT is its selectivity: only tissues that have incorporated the PS and have been exposed to light undergo phototoxic reactions generated by this treatment. While considerable progress has been made to bring light into the treatment area (lasers, fiber, broadcasters), one of the clinical limitations is the lack of selectivity of PS for cancer cells and the control of the production of singlet oxygen in cancer tissues. A new generation of more selective photosensitizers is currently under study.

A first approach considered in this thesis was to modify PS by coupling them with molecules with high affinity for specific markers of tumor cells.

Often discovered at an advanced stage, ovarian cancer progresses to peritoneal carcinosis. Surgical resection provides the removal of only visible lesions and the effectiveness of chemotherapy is limited by the emergence of drug resistance. The frequency of peritoneal recurrence is high and consequently, required to define additional therapeutic strategies for the treatment of microscopic regions. Ovarian carcinomas overexpress the folate receptor, absent from most normal tissues. The development of PS coupled with folic acid is a promising solution for the treatment of ovarian cancer. Various PS directly coupled to folic acid or *via* a spacer have been synthesized, characterized and their photophysical properties studied.

Medulloblastoma is the first cause of brain tumors and cancer death in children. Despite therapeutic advances, the risk of death, recurrence and sequels after treatment are still important. For treating medulloblastoma, a PS (tetraphenylporphyrin, P1-COOH) has been coupled to a peptide with a lysine. The selected peptide (DKPPR) is a specific ligand of neuropilin-1 receptors (NRP-1) involved in tumor progression and overexpressed in tumor cells of medulloblastoma. In vitro models of medulloblastoma stem cells are derived from three cell lines (DAOY, D283 and D341). This new compound K(P1)DKPPR showed better affinity for NRP-1 that DKPPR and lead to a decrease in cell viability on those lines after light excitation .

The second approach developed in this work was to control the production of singlet oxygen only when the PS has reached the target using the action of specific enzymes in the tumor area. Current treatment by neurosurgery and/or radiotherapy of malignant primary brain tumors, which glioblastoma multiform (GBM) is the most aggressive form, does not allow to exceed 10% of life expectancy at 5 years. To treat GBM, the strategy is to develop a molecule composed of a peptide, substrate of MT1-MMP membrane type metalloproteinases, enzymes overexpressed in tumor cells of GBM, a PS and a *quencher* of fluorescence and/or of singlet oxygen: it is a Photodynamic Molecular Beacon (PMB). This compound is inactive except in the presence of enzymes where its phototoxicity is restored. Chemical synthesis, characterization, photophysical properties and enzymatic activation of different PS-peptide derivatives and new PMBs that are activatables or not in the presence of MT1-MMP are described. An original alternative to the chemical synthesis of PMBs has been evaluated using the catalytic potential of enzymes such as lipases in order to conjugate the *quencher* with the lysine residue of the peptide substrate. The influence of the nature of the PS, the nature of the *quencher*, the distance between the peptide and the photosensitizer and the position of the PS on enzymatic activation were investigated. The peptide substrate selected GRIGFLRTAKGG is cleaved between phenylalanine (F) and leucine (L). A study of non-specific type interactions of the cleaved part of PMB containing the PS, PS-GRIGF-OH, with a cell membrane model concluded on the internalization through the membranes of these compounds.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **7**
RESUME **8**
ABSTRACT **9**
TABLE DES MATIERES **11**
LISTE DES TABLEAUX **17**
LISTE DES FIGURES **19**
LISTE DES EQUATIONS **26**
ABREVIATIONS **27**
COLLABORATIONS **35**

CHAPITRE 1 : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT) **37**
I DEFINITION **38**
I.1 LE CANCER 38
I.2 THERAPIE PHOTODYNAMIQUE POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS 40
II MECANISMES PHOTOPHYSIQUES **41**
II.1 LES REACTIONS DE TYPE I 43
II.2 LES REACTIONS DE TYPE II 43
II.3 REGULATION DE LA PRODUCTION D'OXYGENE SINGULET 45
II.3.a Quenching chimique (direct) *46*
II.3.b Quenching physique *47*
II.3.b.i Direct 47
II.3.b.ii Indirect 47
• Le *quenching* collisionnel 47
• Le *quenching* par transfert d'énergie non radiatif 48
III HISTORIQUE **49**
III.1 PS NON TÉTRAPYRROLIQUES 50
III.1.a Les molécules naturelles *50*
III.1.b Les molécules de synthèse *51*
III.2 PS TETRAPYRROLIQUES 53
III.2.a Les porphyrines et leurs dérivés *53*
III.2.a. Structures 53
III.2.a.ii Propriétés photophysiques 55
• Absorption 55
• Fluorescence et production d'oxygène singulet des porphyrines 56
• Fluorescence et production d'oxygène singulet des chlorines 56
III.2.a.iii Synthèses de porphyrine 57
• Extraction de composé naturel [71, 72] 57
• Voie I : Synthèse par condensation du pyrrole et d'aldéhyde(s) 58
• Voie II : Couplage direct d'intermédiaires dipyrroliques, la synthèse « 2+2 » 63
• Voie III : Synthèse « 3+1 » 65
III.2.a.iv Synthèses de chlorine 67
• Couplage direct d'intermédiaires dipyrroliques, la synthèse « 2+2 » 69
• Synthèse microonde 69
• Synthèse *via* une étape d'extraction d'un composé naturel 70
III.2.b Les Phtalocyanines *72*
III.2.b.i Structure 72
III.2.b.ii Propriétés photophysiques 73
• Absorption 73

• Fluorescence et production d'oxygène singulet 73
III.2.b.iii Synthèses 73
• A partir de phtalonitrile 74
• A partir d'anhydride phtalique 74
• A partir de dérivés phtalimide 75
• Synthèse sur support solide 75
III.3 PS DE 1ERE GENERATION 77
III.4 PS DE 2IEME GENERATION 78
III.5 PS CIBLES DE 3IEME GENERATION 85
III.6 PS DE 4IEME GENERATION 85

CHAPITRE 2 : LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT 87

I LE CIBLAGE ACTIF 88

I.1 CIBLAGE ACTIF DIRECT (CIBLAGE DE LA CELLULE CANCEREUSE) 88
I.1.a Les récepteurs à œstrogène 88
I.1.b Les récepteurs aux sucres : les lectines 89
I.1.c Le récepteur de l'acide folique (RAF) 90
I.1.d Les polyamines 90
I.1.e Les récepteurs couplés aux protéines G 91
I.1.e.i La bombésine 91
I.1.e.ii La somatostatine 91
I.1.f Les récepteurs de la transferrine 92
I.2 CIBLAGE ACTIF INDIRECT (CIBLAGE DE LA NEOVASCULARISATION) 92
I.2.a Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ 93
I.2.b Les récepteurs au VEGF (VEGFRs et NRPs) 93
I.2.c Le récepteur de l'EGF 94

II LE CIBLAGE PASSIF 95

II.1 LES NANOPARTICULES ORGANIQUES 96
II.1.a Les liposomes 96
II.1.b Les polymères 96
II.1.c Emulsions et micelles 97
II.1.d Les nanoplateformes de carbone 97
II.2 LES NANOPARTICULES INORGANIQUES 98
II.2.a Les puits quantiques (les quantum dots) 98
II.2.b Les nanoparticules d'oxyde de fer 99
II.2.c Les nanoparticules d'or 99
II.2.d Les nanoparticules à base de lanthanides 99
II.2.e Les nanoparticules à base de silice 100

III CONTROLE DE LA PRODUCTION D'OXYGENE SINGULET 101

III.1 PS ACTIVABLE GRACE A SON ENVIRONNEMENT 101
III.2 PS ACTIVABLE PAR PHENOMENE DE DESAGREGATION 102
III.3 *PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACONS* (PMBS) 103
III.3.a Application 103
III.3.b PS activables par ciblage d'acide nucléique 104
III.3.c Photosensibilisateurs activables par clivage enzymatique 105
III.3.d Encapsulation de PS 108
III.3.e Autre mécanisme 109

IV OBJECTIFS DE LA THESE 109

CHAPITRE 3 : PHOTOSENSIBILISATEURS CONJUGUES A L'ACIDE FOLIQUE POUR LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT 111

I RECEPTEURS DE L'ACIDE FOLIQUE : UNE CIBLE DE CHOIX POUR LES THERAPIES CIBLEES DES CARCINOMES OVARIENS 113

I.1 METASTASES PERITONEALES OVARIENNES 113
I.2 EPIDEMIOLOGIE 114
I.3 TRAITEMENTS 115
I.4 CANCER DE L'OVAIRE ET RECEPTEURS A DE L'ACIDE FOLIQUE (FRA) 117
I.4.a L'acide folique 117
I.4.b Le récepteur α de l'acide folique (FRα) 118

II ETAT DE L'ART : LES CONJUGUES DE L'ACIDE FOLIQUE EN PDT 118

III CONTEXTE DU PROJET 119

IV SYNTHESE ET ETUDE PHOTOPHYSIQUE DE PHOTOSENSIBILISATEURS CONJUGUES A L'ACIDE FOLIQUE POUR AMELIORER LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT 120

IV.1 SYNTHÈSE 120
IV.1.a Les photosensibilisateurs (PS) 122
IV.1.b Couplage avec un bras espaceur (PS-S-NHBoc et PS-S-NH_2) 123
IV.1.c Couplage avec l'acide folique 124
IV.1.d Comparaison avec un conjugué breveté (Ce6-S-FA) 124
IV.1.e Influence du couplage de plusieurs unités d'acide folique 125
IV.1.f Influence de la distance entre l'acide folique et le PS 127
IV.2 HYDROPHOBIE DES MOLÉCULES 128
IV.3 PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES 129
IV.4 DEGRADATION DES COMPOSES PS-(S)-FA 134

V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 136

CHAPITRE 4 : INTERET DE CIBLER NRP-1 POUR AMELIORER LE TRAITEMENT DU MEDULLOBLASTOME : EVALUATION D'UN NOUVEAU COMPOSE PEPTIDIQUE CONJUGUE A UNE PORPHYRINE 137

I LES TUMEURS INTRACRANIENNES 139

I.1 LE SYSTEME NERVEUX 139
I.2 EPIDEMIOLOGIE 140

II LE MEDULLOBLASTOME 142

II.1 DEFINITION ET ORIGINE 142
II.2 EPIDEMIOLOGIE 142
II.3 CELLULES SOUCHES CANCEREUSES DANS LE MEDULLOBLASTOME 142
II.4 TRAITEMENTS 143
II.5 LE MEDULLOBLASTOME ET NRP-1 145
II.5.a La neuropiline-1 (NRP-1) 145
II.5.b Le rôle de la NRP-1 dans la progression du médulloblastome 145

III SYNTHESE DU K(P1)DKPPR 146

III.1 PRESENTATION DU COMPOSE 146
III.2 GENERALITES SUR LES PEPTIDES 147
III.3 LA SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR PHASE SOLIDE (SPPS) 149
III.3.a Choix du polymère (la résine) 150
III.3.b Déprotection du Fmoc 151
III.3.c Allongement de la chaîne 151
III.3.d Capping 152

III.3.e Vérification des couplages ... *152*
III.3.f Clivage du peptide de la résine ... *152*
III.3.g Purification du peptide par HPLC ... *152*
III.4 SYNTHESE CHIMIQUE ... 152
III.5 PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES ... 154

IV EFFET DU K(P1)DKPPR SUR LES CELLULES SOUCHES DE MEDULLOBLASTOME [377] 156

IV.1 AFFINITE POUR LES NRP-1 ... 157
IV.2 LIAISON DU K(P1)DKPPR AUX CELLULES DE MEDULLOBLASTOMES ... 157
IV.3 EFFET DES COMPOSES SUR LA VIABILITE CELLULAIRE ... 158

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES ... 161

CHAPITRE 5 : NOUVEAUX PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACONS COMME AGENTS CIBLANT LES MT1-MMP POUR TRAITER LE GLIOBLASTOME MULTIFORME PAR PDT ... 163

I LE GLIOBLASTOME MULTIFORME (GRADE IV) ... 165

I.1 DEFINITION ET ORIGINE ... 165
I.2 EPIDEMIOLOGIE [392] ... 166
I.3 TRAITEMENTS ... 166

II LES MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPS) ... 171

II.1 DEFINITION ET CLASSIFICATION ... 171
II.2 STRUCTURE ... 171
II.3 ACTION DANS LA PROGRESSION TUMORALE ... 172
II.4 MEMBRANE-TYPE 1 (MMP 14) ... 175
II.5 MECANISME D'ACTION : LA COUPURE PROTEOLYTIQUE ... 175
II.6 PEPTIDES SPECIFIQUES DE LA MT1-MMP ... 177

III SYNTHESE DE NOUVEAUX PMBS COMME AGENTS DE CIBLAGE POUR LA PDT ... 180

III.1 OBJECTIF DU PROJET ... 180
III.2 LE PEPTIDE SUBSTRAT H-GRIGFLRTAKGG-OH ... 181
III.2.a Synthèse ... *181*
III.2.b Clivage enzymatique ... *182*
III.2.b.i Généralités sur les tests de clivage ... 182
III.2.b.ii Vérification du clivage du peptide substrat par les enzymes ... 182
III.2.c Conclusion ... *184*
III.3 ORDRE ET CONFORMATION DES ACIDES AMINES DANS LA SEQUENCE PEPTIDIQUE ... 184
III.3.a Synthèse des peptides ... *184*
III.3.b Clivage enzymatique ... *185*
III.3.c Conclusion ... *185*
III.4 EFFET DU COUPLAGE D'UN PS SUR LE PEPTIDE ... 186
III.4.a Synthèse des dérivés « P1-peptide » ... *186*
III.4.b Propriétés photophysiques ... *187*
III.4.c Clivage enzymatique ... *187*
III.4.d Conclusion ... *188*
III.5 INFLUENCE DE LA PLACE DU PS ... 188
III.5.a Place du PS sur la séquence peptidique ... *188*
III.5.a.i Synthèse ... 188
III.5.a.ii Propriétés photophysiques ... 189
III.5.a.iii Clivage enzymatique ... 190
III.5.a.iv Conclusion ... 190
III.5.b Introduction d'un bras espaceur (PEG) entre le PS et le peptide ... *190*
III.5.b.i Synthèse ... 191
III.5.b.ii Propriétés photophysiques ... 192
III.5.b.iii Clivage enzymatique ... 192

III.5.b.iv Conclusion 195
III.6 INFLUENCE DE LA NATURE DU PS 195
III.6.a Choix du PS 195
III.6.b Synthèse des PS 196
III.6.c Synthèse des PS-GRIGFLRTAKGG-OH 197
III.6.d Hydrophobie des PS et des dérivés PS-peptide 199
III.6.e Propriétés photophysiques des PS-GRIGFLRTAKGG-OH 199
III.6.f Clivage enzymatique 205
III.6.g Amélioration des conditions des tests de clivage 209
III.6.h Conclusion 212
III.7 LES DERIVES « PEPTIDE(*QUENCHER*) » 213
III.7.a Choix des quenchers 213
III.7.b Synthèse 214
III.7.c Hydrophobie des peptide(quencher) 216
III.7.d Clivage enzymatique 216
III.7.e Conclusion 219
III.8 LES PMB 219
III.8.a Choix des PMB synthétisés 219
III.8.b Stratégie de synthèse 220
III.8.c Hydrophobie des PMBs 224
III.8.d Propriétés photophysiques 224
III.8.e Clivage enzymatique 232
III.8.e.i Résultats dans les conditions 1 232
III.8.e.ii Résultats dans les conditions 2 232
III.8.f Conclusion et perspectives 234
III.9 STRATEGIE ORIGINALE DE SYNTHESE DES PMB : SYNTHESE ENZYMATIQUE 236
III.9.a Introduction sur la réaction d'acylation par voie enzymatique 236
III.9.a.i Choix du solvant 237
III.9.a.ii Choix des enzymes 237
III.9.a.iii Paramètres influençant l'acylation enzymatique 237
III.9.b Couplage du quencher sur la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine par voie enzymatique et comparaison avec la synthèse chimique 238
III.9.b.i Synthèse chimique 238
• Fmoc-Lys(*quencher*)-OH 238
• H-Lys(*quencher*)-OH 239
III.9.b.ii Synthèse enzymatique 243
• Etude de la solubilité des *quenchers* dans différents solvants potentiels pour les synthèses enzymatiques 243
• Etude comparative de réactions enzymatiques d'acylation avec différentes enzymes 243
• Etude de l'acylation de la lysine par BHQ-3 catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* 247
III.9.c Conclusions 251

IV PERMEABILISATION MEMBRANAIRE PAR LES DERIVES PS-GRIGF-OH 252

IV.1 INTRODUCTION 252
IV.1.a Les membranes biologiques 252
IV.1.a.i Structure 253
IV.1.a.ii Des membranes biologiques aux membranes modèles 254
IV.1.b Les vésicules lipidiques 254
IV.1.c Interaction photosensibilisateurs - membranes lipidiques 255
IV.2 MATERIELS ET METHODES 257
IV.3 RESULTATS 259
IV.3.a Etude cinétique de l'interaction des PS avec les membranes 259
IV.3.b Etude cinétique de l'interaction des PS-GRIGF-OH avec les membranes 261
IV.4 DISCUSSION ET CONCLUSION 268

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES 269

REFERENCES 271

PARTIE EXPERIMENTALE **289**

I GENERAL PROCEDURES **290**

I.1 SYNTHESIS OF PHOTOSENSITIZERS 290
I.2 SYNTHESIS OF SUCCINIMIDE ESTER PHOTOSENSITIZERS 292
I.3 SYNTHESIS OF PHOTOSENSITIZER-SPACERNHBOC DERIVATIVES 293
I.4 SYNTHESIS OF PHOTOSENSITIZER-SPACERNH_2 DERIVATIVES 295
I.5 SYNTHESIS OF PHOTOSENSITIZER-SPACER-FOLIC ACID DERIVATIVES 296
I.6 SYNTHESIS OF DIRECT LINKED TPP-FOLIC ACID 297
I.7 SYNTHESIS OF FMOC-LYS(P1)-OH 298
I.8 SYNTHESIS OF PEPTIDES 298
I.9 CONJUGATES PHOTOSENSITIZER-PEPTIDE 301
I.10 PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACON SYNTHESIS 313

II STUDIES WITH ACTIVE MMP-2, MMP-9 AND MMP-14 ..... **316**

III PHOTOPHYSICAL PROPERTIES **317**

III.1 DETERMINATION OF ABSORPTION COEFFICIENTS 317
III.2 DETERMINATION OF FLUORESCENCE AND SINGLET OXYGEN PRODUCTION QUANTUM YIELDS 317
III.3 DETERMINATION OF FLUORESCENCE AND SINGLET OXYGEN LIFETIMES 318

ANNEXES **319**

PUBLICATIONS **321**

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES **321**

POSTERS **322**

ENCADREMENT D'ETUDIANT **323**

PUBLICATIONS PARUES **325**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Temps caractéristiques des différentes transitions moléculaires [14]. 43
Tableau 2. Exemples de photosensibilisateurs appliqués cliniquement [8, 164, 165]. 81
Tableau 3. Liste des PMBs activés par clivage enzymatique, synthétisés dans la littérature, adaptée et complétée de la référence [274]. 108
Tableau 4. Stratégies utilisées dans cette thèse. 110
Tableau 5. Stades définis par la FIGO pour les cancers de l'ovaire [301]. 114
Tableau 6. Survie à cinq ans en fonction du stade du cancer de l'ovaire. 114
Tableau 7. Résumé des propriétés photophysiques des différents conjugués dans l'éthanol. $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (pour émission de fluorescence et production d'oxygène singulet) et $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (pour les durées de vie correspondantes). 130
Tableau 8. Plan d'expériences pour l'étude de la dégradation du conjugué Pyro-S-FA. 135
Tableau 9. Classification de l'OMS des tumeurs cérébrales primitives. 141
Tableau 10. Structure chimique des acides aminés naturels [366]. 148
Tableau 11. Structure chimique des protections utilisées dans cette thèse pour protéger les chaînes latérales des acides aminés [370, 371]. 150
Tableau 12. Les résines utilisées dans cette thèse pour la SPPS [369]. 151
Tableau 13. Propriétés photophysiques des composés P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-COOH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol. 154
Tableau 14. Principales caractéristiques des deux composés étudiés ciblant NRP-1. 157
Tableau 15. Nombre de cellules vivantes rapporté au nombre de cellules vivantes du témoin négatif après 72 h de contact avec les composés tuftsine, DKPPR, K(P1)DKPPR et P1. 159
Tableau 16. Thérapies ciblées pour le traitement des récidives de GBM ; exemples de molécules en essais cliniques [415]. 170
Tableau 17. Classification des MMPs [427]. 171
Tableau 18. Liste des peptides clivés par la MT1-MMP. 179
Tableau 19. Résultats des tests de clivage enzymatique pour le peptide parent. 184
Tableau 20. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les trois peptides étudiés. 185
Tableau 21. Propriétés photophysiques des dérivés PS-peptide dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm). 187
Tableau 22. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les dérivés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et P1-GGKATRLFGIRG-OH comparés à ceux des deux peptides correspondants. 187
Tableau 23. Propriétés photophysiques des dérivés synthétisés dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm). 190
Tableau 24. Influence de la place du PS sur le clivage enzymatique. 190
Tableau 25. Rendements η de synthèse des peptides et de leurs dérivés P1-peptide. 191
Tableau 26. Propriétés photophysiques des dérivés P1-PEG-peptide dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm). 192
Tableau 27. Influence de l'introduction d'un bras espaceur sur le clivage enzymatique. 195
Tableau 28. Rendements η de synthèse des dérivés PS-peptides. 198
Tableau 29. Propriétés photophysiques des dérivés PS-peptide dans l'éthanol. 200
Tableau 30. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les PS-GRIGFLRTAKGG-OH avec des PS de nature différente. 209
Tableau 31. Clivage enzymatique du Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH pour deux conditions différentes. 212
Tableau 32. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les deux peptide(*quencher*) étudiés. 218
Tableau 33. Rendements η de synthèse des PMB. 220
Tableau 34. Propriétés photophysiques des PMBs dans l'éthanol. 226
Tableau 35. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les PMBs synthétisés. 234
Tableau 36. Formules brutes et masses exactes des *quenchers* et H-Lys(*quenchers)*-OH. 243
Tableau 37. Solubilité des *quenchers* dans différents solvants 243
Tableau 38. Conditions réactionnelles pour les synthèses enzymatiques. 244

Tableau 39. Procédure pour le couplage du BHQ-3 sur le *N*-latéral de la lysine par voie enzymatique en présence d'une lipase. 247
Tableau 40. Photosensibilisateurs étudiés. 258
Tableau 41. Récapitulatif des données cinétiques de l'interaction du PS seul avec les vésicules lipidiques. 261
Tableau 42. Récapitulatif des données cinétiques de l'interaction des différents PS-GRIGF-OH avec les vésicules lipidiques. 267

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma simplifié de la différenciation cellulaire entre une cellule saine et une cellule cancéreuse, adapté de la référence [3]. 38
Figure 2. Représentation schématique du concept de la thérapie photodynamique. En PDT, il est admis que l'oxygène singulet est l'agent cytotoxique clé qui est responsable de la destruction de la tumeur [6, 7]. 40
Figure 3. Propagation de la lumière à travers les tissus d'après [8]. 41
Figure 4. Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié des processus d'une molécule photosensible et schéma explicatif de l'action photodynamique. Les phénomènes radiatifs sont indiqués par des flèches droites, les phénomènes non radiatifs par des flèches courbes. [13]. 42
Figure 5. Orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène $^3O_2$. 43
Figure 6. Structures électroniques de l'oxygène singulet. 44
Figure 7. Diagramme de Jablonski simplifié de l'oxygène. A gauche : énergies d'excitation des états excités par rapport à l'état fondamental. A droite : longueurs d'onde de luminescence. 45
Figure 8. Action de l'oxygène singulet sur le cholestérol [21] et mécanisme de la réaction « ène » avec l'oxygène singulet. 46
Figure 9. Comparaison des mécanismes des *quenchings* statique et dynamique [23]. 48
Figure 10. Transfert de l'excitation du donneur D^* vers A entre états singulets selon - le mécanisme de Förster (en vert), - le mécanisme de Dexter (en jaune). Dans l'encadré noir, l'état d'arrivée, après transfert de l'excitation : $^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ [24]. 48
Figure 11. Recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur. 49
Figure 12. Structure chimique de l'acridine. 49
Figure 13. PS non tétrapyrroliques extraits de composés naturels : hypéricine, psoralène et ses dérivés. 50
Figure 14. Structures chimiques de la curcumine. 51
Figure 15. Structure chimique du bleu de méthylène. 51
Figure 16. Structure chimique du rose de bengale. 51
Figure 17. Structure chimique de l'érythrosine. 52
Figure 18. Structure chimique de la rhodamine 123. 52
Figure 19. Structure chimique de la TBR. 52
Figure 20. A) Structures chimiques d'azabodipy ; B) Spectres d'absorption et C) Spectres d'émission de fluorescence de ces composés dans un mélange H_2O/CrEL (emulsifier Cremophor EL) ($\lambda_{exc.}$ = 630 nm) [60, 61]. 53
Figure 21. Structure des chlorophylles c1 et c2. 54
Figure 22. Numérotation et appellation des positions de la porphyrine à l'aide du noyau porphine selon l'IUPAC (the International Union of Pure and Applied Chemistry) [63]. 54
Figure 23. Structure générale d'une porphyrine base libre et d'une métalloporphyrine. 54
Figure 24. Structures chimiques des macrocycles porphyriniques. De gauche à droite : porphyrine, chlorine et bactériochlorine. 55
Figure 25. Spectres d'absorption de composés tétrapyrroliques : (A) porphyrine (rouge) et porphyrine métallée (bleu) dans le dichlorométhane [68], (B) mélange bactériochlorine + 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine TPC-COOH (orange) et TPC-COOH (vert) dans l'éthanol. [Molécules synthétisées au laboratoire par notre équipe]. 56
Figure 26. Structure de la protohémine (A), de l'hématoporphyrine IX (B), de la protoporphyrine IX (C) et de la méso-porphyrine IX (D). 57
Figure 27. Synthèse de la TPP effectuée par Rothemund. 58
Figure 28. Schéma de synthèse d'une tétraarylporphyrine suivant la méthode d'Adler et Longo. 58
Figure 29. Synthèse d'une porphyrine méso-substituée par la méthode des « aldéhydes mixtes » catalysée à l'acide propionique [77]. 59
Figure 30. Synthèse d'une porphyrine A_3B. 60

Figure 31. Mécanisme de formation d'une porphyrine A_4 : condensation entre un aldéhyde et un pyrrole suivant la méthode de Lindsey [79]. 61
Figure 32. Synthèse sur phase solide d'une porphyrine monohydroxysubstituée [78, 81]. 61
Figure 33. Synthèse de porphyrines par voie microonde (MW : *microwave*) [83, 84]. 62
Figure 34. Synthèse d'une porphyrine à partir de pyrrole-carbinol [78]. 62
Figure 35. Synthèse d'un dipyrrométhane [89]. 63
Figure 36. Schéma de synthèse d'une porphyrine par la méthode de Woodward et MacDonald. . 63
Figure 37. Schéma de synthèse de 5,15-diarylporphyrines par Ogoshi et al [92]. 64
Figure 38. Schéma de synthèse de 5,15-diarylporphyrines par Manka et Lawrence [93]. 64
Figure 39. Synthèse sur phase solide d'une porphyrine à partir de dipyrrométhanes [94]. 64
Figure 40. Formation d'un cation dipyrrométhène [95]. 65
Figure 41. Exemple de synthèse de porphyrines *via* des dipyrrométhènes [98]. 65
Figure 42. Synthèse améliorée de porphyrines *via* des dipyrrométhènes selon Paine et al. [99]. .. 65
Figure 43. Schéma de synthèse du noyau porphyrine par la méthode « 3+1 » [100]. 66
Figure 44. Synthèse de porphyrines substituées par la méthode « 3+1 » [101]. 66
Figure 45. Synthèse d'une porphyrine ABCD *via* un bilane. 67
Figure 46. Synthèse de l'octaéthylchlorine par réduction diimide de Whitlock. 67
Figure 47. Synthèse sélective d'une chlorine : la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine TPC-COOH. 68
Figure 48. Synthèse de l'octaéthyl-17-oxochlorine par Bonnett et al. [108]. 68
Figure 49. Chlorine obtenue par la réaction de carbéthoxycarbène sur l'octaéthylporphyrine. 68
Figure 50. Synthèse de chlorine à l'aide d'OsO_4 [110]. 69
Figure 51. Réduction de porphyrine en chlorine à l'aide d'hydrure de tributylétain [112]. 69
Figure 52. Synthèse de chlorine à l'aide de malonitrile en présence d'une base [113]. 69
Figure 53. Synthèse d'une chlorine à partir de pyrrométhanes [115]. 69
Figure 54. Réaction de l'étape de synthèse d'une bactériochlorine [84]. 70
Figure 55. Réaction de l'étape de synthèse d'une chlorine [84]. 70
Figure 56. Synthèse de la purpurine à partir de la chlorophylle-a [116]. 70
Figure 57. Schéma de la dégradation de la chlorophylle en pyrophéophorbide et en chlorine e6. 71
Figure 58. Composés connexes aux phtalocyanines et aux porphyrines. 72
Figure 59. Numérotation et appellation des positions de la phtalocyanine selon l'IUPAC [63] et structure d'une métallophtalocyanine. 72
Figure 60. Spectre d'absorption d'une phtalocyanine zinguée dans l'éthanol. 73
Figure 61. Synthèse de la H_2Pc. 73
Figure 62. Mécanisme de cyclisation du phtalonitrile en phtalocyanine [132]. 74
Figure 63. Synthèse d'une phtalocyanine *via* un anhydride phtalique [136]. 75
Figure 64. Synthèse d'une phtalocyanine à partir d'un dérivé phtalimide [137]. 75
Figure 65. Schéma de la 2-(6'-hydroxyhexoxy)-9,16,23-triisoproxyphtalocyanine. 76
Figure 66. Synthèse d'une phtalocyanine en phase solide [139]. 76
Figure 67. Schéma représentant la préparation de l'HpD [145]. 77
Figure 68. Structures chimiques de l'éther dihématoporphyrine (à gauche) et de l'ester de dihématoporphyrine (à droite) : les DHE. 78
Figure 69. Photosensibilisateurs de 2ième génération : le Foscan® (à gauche) et la Visudyne® (à droite). 79
Figure 70. Schéma de synthèse biologique de la protoporphyrine IX (PpIX), adapté de la référence [160]. 79
Figure 71. Structures chimiques du 5-ALA et de quelques-uns de ses dérivés esters. Les dérivés esters sont plus lipophiles que le 5-ALA ou son ester méthylique, ce qui leur permettent de traverser la membrane biologique par diffusion passive [163]. 80
Figure 72. (a) Kératose actinique avant traitement. (b) Kératose actinique, 3 jours après le traitement PDT avec ALA avec de la lumière rouge. (c) Kératose actinique, 30 jours après traitement. 80
Figure 73. Structures chimiques des composés porpyrine-œstradiol (a) et phéophorbide a-œstradiol (b) [171, 172]. 89
Figure 74. Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres [174]. 89
Figure 75. Structure chimique du conjugué porphyrine-acide folique [183]. 90

Figure 76. Structures des conjugués meso-tritolylporphyrine (gauche) et protoporphyrine IX (droite) avec les polyamines spermine et spermidine [186]. 91
Figure 77. Structure du conjugué AlPcS4-bombésine [187]. 91
Figure 78. Structure des conjugués somatostatine Ce6-[Tyr3]-octréotate [188]. 92
Figure 79. Structure chimique du composé TPC-Ahx-ATWLPPR. 94
Figure 80. Représentation schématique du ciblage tumoral avec des nanoparticules par l'intermédiaire de l'effet EPR, adaptée de la référence [213]. 95
Figure 81. Exemples de porphyrines conjuguées à des fullerènes pour la PDT [238]. 97
Figure 82. Représentation chimique du composé ZnPc-SWCNT (*Single-Walled carbon nanotubes* = nanotubes en carbone à une seule paroi) [242]. 98
Figure 83. Représentation schématique du conjugué protoporphyrine IX – nanoparticules d'or. . 99
Figure 84. Schéma de la nanoparticule en oxyde de terbium développée par Bulin et al. [251].. 100
Figure 85. Changement de rendement quantique de production d'oxygène singulet dans des solvants d'hydrophobies différentes, pour la bactériophéophorbide-a de palladium [253]. 101
Figure 86. Schéma de la micelle polymérique MPEG poly-(acides β–aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide. 102
Figure 87. Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables. 102
Figure 88. Diagramme de Jablonski simplifié du transfert d'énergie par résonance. 104
Figure 89. Activation de PS conjugués à des oligonucléotides par déplacement de l'hybridation. 104
Figure 90. Oligonucléotide d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1. 105
Figure 91. Représentation des squelettes possibles pour les photosensibilisateurs activables par clivage enzymatique *via* un peptide [274]. Le transfert d'énergie du photosensibilisateur au *quencher* est représenté par une flèche. 105
Figure 92. 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). 106
Figure 93. Schéma d'activation par clivage enzymatique d'un PMB pour la thérapie photodynamique. 107
Figure 94. Schéma du PMB utilisant le pyrophéophorbide a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPL*GV*RGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique). 107
Figure 95. Schéma des voies classiques de l'activation d'un PMB d'encapsulation. 108
Figure 96. Aptamère-photosensibilisateur (AP)-nanotube de carbone. AP : GGTTGGTGTGGTTGG-Chlorine e6 [299]. 109
Figure 97. Structures chimiques du paclitaxel, du carboplatine et du cisplatine. 115
Figure 98. Structure chimique de l'acide folique. 117
Figure 99. Structure chimique développée de la P1-PEG-FA. 119
Figure 100. Représentation schématique des systèmes synthétisés à partir d'acide folique. 120
Figure 101. Stratégie de synthèse des dérivés PS-spacer-FA (13, 14, 15). (i) NHS, DCC, CH_2Cl_2, 45 °C, 16h. (ii, a) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), THF, r.t., 18h. (ii, b) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (iii) TFA, r.t., 2h. (iv) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 24h ou 48h. 121
Figure 102. Synthèses des photosensibilisateurs P1-COOH 1 et TPC-COOH 2. (i) BF_3,OEt_2, DCM, reflux, 16h et ensuite ajout de *p*-chloranil, 60°C, 2h. (ii) *p*-TSH, K_2CO_3, pyridine, reflux, 16h. (iii) EtOAc, *o*-chloranil. 122
Figure 103. Evolution du spectre UV-Visible du brut réactionnel de la bactériochlorine en fonction de la quantité d'*o*-chloranil ajouté (volumes en µL) dans l'éthanol. 123
Figure 104. Tentative de synthèse du dérivé Ce6-S-FA. (i) EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (ii) TFA, r.t., 2h. (iii) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h. 125
Figure 105. Tentative de synthèse des dérivés PpIX-S-FA et PpIX-$(S\text{-}FA)_2$. (i) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (ii) TFA, r.t., 2h. (iii) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h. 126
Figure 106. Synthèse du composé TPP-FA (16) : acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h. 127

Figure 107. Tentative de synthèse du conjugué PSO_3H-FA. 128
Figure 108. Comparaison des temps de rétention des PS et des dérivés PS-(S)-FA. 129
Figure 109. Spectres UV-Visible des PS (A) et des conjugués PS-(S)-FA (B) dans l'éthanol (C = 4,90 x 10^{-6} mol/L). 131
Figure 110. Spectres d'émission de fluorescence des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (A_{414nm} = 0,2). 132
Figure 111. Spectres de production d'oxygène singulet (B) des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (A_{414nm} = 0,2). 132
Figure 112. Durées de vie de fluorescence des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (A_{408nm} = 0,2). 133
Figure 113. Durées de vie de production d'oxygène singulet des PS (A) et des conjugués PS-(S)-FA (B) dans EtOH, $\lambda_{exc.}$ = 415 nm (A_{415nm} = 0,2). 133
Figure 114. Réaction de dégradation des conjugués PS-S-FA et de la TPP-FA. 134
Figure 115. Schéma explicatif des différentes parties constitutives du système nerveux central (SCN) adapté de la référence [338]. 139
Figure 116. Coupe sagittale. A : IRM pondération T1 sans injection, localisation médiane. B : IRM pondération T1 avec injection, localisation médiane [344]. 142
Figure 117. Structure chimique du Vismodegib [352]. 144
Figure 118. Représentation schématique du rôle de la NRP-1 dans la croissance et la progression du médulloblastome, adapté de la référence [360]. PTCH1 (*protein patched homolog 1*), récepteurs des SHH. 146
Figure 119. Structure chimique et représentation schématique du composé K(P1)DKPPR. 147
Figure 120. (A) Structure d'un dipeptide (en rouge, la liaison amide). (B) Forme générale des acides α-aminés. (C) Isomères optiques des acides aminés dus à l'asymétrie du C_α. (D) La liaison peptidique (ou amide) ne permet pas la rotation, gardant les deux atomes C_α et les trois atomes de la liaison peptidique dans un même plan (en bleu) [365]. 147
Figure 121. Formules développées planes des groupements Fmoc (9-fluorénylmethyloxycarbonyle), tBu (tert-butyl ester) et Boc (tertio-butyloxycarbonyle), Bzl (benzoyle). 150
Figure 122. Mécanisme de déprotection d'un groupe Fmoc par utilisation de pipéridine. 151
Figure 123. Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés, par activation au HBTU. 152
Figure 124. Schéma chimique de l'étape du capping en présence d'anhydride acétique. 152
Figure 125. Préparation de la Fmoc-Lys(P1)-OH. (i) BF_3, OEt_2, DCM, reflux, 16 h. (ii) *p*-chloranile, 60°C, 2h. (iii) NHS, DCC, CH_2Cl_2, 45°C, 16 h. (iv) Fmoc-Lys-OH.HCl dilué dans un minimum de DMF, TEA, DCM, 24 h. 153
Figure 126. Synthèse du K(P1)DKPPR : (i) 20% pipéridine, DMF. (ii) Fmoc-Pro-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (iii) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (iv) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (v) Fmoc-Lys(P1)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (vi) Clivage: TFA / TIPS / H_2O (92,5/5/2,5 % vol.). 153
Figure 127. Spectres UV-Visible des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-COOH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (2,03 x 10^{-6} mol/L). 155
Figure 128. Spectres d'émission de fluorescence des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-OH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (A_{414nm} = 0,2). 155
Figure 129. Spectres d'émission d'oxygène singulet des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-OH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (A_{414nm} = 0,2). 155
Figure 130. Structures chimiques des trois composés utilisés pour les tests. 156
Figure 131. Tests ELISA sur tuftsine, DKPPR et K(P1)DKPPR. 157
Figure 132. Incorporation du K(P1)DKPPR déterminée par mesure de la fluorescence du K(P1)DKPPR après 3h d'incubation à 37°C ($\lambda_{excitation}$ = 450 nm et $\lambda_{émission}$ = 650 nm) dans les lignées DAOY et D283. 158
Figure 133. Viabilité cellulaire des cellules cultivées en médullosphères pour les lignées DAOY, D283 et D341, après 72h d'exposition des différents composés (la tuftsine, DKPPR, K(P1)DKPPR et P1-COOH) (n = 6, * $p < 0,05$ *versus* témoin négatif). 160
Figure 134. Image IRM d'un glioblastome multiforme [383]. 165

Figure 135. Anatomie histologique d'un glioblastome multiforme : sur la gauche, l'image IRM (pondérée en T1) montre la masse tumorale qui est composée de cellules tumorales collées les unes aux autres et sur la droite, l'image IRM (pondérée en T2) montre les cellules tumorales infiltrantes autour de la masse tumorale [384]. 165
Figure 136. (A) Matériel pour une neuronavigation. (B) Images préopératoires. (C) Images après intervention chirurgicale (neuronavigation) [398]. 167
Figure 137. Formule semi-développée du témozolomide. 168
Figure 138. Courbe de Kaplan-Meyer estimant la survie globale des patients atteints de glioblastome selon le traitement administré [401]. 168
Figure 139. Structure du motexafin gadolinium. 170
Figure 140. Schéma de la structure des domaines des deux types de MMP adapté de la référence [438]. 172
Figure 141. Dualité fonctionnelle des MMPs au cours de la progression tumorale. Le symbole bleu indique une activité pro-tumorale, alors que le symbole rouge indique un effet anti-tumoral. 173
Figure 142. L'angiogenèse tumorale [442]. 173
Figure 143. A) MT1-MMP humaine (en gris, domaine catalytique, résidus 114-291) entourée de molécules d'eau (*sticks* rouge et blanc) et liée à un substrat peptide (en cyan). L'ion catalytique zinc est représenté par une sphère orange [469]. B) Localisation de la MT1-MMP dans la migration cellulaire [442]. 175
Figure 144. Mécanisme réactionnel pour le clivage d'un peptide par les MMPs, adapté des références [472, 473]. 177
Figure 145. Structure chimique de la sonde fluorescente spécifique de la MT1-MMP synthétisée par Zhu et al. [476]. Cy5.5 : Cyanine 5.5 ; BHQ-3 : *Black hole quencher* – 3. 178
Figure 146. Représentation schématique du plan de ce chapitre. 180
Figure 147. Synthèse du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau. 181
Figure 148. Chromatogrammes HPLC analytique du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 183
Figure 149. Structures chimiques du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH et du *retro*-peptide H-GGKATRLFGIRG-OH. 184
Figure 150. Chromatogrammes HPLC analytique du *rétro*-peptide H-GGKATRLFGIRG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 185
Figure 151. Structures simplifiées du peptide natif et du *rétro* peptide. 186
Figure 152. Schéma de synthèse des dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) PS-COOH, HBTU, NMM, DMF, 3 jours. (iii) Clivage : TFA/TIPS/Eau. 186
Figure 153. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (ii)a Fmoc-Lys(P1)-COOH, HBTU, NMM, DMF, 5 jours. (iii) Clivage : TFA/TIPS/Eau. 189
Figure 154. Synthèse du peptide H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH et du dérivé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Fmoc-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-COOH (PEG), HBTU, NMM, DMF, 16h. (iii) P1-COOH, HBTU, NMM, DMF, 3 jours. (iv) Clivage: TFA/TIPS/Eau. 191
Figure 155. Chromatogrammes HPLC analytique du peptide H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 193
Figure 156. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose).

Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 194
Figure 157. Synthèse de la phtalocyanine Phtalo-COOH (4) : (i) K_2CO_3, DMSO, 6 jours. HCl. (ii) Li, pentanol, reflux, 15 min. (iii) CH_3COOH. (iv) $Zn(CH_3COO)_2$, DMF. 196
Figure 158. Synthèse de la porphyrine PSO_3H-COOH: (i) H_2SO_4, 120°C, 4h. 196
Figure 159. Structures chimiques de la PPIX, de la Pyro(a)-COOH et de la Ce6. 197
Figure 160. Chromatogramme HPLC du brut de la réaction de synthèse de Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH. Détection UV à 415 nm. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau +0,1% TFA). 198
Figure 161. Comparaison des temps de rétention des PS et des dérivés PS-peptide. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 199
Figure 162. Spectres UV-Visible des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même concentration (C = 4,9 x 10^{-6} mol/L) dans l'éthanol. 201
Figure 163. Spectres d'émission de fluorescence des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même absorbance ($A_{\lambda exc.}$ = 0,2) dans l'éthanol. 202
Figure 164. Spectres d'émission de production d'oxygène singulet des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même absorbance ($A_{\lambda exc.}$ = 0,2) dans l'éthanol. 203
Figure 165. Durées de vie de fluorescence des conjugués PS-GRIGFLRTAKGG-OH dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (A_{408nm} = 0,2). 204
Figure 166. Durées de vie de production d'oxygène singulet des PS-GRIGFLRTAKGG-OH dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 415 nm (A_{415nm} = 0,2). 204
Figure 167. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 205
Figure 168. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 206
Figure 169. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 435 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 207
Figure 170. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr2) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 400 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 208
Figure 171. Clivage enzymatique pour différentes concentrations de départ en PS-GRIGFLRTAKGG-OH et une concentration en MMP constante. (Détection en fluorescence). 210
Figure 172. Clivage enzymatique pour différentes concentrations en MMP-9 et une concentration en Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH constante et égale à 15 µM. 210
Figure 173. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (15 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 211
Figure 174. Recouvrement des spectres d'émission de fluorescence des PS étudiés par les spectres d'absorption des *quenchers* (BBQ650 et BHQ-3) dans l'éthanol. 213
Figure 175. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (ii)a Fmoc-Lys(BBQ)-COOH, HBTU, NMM, DMF, 7 jours. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau. 214
Figure 176. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH. (i) Clivage: DCM/TFE/Acide acétique. (ii) Déprotection du Mtt : 3% TFA et 5% TIPS dans du CH_2Cl_2. (iii) BHQ-3-NHS, DMSO avec 2% de DIPEA, 16 h, sous N_2. (iv) Suppression des dernières protections : 95 % TFA, 5% TIPS. (v) Déprotection du Fmoc : NMM/DMF (1/1, v/v). 215

Figure 177. Comparaison des temps de rétention des *quenchers* et peptide(*quencher*). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 216
Figure 178. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé H-GRIGFLRTAK(BBQ)-OH (100 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA)..... 217
Figure 179. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (100 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA)..... 218
Figure 180. Synthèse du PMB1. (i) Déprotection du groupe Fmoc : 20% pipéridine dans de la DMF. (ii) P1-COOH, HBTU, NMM, DMF. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau. 222
Figure 181. Synthèse des PMBs 2-4 et 6. (i) Déprotection du groupe Fmoc : 20% pipéridine dans de la DMF. (ii)a Fmoc-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-COOH (PEG), HBTU, NMM, DMF, 16h. (ii) PS-COOH, HBTU, NMM, DMF. (iii) Clivage: DCM/TFE/acide acétique. (iv) Déprotection du groupe Mtt : 3% TFA, 5% TIPS, DCM. (v) Couplage du *Quencher*-NHS, DMSO avec 2% de DIPEA, N_2. (vi) Suppression des dernières protections : 95 % TFA, 5% TIPS..... 223
Figure 182. Comparaison des temps de rétention des PS, PS-GRIGF-OH et des PMBs. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 224
Figure 183. Spectres UV-Visible à la même concentration dans l'éthanol..... 227
Figure 184. Spectres d'émission de fluorescence à la même absorbance dans l'éthanol. 228
Figure 185. Spectres d'émission d'oxygène singulet. 229
Figure 186. Durées de vie de fluorescence (λ_{exc} = 408 nm, C = 1 x 10^{-6} mol/L)..... 230
Figure 187. Durées de vie d'oxygène singulet (λ_{exc} = 408 nm, C = 1 x 10^{-6} mol/L). 231
Figure 188. Chromatogrammes HPLC analytique des PMB2 (en bleu) et PMB3 (en rouge) (15 µM) après ajout de MMP-2 (A), MMP-9 (B) et MMP-14 (C). Détection UV-Visible (λ = 415 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA). 233
Figure 189. Réaction de couplage du *quencher* sur la fonction amine latérale de la lysine par voie enzymatique (*quenchers* : BBQ-650 et du BHQ-3). 236
Figure 190. Synthèse chimique du composé Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH : (i) Fmoc-Lys-OH. HCl (DMF), TEA, CH_2Cl_2, 24h. 238
Figure 191. Spectre de masse du Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH. 239
Figure 192. Déprotection du groupement Fmoc pour obtenir le composé H-Lys(*quencher*)-OH. 239
Figure 193. Résultats obtenus par spectrométrie de masse pour H-Lys(BBQ)-OH obtenus par synthèse chimique. 241
Figure 194. Résultats obtenus par spectrométrie de masse pour H-Lys(BHQ-3)-OH obtenus par synthèse chimique. 242
Figure 195. Spectre MS (A) et comparaison des spectres MS/MS de H-Lys(BBQ)-OH (masse isolée 745,50) obtenue (B) par synthèse chimique et (C) par voie enzymatique..... 245
Figure 196. Suivi par spectrométrie de masse MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50). 246
Figure 197. Suivis MS (A) de BHQ-3 et (B) de H-Lys(BHQ-3)-OH lors de la réaction de couplage du BHQ-3 avec la lysine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans M_2B_2 en présence ou non de TEA. 248
Figure 198. Suivi MS de BHQ-3 à t = 0h pour les trois concentrations utilisées..... 248
Figure 199. Suivi MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50). (A) Référence synthétisée chimiquement. (B à E) Composés synthétisés par voie enzymatique, à différents temps (t) de réaction pour un rapport molaire Lysine : BHQ-3 : 1 : 1/2. 249
Figure 200. Suivis MS/MS de (A) BHQ-3 (masse isolée 547,50) et (B) H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50) pour trois différents rapports molaires Lysine : BHQ-3 : 1 : 1/2, 1 : 1/5 et 1 : 1/10, lors de la réaction de couplage du BHQ-3 avec la lysine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans M_2B_2 en présence de TEA. 250
Figure 201. Suivi MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50) pour les trois concentrations utilisées en BHQ-3. 250

Figure 202. Représentation schématique d'une membrane biologique. La membrane est composée de deux feuillets lipidiques auxquels sont associés des protéines membranaires [521]. 252
Figure 203. Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes. 253
Figure 204. Structure chimique des lipides les plus représentés dans les membranes biologiques. (a) phosphatidylcholine, (b) sphingomyéline, (c) cholestérol. 253
Figure 205: a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue [528]. 254
Figure 206. Représentation schématique de la cinétique par diffusion passive d'un PS amphiphile avec les vésicules lipidiques. 256
Figure 207. Spectres d'émission de fluorescence de la P1-COOH (5,61 x 10^{-7} M) dans le PBS ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm) en fonction de la concentration en lipides. 256
Figure 208. Structure du phospholipide 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. 257
Figure 209. Intensité de fluorescence à 653 nm du P1-COOH ([P1-COOH] = 2,8 x 10^{-7} M) et à 676 nm du Pyro(a)-COOH ([Pyro(a)-COOH] = 3,1 x 10^{-7} M) en fonction du temps, pour trois concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm). 260
Figure 210. Constantes de vitesses k_1 et k_2 en fonction de la concentration en lipides (A) pour P1-COOH (B) pour Pyro(a)-COOH. 261
Figure 211. Intensité de fluorescence : à 653 nm du P1-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), à 653 nm du P1-PEG-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), et à 676 nm du Pyro(a)-GRIGF-OH (3,1 x 10^{-7} M et 1,3 x 10^{-7} M) - en fonction du temps, pour différentes concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm). 262
Figure 212. Evolution de la fluorescence - à 653 nm du P1-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), à 653 nm du P1-PEG-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), et à 676 nm du Pyro(a)-GRIGF-OH (3,1 x 10^{-7} M) - en fonction du temps, pour différentes concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm). 263
Figure 213. Représentation schématique de la cinétique d'un PS-GRIGF-OH avec les vésicules lipidiques. 264
Figure 214. Evolution des constantes de vitesses k_{as} et k_{dis} en fonction de la concentration en lipides pour P1-GRIGF-OH, pour P1-PEG-GRIGF-OH et pour Pyro(a)-GRIGF-OH. 267

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1. Réactions photochimiques primaires, d'après les références [14-16]. 43
Équation 2. Réactions photochimiques primaires, d'après la référence [14]. 43
Équation 3. Réaction de transfert d'énergie du photosensibilisateur au dioxygène. 44
Équation 4. Formule du rendement quantique de production d'oxygène singulet. 44
Équation 5. Réactions de formation de l'oxygène singulet et *quenching* des états excités. F = fluorescence ; P = phosphorescence ; nr = désactivation non-radiative ; Q = *quencher* ; O2 = dioxygène ; S = substrat. 46
Équation 6. Réaction de *quenching* chimique de l'oxygène singulet [15a]. 46
Équation 7. Réaction de *quenching* physique de l'oxygène singulet [15a]. 47
Équation 8. Résumé des processus d'inhibition du β-carotène par Foote et al. [15b]. 47
Équation 9. Formule du rayon de Förster. 49
Équation 10. Formule pour obtenir J(λ), recouvrement spectral entre émission de D et absorption de A [25]. 49

ABREVIATIONS

$\lambda_{émi.}$	Longueur d'onde d'émission
$\lambda_{exc.}$	Longueur d'onde d'excitation
ε	Coefficient d'extinction molaire
ϕ_{Δ}	Rendement quantique de formation d'oxygène singulet
ϕ_F	Rendement quantique de fluorescence
ν	Fréquence d'une onde (Hz)
°C	Degrés Celsius
$^1O_2$	Oxygène singulet
Δ	Chauffage
τ_{Δ}	Durées de vie de production de l'$^1O_2$
τ_F	Durées de vie de fluorescence
A	Accepteur ou Absorbance
AA	Acide Aminé
Ac	Acétyle
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACN	ACétoNitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF ou FA	Acide Folique ou *Folic acid* (en anglais)
AHP	2-Amino-4-HydroxyPtéridine
Ahx	Acide aminohexanoïque
AIBN	Azobiisobutyronitrile
Ala (A)	Alanine
ALA	Acide 5-minolévulinique
$AlPcS_4$	Phtalocyanine d'aluminium tétrasulfonée
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AP	Aptamère
APAB	Acide *P*-AminoBenzoïque
APC	Acide 6-Ptérine Carboxylique
APG	Acide *P*-aminobenzoyl-L-Glutamique
Ar	Aryle
ARC	Association pour la Recherche sur le Cancer
Arg (R)	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
as	Association
Asn (N)	Asparagine
Asp (D)	Acide aspartique
ATNBS	Acide TriNitroBenzèneSulfonique
BAL	Butyl ester
BBQ650	*Black Berry Quencher 650*
BCA	Bactériochlorine-a
BChl	Bactériochlorophyle
BCl_3	Trichlorure de Bore
$BF_3.OEt_2$	Trifluorure de Bore éthérate
BHQ-3	*Black Hole Quencher 3*
Bn	Benzyl
Boc	*Tert*-butyloxycarbonyle
BOPP	*Boronated Porphyrin*
BPD	BenzoPorphyrine Dérivée

BPD-MA	Dérivé de BenzoPorphyrine mono acide cycle A
Br_2	Dibrome
BRET	*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
BuOH	Butanol
Bu_3SnH	Hydrure de tributylétain
Bu^n	*n*-Butyl
Bu^t	*Tert*-butyl
Bzl	Benzoyle
C	Concentration (mol.L-1)
CBTRUS	*Central Brain Tumor Registry of the United States*
CdTe	Tellurure de cadmium
CE	Cellule endothéliale
Ce6	Chlorine e6
$CHCl_3$	Chloroforme
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
CHIP	Chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale
CH_3ONa	Méthanolate de sodium
CI	Conversion Interne
CIP	Cahn-Ingold et Prelog
CIRC	Centre Internationale de Recherche sur le Cancer
CIS	Conversion Inter Système
CMR	Cremophor®
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
COSY	*Correlation Spectroscopy*
CP	Carcinose Péritonéale
CRAN	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
Cy5.5	Cyanine 5.5
Cys (C)	Cystéine
D	Donneur
D_2O	Oxyde de deutérium
Da	Dalton
DBU	1,8-DiazaBicyclo[5.4.0]Undéc-7-ène
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
DCM	DiChloroMéthane
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-DicyanoQuinone
DHE	*DiHematoporphyrin Ether and Ester*
DIPEA	*N*,*N*-DiIsoPropylEthylAmine
dis	Dissociation
DL_{50}	Dose Létale médiane : indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance ; cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) ou provoquant une modification du paramètre suivi de 50% sur une lignée cellulaire dans des conditions d'expérimentation précises.
DMAE	DiMéthylAminoEthanol
DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
DMF	*N*,*N*-DiMéthylFormamide
DMPC	DiMyristoyl PhosphatidylCholine
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNET	Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique
DO	Densité Optique
DOPC	DiOleoylPhosphatidyl Choline

DPBF	1,3 DiPhénylisoBenzoFuran
DPPC	DiPalmitoylPhosphatidyl-Choline
EAL	Ethyl ester
EDC	1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	Récepteurs à l'EGF
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
EPR	*Enhanced Permeation and Retention effect*
EtOH	Ethanol
F_D	Spectre d'émission du donneur
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FH_4	Tétrahydrofolate
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie Obstétique
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fmoc	9-Fluorénylméthyloxycarbonyle
FPT	6-FormylPTérine
FR	Récepteur à l'acide folique (*folate receptor*)
FRET	*Förster Resonance Energy Transfer*
GBM	Glioblastome multiforme
GLI	*Glioma Associated Oncogene*
Gln (Q)	Glutamine
Glu (E)	Acide Glutamique
Gly (G)	Glycine
GPI	*Glycosyl PhosphatidylInositol*
GRP	Gastrin-Releasing Peptide
GUV	Vésicules Unilamellaires Géantes
h	Heure
H_2O	Eau
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
H_2S	Hydrogène sulfuré
H_2SO_4	Acide sulfurique
HAL	Hexyl ester
HBTU	Hexafluorophosphate de *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium
HCHO	Formaldéhyde
HCl	Acide chlorhydrique
HCO_2H	Acide formique
His (H)	Histidine
HpD	*Hematoporphyrin Derivative*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
H_3PO_4	Acide phosphorique
HPPH	2-(1-Héxyloxyéthyl)-2-devinyl pyrophéophorbide-a
HSV	*Herpes simplex virus*
HUVEC	*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*
Hy	Hypéricine
I_{f0}	Intensité de fluorescence d'une référence
I_f	Intensité de fluorescence d'une molécule
I_0	Intensité de luminescence d'une référence
I	Intensité de luminescence
IC_{50}	Concentration Inhibitrice médiane : mesure de l'efficacité d'un composé pour inhiber une fonction biologique spécifique, cette mesure quantitative

	indique quelle quantité de ce composé est nécéssaire pour inhiber à moitié le processus biologique.
ICG	IndoCyanine Green
IDL	Intervalle Drogue-Lumière
IGF	*Insulin-Like Growth Factor* (facteur de croissance de type insuline)
IL	InterLeukine
Ile (I)	Isoleucine
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J(λ)	Recouvrement spectral entre émission de D (donneur) et A (accepteur)
k	Constante de vitesse
K_2CO_3	Carbonate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
KO^tBu	*Tert*-butylate de potassium
LASER	*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
LCMS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)
LCPM	Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
LDL	*Low Density Lipoprotein*
Leu (L)	Leucine
Li	Lithium
$LiAlH_4$	Tétrahydruroaluminate de lithium
Lip	Lipide
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
Lys (K)	Lysine
LUV	Grandes vésicules unilamellaires
M	$mol.L^{-1}$
M_2B_2	2-Méthyl-2-Butanol
min	Minute
***m*-THPC**	Méso -TétraHydroxyPhénylChlorine (Foscan®)
***m*-TPP**	Méso-TétraPhénylPorphyrine
***m*-TPPPL**	Méso-TétraPhénylPorPholactol
MAL	Méthyl ester
MB	Bleu de Méthylène
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MeOH	Méthanol
Met (M)	Méthionine
Mg	Magnésium
MGd	*Motexafin gadolinium*
MMP	Métalloprotéinase matricielle
Mn	Manganèse
MT-MMP	MMP de type membranaire
Mtt	4-Méthyltrityl
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
MUV	Vésicules multilamellaires
MW	*MicroWaves* = microondes
n	Indice de réfraction ou nombre de moles
n_0	Indice de réfraction d'une référence
N_2	Azote

$NaBH_4$	Tétrahydruroborate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NIR	Proche infra rouge
$(NH_4)_2MoO_4$	*Ammonium molybtate*
NH_4Cl	Chlorure d'ammonium
NHS	*N*-HydroxySuccinimide
nm	Nanomètre
NMM	*N*-MéthylMorpholine
NMP	*N*-MéthylPyrrolidone
NOESY	*Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY*
NP	NanoParticule
NRP	NeuRoPiline
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORMOSIL	*Organically Modified Silica*
OsO_4	Tétraoxyde d'osmium
[Ox]	Oxydant
***p*-TSH**	*Para*-ToluèneSulfonylHydrazine
P1-COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
P1-NHS	5-(4-succinimidephényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
PAL	Pentyl ester
PAT	*Polyamine transport system*
Pbf	2,2,4,6,7-Pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle
PBS	Tampon salin phosphate
PCI	Internalisation PhotoChimique
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PDGF	*Platelet Derived Growth Factor*
PDT	Thérapie Photodynamique (*PhotoDynamic Therapy*)
PEG	PolyEthylène Glycol
Ph	Phényl
pH	potentiel Hydrogène
PhCHO	Diphénylphosphine
Phe (F)	Phénylalanine
Phtalo-COOH	2-(4-carboxyphénoxy) phtalocyanine de zinc
PIGF	*Placental Growth Factor*
PLA	Poly(DL-Lactide)
PLGA	Poly(DL-Lactide-coGlycolide)
pm	picomètre
PMB	*Photodynamic Molecular Beacon*
PNET	Tumeurs neuroectodermiques primitives
PpIX	Protoporphyrine IX
Pr^iOH	Alcool isopropylique
Pro (P)	Proline
PS	PhotoSensibilisateur
PSO_3H-COOH	5-phényl-10,15,20-tris(4-sulfo)phénylporphyrine
PTCH1	*Protein PatChed Homolog 1*
Pyro(a)-COOH	Pyrophéophorbide-a
Q	*Quencher*
QD	*Quantum Dots*
Q_x	Bande du spectre d'absorption d'un photosensibilisateur
rt	*Room Temperature*, température ambiante
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G

RE	Récepteurs des oestrogènes
RGD	Séquence peptidique H-Arg-Gly-Asp-OH
RLuc8	*Renilla luciferase 8*
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	*Reactives oxygen species*
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
RX	Rayon X
s	Seconde
S_0	Etat fondamental singulet
S_1	Premier état excité singulet
S_n	Nième état singulet excité
Ser (S)	Sérine
SHH	Sonic HedgeHog
Si-C18	Silice greffée avec des chaînes à 18 carbones
SMO	*Smoothened* (protéine)
SNC	Système Nerveux Central
SPPS	Synthèse Peptidique sur Phase Solide
SRP	*Small Rigid Plateforms*
SST	Récepteurs de la somatostatine
SUV	Petites vésicules unilamellaires
SWCNT	*Single-Walled carbon nanotubes* = nanotubes en carbone à une seule paroi
T_1	Premier état triplet excité
T_n	Nième état excité triplet
T_{amb}	Température ambiante
tBu	*Tertio*-butyle
TBR	TétraBromo Rhodamine 123
TCSPC	*Time Correlated Single Photon Counting*
TEA	TriEthylAmine
TEOA	TriEthyl OrthoAcétate
TFA	Acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-TriFluoroEthanol
TGA	Acide thioglycolique
TGF-β	*Transforming Growth Factor beta*
THF	Tétrahydrofurane
Thr (T)	Thréonine
TIPS	TriIsoPropylSilane
TOCSY	*Total Correlation spectroscopy*
TPC-COOH	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine
TPP	TétraPhénylPorphyrine
TPP-NH_2	5-(4-aminophényl)-10,15,20-(triphényl)porphyrine
Trp (W)	Tryptophane
TsOH	Acide *p*-toluènesulfonique
Tyr (Y)	Tyrosine
u.a	Unité arbitraire
UCNP	*Lanthanide-doped up-conversion nanoparticles*
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	UltraViolet
UVA	UltraViolet A (320 nm - 400 nm)
UVB	UltraViolet B (280 - 320 nm)
v/v	Composition en volumes d'un mélange
Val (V)	Valine

VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR	*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
Vis	Domaine du visible situé entre 400 nm et 800 nm
VTP	*Vascular Targeted Photodynamic therapy*
W	Watt
WNT	Voie Wingless
$Zn(OAc)_2$	Acétate de zinc
ZnPc	Phtalocyanine de zinc

COLLABORATIONS

Laboratoire	Personnel
LRGP **Nancy** **(UMR 7274)**	Céline Frochot (DR) Isabelle Chevalot (Pr) Jean-Claude André (DR) Francis Baros (CR) Ludovic Colombeau (Pdoc) Aymeric Sève (D) Gulim Jetpisbayeva (MS) Bauyrzhan Myrzakhmetov (MS) Florent Le Guern (MS) Esme Meledje (MS) Mathilde Lobry (MS) Romain Walck (MS)
LCPM **Nancy** **(UMR 7375)**	Régis Vanderesse (CR) Samir Acherar (MdC) Mathilde Achard (T) Amirah Mohd Gazzali (D)
CRAN **Vandœuvre-lès-Nancy** **(UMR 7039)**	Cedric Boura (MdC) Thierry Bastogne (MdC) Muriel Barberi-Heyob (Pr) Julie Valduga (MS)
INSERM **Lille** **(U1189)**	Serge Mordon (Pr) Henri Azaïs (D) Soraya Khodja-Bach (MS) Alfred Bassil (MS)
MEDyC **Reims** **(UMR 7369)**	Jérôme Devy (MdC) Nicolas Etique (MdC) Carine Chaintreuil (IE)
ICMUB **Dijon** **(UMR 6302)**	Claude Gros (Pr) Nicolas Desbois (MdC) Clément Michelin (D)
Laboratoire Jean Perrin **UPMC, Paris** **(UMR 8237)**	Stéphanie Bonneau (MdC) Franck Sureau (CR) Aurélien Bour (D)
University of Padova **Italie**	Giulio Jori (Pr)

CR : chargé de recherche ; D : doctorant ; DR : directeur de recherche ; IE : ingénieur d'étude ; MdC : maitre de conférence ; MS : élève de master ; Pr : professeur ; Pdoc : Post-doctorant.

CHAPITRE 1

LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)

I DEFINITION

I.1 Le cancer

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. Lancée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'étude Globocan 2008 a enregistré 12,7 millions de nouveaux cas de cancer et 7,6 millions de décès dans le monde en 2008, soit environ 13% de la mortalité mondiale (IARC 2010). D'après les prédictions, la mortalité due au cancer va continuer d'augmenter pour dépasser, selon les estimations, 13,1 millions de décès en 2030 dans le monde [1, 2].

Le cancer est une maladie qui affecte la croissance et la division cellulaire normales de certaines cellules de l'organisme. Les cellules sont les unités constitutives de tous les organes et tissus de l'organisme. Une cellule dite normale a un cycle de vie bien défini qui est composé de plusieurs phases de croissance dans lesquelles la cellule commence par grossir et dupliquer son matériel génétique (interphase). Dans la seconde phase, celle-ci se divise (mitose) pour donner naissance à deux cellules filles identiques (dans le cas de la mitose). Les cellules filles ainsi obtenues reproduiront ce cycle, et ainsi de suite. Enfin, une cellule normale a constamment besoin que le corps lui confirme son utilité, aux moyens de facteurs de croissance. La perte de ces signaux peut déclencher un processus apoptotique, engendrant la mort programmée de la cellule. Si les cellules filles formées ont une fonction précise dans l'organisme, elles vont se développer et atteindre la taille de la cellule mère. L'organisme assure un contrôle strict de la division cellulaire et de l'apoptose ; cependant, pour diverses raisons complexes, il arrive qu'une cellule spécifique échappe aux contrôles de notre organisme. Ce phénomène est rare et va entraîner une multiplication anarchique de cellules, appelée tumeur (Figure 1).

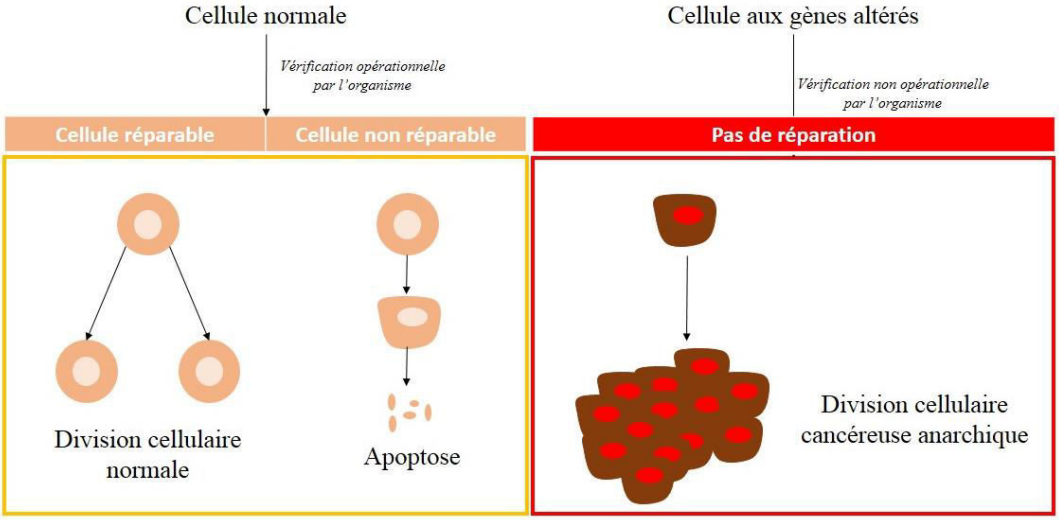


Figure 1. Schéma simplifié de la différenciation cellulaire entre une cellule saine et une cellule cancéreuse, adapté de la référence [3].

Une tumeur est qualifiée de **bénigne** si les cellules qui la composent gardent les propriétés du tissu normal et se montrent incapables d'envahir d'autres tissus. A l'inverse, une tumeur **maligne** présente non seulement des cellules dont la taille, la forme et la structure sont différentes de celles du tissu d'origine mais surtout, elles se détachent de leur lieu de naissance et migrent vers d'autres organes [3].
Il existe plusieurs types de cancers, qui sont déterminés en fonction de l'histologie, c'est-à-dire la nature du tissu dans lequel ils se développent. La classification de ces cancers différencie (1) les tumeurs solides et (2) les tumeurs des cellules sanguines. Les tumeurs solides, caractérisées par une

masse individualisée, sont distinguées des cancers atteignant des cellules sanguines, qui sont diffuses dans l'organisme et principalement présentes dans la moelle osseuse ou le sang. La majorité des cancers sont des tumeurs solides [4]. Ainsi, on distingue :

1) **- les carcinomes** : les cellules cancéreuses apparaissent dans un épithélium, c'est-à-dire un tissu recouvrant les surfaces internes (tissu de revêtement des organes) ou externes (épiderme par exemple). Dans cette famille, on distingue les adénocarcinomes qui se développent à partir de l'épithélium d'une glande telle que le sein et la prostate,
   - les sarcomes : les cellules cancéreuses apparaissent dans un tissu « de support » comme les os, la graisse ou les muscles. On parle d'ostéosarcomes (sarcomes des os), de liposarcomes (sarcomes des tissus graisseux) et de rhabdomyosarcomes (sarcomes des muscles striés),
2) **- les cancers hématopoïétiques** : le cancer affecte le sang ou les organes lymphoïdes, organes dans lesquels certaines cellules du sang acquièrent leur fonction. C'est le cas, par exemple, des leucémies et des lymphomes.

Il existe presque autant de cancers que de tissus dans l'organisme. Certains sont toutefois plus fréquents que d'autres [5].

Le traitement du cancer est adapté en fonction de chaque situation. En effet, chaque patient atteint d'un cancer est un cas particulier et demande une prise en charge appropriée.
Le choix d'un traitement ou d'une combinaison de traitements dépend de plusieurs facteurs dont les plus importants sont :

- le type de cancer,
- le degré d'extension du cancer,
- la présence d'éventuelles autres maladies,
- l'âge de la personne,
- le pays,
- l'état général de la personne.

De nos jours, pour traiter les cancers, les trois stratégies les plus couramment utilisées sont :

- L'exérèse qui consiste à enlever la masse tumorale par un procédé chirurgical,
- La radiothérapie qui, par des rayons X, permet d'irradier la masse tumorale pour induire une mort cellulaire localisée au niveau de la tumeur,
- Les traitements chimiques ou chimiothérapie pour lesquels on injecte au patient des molécules chimiques (le plus souvent par voie intraveineuse) afin de détruire préférentiellement les cellules à croissance anarchique par accumulation de ces molécules à leur niveau.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à l'un des traitements chimiques parmi la totalité de ceux-ci, qui sont classés en fonction du type de molécule chimique utilisée [15] :
- Les molécules anti-métaboliques,
- Les molécules qui inhibent l'action hormonale,
- Les molécules qui agissent par l'intermédiaire d'espèces radicalaires, **les photosensibilisateurs et la PDT,**
- Les agents d'alkylation de l'ADN,
- Les agents alkylants et non-alkylants qui interagissent avec la partie « *Minor Groove* » de l'ADN,
- Les molécules d'intercalation dans l'ADN et inhibitrices de la topoisomérase,
- Les molécules de ciblage des tubulines et des microtubules,
- Les molécules qui inhibent les signaux favorisant le développement et la croissance des cellules tumorales.

La famille qui nous importe est celle des molécules agissant par l'intermédiaire d'espèces radicalaires ; cette famille est composée de deux types de molécules : celles générant des espèces radicalaires et/ou des espèces réactives de l'oxygène *in situ* par réaction chimique et celles nécessitant une excitation lumineuse pour agir, les photosensibilisateurs.
Nous nous intéresserons uniquement aux photosensibilisateurs et à leur utilisation en thérapie photodynamique.

I.2 Thérapie photodynamique pour le traitement des cancers

La thérapie photodynamique (PDT) est une technique de traitement de certains types de cancer basée sur l'association d'un photosensibilisateur (PS), de lumière et d'oxygène ayant pour objectif la mort des cellules tumorales grâce à leur sensibilisation photochimique.

Excepté en dermatologie, le photosensibilisateur est injecté majoritairement par voie intraveineuse et se concentre plus ou moins sélectivement au niveau des cellules tumorales. Son irradiation par une lumière de longueur d'onde appropriée conduit à la nécrose ou l'apoptose de ces cellules cancéreuses. En effet, l'action de la lumière sur le photosensibilisateur va entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène dont l'oxygène singulet $^1O_2$, molécule très réactive vis-à-vis des composants cellulaires et donc très toxique (Figure 2).

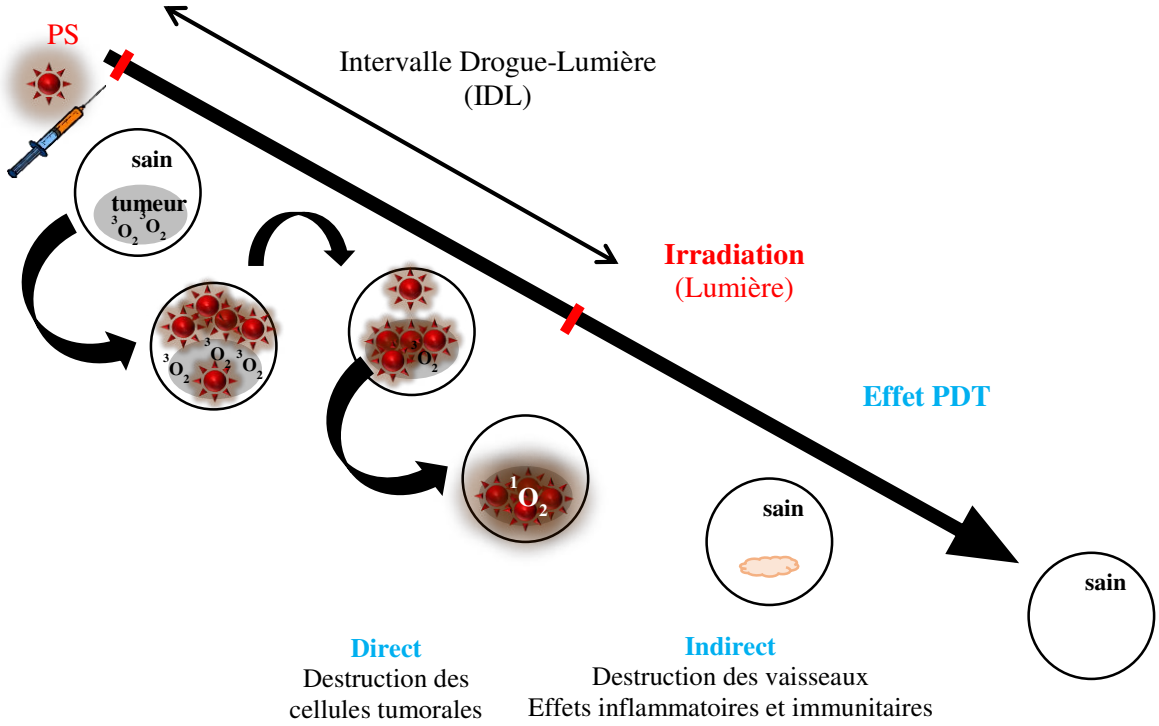


Figure 2. Représentation schématique du concept de la thérapie photodynamique. En PDT, il est admis que l'oxygène singulet est l'agent cytotoxique clé qui est responsable de la destruction de la tumeur [6, 7].

L'effet PDT repose sur l'activation d'une molécule par l'absorption d'un photon à la bonne longueur d'onde ; or, *in vivo*, le photosensibilisateur va entrer en compétition avec les constituants du sang et des tissus qui, eux même, absorbent dans le visible et le proche infrarouge. 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'hémoglobine ou la mélanine, absorbent fortement jusqu'à 600 nm. Pour une pénétration profonde de la lumière dans les tissus, les composés utilisés pour la PDT doivent donc absorber dans une zone de moindre absorbance des composés endogènes, d'où la notion de « fenêtre thérapeutique » : zone d'absorption, située entre 650 nm et 900 nm environ, où les composés endogènes absorbent le moins et où l'énergie est suffisante pour produire l'oxygène singulet (Figure 3).

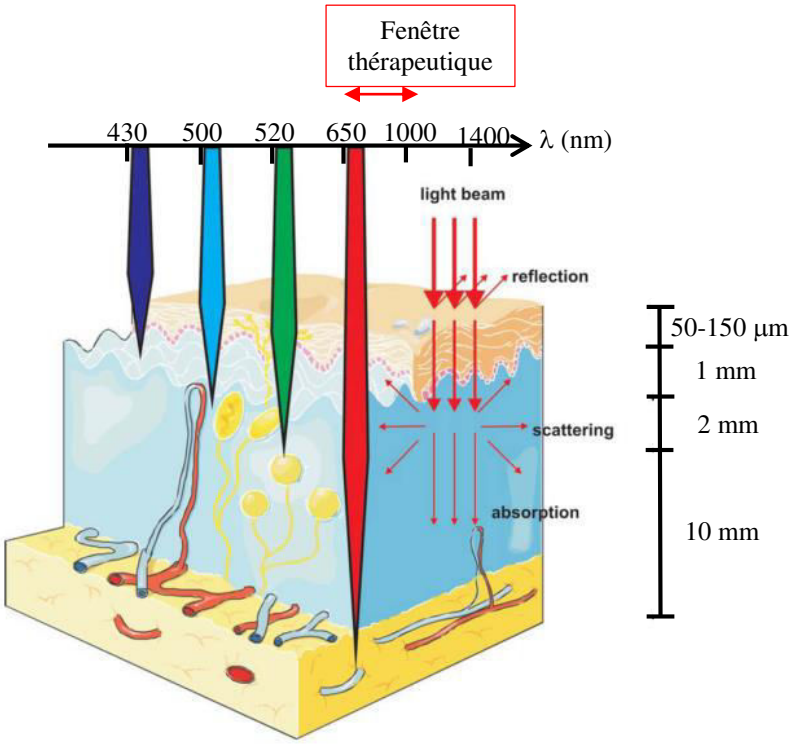


Figure 3. Propagation de la lumière à travers les tissus d'après [8].

Cependant, la lumière rouge pénètre à une profondeur supérieure aux lumières bleue et verte, et n'est pas toujours conseillée en PDT. En effet, pour les cancers superficiels tels que le cancer de la peau, la lumière bleue peut être utilisée. En dermatologie, le Levulan® (acide aminolévulinique à 20 %), activé par une source de lumière bleue, de longueur d'onde 417 nm, est indiqué pour les kératoses actiniques [9]. Dans le cas des cancers de l'œsophage et des bronches, l'utilisation de la lumière rouge en PDT peut occasionner la perforation de la paroi et/ou des fistules (une fistule, désigne un canal anormal qui relie un organe à un autre, entraînant la circulation de liquides dans un organe auquel ils ne sont pas destinés) [10]. De nombreuses études cliniques sont menées pour l'utilisation d'une longueur d'onde moins pénétrante (514 nm) pour le traitement de ces cancers. L'efficacité et la tolérance de la thérapie photodynamique avec la lumière verte et un photosensibilisateur, la témoporfine ou *m*-tétrahydroxyphényl chlorine peut éradiquer des lésions néoplasiques à un stade précoce de l'œsophage de Barrett et peut être proposé comme traitement [11]. En conclusion, le choix de la longueur d'onde à appliquer au PS dépend en premier lieu, du type de cancer traité.

II MECANISMES PHOTOPHYSIQUES

La section suivante va aborder les phénomènes photophysiques produits lors de l'effet photodynamique. L'ensemble de ces phénomènes est résumé dans le digramme de Perrin-Jablonski (Figure 4) [12]. Les réactions photodynamiques nécessitent la présence simultanée d'un photosensibilisateur, de la lumière à une longueur d'onde appropriée et d'oxygène. Un photosensibilisateur dans son état normal est caractérisé par une paire d'électrons avec un spin total S égal à 0 et une multiplicité de 1. Cette configuration est appelée **état singulet** et la configuration où tous les électrons sont dans l'orbitale d'énergie la plus faible est appelée état fondamental ($^1PS_0$). Lorsque le photosensibilisateur dans son état fondamental ($^1PS_0$) **absorbe** un photon, il passe à un niveau d'énergie **singulet excité** (^1PS_x, x = 1, 2, 3…, selon l'énergie transférée). Par une succession de relaxations vibrationnelles (**conversions internes**, CI), le PS revient à l'état excité de plus bas niveau d'énergie ($^1PS_1$). Des processus peuvent ensuite le ramener à son état singulet fondamental ($^1PS_0$) : la **désactivation non radiative** (émission de chaleur par exemple) et la **fluorescence**.

Cependant, comme le montre le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 4), un autre phénomène entre en compétition avec les processus précédents : la formation de l'état **triplet excité** ($^3PS_1$) par **conversion intersystème** (CIS) et rotation de spin. Le CIS est un phénomène iso-énergétique très lent du fait de son interdiction par les règles de sélection. D'une manière générale, les chromophores auront tendance à se désexciter plutôt par CI ou par fluorescence que par peuplement de leur état triplet. Cependant certaines structures ou atomes permettent d'allonger la durée de vie de l'état $^1PS_1$, de façon à favoriser ce dernier processus. Dans le cas des porphyrines, le passage $^1PS_1$ à $^1PS_0$ est interdit par symétrie ce qui confère à $^1PS_1$ une durée de vie suffisante pour permettre le CIS de façon majoritaire. A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité ($^3PS_1$) et l'état singulet fondamental ($^1PS_0$), transition dite interdite : processus de **phosphorescence** (émission d'un photon et inversion de spin de l'électron excité) ou de désactivation non radiative. Ainsi, la durée de vie de l'état triplet est plus longue (quelques µs) que l'état singulet (quelques ns) et permet son interaction avec des molécules voisines et en particulier avec l'oxygène moléculaire. Ces interactions possibles peuvent générer des espèces photoactives, à partir de deux voies de photooxydation de type I et II. Les temps caractéristiques des différentes transitions sont indiqués dans le Tableau 1.

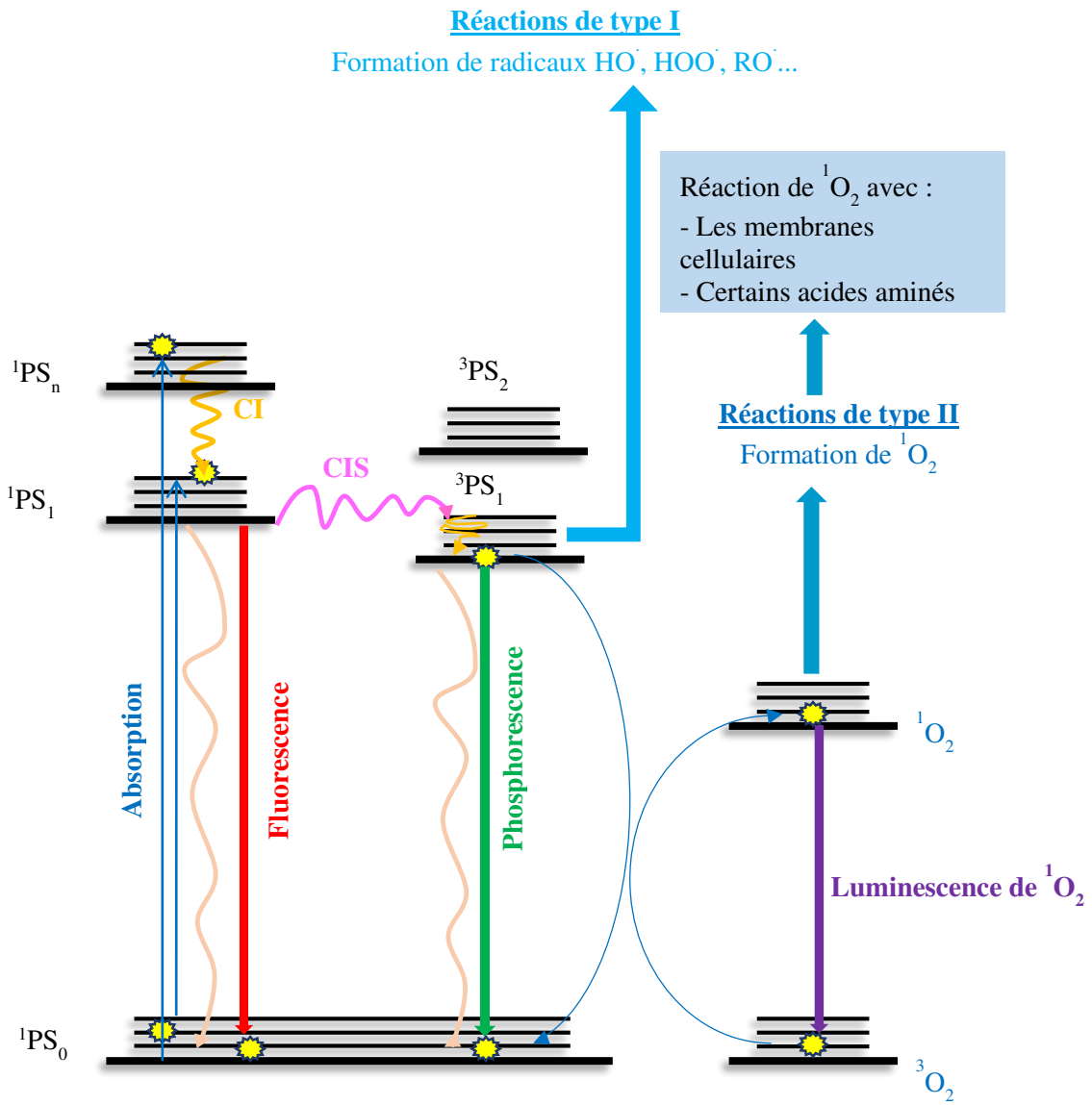


Figure 4. Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié des processus d'une molécule photosensible et schéma explicatif de l'action photodynamique. Les phénomènes radiatifs sont indiqués par des flèches droites, les phénomènes non radiatifs par des flèches courbes. [13].

Tableau 1. Temps caractéristiques des différentes transitions moléculaires [14].

Transition	Temps caractéristiques (s)
Absorption	10^{-15}-10^{-12}
Fluorescence	10^{-11}-10^{-8}
Phosphorescence	$> 10^{-6}$
Conversion interne	10^{-13}-10^{-10}
Conversion intersystème Singulet→Triplet	10^{-7}

II.1 Les réactions de type I

Dans les réactions photochimiques de type I, des radicaux libres vont être générés, suite au transfert d'un électron entre le PS à l'état triplet ($^3PS_1$) et des substrats biologiques (S), ou suite au transfert d'un atome d'hydrogène entre le PS et le substrat. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés (équations 1 et 2).

$$^3PS^\bullet + {}^3PS^\bullet = PS^{+\bullet} + PS^{-\bullet}$$
$$^3PS^\bullet + S = S^{+\bullet} + PS^{-\bullet}$$
$$PS^{-\bullet} + {}^3O_2 = PS + O_2^{-\bullet}$$

Équation 1. Réactions photochimiques primaires, d'après les références [14-16].

$$O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \text{ (Dismutation superoxyde)}$$
$$H_2O_2 + O_2^{-\bullet} \rightarrow {}^3O_2 + OH^- + OH^{-\bullet} \text{ (Réaction de Haber-Weiss)}$$

Équation 2. Réactions photochimiques primaires, d'après la référence [14].

II.2 Les réactions de type II

Les réactions photochimiques de type II ne reposent pas sur un transfert de matière (atome d'hydrogène ou électron) comme les réactions de type I, mais sur un transfert d'énergie. Ces réactions nécessitent la présence d'oxygène dès les premières étapes du processus, et la différence d'énergie entre $^3PS_1$ et $^1PS_0$ doit être supérieure à la différence d'énergie entre $^1O_2$ et $^3O_2$, soit 94 kJ.mol^{-1} [17]. Suite aux mêmes étapes initiatrices que pour les réactions de type I, le PS va se retrouver à l'état triplet excité $^3PS_1$. Du fait de la présence de deux électrons célibataires dans sa couche externe (HOMO), l'oxygène moléculaire à son état fondamental se trouve à l'état triplet ($^3O_2$) (Figure 5).

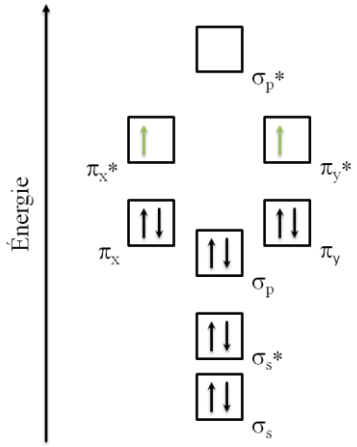


Figure 5. Orbitales moléculaires de la molécule de dioxygène $^3O_2$.

Un transfert d'énergie va alors être possible entre $^3PS_1$ et $^3O_2$ (transition permise car ce sont des états de même multiplicité), ce qui va engendrer la formation d'oxygène singulet $^1O_2$ et le retour du PS à son état énergétique fondamental ($^1PS_0$, équation 3).

$$^3PS_1 + {}^3O_2 = {}^1PS_0 + {}^1O_2$$

Équation 3. Réaction de transfert d'énergie du photosensibilisateur au dioxygène.

Ceci nous amène à définir une caractéristique des photosensibilisateurs : le rendement quantique de production d'oxygène singulet, Φ_Δ (équation 4). Il peut s'écrire comme suit :

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

Équation 4. Formule du rendement quantique de production d'oxygène singulet.

Cette valeur 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. Elle est néanmoins fréquemment utilisée, car facile à déterminer. 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.

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 [18]. 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 (Figure 6).

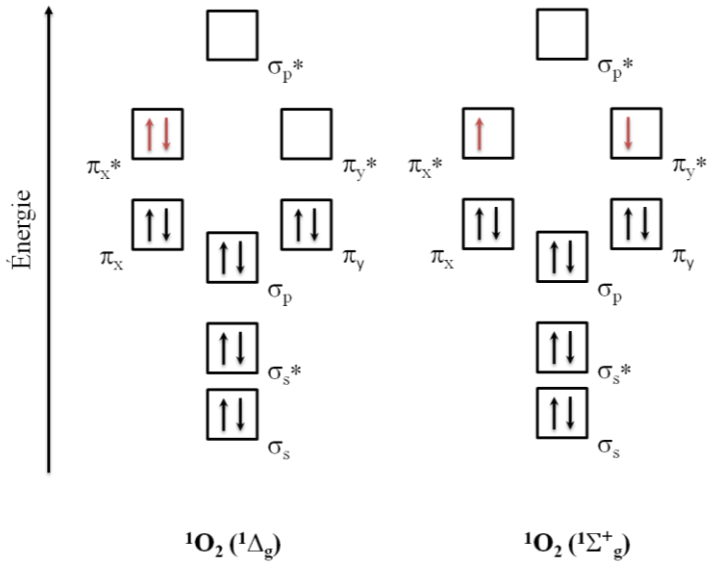


Figure 6. Structures électroniques de l'oxygène singulet.

L'énergie d'excitation de l'oxygène singulet $^1\Delta_g$ par rapport à l'état fondamental étant d'environ 22,4 kcal/mol (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 7).

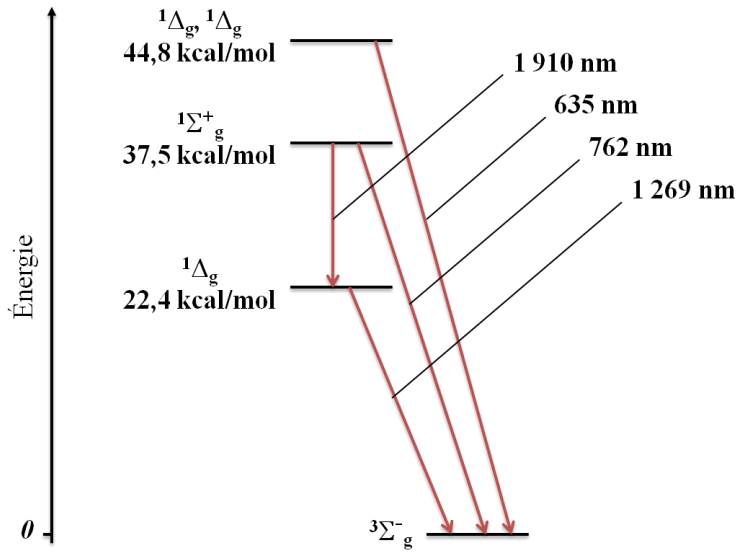


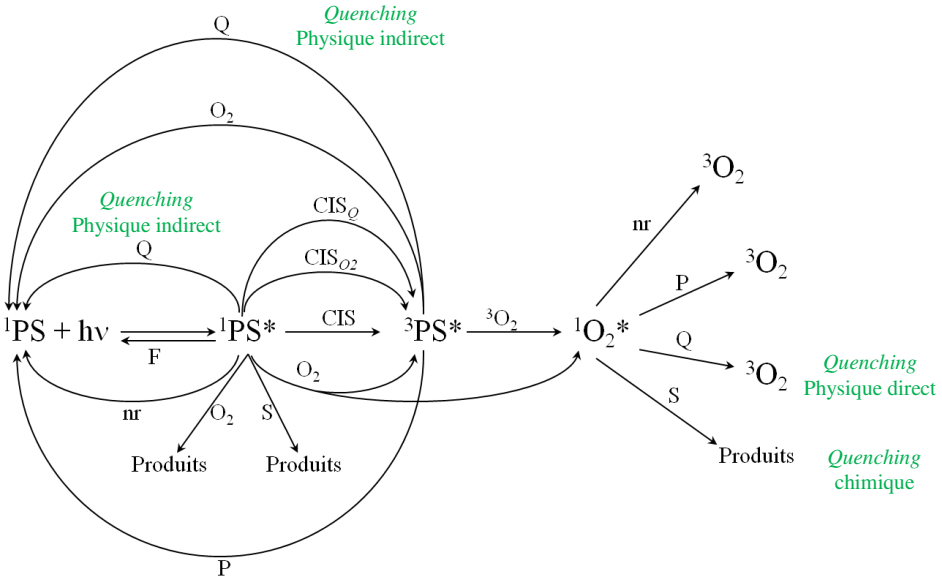
Figure 7. Diagramme de Jablonski simplifié de l'oxygène. A gauche : énergies d'excitation des états excités par rapport à l'état fondamental. A droite : longueurs d'onde de luminescence.

La transition de l'état $^1\Delta_g$ à l'état $^3\Sigma_g^-$ étant interdite, cette propriété confère un temps de vie relativement long aux espèces de l'oxygène singulet formées à l'état d'énergie $^1\Delta_g$. Le second état excité de l'oxygène ($^1\Sigma_g^+$) possède, quant à lui, un temps de vie très court du fait de la transition de spin permise entre l'état $^1\Sigma_g^+$ et l'état $^1\Delta_g$. Il y a donc, en solution, des temps de vie radiative très différents entre l'oxygène $^1O_2$ à l'état $^1\Sigma_g^+$ (10^{-11} à 10^{-9} seconde) et celui à l'état $^1\Delta_g$ (10^{-6} à 10^{-3} seconde). L'état $^1\Delta_g$ possède un temps de demi-vie suffisamment long (de l'ordre de 1 µs dans l'eau) pour lui permettre de réagir chimiquement avec son environnement contrairement à l'oxygène singulet $^1\Sigma_g^+$. La luminescence observée dans le cas de l'$^1O_2$ correspond donc à la transition $^1\Delta_g \rightarrow {}^3\Sigma_g^-$ dont la longueur d'onde maximale d'émission se situe à 1269 nm.

L'oxygène singulet formé réagit rapidement avec les molécules environnantes. La production d'oxygène singulet par un PS dépend de la concentration et de la vitesse de diffusion de l'oxygène dans le milieu. Le premier paramètre prend son importance dans le cas de tumeurs volumineuses présentant en leur sein des zones hypoxiques où l'oxygène est absent et où la PDT perd en efficacité. Sa faible durée de vie (10-100 µs dans certains solvants organiques, de l'ordre 2 µs en milieu aqueux) en fait une espèce dont le rayon d'action est limité par la diffusion, soit une sphère de 10 nm à 20 nm environ centrée en son point de production [19, 20]. Dans la cellule, la nature hydrophobe de nombreux PS implique que la plus grande partie de l'effet photodynamique prend naissance dans des zones hydrophobes de la cellule (membranes, lysosomes). L'oxygène singulet donne lieu à de nombreux et très divers dégâts oxydatifs sur de nombreuses biomolécules (lipides, stéroïdes, enzymes ou encore acides nucléiques).

II.3 Régulation de la production d'oxygène singulet

Pour la PDT, il y a différentes façons d'inhiber l'action de l'$^1O_2$ sur les tissus non ciblés (équation 5) : l'inhiber directement ou empêcher sa formation par *quenching* du PS.



Équation 5. Réactions de formation de l'oxygène singulet et *quenching* des états excités. F = fluorescence ; P = phosphorescence ; nr = désactivation non-radiative ; Q = *quencher* ; O2 = dioxygène ; S = substrat.

II.3.a *Quenching* chimique (direct)

Le *quenching* chimique consiste en une réaction chimique entre l'$^1O_2$ et un substrat menant à une modification de la structure moléculaire de ce dernier et donnant un nouveau produit (équation 6).

$$^1O_2 + A \overset{k_C}{\rightarrow} P$$

Équation 6. Réaction de *quenching* chimique de l'oxygène singulet [15a].

Les principales cibles de l'oxygène singulet en milieu biologique sont :

- les acides aminés,
- les bases nucléiques,
- les lipides, les acides gras,
- le cholestérol,
- l'acide ascorbique.

Comme exemple de *quenching* chimique, on peut citer l'action de l'$^1O_2$ sur le cholestérol qui mène principalement au 5α-hydroperoxyde (Figure 8, R = OOH) *via* la réaction « ène » (La réaction « ène » fait intervenir un alcène en présence d'un énophile qui vient attaquer la double liaison. L'oxygène singulet peut faire office d'énophile et conduit donc à la formation d'un hydroperoxyde allylique. Dans le cas où l'oxygène singulet est l'énophile, cette réaction s'appelle la réaction de Schenck).

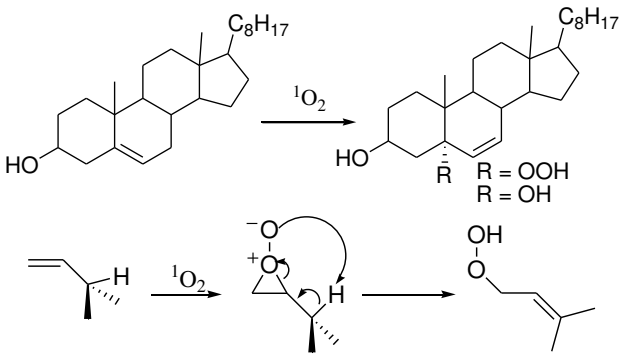


Figure 8. Action de l'oxygène singulet sur le cholestérol [21] et mécanisme de la réaction « ène » avec l'oxygène singulet.

II.3.b *Quenching* physique

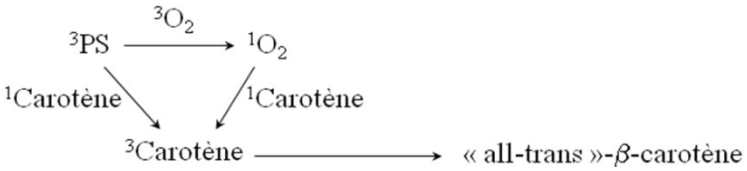
II.3.b.i Direct

Ce deuxième type de *quenching* consiste en un transfert d'énergie de l'oxygène singulet vers une molécule, capable d'accepter cette énergie, sans altérer la nature chimique de celle-ci. Cette interaction mène uniquement à la désactivation de l'oxygène singulet en oxygène à l'état triplet sans consommation d'O_2 ou formation de produit de réaction (équation 7).

$$^{1}O_2 + A \overset{k_p}{\rightarrow} {}^{3}O_2 + A^*$$

Équation 7. Réaction de *quenching* physique de l'oxygène singulet [15a].

Le *quencher* d'oxygène singulet le plus connu reste 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 $^{1}O_2$ par le β -carotène. 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 [15b] (équation 8).



Équation 8. Résumé des processus d'inhibition du β-carotène par Foote et al. [15b].

II.3.b.ii Indirect

Il existe deux grands modes de désactivation d'une molécule photophysiquement active et d'inhiber indirectement par conséquent la production d'$^{1}O_2$: le *quenching* collisionnel et le FRET. Il s'agit de *quencher* soit l'état singulet soit l'état triplet du PS empêchant ainsi la formation d'oxygène singulet.

- **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 diffusionnel, on parle alors de ***quenching* dynamique**, ou à la formation d'un complexe, on parle alors de ***quenching* statique** [22].

- Le ***quenching* dynamique** est illustré Figure 9 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.
- 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 9 illustre le cas d'un complexe se formant à l'état excité.

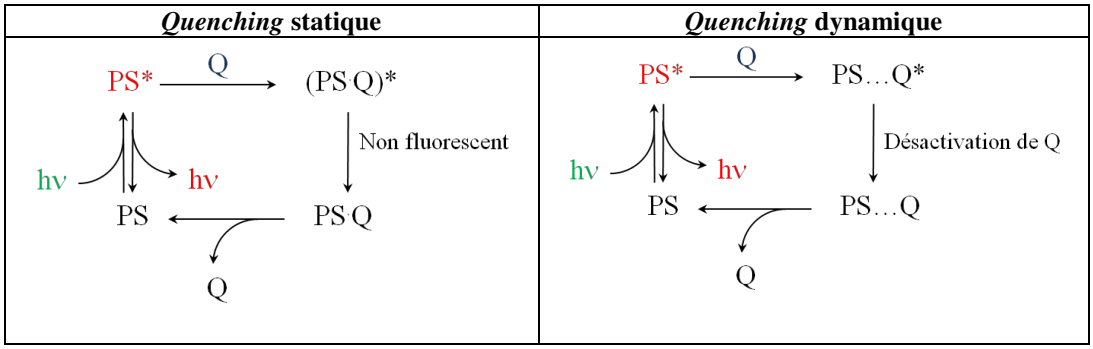


Figure 9. Comparaison des mécanismes des *quenchings* statique et dynamique [23].

- **Le *quenching* par transfert d'énergie non radiatif**

Le transfert d'énergie non radiatif s'effectue comme son nom l'indique sans émission de photon. Il implique un transfert d'énergie à la suite :

- soit d'une interaction à courte distance (0,6 à 2 nm) entre nuage électroniques des deux espèces D (donneur) et A (accepteur), (transfert de **Dexter**) ;
- soit d'une interaction à longue distance (3 à 10 nm) de type dipôle-dipôle (**FRET** : *Förster resonance energy transfer*) [24] (Figure 10).

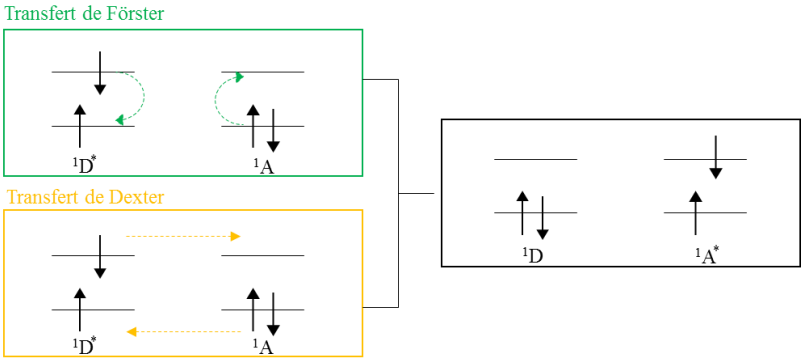


Figure 10. Transfert de l'excitation du donneur D^* vers A entre états singulets selon - le mécanisme de Förster (en vert), - le mécanisme de Dexter (en jaune). Dans l'encadré noir, l'état d'arrivée, après transfert de l'excitation : $^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ [24].

Le FRET est un transfert d'énergie entre états singulets excités qui influe de manière indirecte sur la production d'état triplet et donc d'oxygène singulet. Ce transfert d'énergie non radiatif ne peut se produire que s'il existe un recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur (desexcitation du donneur, ici le PS : $D^* \rightarrow D$) et le spectre d'absorption de l'accepteur (excitation de l'accepteur : $A \rightarrow A^*$) (Figure 11). L'énergie récupérée entre les transitions vibrationnelles du donneur doit être suffisante pour exciter les transitions vibrationnelles de l'accepteur ; de telles transitions sont dites couplées, c'est-à-dire doivent être en résonance, d'où le terme utilisé : transfert d'énergie résonant [24].

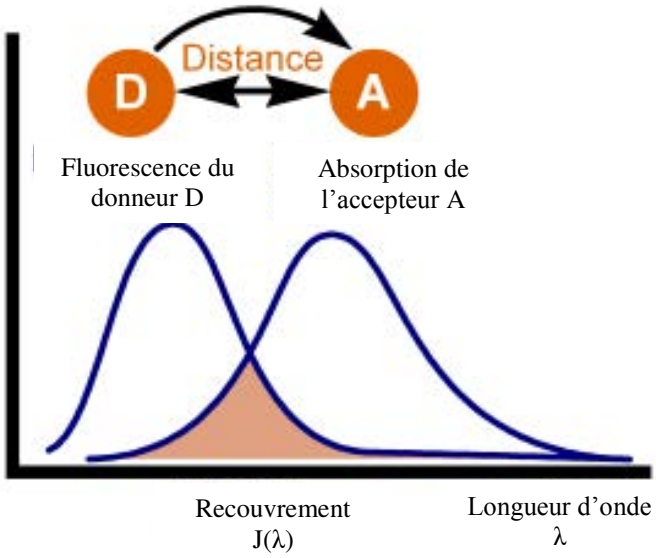


Figure 11. Recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.

La qualité du transfert dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur.

Förster a exprimé la distance R_0 à laquelle le FRET a une efficacité de 50% (équation 9) en fonction de k le facteur d'orientation (maximal si A et D sont alignés, pris le plus souvent = 2/3), ϕ_f le rendement quantique de fluorescence du donneur seul, n l'indice de réfraction du milieu et J(λ), le recouvrement spectral entre émission de D et absorption de A donné par l'équation 10. $F_D(\lambda)$ est le spectre d'émission du donneur (PS), $\varepsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur (un *quencher*) en $M^{-1}.cm^{-1}$ et λ est la longueur d'onde en nm [25]. Le rayon de Förster est généralement compris entre 10 et 100 Å [26] dans le cadre du FRET.

$$R_0 = 0{,}211(k^2 n^{-4} \Phi_f J(\lambda))^{1/6}$$

Équation 9. Formule du rayon de Förster.

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\,\lambda}$$

Équation 10. Formule pour obtenir J(λ), recouvrement spectral entre émission de D et absorption de A [25].

III HISTORIQUE

L'utilisation de la lumière comme agent thérapeutique est connue depuis des milliers d'années. Cette méthode était utilisée en Egypte ancienne, en Inde et en Chine pour traiter diverses maladies telles que le psoriasis, le vitiligo et même certains cancers cutanés [27-30]. Les grecs anciens, eux, utilisaient l'héliothérapie (exposition au rayonnement solaire) pour traiter certaines maladies [31]. Cependant, ce n'est qu'à partir du début du XXième siècle et les travaux de Raab sur l'action de l'acridine (Figure 12) et de la lumière sur *Paramecium caudatum* que le principe de photothérapie est introduit [32]. Quelques années plus tard, von Tappeiner démontra l'importance de l'oxygène dans le processus mis en jeu et introduit le terme Photothérapie Dynamique [33-35].

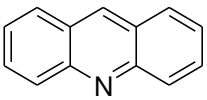


Figure 12. Structure chimique de l'acridine.

Bien que l'effet photodynamique ait été observé pour de très nombreuses molécules, aux profils très variés, l'histoire de la PDT reste étroitement liée aux porphyrines et plus généralement aux macrocycles tétrapyrroliques. Les PS tétrapyrroliques développés sont usuellement classifiés par ordre de leur découverte ou invention.

III.1 PS non tétrapyrroliques

Bien que les porphyrines et leurs dérivés tétrapyrroliques soient les photosensibilisateurs qui nous intéressent pour la suite, il est important de noter que d'autres molécules non basées sur des macrocycles tétrapyrroliques ont été utilisées ces dernières décennies. On peut distinguer parmi elles les molécules d'origine naturelle de celles qui ont été conçues spécialement pour l'application à la PDT.

III.1.a Les molécules naturelles

L'**hypéricine** (Figure 13) fait partie de la famille des quinones. Cette molécule est un colorant rouge présent dans 27 sur 36 espèces évaluées des *Hypericum* [36]. Cette molécule est principalement extraite du millepertuis *Hypericum perforatum*, extraction réalisée pour la première fois par Brockmann et al. en 1942. L'activité en PDT de l'hypéricine a été mise en évidence en 1996 par Koren et al. [37, 38]. Cette molécule présente un rendement quantique de fluorescence et un rendement quantique d'oxygène singulet élevés [39] ainsi qu'une faible toxicité à l'obscurité [40], caractéristiques fondamentales pour les applications biologiques et cliniques de ce photosensibilisateur. L'intérêt de l'utilisation de l'hypéricine comme photosensibilisateur en PDT est dû à son rendement quantique de triplet élevé et sa forte capacité à générer de l'oxygène singulet et des anions superoxydes [41]. Un grand nombre d'études ont déjà montré que l'hypéricine possédait une bonne activité phototoxique *in vitro*. Plusieurs études *in vivo* et cliniques sur l'efficacité de l'hypéricine sont toujours actuellement menées [42].

Le **psoralène** et **ses dérivés** (Figure 13) sont des composés naturels de la famille des furocoumarines (composées de trois hétérocycles carbonés), contenues dans les plantes appartenant à la famille des Ombellifères et des Apiacées (*Umbelliferae*, *Apiaceae*) [43]. Le psoralène est une molécule qui a été utilisée en PUVA-thérapie (psoralène + UVA) pour le traitement de différentes maladies de peau : le psoriasis, l'eczéma, le vitiligo, certains lymphomes cutanés par interaction avec les rayons lumineux [44]. El Mofty en 1948 fut le premier médecin à traiter des patients porteurs de vitiligo avec des comprimés de 8-Méthoxypsoralène (Meladinine®) [44, 45].

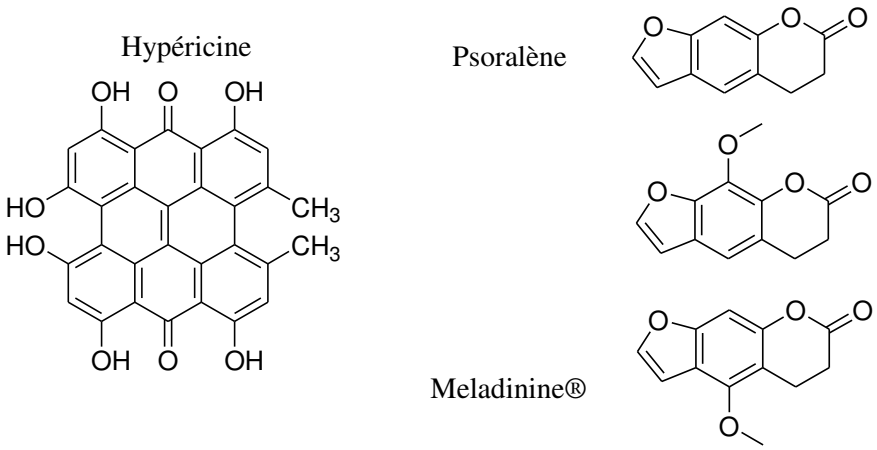


Figure 13. PS non tétrapyrroliques extraits de composés naturels : hypéricine, psoralène et ses dérivés.

La **curcumine** ou diféruloylméthane est un polyphénol présent dans la racine du curcumin qui est une plante de la famille des gingembres (*Zingiberaceae*) [46]. La curcumine présente plusieurs formes tautomères dont la forme 1,3-dikéto et la forme énol correspondante (Figure 14) [47]. Des recherches récentes effectuées avec cette molécule tendent à montrer qu'elle possède un potentiel anticancéreux en PDT [48, 49].

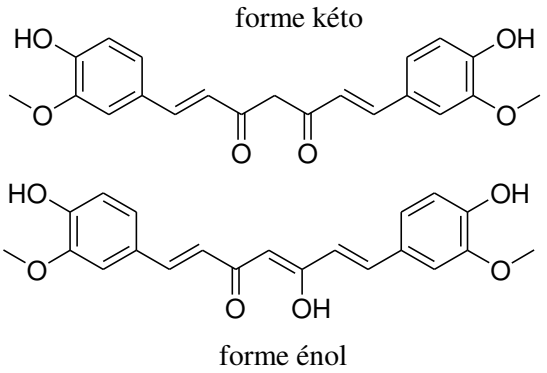


Figure 14. Structures chimiques de la curcumine.

III.1.b Les molécules de synthèse

Le **bleu de méthylène** (Figure 15) est une molécule cationique soluble dans l'eau qui possède un spectre d'absorption UV-visible présentant une forte bande d'absorption à 664 nm dans l'eau (ε = 85 000 L.mol^{-1}.cm^{-1}) [50] ainsi qu'une bande plus faible à 609 nm. De plus, son rendement quantique de formation d'oxygène singulet (ϕ_Δ = 0,51 dans l'éthanol) est compatible avec des applications en PDT. Cette molécule est cependant peu utilisée en PDT en raison de son manque de stabilité *in vivo* du fait de sa dégradation par des réactions enzymatiques [46, 51, 52].

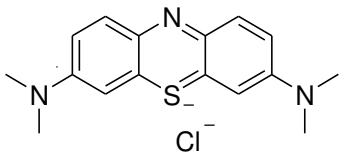


Figure 15. Structure chimique du bleu de méthylène.

Le **rose de bengale** (Figure 16) est un colorant mentionné pour la première fois par Schultz en 1881 [53]. Cette molécule très soluble dans l'eau montre une forte bande d'absorption UV-Visible dont le maximum se situe à 549 nm avec un ε = 99 800 L.mol^{-1}.cm^{-1} dans l'eau [54]. Son rendement quantique de formation d'oxygène singulet a été déterminé par Gollnick et al. en 1964 (ϕ_Δ = 0,68 dans l'EtOH et ϕ_Δ = 0,75 dans l'eau) [15, 39]. Le rose de bengale a été utilisé sous forme d'un médicament appelé PV-10 pour le traitement de mélanome métastatique [55]. Des essais PDT ont été réalisés avec du rose de bengale encapsulé dans des liposomes afin de s'affranchir de sa forte lipophobie et d'assurer sa vectorisation et donc une meilleure accumulation dans les cellules tumorales [56].

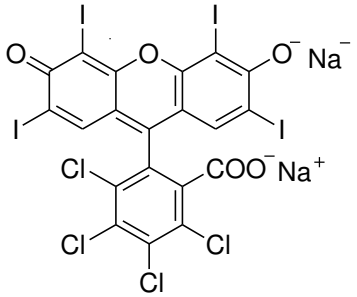


Figure 16. Structure chimique du rose de bengale.

L'**érythrosine** (Figure 17) est apparentée au rose de bengale et a été utilisée dans le cas de traitements antibactériens par PDT [57].

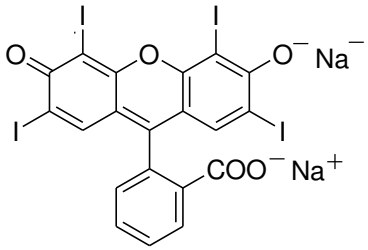


Figure 17. Structure chimique de l'érythrosine.

Les **rhodamines** sont utilisées en tant que pigments pour les lasers et comme agents photosensibilisants potentiels. La plus importante est la rhodamine 123 (Figure 18) qui absorbe fortement à 500 nm avec un épaulement à 475 nm dans l'éthanol. Son émission maximale de fluorescence est localisée vers 530 nm avec un rendement quantique de fluorescence significatif (= 0,9, excitation à 480 nm dans l'éthanol) mais les effets phototoxiques restent encore controversés. La rhodamine 123 est une molécule lipophilique possédant une charge positive qui favorise son accumulation dans la mitochondrie des cellules vivantes [58].

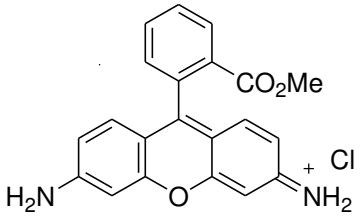


Figure 18. Structure chimique de la rhodamine 123.

La **tétrabromo rhodamine 123 TBR** (Figure 19) est un dérivé de la rhodamine à laquelle ont été incorporés des atomes lourds. Ce composé montre une meilleure phototoxicité que la rhodamine 123 dans le cas de tests *in vitro* sur les cellules du carcinome de la vessie en photochimiothérapie [59].

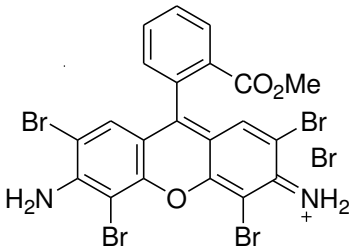


Figure 19. Structure chimique de la TBR.

Des structures innovantes constituants de nouveaux points de départ sont en train de voir le jour tels que les difluoroborateazadipyrrométhènes ou aza-bodipy (Figure 20 A) [60, 61]. Du point de vue des caractéristiques physico-chimiques, la participation de l'azote au système électronique confère à ce fluorophore des propriétés spectroscopiques décalées vers le rouge en absorption (~ 680 nm) et en émission (~700 à 730 nm) (Figures 20 B et C) [60, 61]. Les rendements quantiques de fluorescence obtenus sont de l'ordre de 0,35 dans le chloroforme. Du fait de leurs caractéristiques spectroscopiques, les aza-bodipy ont été employés comme agent de contraste dans le cadre d'études d'imagerie cellulaire, en temps réel. Des études *in vitro* et *in vivo* de thérapie photodynamique ont également été réalisées.

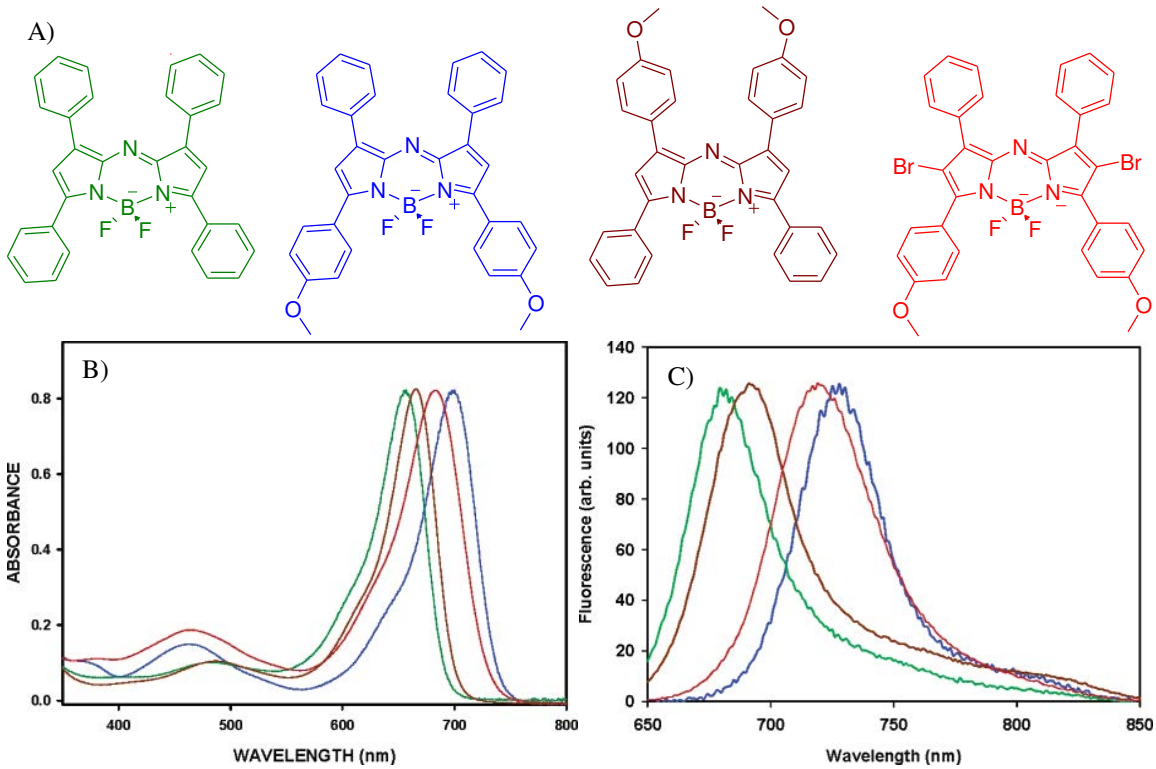


Figure 20. A) Structures chimiques d'azabodipy ; B) Spectres d'absorption et C) Spectres d'émission de fluorescence de ces composés dans un mélange H_2O/CrEL (emulsifier Cremophor EL) ($\lambda_{exc.}$ = 630 nm) [60, 61].

Le **vert d'indocyanine** (**Indocyanine green, ICG** en anglais) est une molécule amphiphile possédant par conséquent une forte affinité pour les protéines plasmatiques, en particulier envers les lipoprotéines. Le vert d'indocyanine green présente la particularité d'absorber dans le proche infrarouge (780-805 nm) et d'émettre une fluorescence elle aussi dans l'infrarouge (810-835 nm), permettant de visualiser des structures tissulaires en profondeur dans la mesure où les tissus biologiques présentent une certaine transparence. Au tout début des années 1970, l'angiographie au vert d'indocyanine a été proposée pour l'ophtalmologie pour étudier le réseau vasculaire choroïdien et depuis représente aussi une aide diagnostique dans l'évaluation de certaines tumeurs de l'œil. Certains auteurs ont avancé que l'ICG pouvait être un photosensibilisateur. Après une analyse détaillée de la littérature et des expériences effectuées au laboratoire, il apparaît que ceci reste toujours à démontrer (Voir revue en annexe, "Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a debate.": *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*(*16*), 1871-1897).

III.2 PS tétrapyrroliques

III.2.a Les porphyrines et leurs dérivés

III.2.a.i Structures

La classe de photosensibilisateurs la plus étudiée et utilisée est, sans conteste, celle des porphyrines et leurs dérivés (chlorines, bactériochlorines) [62]. Ces pigments ont un grand intérêt biologique puisqu'ils sont à la base de molécules et protéines nécessaires au fonctionnement des organismes vivants. On en retrouve ainsi comme structure de base des hèmes et hématoporphyrines (transport d'oxygène chez les animaux), dans les chlorophylles (photosynthèse chez les plantes, Figure 21) et la vitamine B12.

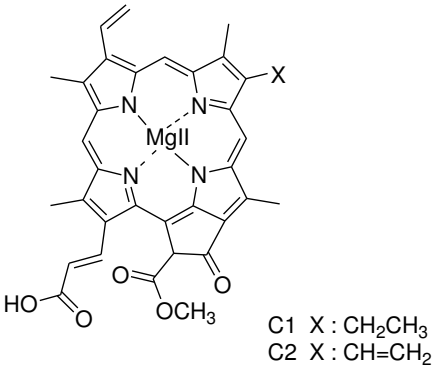


Figure 21. Structure des chlorophylles c1 et c2.

Les porphyrines sont des dérivés de la porphine constituée de quatre noyaux pyrrole reliés par des ponts méthènes établis entre les atomes de carbone α des unités pyrrole. Les porphyrines possèdent la même structure de base, mais peuvent porter divers substituants sur les carbones β des noyaux pyrrole ou sur les carbones méso (Figure 22) [63, 64].

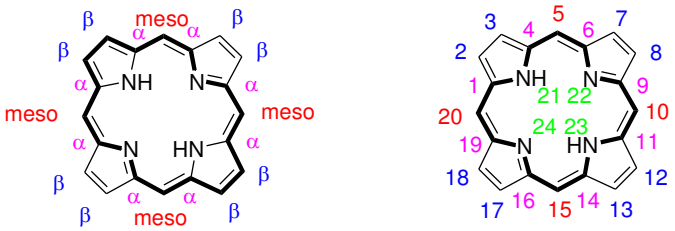


Figure 22. Numérotation et appellation des positions de la porphyrine à l'aide du noyau porphine selon l'IUPAC (the International Union of Pure and Applied Chemistry) [63].

Les positions 5, 10, 15 and 20 correspondent aux carbones dit "*meso*" et les positions 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 et 18 aux carbones *β*. Les deux atomes d'azote au centre peuvent accepter des protons pour former un dication, tandis que les deux groupes NH peuvent perdre des protons et former un dianion. La métallation des porphyrines est possible grâce à la formation de ce dianion (Figure 23). Une porphyrine sans ion métallique en son centre est nommée porphyrine base libre et sinon, il s'agit d'une métalloporphyrine. Les porphyrines ont été métallées avec de nombreux métaux afin de former des complexes avec une grande variété de géométrie [65].

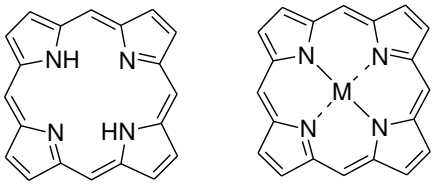
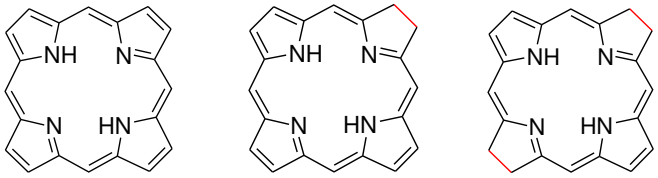


Figure 23. Structure générale d'une porphyrine base libre et d'une métalloporphyrine.

Les chlorines (2,3-dihydroporphyrines) se distinguent des porphyrines par la réduction d'une double liaison périphérique et les bactériochlorines par deux doubles liaisons en vis-à-vis du macrocycle (Figure 24). Les bactériochlorines dont les doubles liaisons sont sur deux entités pyrroliques vicinales sont dites isobactériochlorines.



22 électrons π 20 électrons π 18 électrons π

Figure 24. Structures chimiques des macrocycles porphyriniques. De gauche à droite : porphyrine, chlorine et bactériochlorine.

III.2.a.ii Propriétés photophysiques

- **Absorption**

Les porphyrines sont connues pour être des molécules très colorées car elles possèdent un macrocycle très conjugué, et ceci explique leur utilisation dans de nombreux domaines. En effet, le système d'électrons π conjugués confère à ces molécules des particularités photophysiques uniques.

Le spectre d'absorption des porphyrines présente classiquement (Figure 25 A) :

- une forte bande d'absorption entre 400 et 430 nm (bande de Soret) qui sera d'autant plus fine que la porphyrine est pure et sous forme non agrégée. Cette bande de Soret résulte d'une forte transition électronique π→π* de l'état fondamental vers le second état excité ($S_0 \rightarrow S_2$).
- quatre bandes entre 480 et 700 nm, dites bandes Q, dont l'intensité est dix à vingt fois plus faible. Ces bandes résultent d'une faible transition électronique π→π* de l'état fondamental vers le premier état excité ($S_0 \rightarrow S_1$) [66, 67].

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. Les chlorines présentent une bande d'absorption Q_I vers 650 nm environ dix fois plus intense que les porphyrines. Quant aux bactériochlorines, elles présentent une bande Q_I dix fois plus intense que les porphyrines et décalée vers 750 nm (Figure 25 B). La première réduction vient légèrement transformer les spectres d'absorption : la bande de Soret devient moins intense et plus large. La deuxième réduction entraîne le déplacement de la bande de Soret dans l'utra-violet (environ 350 nm).

Les métalloporphyrines ne possèdent la plupart du temps que deux bandes Q (Figure 25 A) tandis que les porphyrines base-libres en possèdent quatre. Ceci est dû au recouvrement des orbitales du métal de transition dπ ($d_{xz, yz}$) ayant une symétrie e_g avec le système π de la porphyrine. Pour les métaux d^1-d^5, les orbitales dπ partiellement occupées permettent à la possibilité d'un transfert de charge entre la porphyrine et le métal. Ces transitions sont moins intenses que les transitions π→π* de la porphyrine mais peuvent être observées. Pour les métaux d^6-d^9, les orbitales dπ remplies peuvent interagir avec les orbitales vides π*. Par conséquent, les orbitales dπ du métal sont stabilisées et l'énergie des orbitales π* de la porphyrine augmente. La transition d'énergie π→π* sera plus haute en énergie. Pour les métaux d^{10}, les orbitales dπ se situent bien en dessous des orbitales π de la porphyrine. Comparées aux métalloporphyrines, les porphyrines base-libres sont moins symétriques d'où la présence de quatre bandes Q [66, 67].

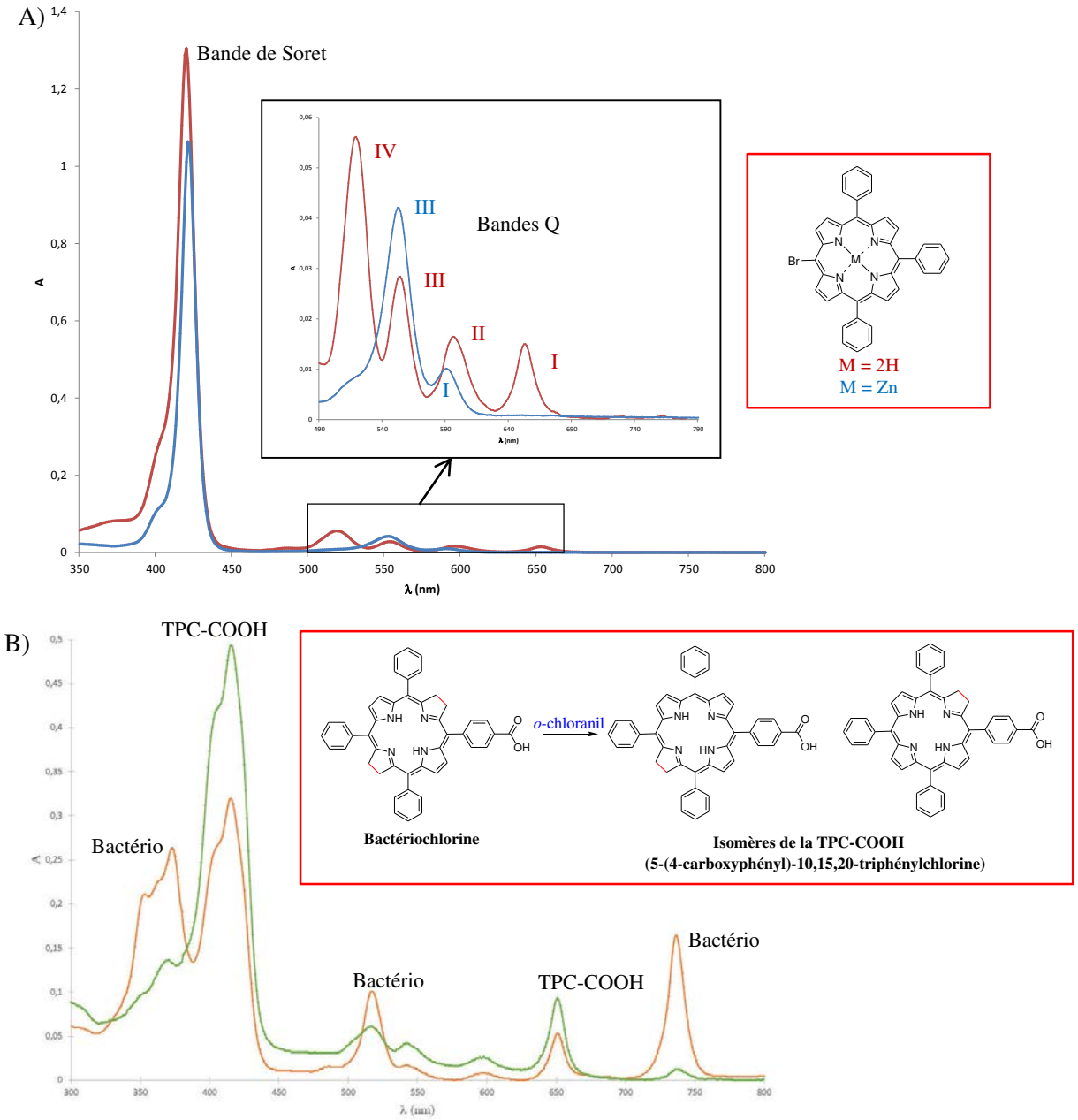


Figure 25. Spectres d'absorption de composés tétrapyrroliques : (A) porphyrine (rouge) et porphyrine métallée (bleu) dans le dichlorométhane [68], (B) mélange bactériochlorine + 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine TPC-COOH (orange) et TPC-COOH (vert) dans l'éthanol. [Molécules synthétisées au laboratoire par notre équipe].

- **Fluorescence et production d'oxygène singulet des porphyrines**

La plupart des porphyrines sont capables d'émettre de la fluorescence et de produire de l'oxygène singulet. Dans le cas des porphyrines non métallées, la fluorescence s'observe dans le rouge entre 600 et 750 nm, mais la longueur d'onde d'émission, ainsi que le rendement quantique de fluorescence sont dépendants de la substitution et du solvant [69]. De même, la production d'oxygène singulet est fortement influencée par la substitution des macrocycles [70]. Ces caractéristiques photophysiques varient également avec la formation d'un complexe métal-porphyrine, dont les effets sont directement dépendants de la nature du métal inséré dans le macrocycle.

- **Fluorescence et production d'oxygène singulet des chlorines**

Pour les chlorines, la fluorescence reste toujours centrée entre 600 et 750 nm et la deuxième bande de fluorescence est moins intense que dans le cas des porphyrines. Tout comme les porphyrines, les

rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet dépendent des substituants sur les macrocycles. L'inconvénient majeur de ces molécules est leur relativement faible stabilité. En effet, certaines sont capables de s'oxyder à l'air (ou en milieu oxydant) pour se transformer en porphyrine.

III.2.a.iii Synthèses de porphyrine

- **Extraction de composé naturel [71, 72]**

Certaines porphyrines sont accessibles à partir de pigments animaux ou végétaux.

Nous présenterons ici quelques exemples de macrocycles tétrapyrroliques issus de la dégradation de chromophores naturels. La chloroprotoporphyrine de fer(III), plus connue sous le nom de protohémine est le dérivé porphyrinique le plus abondant chez les animaux supérieurs (Figure 26). On l'obtient à partir du sang selon l'une des deux méthodes décrites ci-dessous.

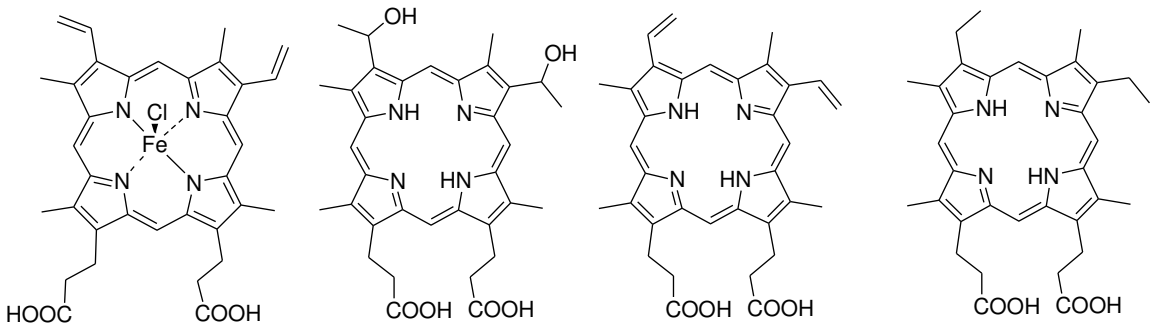
- **La méthode de Fischer**

Proposée par Fischer en 1955, cette méthode est devenue classique pour l'obtention de la protohémine. Elle consiste à chauffer du sang défibriné en milieu acide, puis à isoler la protohémine (par filtration ou centrifugation) lors du refroidissement du mélange. La purification est réalisée par recristallisation, ce qui permet d'obtenir 2,8 à 3,6 grammes de protohémine pure par litre de sang.

- **La méthode de Labbe et Nishida**

Robert F. Labbe et Goro Nishida ont proposé une autre méthode, basée sur l'usage de chlorure de Strontium, afin d'éliminer la majorité des protéines par filtration à chaud. La protohémine cristallise dans le filtrat en cours de refroidissement, puis elle est purifiée, toujours par recristallisation. Les rendements obtenus par cette méthode sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus par la méthode de Fisher.

Ainsi obtenue, la protohémine sert ensuite de précurseur pour la préparation de l'hématoporphyrine IX (traitement en milieu acide), de la protoporphyrine IX (par démétallation) ou encore de la méso-porphyrine IX, entre autres (Figure 26).



A **B** **C** **D**

Figure 26. Structure de la protohémine (A), de l'hématoporphyrine IX (B), de la protoporphyrine IX (C) et de la méso-porphyrine IX (D).

Cependant, au cours des 70 dernières années, de nombreuses porphyrines ont été préparées par synthèse totale. Quelle que soit la stratégie suivie, le noyau porphyrinique est formé par la mise en jeu de deux types de réaction : dans un premier temps, des substitutions électrophiles sont réalisées sur les positions 2 et 5 d'unités pyrroliques, formant un macrocycle qui est alors oxydé pour conduire au produit attendu. En fonction de la nature, du nombre et de la position des substituants à introduire sur le macrocycle, différentes stratégies ont été développées. Trois approches majeures sont utilisées pour la construction de macrocycles tétrapyrroliques.

De nombreuses méthodes de synthèse reposent sur la condensation de quatre pyrroles (**voie I**). Une alternative intéressante consiste à former le macrocycle à partir de deux intermédiaires dipyrrométhanes, selon la stratégie dite « 2+2 » (**voie II**). Cette stratégie a été développée afin de contrôler l'agencement des substituants portés par le produit final, et c'est également dans ce but qu'un pyrrole est condensé sur un tripyrrane selon l'approche «3+1 » (**voie III**). Chaque approche implique des méthodes qui ont leurs avantages et leurs limitations : la détermination de conditions préparatives optimales reste un enjeu d'actualité. Les principales méthodes d'obtention de porphyrine sont recensées ci-dessous [73].

- **Voie I : Synthèse par condensation du pyrrole et d'aldéhyde(s)**

• *Synthèse de Rothemund*
La première synthèse de porphyrines substituées en position méso a été décrite par Rothemund en 1935 [74]. Il a formé la méso-tétraphénylporphyrine en tube scellé, en chauffant à 220°C pendant 48 heures un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde dans la pyridine (Figure 27). Dans de telles conditions, seuls les aldéhydes aromatiques les plus résistants au chauffage ont pu former des méso-tétraarylporphyrines symétriques, avec des rendements faibles de l'ordre de 5 à 10 %. Les chlorines (10 – 20 %) obtenues lors de la synthèse ont été réduites en porphyrine correspondante par le DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyanoquinone) (Figure 27) [75].

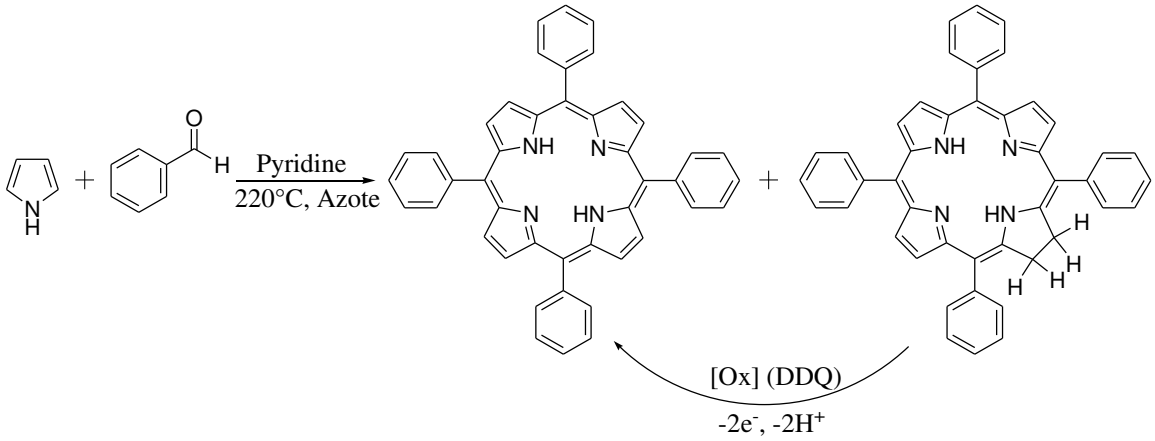


Figure 27. Synthèse de la TPP effectuée par Rothemund.

• *Synthèse de Adler et Longo*
En 1967, Adler et Longo ont établi que le rendement de la condensation entre le pyrrole et un benzaldéhyde, en vue d'obtenir une porphyrine substituée en position méso par des groupements aryles, dépendait de l'acidité du milieu, de la température, de la présence de dioxygène, du solvant et enfin de la concentration initiale des réactifs. La méthode d'Adler-Longo consiste à chauffer à reflux d'acide propionique (141°C) un mélange équimolaire de pyrrole et de benzaldéhyde pendant une demi-heure et à l'air libre, ce qui permet une oxydation par l'air de l'intermédiaire porphyrinogène (Figure 28).

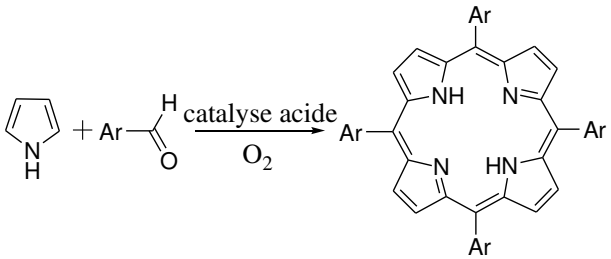


Figure 28. Schéma de synthèse d'une tétraarylporphyrine suivant la méthode d'Adler et Longo [76].

La méso-tétraphénylporphyrine (TPP) est obtenue avec un rendement d'environ 20%. Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients. En effet, elle ne s'applique pas aux benzaldéhydes portant des groupes sensibles ou ionisables, et elle pose des problèmes de purification pour les porphyrines qui ne cristallisent pas dans l'acide propionique. De plus, le rendement de la réaction est souvent non reproductible [76].

• *Synthèse des « aldéhydes mixtes » (Little)*
En 1975, Little a adapté la méthode d'Adler et Longo à la synthèse de méso-arylporphyrines non symétriques [77]. Cette méthode dite des « aldéhydes mixtes » consiste à condenser dans l'acide propionique à reflux pendant 30 min du pyrrole et deux aldéhydes différents (Figure 29).

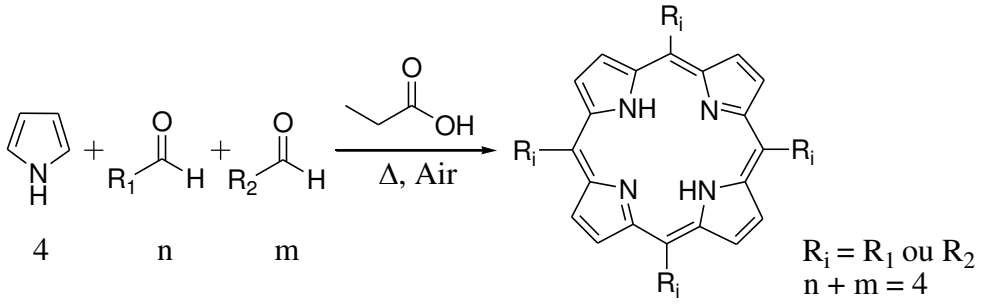


Figure 29. Synthèse d'une porphyrine méso-substituée par la méthode des « aldéhydes mixtes » catalysée à l'acide propionique [77].

Lorsqu'on effectue la condensation entre un aldéhyde A unique et le pyrrole, on obtient un seul type de porphyrine, une porphyrine symétrique, appelée A_4. En revanche, si la condensation est réalisée entre deux aldéhydes différents A et B, un mélange statistique de six porphyrines différentes est obtenu. Les six possibilités sont les porphyrines A_4, A_3B, A_2B_2 trans, A_2B_2 cis, B_3A et B_4 comme indiqué Figure 30.

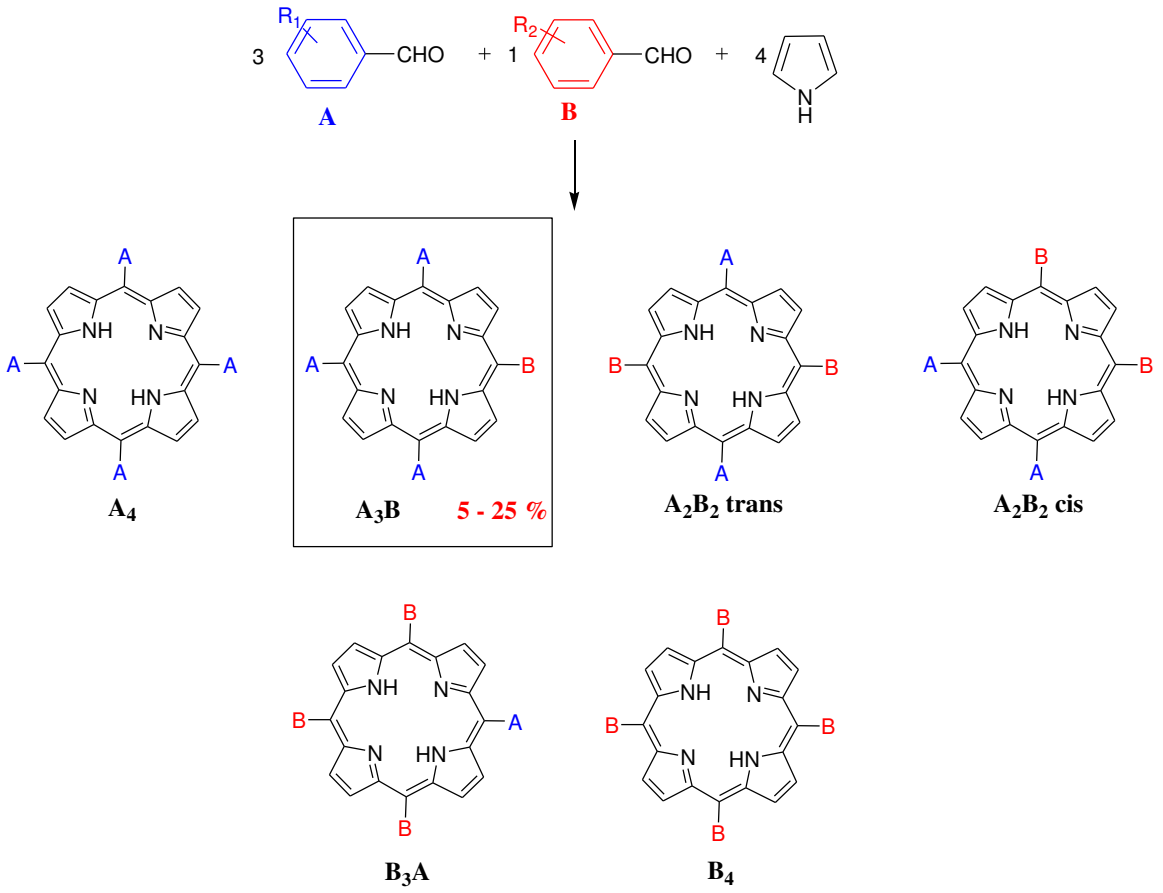


Figure 30. Synthèse d'une porphyrine A_3B.

Les conditions décrites Figure 30 sont optimisées de façon à augmenter le rendement de synthèse de la porphyrine de type A_3B. De ce fait, 3 équivalents de l'aldéhyde A et un équivalent de l'aldéhyde B sont condensés avec 4 équivalents de pyrrole. La production d'une porphyrine de type A_3B dans ce cas, se limite généralement entre 5 et 25 % de rendement environ [78].

• *Synthèse de Lindsey*

Depuis 1986, un grand nombre de porphyrines symétriques ont pu être synthétisées suivant le protocole de J.S. Lindsey (Figure 31). C'est une méthode alternative à celles de Rothemund et d'Adler et Longo qui permet l'obtention de petites quantités de TPP à partir de benzaldéhydes sensibles, dans des conditions douces. Cette méthode permet d'éviter les problèmes de purification (diminution de la formation de polymères comme sous-produit) et donne de bons rendements (40-50 %) [79]. La réaction est réversible et atteint un équilibre où il se forme le tétraphénylporphyrinogène et des polypyrrométhanes. Les conditions expérimentales de la méthode de Lindsey sont optimisées et permettent d'obtenir le porphyrinogène comme le produit thermodynamiquement favorisé. Lindsey a mis au point un protocole qui consiste à utiliser un acide ($BF_3.OEt_2$, TFA ou BCl_3) en quantité catalytique. L'emploi du TFA augmente le rendement d'obtention de dipyrrylméthènes qui se forment au cours de cette réaction. Cette réaction s'effectue dans le dichlorométhane anhydre (CH_2Cl_2) à reflux en présence d'un capteur d'eau ou « *water scavenger* » (TEOA pour *triéthyl orthoacétate*) et sous atmosphère inerte. Il suffit ensuite d'ajouter un oxydant, une quinone comme le DDQ ou le *p*-chloranil, pour oxyder d'une façon irréversible le tétraphénylporphyrinogène en porphyrine.

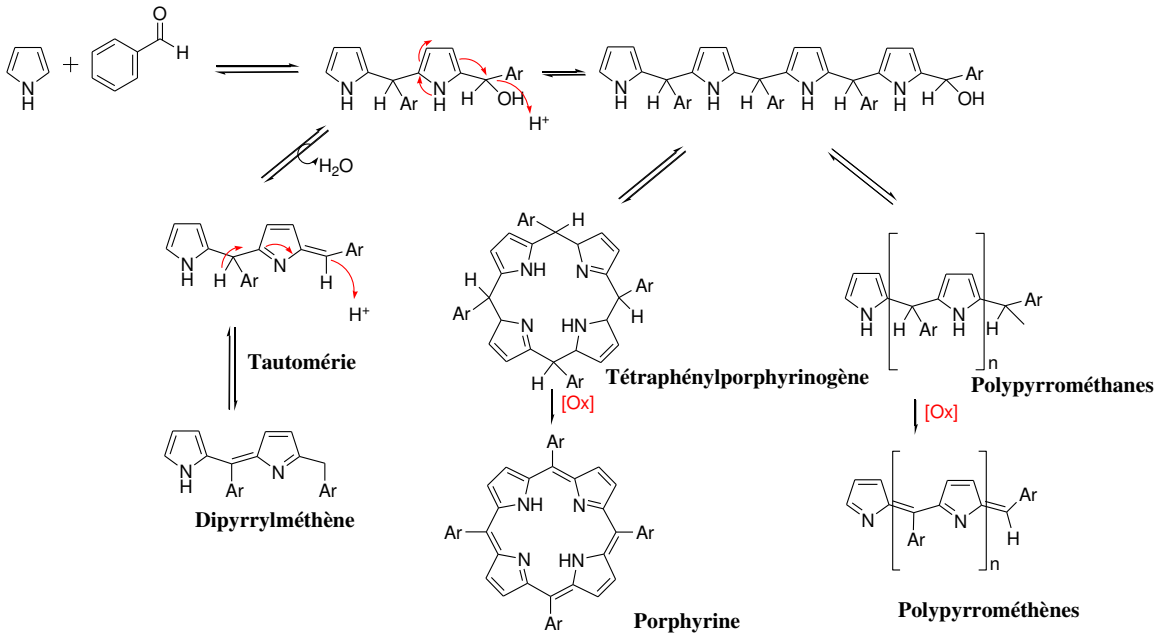


Figure 31. Mécanisme de formation d'une porphyrine A_4 : condensation entre un aldéhyde et un pyrrole suivant la méthode de Lindsey [79].

Le rendement maximal est atteint pour des solutions très diluées ($C < 10^{-2}$ M). Cette méthode est également utilisée pour la synthèse de porphyrines asymétriques, avec les réactifs introduits en quantités stœchiométriques dans le $CHCl_3$ à température ambiante pendant une heure, et elle permet d'obtenir des rendements supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes précédentes. Après oxydation des porphyrinogènes, la porphyrine A_3B est obtenue avec un rendement variant de 5 à 25%, selon la réactivité des aldéhydes A et B mis en réaction [80].

• *Synthèse sur support solide*

En 1978, Svirskaya et Leznoff [81] proposent, dans le but de synthétiser la 5-hydroxyphényl-10,15,20-tritolyporphyrine, un protocole, en phase solide, limitant les étapes de purification (Figure 32). Leur approche consiste dans une première étape à fixer le 3- (ou 4-) hydroxybenzaldéhyde sur une résine polystyrène de chlorure d'acide puis, dans une seconde étape, à faire réagir ce support avec le pyrrole et le para-tolualdéhyde dans l'acide propionique à reflux.

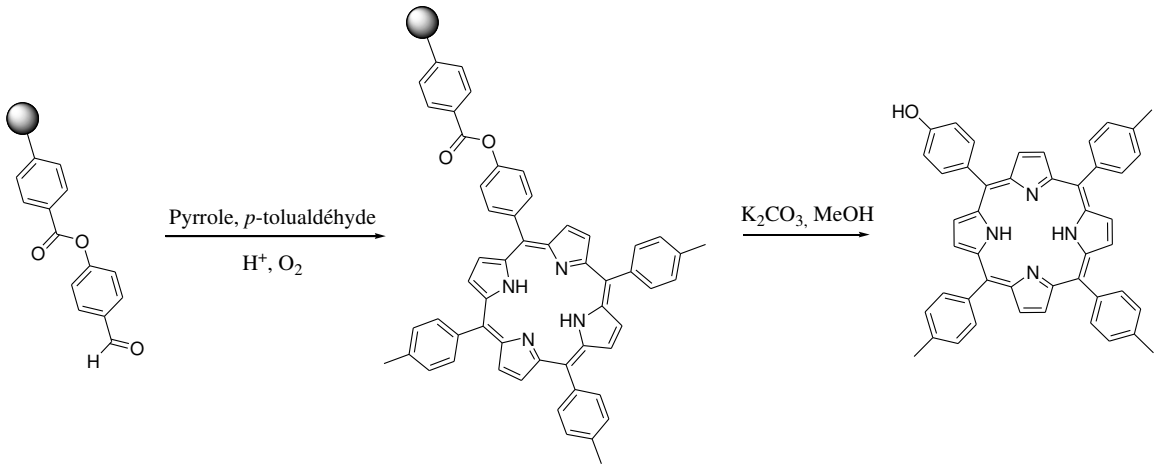


Figure 32. Synthèse sur phase solide d'une porphyrine monohydroxysubstituée [78, 81].

Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas très convaincants. Bien qu'ils soient parvenus à simplifier la purification, le rendement en monohydroxyphénylporphyrine reste par cette méthode très faible (de 2 à 4,5%). Pour appliquer cette stratégie, il faut nécessairement que l'un des

aldéhydes employés possède une fonction permettant de le fixer sur la résine ce qui limite son domaine d'application.

• *Synthèse microonde*

Dans les années 2000, la synthèse de porphyrines par microondes a été étudiée du fait des avantages significatifs de cette technique d'un point de vue écologique ainsi que de rapidité et de sélectivité des produits obtenus [82]. Pour synthétiser différentes porphyrines, Nascimento et al. ont utilisé tout d'abord un four microonde domestique [83] puis un réacteur microonde à un seul mode (Figure 33) [84]. Différentes méso-trétraarylporphyrines ont été obtenues par irradiation d'une durée de 5 min d'un mélange de l'aldéhyde et du pyrrole dilués dans de l'acide propanoïque et du nitrobenzène, avec des rendements allant de 5 % à 55 %. Cette même équipe a montré également les avantages de l'oxydation hétérogène avec MnO_2 sous microonde ou non pour la synthèse de porphyrines méso-substituées (Figure 33) telle que la méso-tétraphénylporphyrine. L'emploi de MnO_2 facilite le travail de purification et coûte également moins cher que les oxydants, les quinones, couramment utilisés pour oxyder les porphyrinogènes en porphyrines.

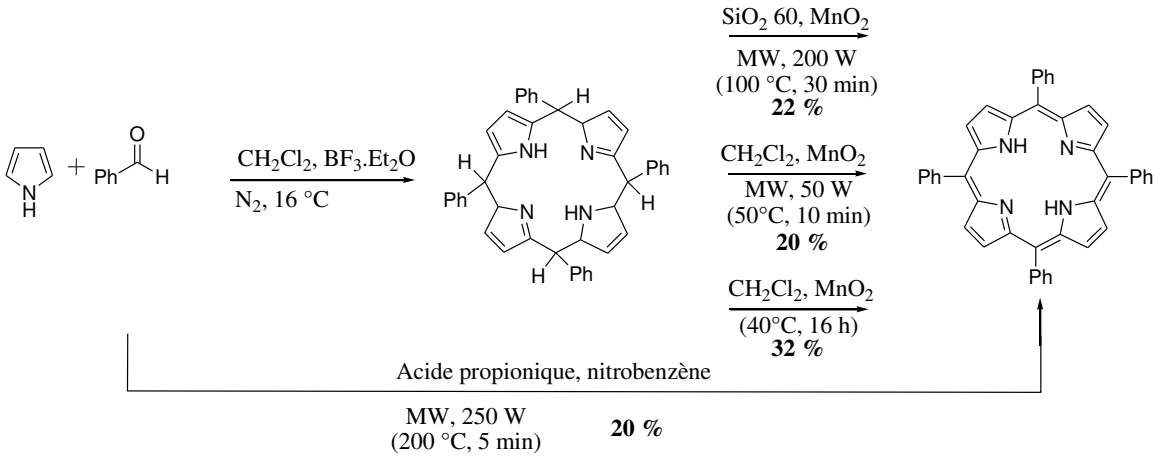


Figure 33. Synthèse de porphyrines par voie microonde (MW : *microwave*) [83, 84].

• *Synthèse à partir de pyrroles-carbinol*

Lindsey a également développé une méthode de synthèse à partir de pyrrole-carbinol. Celle-ci consiste à traiter une molécule de pyrrole avec du chlorure d'acyle afin d'obtenir un cétopyrrole qui est ensuite converti en pyrrole-carbinol désiré. Cette molécule réagit à chaud avec un acide en présence d'air pour former la porphyrine méso-substituée correspondante (Figure 34). Cette méthode a permis d'obtenir la TPP avec un rendement de synthèse de 41 % dans l'acide propionique [78].

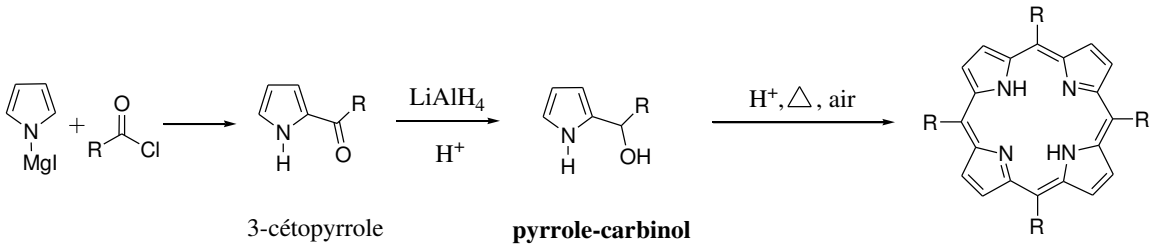


Figure 34. Synthèse d'une porphyrine à partir de pyrrole-carbinol [78].

Cependant, en pratique, il existe de nombreuses réactions secondaires pouvant interférer avec la formation du macrocycle comme la polymérisation du pyrrole, la formation d'enchaînement chaotique de motifs pyrrole et aldéhyde, la formation de chaînes non cyclisées qui diminuent le rendement de synthèse et qui compliquent les phases de purification chromatographiques du produit désiré obtenu. D'autres méthodes ont donc été développées pour remédier à ces problèmes.

- **Voie II : Couplage direct d'intermédiaires dipyrroliques, la synthèse « 2+2 »**

Cette méthode permet de synthétiser une très grande variété de porphyrines β-substituées asymétriques. Les dipyrrométhanes et les dipyrrométhènes sont les intermédiaires les plus utilisés.

● *Dipyrrométhanes*
Les dipyrrométhanes sont le plus souvent obtenus par condensation de deux unités de pyrrole avec un aldéhyde sous catalyse acide (Figure 35) [64, 85-87]. Pour les porphyrines méso-substituées, le formaldéhyde est employé, mais une grande série de porphyrines substituées peut être synthétisée en utilisant des aldéhydes possédant des groupes aliphatique ou aromatique [88].

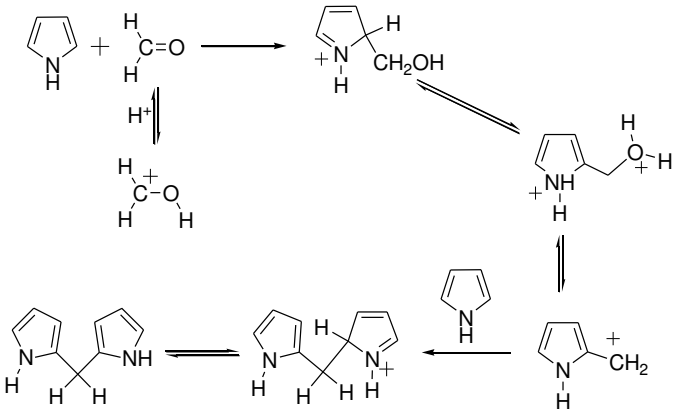


Figure 35. Synthèse d'un dipyrrométhane [89].

Woodward et MacDonald furent les premiers à synthétiser des porphyrines à partir de deux entités dipyrrométhanes au début des années 1960. La réaction des dipyrrométhanes conduit à la formation d'un intermédiaire porphyrinogène qui est ensuite rapidement oxydé à l'air pour donner la porphyrine correspondante (Figure 36). Plus précisément, la synthèse de MacDonald consiste en la condensation de 5,5'-diformyldipyrrométhane avec des dipyrrométhanes 5,5'-non substitués permettant d'obtenir une porphyrine avec un rendement de synthèse de 50 à 60 % [90, 91].

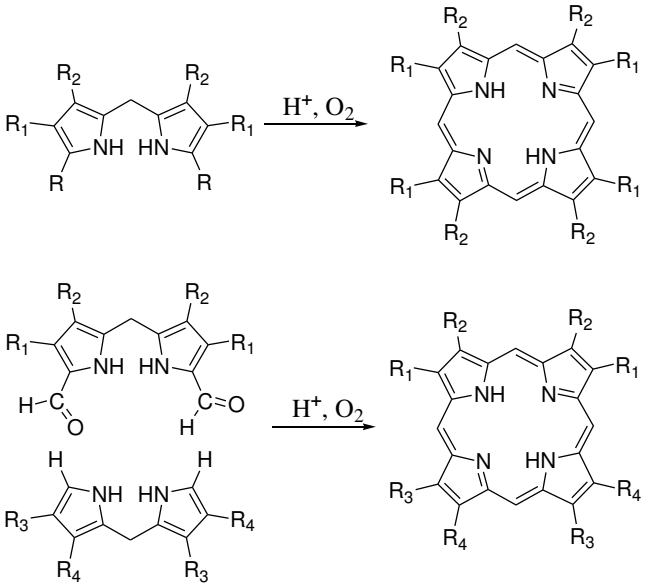


Figure 36. Schéma de synthèse d'une porphyrine par la méthode de Woodward et MacDonald.

En 1978, Ogoshi et al. ont développé une variante de cette méthode en condensant un dipyrrométhane sur un aldéhyde aromatique dans le benzène et sous catalyse acide (TFA) en

présence d'air comme oxydant. Cette alternative a permis la synthèse de divers 5,15-diarylporphyrines avec des rendements entre 30 et 40 % (Figure 37) [92].

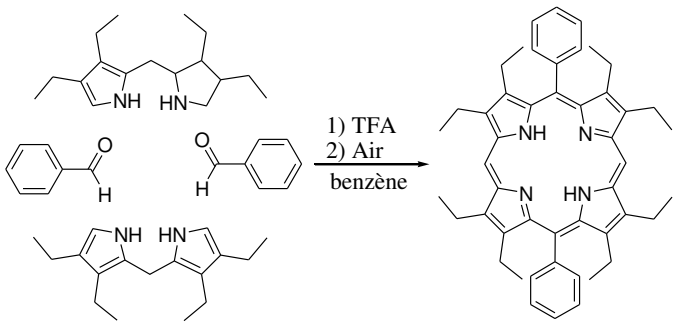


Figure 37. Schéma de synthèse de 5,15-diarylporphyrines par Ogoshi et al [92].

Manka et Lawrence ont réussi en 1989 à synthétiser des 5,15-diarylporphyrines par condensation de dipyrrométhanes et d'aldéhydes aromatiques avec des rendements de 73-92 %. A la différence des méthodes précédentes, les porphyrinogènes sont oxydés avec une quinone, le chloranil (Figure 38) [93].

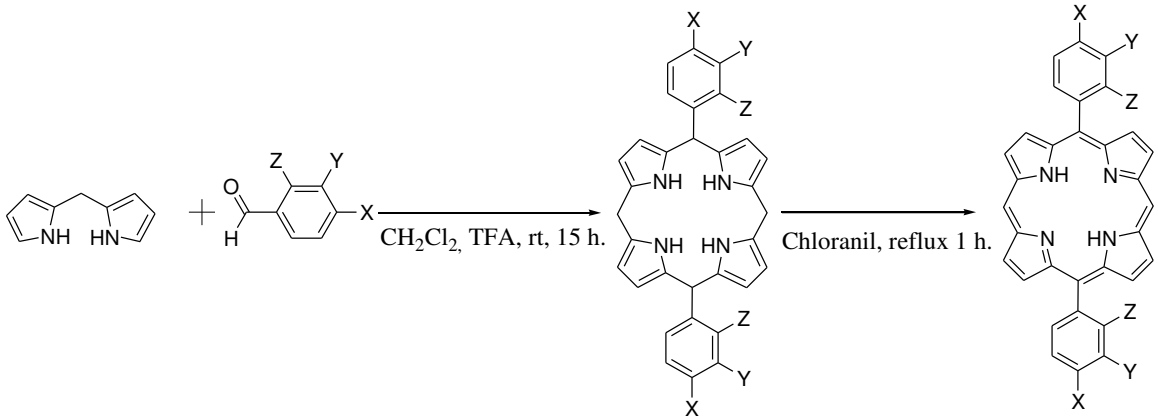


Figure 38. Schéma de synthèse de 5,15-diarylporphyrines par Manka et Lawrence [93].

● *Synthèse sur support solide*

Plus récemment, une étude a été menée sur les effets de la synthèse sur phase solide sur la procédure de MacDonald [94]. Un premier dipyrrométhane est couplé sur une résine de Merrifield. Dans un deuxième temps, le couplage entre le dipyrrométhane sur résine avec un second dipyrrométhane permet l'obtention d'un intermédiaire tétrapyrrolique qui, après traitement avec du TFA, du *p*-TsOH (acide *p*-toluènesulfonique) et du benzaldéhyde, donne la porphyrine sur support solide (Figure 39). Les rendements de synthèse des porphyrines par cette méthode sont compris entre 15 et 20 %.

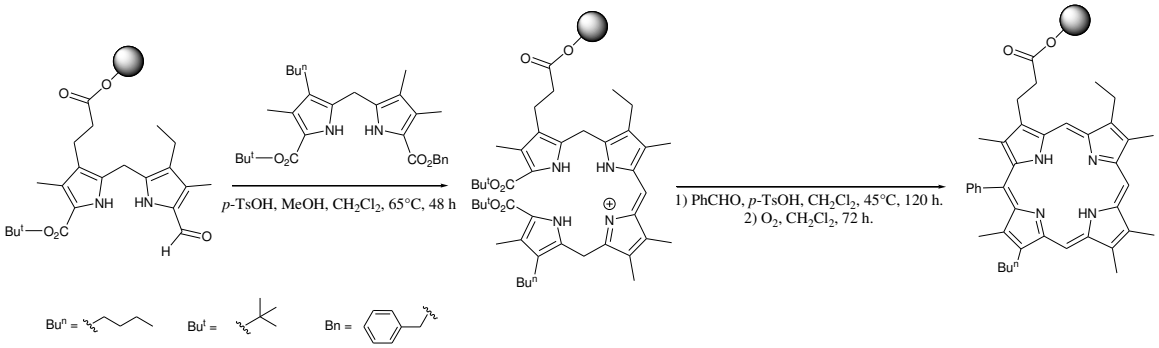


Figure 39. Synthèse sur phase solide d'une porphyrine à partir de dipyrrométhanes [94].

● *Dipyrrométhènes*

Une autre méthode consiste à former des dipyrrométhènes, base ensuite pour la synthèse de la porphyrine. Les dipyrrométhènes peuvent être obtenus à partir de dipyrrométhanes en milieu acide. Autre exemple possible, la condensation entre un 2,3-diméthylpyrrole et un 2-formyl-3,5-diméthylpyrrole, en milieu acide fournit un cation dipyrrométhène (Figure 40) [95]. La présence de la charge électronique modifie considérablement les propriétés de stabilité et de réactivité des dipyrrométhènes par rapport aux dipyrrométhanes.

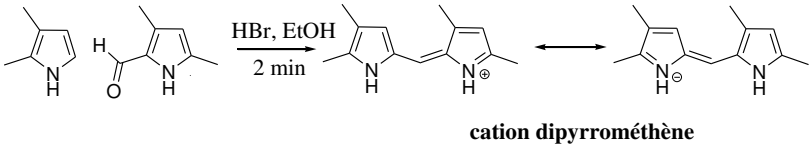


Figure 40. Formation d'un cation dipyrrométhène [95].

Les premières synthèses de porphyrine « naturelle » ont été accomplies par H. Fischer (qui reçut un prix Nobel en 1930) à partir de pyrrométhènes avec des rendements compris entre 0,2 et 20 % [96]. La condensation de deux pyrrométhènes a été réalisée dans des solutions acides (exemple, tartarique ou succinimique) à des températures supérieures à 200°C. Cependant, au vu des conditions expérimentales, cette procédure est limitée aux porphyrines symétriques [97]. Par la suite, il a été montré que la synthèse de porphyrines à partir de dipyrrométhènes peut être également effectuée dans l'acide formique en présence d'un équivalent de brome (Figure 41). Les porphyrines ont été obtenues avec des rendements compris entre 25 et 40 % [98].

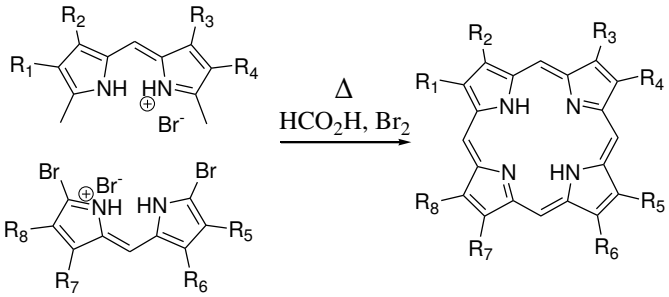


Figure 41. Exemple de synthèse de porphyrines *via* des dipyrrométhènes [98].

En 1988, Paine et al. montrent l'efficacité de l'utilisation de la bromation des dipyrrométhènes pour la synthèse de porphyrine. Ils réussirent à synthétiser des porphyrines à partir de ces composés avec de très bons rendements de 80-90 % [99]. La différence avec les autres méthodes vient de l'utilisation de DMSO et de pyridine lors de la synthèse de la porphyrine (Figure 42).

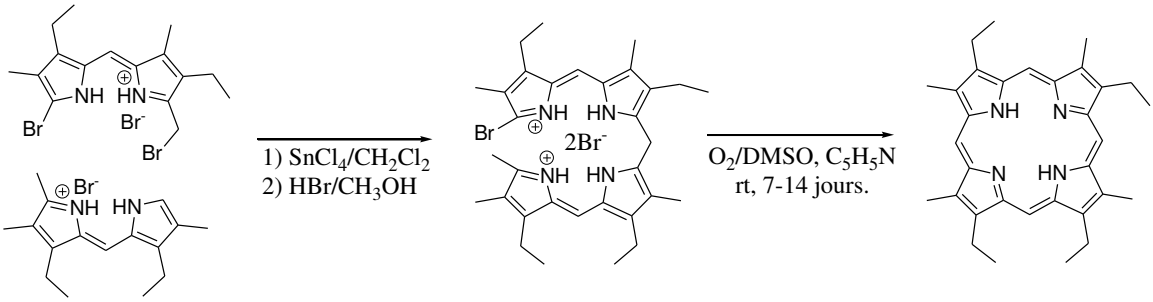


Figure 42. Synthèse améliorée de porphyrines *via* des dipyrrométhènes selon Paine et al. [99].

- **Voie III : Synthèse « 3+1 »**

La méthode « 3+1 » consiste à faire réagir un tripyranne dont les atomes de carbone en positions 1 et 14 sont non substitués avec un pyrrole portant deux fonctions alcool. Le plus simple des dipyrrométhanes peut être obtenu à partir du pyrrole dans une solution aqueuse d'acide acétique, réaction qui, en présence de carbonate de potassium, permet d'obtenir le (1*H*-pyrrole-2,5-diyl)diméthanol. Ce diol va ensuite réagir avec le pyrrole dans une solution d'acide diluée pour

donner le tripyranne. Le diol et le tripyranne vont réagir ensemble pour donner le porphyrinogène qui sera enfin oxydé, par une quinone, en porphyrine (Figure 43) [100].

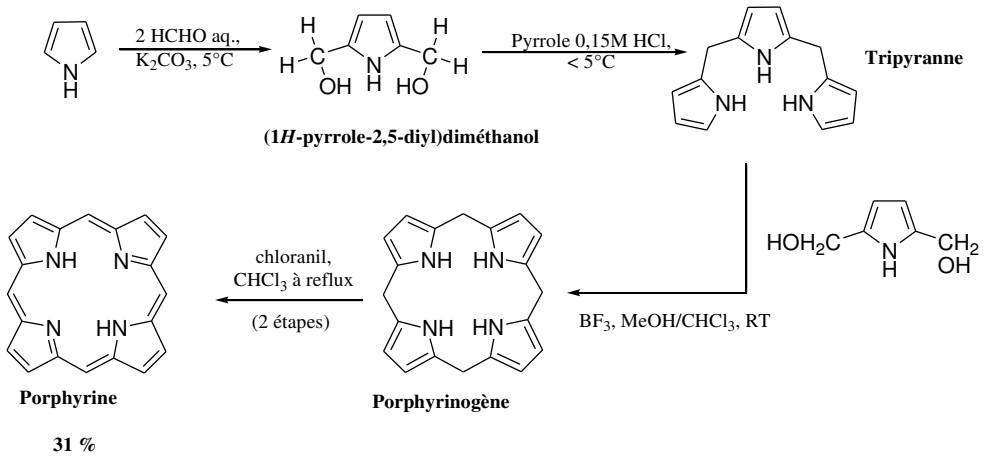


Figure 43. Schéma de synthèse du noyau porphyrine par la méthode « 3+1 » [100].

Plus tard, Hatscher et Senge [101] vont réussir à synthétiser par cette méthode, des porphyrines mono ou disubstituées en position méso avec des rendements allant de 4 à 75 % selon les aldéhydes utilisés. A la différence de la procédure précédente, le tripyranne est mis à réagir, non plus avec un diol, mais avec du pyrrole et des aldéhydes (Figure 44).

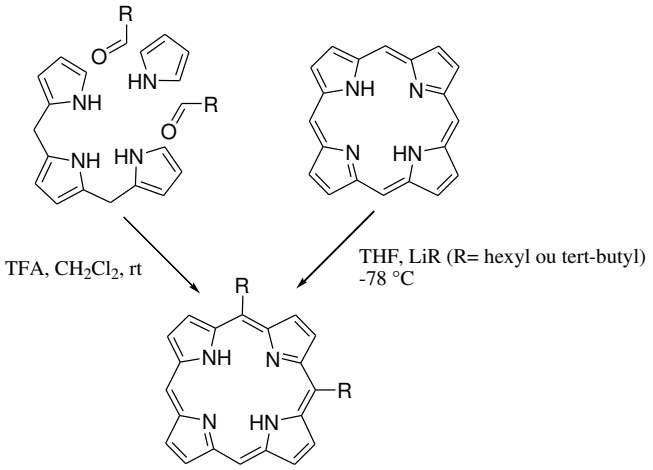


Figure 44. Synthèse de porphyrines substituées par la méthode « 3+1 » [101].

Pour former le macrocycle tétrapyrrolique des porphyrines, la dernière possibilité stratégique consiste à cycliser des intermédiaires tétrapyrroliques linéaires (ou bilanes). Cette approche est développée pour la synthèse de porphyrines β-substituées qui ne possèdent pas de symétrie. A la manière dont sont construites les séquences peptidiques ou nucléotidiques, l'intermédiaire est élaboré au cours d'une synthèse multi-étapes. Il est ensuite cyclisé, puis oxydé pour donner la porphyrine attendue.

En 2007, l'équipe de Lindsey a montré que cette nouvelle stratégie pour synthétiser des porphyrines avec quatre substituants méso différents (porphyrine ABCD), possédait certains avantages par rapport à la stratégie « 2+2 ». Cette équipe a étudié la transformation d'un bilane en milieu basique et en présence d'un complexe métallique. Les paramètres de la réaction de cyclisation du bilane pris en compte sont : le solvant, le sel métallique, la base, la concentration, la température, l'atmosphère et le temps de réaction. Les conditions optimales impliquent la réaction du bilane à 100 mM dans le toluène contenant du DBU (1,8-DiazaBicyclo[5.4.0]Undéc-7-ène, 10 mol équiv.) et $MgBr_2$ (bromure de magnésium, 3 mol équiv.) à 115°C exposé à l'air pendant deux heures (Figure 45). La porphyrine métallée (Mg) est synthétisée avec un rendement de 65 %. Le magnésium est

enlevé facilement et la porphyrine base libre est obtenue. Les avantages sont l'absence d'acide dans la formation de la porphyrine, l'utilisation d'un métal pour la cyclisation, la possibilité de réaliser la réaction à des concentrations élevées, l'absence d'oxydant, l'absence de dichlorométhane et l'augmentation du rendement de la porphyrine ABCD souhaitée [102].

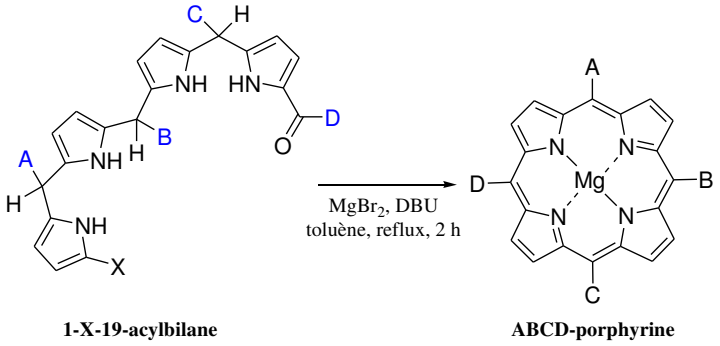


Figure 45. Synthèse d'une porphyrine ABCD *via* un bilane.

III.2.a.iv Synthèses de chlorine

Rappelons qu'une chlorine dérive structuralement d'une porphyrine par la réduction d'une double liaison en position β pyrrolique.

La réduction de porphyrines par du sodium dans un alcool a été étudiée pour la première fois par Fischer qui affirme avoir obtenu des mélanges de chlorine et bactériochlorine (celle-ci étant due à une réduction ultérieure de la chlorine désirée). Un peu plus tard, en 1957, Eisner et al. décident de reprendre ces travaux et d'établir la nature de chaque produit obtenu lors de cette réduction, en prenant comme exemple, l'octaéthylporphyrine. La réduction de l'octaéthylporphyrine a été effectuée avec du sodium dans de l'alcool isopentylique (3-méthylbutan-1-ol) à reflux et a permis d'obtenir 32,5 % d'octaéthylchlorine [103]. Grâce à la même procédure, la réduction de l'étiohemine avait été essayée par Schlesinger et al. auparavant en 1950. La chlorine a été obtenue avec un rendement de 34 % et la bactériochlorine obtenue avec un rendement de 40 % [104].

Une autre voie de synthèse des chlorines a été apportée par Whitlock et al. [105] en 1969 avec la méthode de réduction des porphyrines par les diimides. Ils ont ainsi réduit avec un bon rendement de 72 %, l'octaéthylporphyrine en octaéthylchlorine, avec le *p*-toluènesulfonylhydrazine (*p*-TSH) (Figure 46).

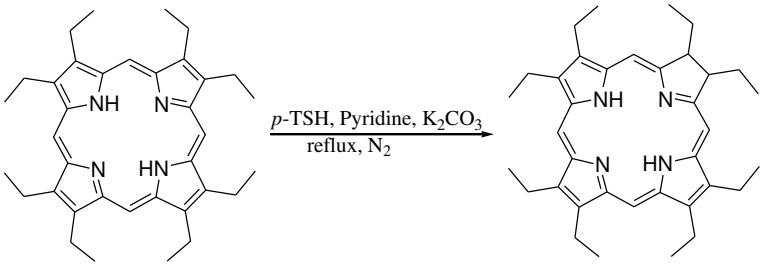


Figure 46. Synthèse de l'octaéthylchlorine par réduction diimide de Whitlock.

Des améliorations ont été apportées en réoxydant la bactériochlorine formée au cours de la réduction. La première étape qui consiste en la réduction de la porphyrine en bactériochlorine, s'inspire de la méthode précédente de Whitlock. La porphyrine est diluée dans de la pyridine fraîchement distillée en milieu basique avec du K_2CO_3. Du *p*-TSH est ajouté et la solution est portée à reflux. L'oxydation sélective de la bactériochlorine en chlorine se fait à l'aide d'*o*-chloranil (Figure 47). De nombreuses chlorines asymétriques [106, 107] ont été synthétisées *via* cette méthode.

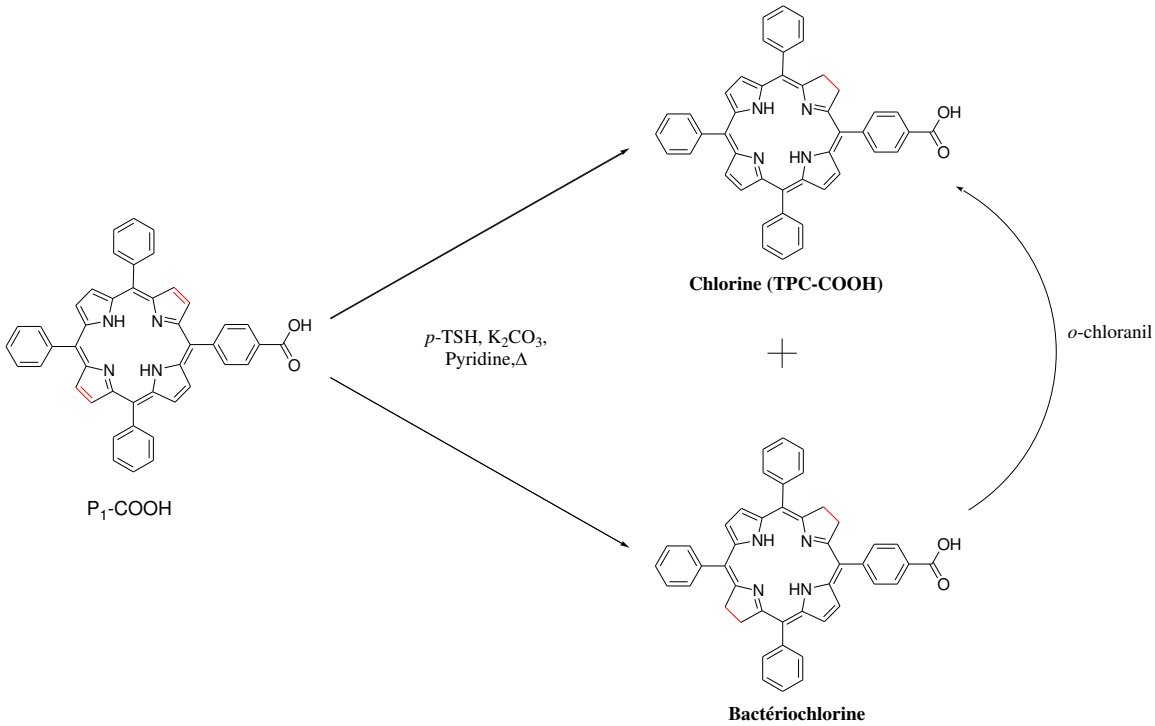


Figure 47. Synthèse sélective d'une chlorine : la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine TPC-COOH.

Bonnett et al. ont mis en place un procédé permettant d'introduire une fonction avec un oxygène dans les chlorines. Une solution froide de porphyrine diluée dans de l'acide sulfurique concentré en présence de peroxyde d'hydrogène donne l'oxochlorine correspondante. Ce procédé a permis de synthétiser l'octaéthyl-17-oxochlorine avec un rendement de 20 % (Figure 48) [108].

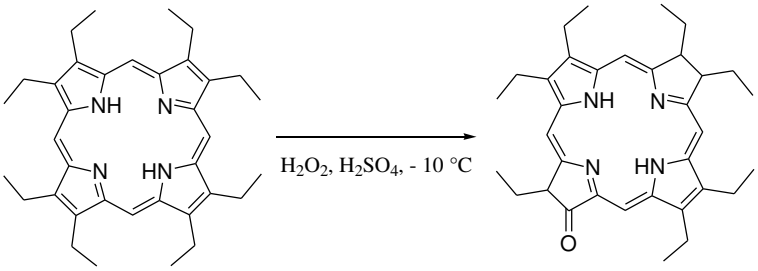


Figure 48. Synthèse de l'octaéthyl-17-oxochlorine par Bonnett et al. [108].

En 1972, H. Callot a démontré qu'il était possible d'utiliser des carbènes pour obtenir une cyclopropylchlorine à partir de la porphyrine correspondante [109] (Figure 49). Une cyclopropylchlorine est une chlorine comportant un cyclopropane accolé au noyau pyrrolique.

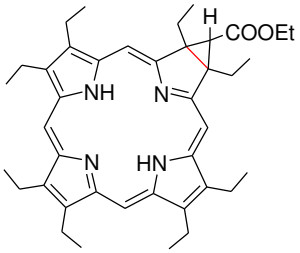


Figure 49. Chlorine obtenue par la réaction de carbéthoxycarbène sur l'octaéthylporphyrine [109].

Un autre oxydant peut être employé pour oxyder les porphyrines : OsO_4, le tétraoxyde d'osmium. Cette oxydation s'accompagne de l'addition de deux groupements hydroxyles sur les carbones β de la chlorine (Figure 50) [110, 111].

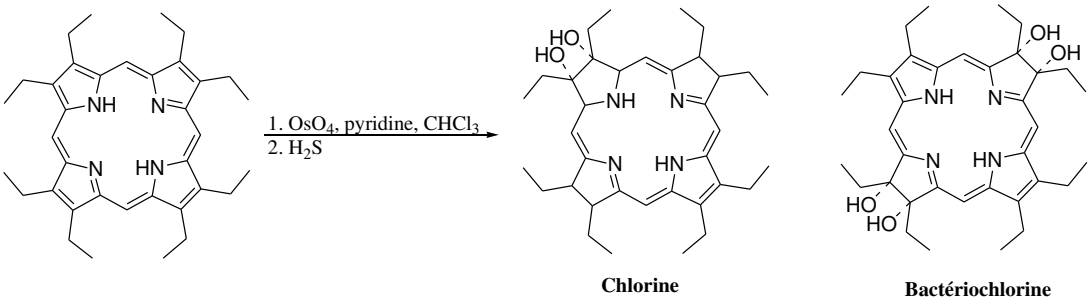


Figure 50. Synthèse de chlorine à l'aide d'OsO_4 [110].

Crossley et King [112] ont montré que des nitroporphyrines pouvaient être réduites en des nitrochlorines à l'aide de $NaBH_4$. Le groupement NO_2 de ces chlorines peut être ensuite enlevé en présence d'hydrure de tributylétain et d'azobiisobutyronitrile (AIBN) (Figure 51).

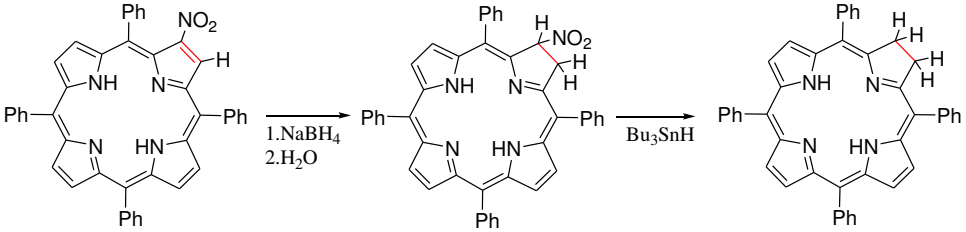


Figure 51. Réduction de porphyrine en chlorine à l'aide d'hydrure de tributylétain [112].

La formation sélective de *trans*-chlorines fonctionnalisées avec des rendements compris entre 40 et 70% peut être réalisée à partir de nitro-tétraphénylporphyrines avec des malonates ou le malononitrile en présence d'une base comme le DBU [113] ou le K_2CO_3 [114] (Figure 52).

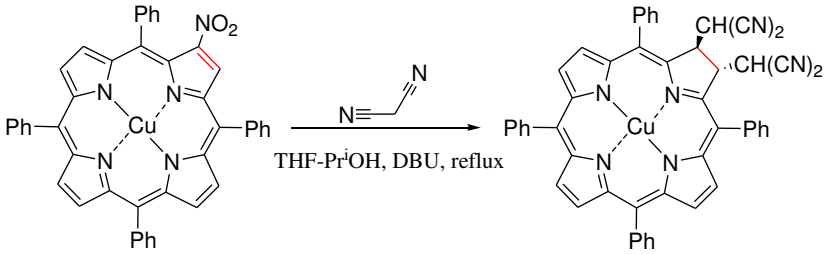


Figure 52. Synthèse de chlorine à l'aide de malonitrile en présence d'une base [113].

- **Couplage direct d'intermédiaires dipyrroliques, la synthèse « 2+2 »**

En 1993, Burns et al. ont synthétisé une chlorine zinguée à partir de deux unités pyrrométhanes avec un rendement de 27 % (Figure 53) [115].

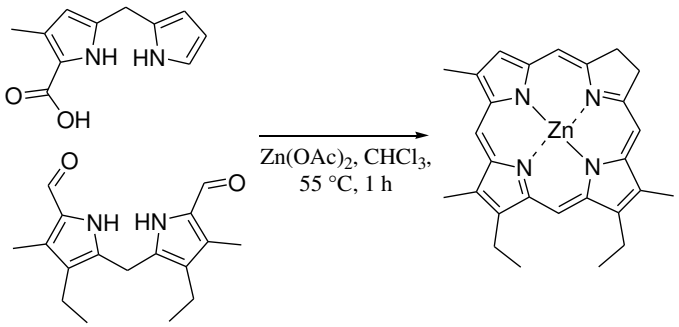


Figure 53. Synthèse d'une chlorine à partir de pyrrométhanes [115].

- **Synthèse microonde**

En 2010, le procédé de synthèse assisté par microondes prouve sa validité pour la synthèse de chlorine et de bactériochlorine (Figures 54 et 55). L'étape d'irradiation a remplacé celle du

chauffage utilisé dans les autres méthodes. Suite à la première synthèse de la méso-5,10,15,20-tétraphénylporphyrine, une large gamme de composés a été obtenue dont les métalloporphyrines [84].

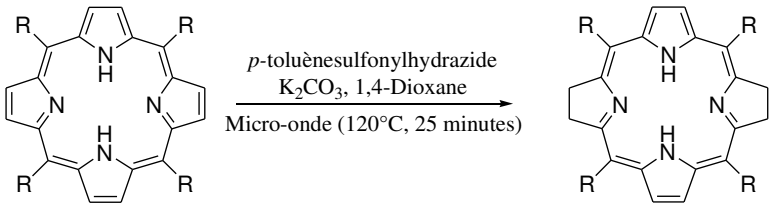


Figure 54. Réaction de l'étape de synthèse d'une bactériochlorine [84].

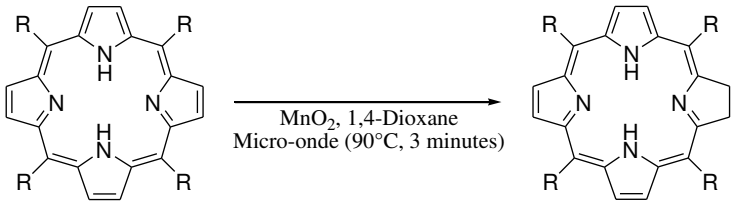


Figure 55. Réaction de l'étape de synthèse d'une chlorine [84].

- **Synthèse *via* une étape d'extraction d'un composé naturel**

La purpurine-18, un dérivé de la chlorophylle, est une chlorine intéressante comme point de départ pour générer d'autres photosensibilisateurs tels que les purpurinimides, absorbant entre 700 et 850 nm et montrant une activité anti-tumorale efficace. Une méthode simple et rapide pour obtenir cette chlorine avec un rendement élevé (99,6 %) a été décrite par Drogat et al. [116] à partir d'une algue, la *Spirulina maxima*. La première étape consiste à extraire les pigments de cette algue, extraits ensuite oxydés par du dioxygène en présence de NaOH (oxydation du cyclopentane). Un traitement acide ensuite permet de saponifier les deux fonctions ester et ainsi obtenir la purpurine-18 (Figure 56). Cette même méthode a été utilisée pour obtenir la bactériopurpurine-18, avec un très bon rendement de 91 %, à partir de la bactériochlorophylle-a extraite à partir de bactéries, les *Rhodobacter sphaeroides* (bactéries photosynthétiques aquatiques) [117].

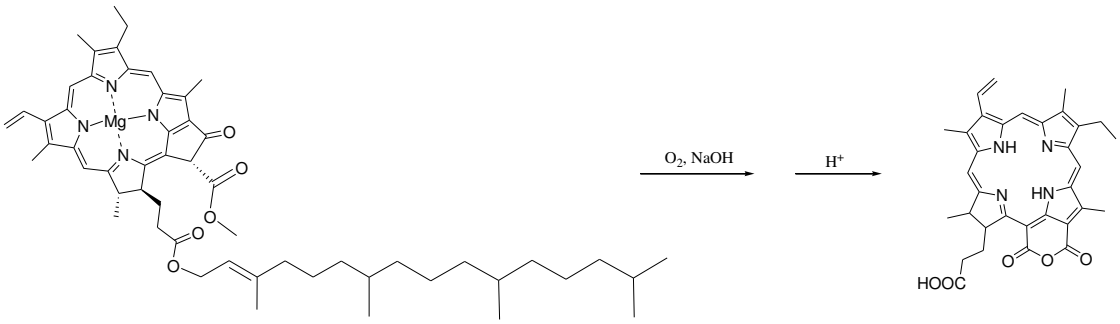


Figure 56. Synthèse de la purpurine à partir de la chlorophylle-a [116].

La pyrophéophorbide-a et la chlorine e6 sont des tétrapyrroles intermédiaires de la dégradation de la chlorophylle-a [118]. Cette dernière peut être extraite de feuille (0,1 et 1 % en masse de feuille, jusqu'à 1% dans les épinards) [119] ou d'une algue lyophilisée *Spirulina* [120]. Le traitement de la chlorophylle en milieu acide cause la démétallation, permettant la formation de la phéophytine a et b, qui peuvent être hydrolysées en phéophorbide a et b. Ces dernières chauffées à reflux dans la collidine pendant 90 min donnent les pyrophéophorbides correspondantes a et b (Figure 57) [121]. La méthylphéophorbide-a est obtenue par transestérification du groupement ester phytylique de la chlorophylle-a avec un ester méthylique. La triméthylchlorine e6 est ensuite synthétisée *via* l'ouverture du cycle de la méthylphéophorbide a dans le méthanol en présence de méthanolate de

sodium avec un rendement de 98%. L'hydrolyse des fonctions esters permet d'obtenir la chlorine e6 [122].
La pyrophéophorbide-*a* peut être également obtenue à partir du même dérivé ester de la chlorine-e6 (Figure 57). La réaction peut être effectuée dans la pyridine, mais il a été montré que pour améliorer cette synthèse, il est possible d'utiliser un analogue tel que la collidine afin d'augmenter le point d'ébullition de la réaction. En augmentant ce point d'ébullition, il est possible de réaliser la décarboxylation sans faire intervenir de purification et manipulation supplémentaires [122].

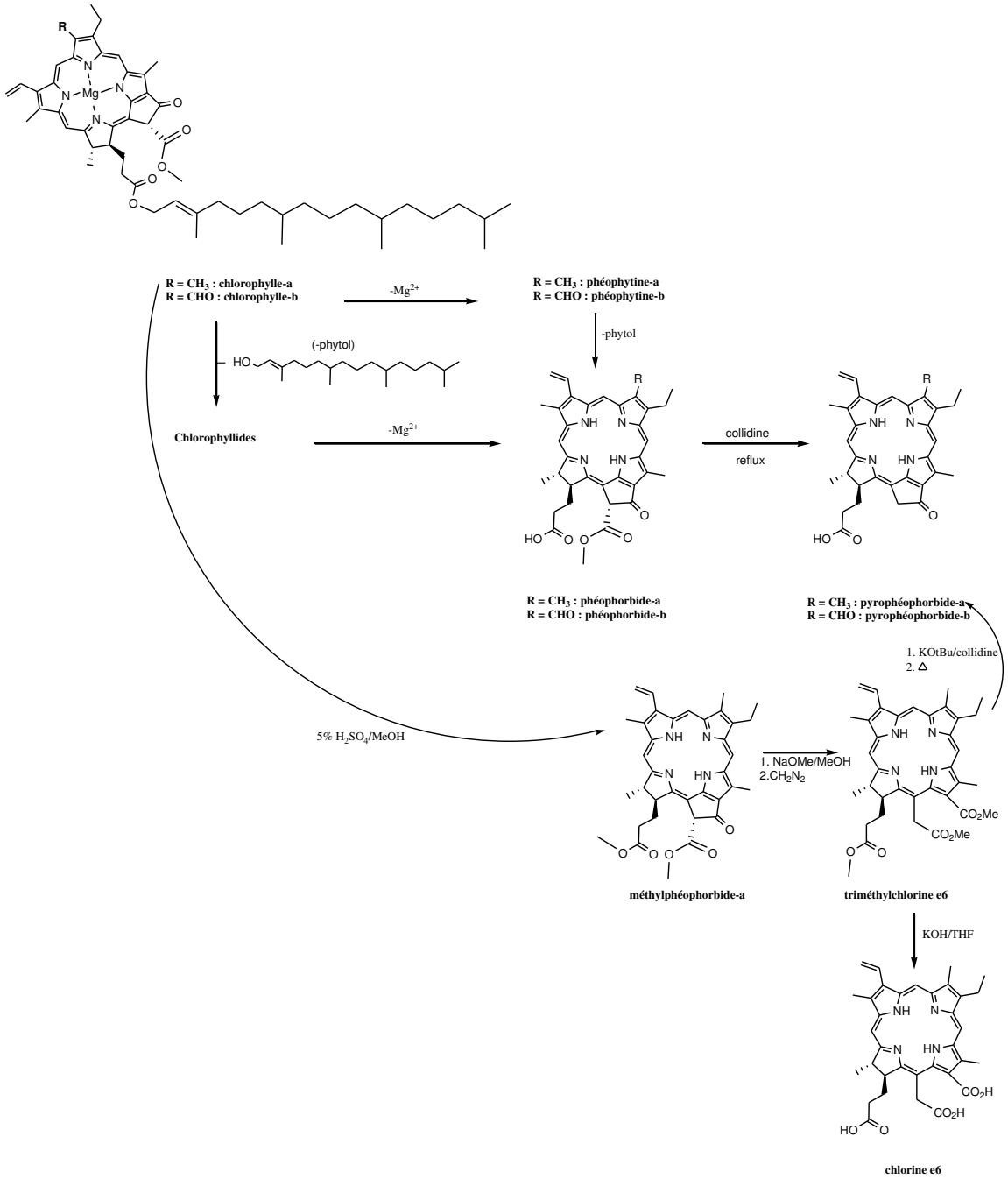


Figure 57. Schéma de la dégradation de la chlorophylle en pyrophéophorbide et en chlorine e6 [121, 123].

III.2.b Les Phtalocyanines

III.2.b.i Structure

Les phtalocyanines (Pcs) ont une structure semblable à celle des porphyrines ; ce sont des porphyrines de synthèse (tétrabenzo-[5,10,15,20]-tétraazaporphyrines), qui n'existent que sous forme de traces à l'état naturel (Figure 58).

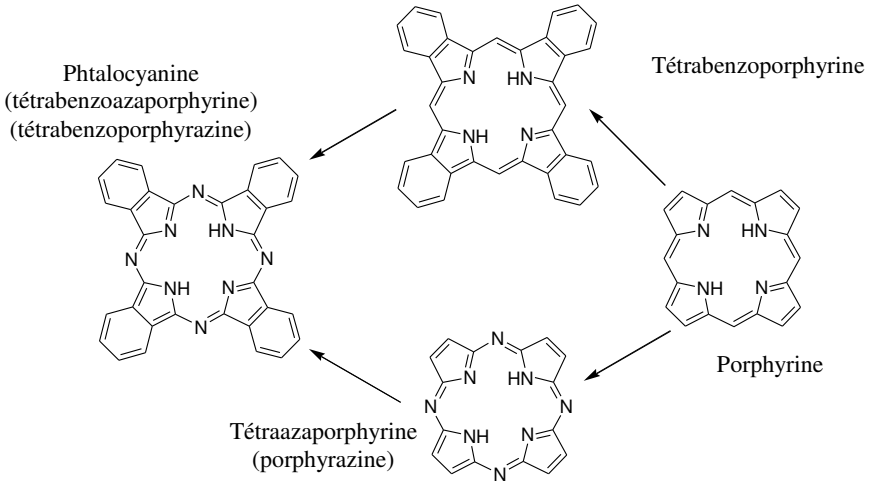


Figure 58. Composés connexes aux phtalocyanines et aux porphyrines.

Les phtalocyanines sont des macrocyc1es aromatiques plans de 18 électrons π comprenant 4 groupements isoindoles liés en position 1-3 par des ponts azotes : macrocycle tétraazaisoindole (Figure 59). La remarquable délocalisation bidimensionnelle des électrons π sur ces macrocycles leur confère des propriétés physiques uniques. Par ailleurs, les phtalocyanines sont stables chimiquement et thermiquement. Les phtalocyanines ont la possibilité d'incorporer au sein de leur cavité différents cations métalliques tout comme les porphyrines. Il est aussi possible de leur greffer différents substituants, principalement sur les positions α et β. Les positions 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 correspondent aux positions α ou positions non-périphériques tandis que les positions 2, 3, 9, 10, 16, 17, 23, 24 sont nommées positions périphériques ou positions β [63, 124].

Les phtalocyanines sont souvent synthétisées sous forme de métallophtalocyanines (Figure 59), comprenant en leur centre un ion qui est le plus souvent du zinc, de l'aluminium ou du silicium. L'inconvénient majeur de ces molécules est leur très mauvaise solubilité dans les solvants usuels (dichlorométhane, éthanol…), et notamment dans l'eau. Des dérivés hydrophiles, comme le Photosense, une phtalocyanine d'aluminium, ont été synthétisés en fonctionnalisant les motifs isoindoliques avec des groupements sulphonate SO_3^- [125].

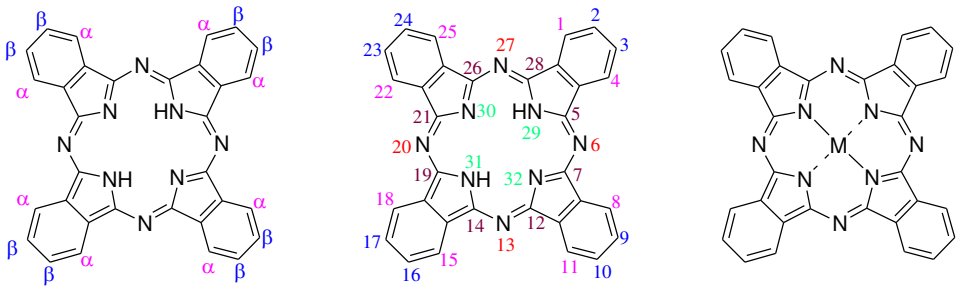


Figure 59. Numérotation et appellation des positions de la phtalocyanine selon l'IUPAC [63] et structure d'une métallophtalocyanine.

III.2.b.ii Propriétés photophysiques

- **Absorption**

Les spectres d'absorption des phtalocyanines 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 60).

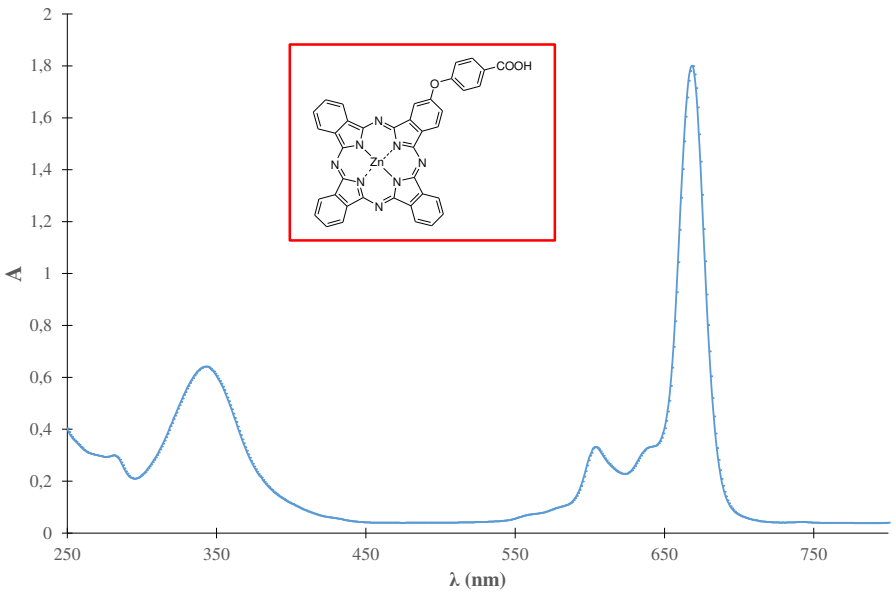


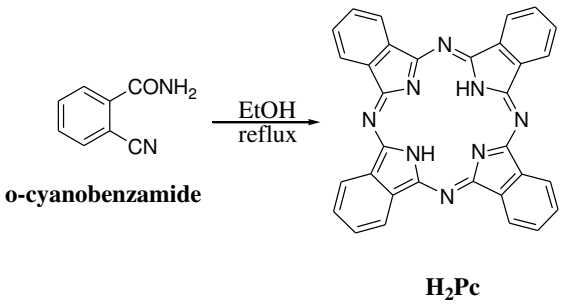
Figure 60. Spectre d'absorption d'une phtalocyanine zinguée dans l'éthanol.

- **Fluorescence et production d'oxygène singulet**

Dans le cas des phtalocyanines, la fluorescence s'observe dans le rouge vers 670 nm, mais la bande d'émission, ainsi que le rendement quantique de fluorescence sont dépendants de la substitution tout comme la production d'oxygène singulet. Le problème des phtalocyanines est la forte agrégation de ces molécules dans les solvants usuels, particulièrement pour les phtalocyanines métallées. Ceci diminue leur rendement quantique de production d'oxygène singulet [15, 126, 127].

III.2.b.iii Synthèses

En 1907, Braun et Tcherniak observèrent une impureté de teinte bleue obtenue accidentellement à partir de la molécule de *o*-cyanobenzamide dans l'éthanol à reflux (Figure 61) [128]. Ce composé s'avéra être la phtalocyanine notée H_2Pc. La phtalocyanine de cuivre (CuPc) fut préparée pour la première fois en 1927 par Diesbach et Von der Weid, avec un rendement de 23 % [129]. La troisième observation d'une phtalocyanine a été faite dans une compagnie nommée *Scottich dyes* en 1929. Pendant la préparation d'une phtalimide à partir d'un anhydride phtalique et d'ammoniac, une impureté bleue apparaîssait [130]. Linstead et al. de l'université de Londres découvrirent la structure des phtalocyanines et développèrent de nombreuses méthodes synthétiques de phtalocyanines métallées de 1929 à 1934 [131].



o-cyanobenzamide **H_2Pc**

Figure 61. Synthèse de la H_2Pc.

Les modes de synthèse et les produits de départ sont très nombreux, nous nous limiterons donc dans cette thèse aux voies les plus couramment suivies. La plupart des phtalocyanines sont synthétisées à partir de phtalonitrile, anhydride phtalique ou de dérivés phtalimides.

- **A partir de phtalonitrile**

La méthode la plus couramment utilisée est la cyclisation du 1,2-dicyanobenzène (phtalonitrile), ou de l'un de ses analogues, autour de différents ions métalliques. Les réactifs employés sont souvent un sel du métal, le métal lui-même ou un de ses oxydes. Pour obtenir des phtalocyanines, on peut faire réagir un phtalonitrile avec un anion alkoxide ou de lithium (Figure 62) [132]. Cette réaction peut être réalisée en tube scellé, sans adjonction de solvant, ou dans des solvants tels que le diméthylaminoéthanol (DMAE) [133]. La réaction d'un phtalonitrile peut également s'effectuer avec une base, telle que la DBU, dans un alcool (pentanol, par exemple) à reflux [134, 135]. Le DBU enlève le proton du solvant pour former l'éthanolate nécessaire à la cyclisation.

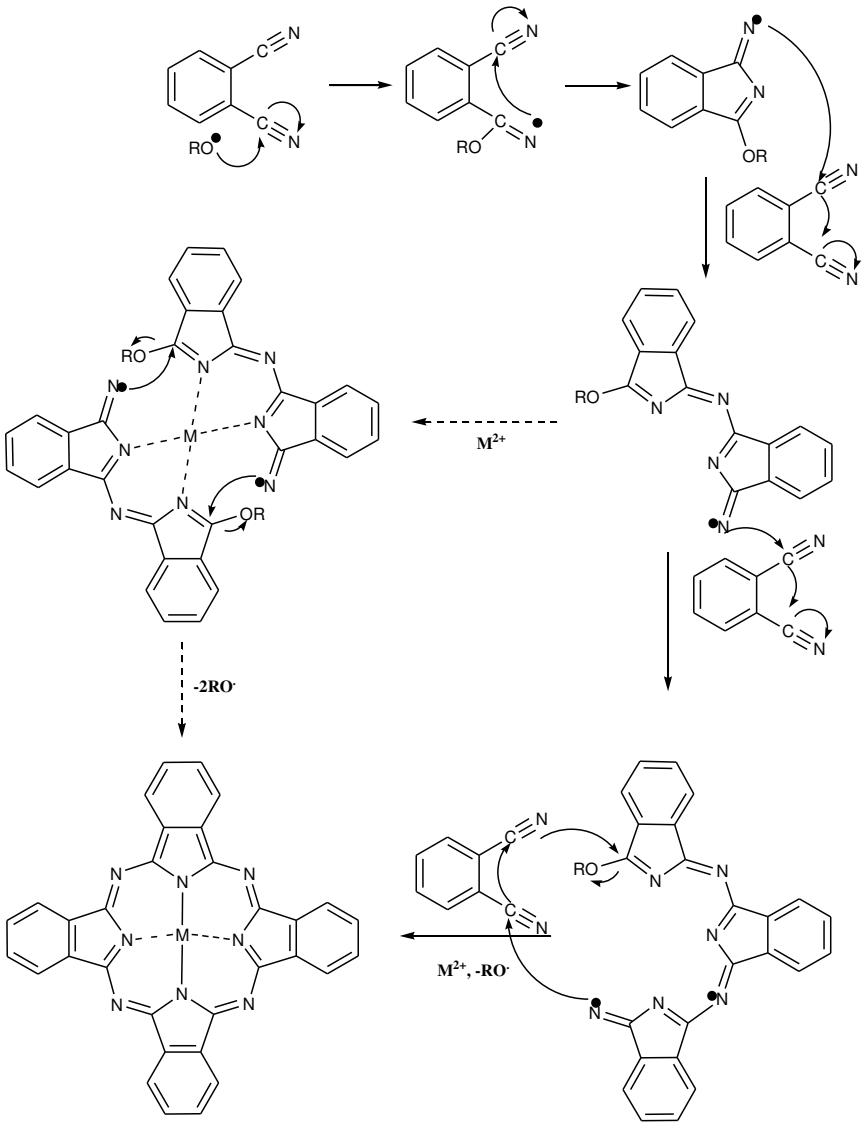


Figure 62. Mécanisme de cyclisation du phtalonitrile en phtalocyanine [132].

- **A partir d'anhydride phtalique**

L'anhydride phtalique, résultant de la déshydratation de l'acide phtalique, sert également à la synthèse des macrocycles phtalocyanine par réaction avec un sel d'ion métallique, en présence d'urée et d'un sel de molybdène jouant le rôle de catalyseur (Figure 63) [136].

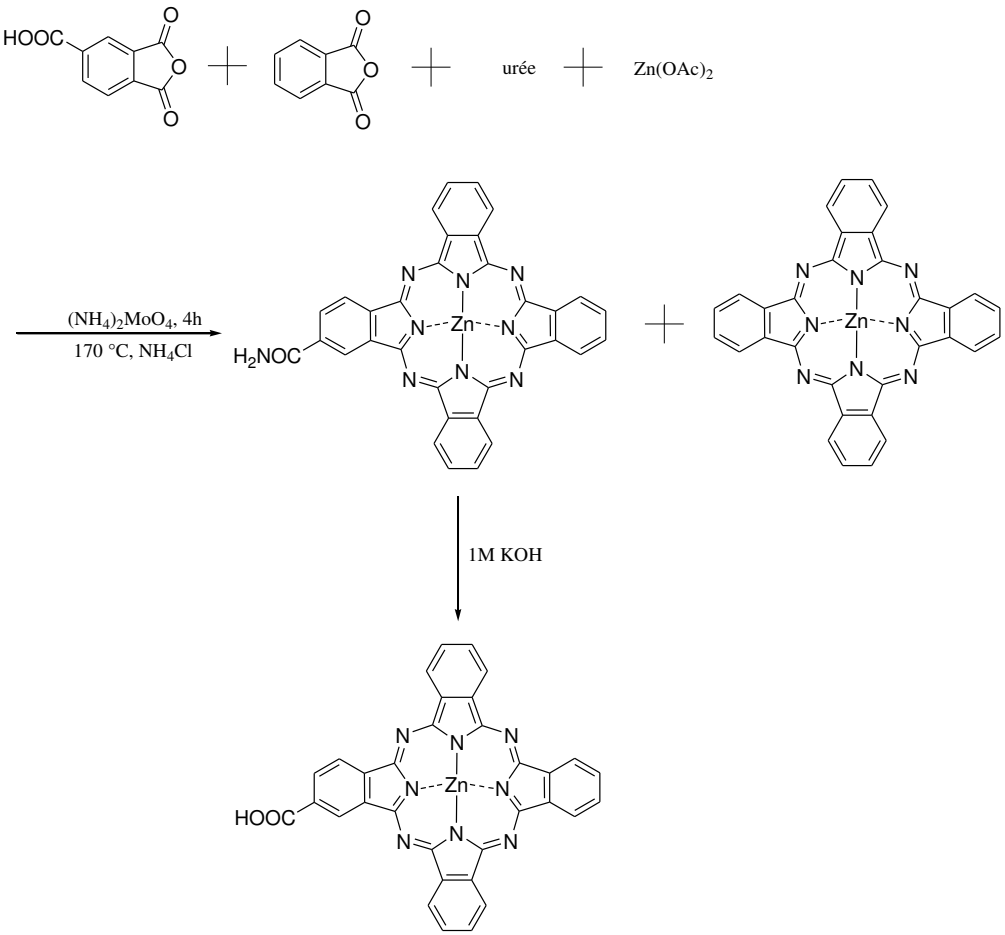


Figure 63. Synthèse d'une phtalocyanine *via* un anhydride phtalique [136].

- **A partir de dérivés phtalimide**

Les Phtalonitriles peuvent être convertis en phtalimides par addition d'ammoniac gazeux à un dérivé du 1,2-dicyanobenzène en solution dans le méthanol en présence de méthoxide de sodium, à température ambiante ou à reflux dans le méthanol [137]. Un phtalimide peut ensuite être condensé sur lui-même pour former la phtalocyanine d'hydrogène ou métallée, lorsque la réaction est réalisée en présence d'un ion métallique. Cette réaction s'effectue dans le DMAE (Figure 64) [133, 137].

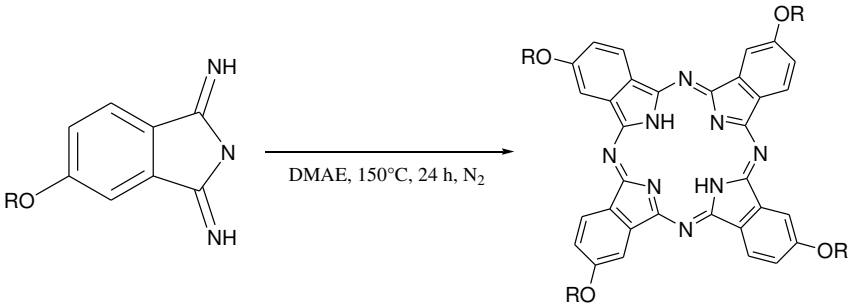


Figure 64. Synthèse d'une phtalocyanine à partir d'un dérivé phtalimide [137].

- **Synthèse sur support solide**

En 1982, Leznoff et al. montre que la synthèse sur phase solide pourrait être utilisée avantageusement dans la synthèse de phtalocyanines asymétriques. La synthèse de la 2-(6'-hydroxyhexoxy)-9,16,23-triisoproxyphtalocyanine (Figure 65) a été réalisée sur une résine diiminoisoindoline (dérivé phtalimide) avec un rendement de 24 % [138]. Peu de temps après, en 1986, Wöhrle et al. synthétise une phtalocyanine A_3B sur un support solide (une résine de divinylbenzène-styrène) à partir de phtalonitrile avec un rendement de 22 % (Figure 66) [139].

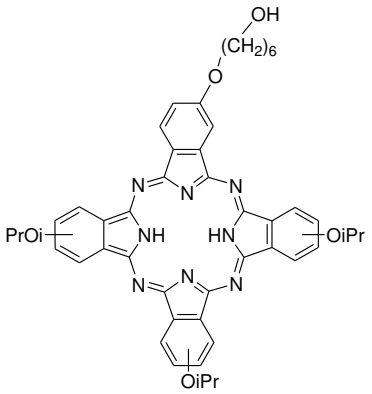


Figure 65. Schéma de la 2-(6'-hydroxyhexoxy)-9,16,23-triisoproxyphtalocyanine.

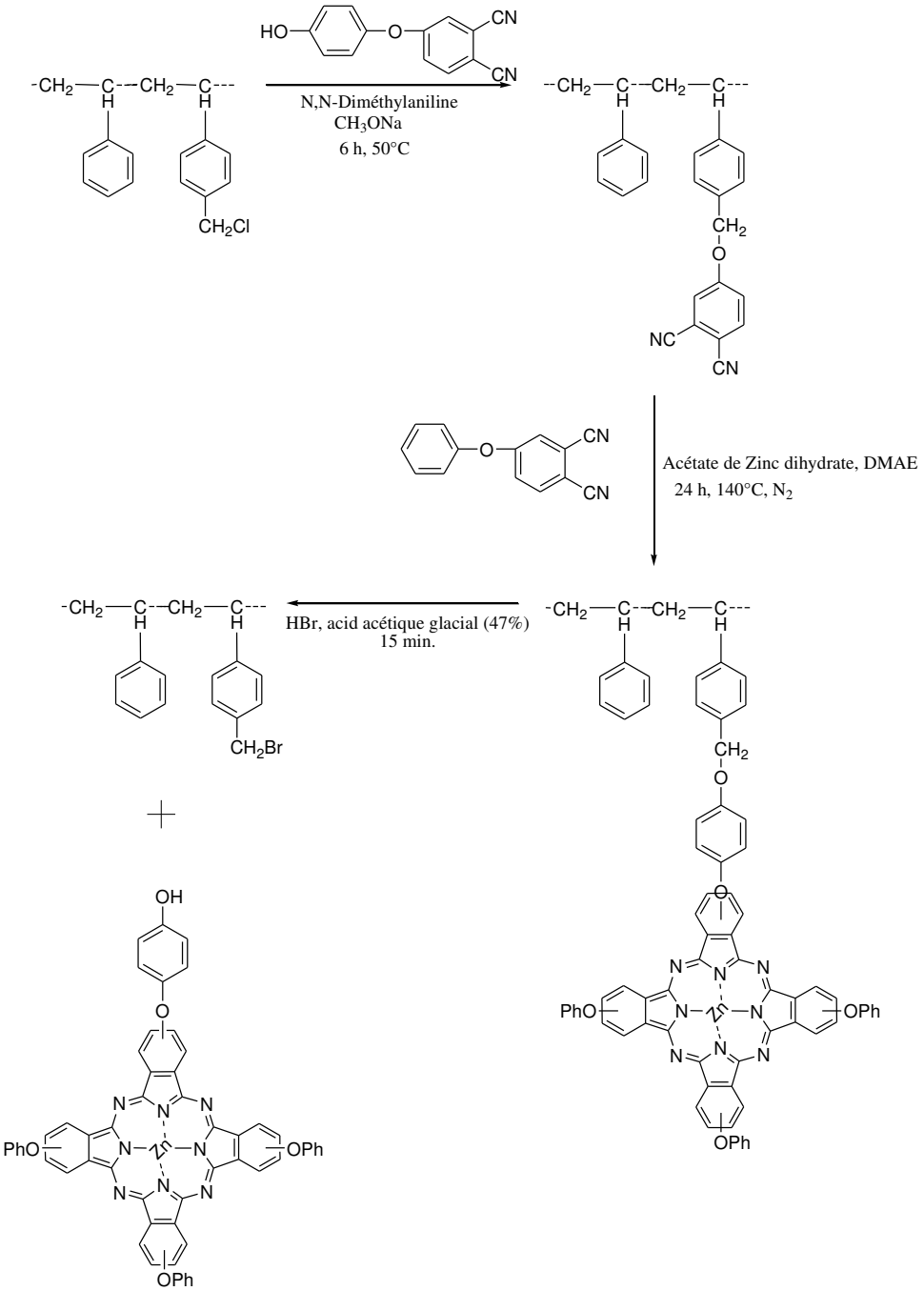


Figure 66. Synthèse d'une phtalocyanine en phase solide [139].

Classiquement, les photosensibilisateurs sont répartis selon quatre générations que nous allons à présent détailler.

III.3 PS de 1ère génération

C'est incontestablement W.H. Hausmann qui est responsable de l'utilisation des photosensibilisateurs à base de porphyrine en PDT lorsqu'il a montré le caractère phototoxique de l'**hématoporphyrine** (Figure 26) chez la souris en 1911. L'hématoporphyrine est dérivé de l'hydrolyse acide de l'hémoglobine et a été produite pour la première fois en 1841 sous forme impure par Von Scherer qui a traité du sang séché avec de l'acide sulfurique [140]. En 1913, Meyer-Betz met en évidence le rôle photosensibilisateur de l'hématoporphyrine Hp chez l'homme, en s'injectant 200 mg de ce constituant. Il ne ressentit aucun effet notable puis en s'exposant à la lumière du soleil, il développa une réaction violente qui perdura pendant plusieurs mois [140, 141].

Le phénomène d'accumulation des porphyrines *in vivo* dans les tissus en croissance est connu depuis le début du siècle grâce au chercheur français Policard ayant remarqué dès 1924 une fluorescence rouge de certaines tumeurs, qu'il attribua à une accumulation porphyrique dans ces structures [140]. Durant la seconde guerre mondiale, Auler et Banzer étudièrent l'interaction de l'hématoporphyrine avec le tissu néoplasique et confirmèrent les résultats de Policard sur l'accumulation de l'hématoporphyrine par les cellules tumorales [142].

L'utilisation de l'**hématoporphyrine dérivée** (**HpD**), mélange de porphyrines, en PDT a été introduite par Lipson et al. dans les années 1960 [143]. Son obtention se fait par acétylation du dihydrochlorhydrate d'hématoporphyrine avec un mélange acide sulfurique à 5 % / acide acétique, suivi de la neutralisation du produit de la réaction par de la soude (Figure 67) [144].

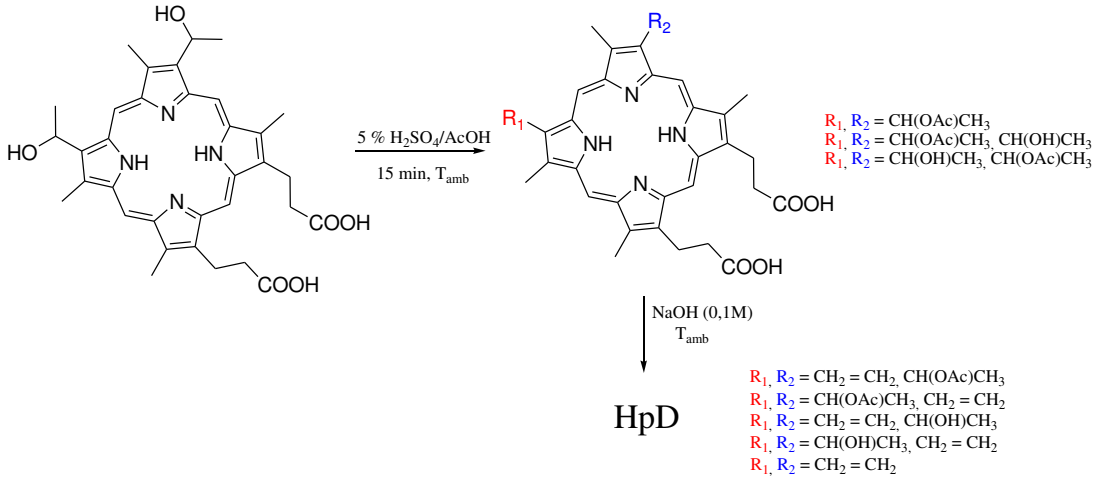


Figure 67. Schéma représentant la préparation de l'HpD [145].

En 1987, Dougherty proposa une nouvelle purification de l'hématoporphyrine [146] qui permit la production du **Photofrin®**, nom commercial sous lequel une fraction enrichie en produits photoactifs de HpD, les DHE (*dihematoporphyrin ether and ester*, Figure 68) [147], est commercialisée et qui fut le premier PS à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 1993 au Canada pour le traitement du cancer de la vessie [148] et est, à ce jour, le PS le plus utilisé en clinique [149].

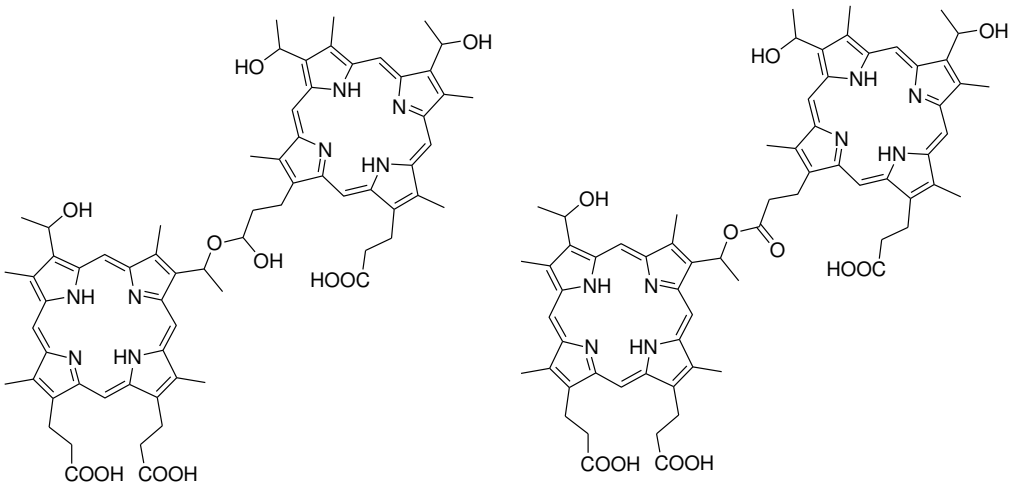


Figure 68. Structures chimiques de l'éther dihématoporphyrine (à gauche) et de l'ester de dihématoporphyrine (à droite) : les DHE.

Le Photofrin® a une photocytotoxicité efficace, mais il présente certaines limites :
- ses propriétés pharmaceutiques sont difficiles à étudier, comme ce n'est pas un composé chimiquement pur,
- il ne présente qu'une faible absorption à 630 nm,
- il n'est pas sélectif des tissus tumoraux et s'élimine lentement de l'organisme. Cette propriété est à l'origine de la photosensibilité cutanée des patients. Les photoréactions telles que les brûlures solaires, peuvent être évitées par le port de vêtements de protection et de lunettes. Ces précautions doivent être respectées durant quatre à huit semaines après le traitement [145].

III.4 PS de 2ième génération

Pour remédier aux inconvénients du Photofrin®, une nouvelle génération de photosensibilisateurs a été développée à partir de macrocycles tétrapyrroliques tels que les porphyrines et leurs dérivés, chlorines, bactériochlorines ou phtalocyanines. Seuls les principaux PS de cette seconde génération approuvés cliniquement dans le monde ou en Europe seront décrits ici.

- Le **Foscan®** ou **Temoporfin** (***m*-THPC**, 5,10,15,20-tétra(*m*-hydroxyphényl)chlorine, Figure 69) est une chlorine obtenue par hydrogénation d'une double liaison C = C du macrocycle de la porphyrine correspondante, la *m*-THPP [150]. Le Foscan® a reçu en Europe une AMM généralisée en 2008 [151] et est utilisé actuellement pour traiter les cancers de l'œsophage, de la tête, du cou, du poumon, du larynx ou de la peau [8, 152]. Comparé au HpD, ce composé possède une activité photosensibilisatrice accrue [153], un maximum d'absorption déplacé vers le rouge (630 pour HpD et 650 nm pour Foscan®) et une meilleure localisation dans les cellules tumorales [154] ; ceci permet une diminution des doses injectées au patient (lumière et médicament) ainsi qu'une diminution du temps de traitement [148]. La métabolisation du Foscan® est plus rapide que celle du Photofrin® mais reste toujours longue, le photosensibilisation pouvant se prolonger au-delà d'une semaine, et il présente également encore une trop faible sélectivité pour les tissus tumoraux [149].
- La **Visudyne®** ou **Verteporfin** (Figure 69) est un dérivé de chlorine (ou également de benzoporphyrine) synthétisé à partir de la protoporphyrine [155] recevant en 2000 une AMM [156]. Ce composé est un très bon générateur d'oxygène singulet et possède un coefficient d'extinction molaire élevé vers 689 nm [157]. Cette molécule est rapidement éliminée par l'organisme ce qui permet de minimiser la photosensibilité [155]. La Visudyne® est actuellement utilisée cliniquement pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [158, 159].

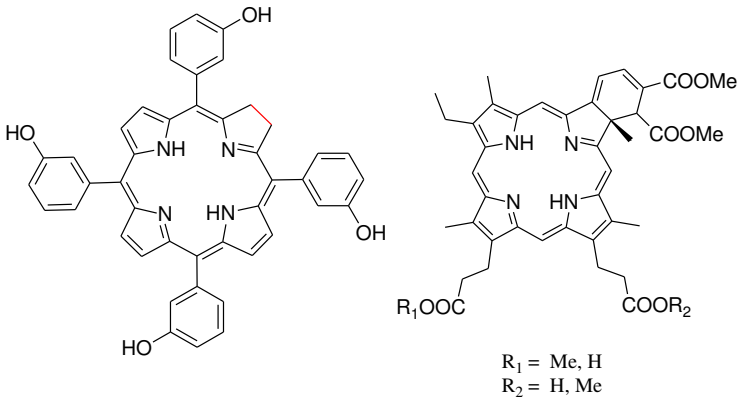


Figure 69. Photosensibilisateurs de 2ième génération : le Foscan® (à gauche) et la Visudyne® (à droite).

Une autre approche utilisée en photothérapie dynamique est la synthèse de porphyrines endogènes. L'**acide 5-aminolévulinique** (**5-ALA**, Figures 70 et 71) est un précurseur de la biosynthèse de l'hème et donc également de la protoporphyrine IX (Figure 70), agent photosensibilisateur.

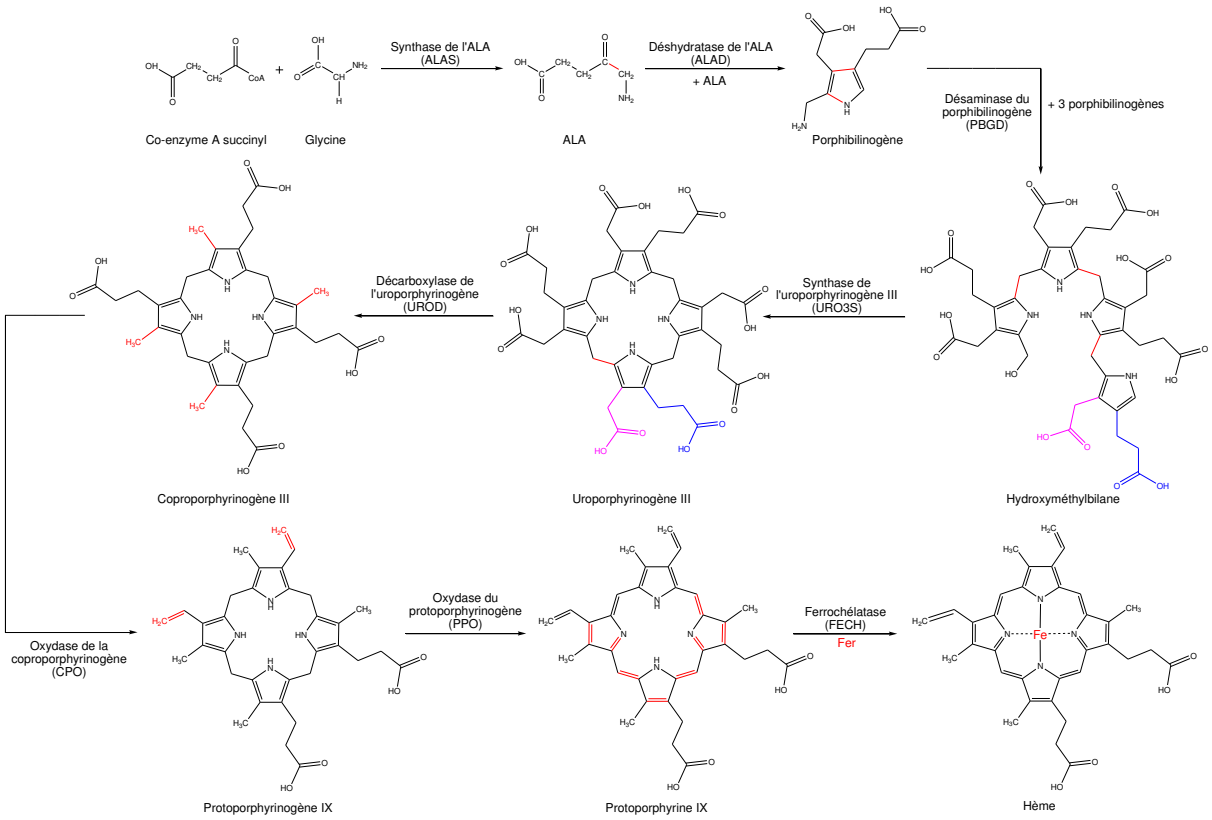


Figure 70. Schéma de synthèse biologique de la protoporphyrine IX (PpIX), adapté de la référence [160].

La conversion relativement lente de la protoporphyrine IX en hème, ainsi qu'un apport exogène de 5-ALA, permet d'obtenir des concentrations élevées en **protoporphyrine IX** dans les cellules. Il est possible alors d'irradier la tumeur afin de déclencher le processus photochimique de la PDT [161]. Ces porphyrines se dégradent rapidement avec l'oxygène singulet qu'elles produisent (photoblanchiment), réduisant les phénomènes de photosensibilité du patient. L'acide 5-aminolévulinique s'avère très efficace dans le traitement des maladies cutanées comme les kératoses actiniques (Figure 72). L'ALA-PDT est limitée à des lésions superficielles. Le traitement de plus grosses tumeurs est limité par la pénétration de L'ALA à travers les tissus tumoraux. Pour résoudre ces problèmes, des **dérivés esters de l'ALA** (Figure 71) ont été développés pour atteindre des lésions plus profondes [162]. L'ester méthylique est approuvé en Europe et en Australie pour

le traitement chez les patients présentant des kératoses actiniques fines et non pigmentées ou un carcinome basocellulaire superficiel primitif sur le visage et le cuir chevelu (**Metvix** par Photocure) et l'ester hexylique est approuvé en Europe pour le diagnostic par fluorescence du cancer de la vessie (**Hexvix**, Photocure) [161].

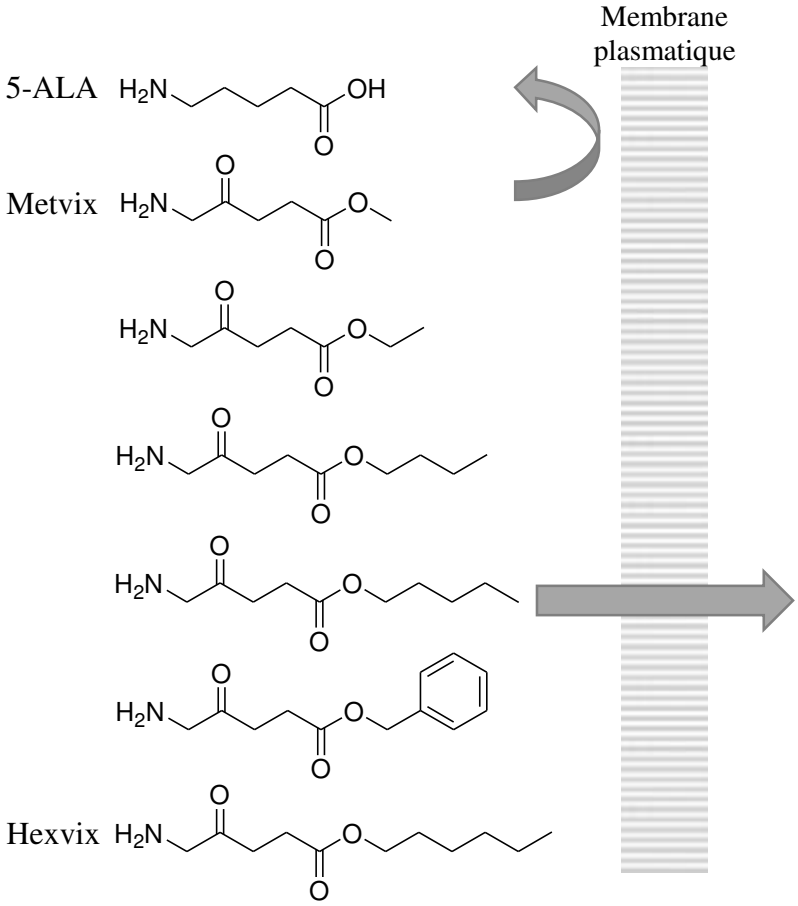


Figure 71. Structures chimiques du 5-ALA et de quelques-uns de ses dérivés esters. Les dérivés esters sont plus lipophiles que le 5-ALA ou son ester méthylique, ce qui leur permettent de traverser la membrane biologique par diffusion passive [163].

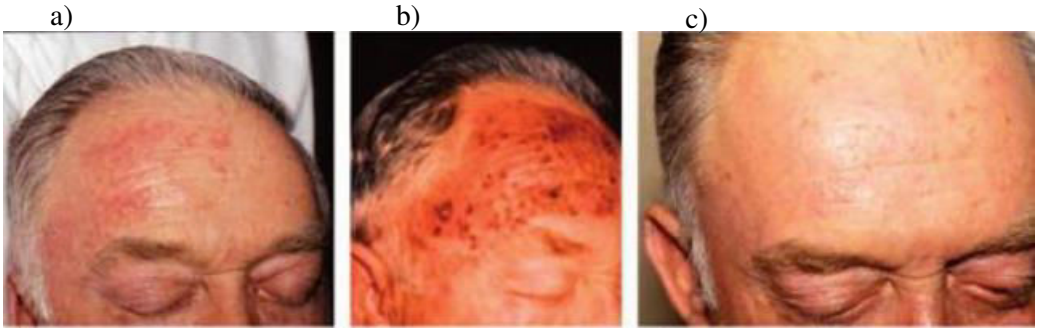
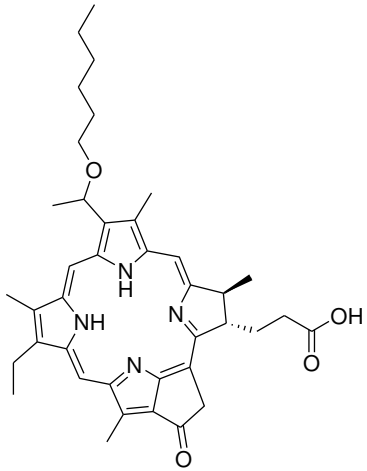


Figure 72. (a) Kératose actinique avant traitement. (b) Kératose actinique, 3 jours après le traitement PDT avec ALA avec de la lumière rouge. (c) Kératose actinique, 30 jours après traitement [161].

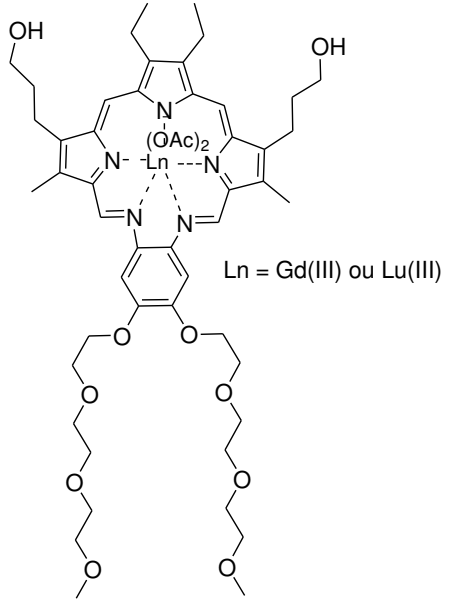
Le Tableau 2 répertorie d'autres PS actuellement en phase clinique dans certains pays.

Tableau 2. Exemples de photosensibilisateurs appliqués cliniquement [8, 164, 165].

PS	Structure	Structure Chimique	Longueur d'onde (nm)	Approuvé	Essais cliniques	Types de cancer
Photofrin (HpD)	Porphyrine	Fig. 27	630	Monde		Poumon, œsophage, vessie, bile, cerveau, ovaires
ALA	Précurseur de porphyrine	Fig. 71	635	Monde		Peau, vessie, cerveau, œsophage
ALA esters	Précurseur de porphyrine	Fig. 71	635	Europe		Peau, vessie
Foscan (Temoporfin, *m*-THPC)	Chlorine	Fig. 70	652	Europe	Etats-Unis	Tête, cou, poumon, cerveau, peau, bile
Verteporfin	Chlorine	Fig. 70	690	Monde (DMLA)	Royaume Uni	Ophtalmique, pancréatique, peau
HPPH	Chlorine		665		Etats-Unis	Tête, cou, œsophage, poumon

$SnEt_2$ (Purlytin)	Chlorine (Purpurine)		660		Etats-Unis	Peau, sein
Talaporfin (LS11, MACE, NPe6)	Chlorine		660		Etats-Unis	Foie, colon, cerveau
Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 derivatives (Radachlorin, Photodithazine)	Chlorine		660		Biélorussie, Russie	Nasopharynx, sarcome, cerveau

Silicon phthalocyanine (Pc4)	Phtalocyanine		675		Etats-Unis	cutané
Padoporfin (TOOKAD)	Bactériochlorine		762		Etats-Unis Europe	Prostate

Motexafin lutetium (Lu-Tex) [100] Motexafin gadolinium (Xcytrin) [166]	Texaphyrine		732		Etats-Unis	Sein Métastases du cerveau

Abbréviations : - DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge – HPPH : 2-(1-Héxyloxyéthyl)-2-devinyl pyrophéophorbide-a – MACE : mono-(L)-aspartyl chlorine –Ce6-PVP : chlorine e6-polyvinylpyrrolidone

Ces PS, bien que présentant des avancées considérables par rapport à la première génération, sont encore loin de constituer des PS idéaux. De nombreux paramètres peuvent et doivent encore être optimisés tels que les propriétés d'absorption de la lumière, de production d'oxygène singulet, de distribution dans l'organisme, de ciblage de la tumeur ou encore de métabolisme.

III.5 PS ciblés de 3ième génération

Une nouvelle génération de photosensibilisateurs est actuellement en cours d'élaboration et/ou d'étude pour améliorer **le ciblage tumoral**, une des limitations en PDT (ciblage actif et ciblage passif) :

- la vectorisation de ces photosensibilisateurs, c'est-à-dire l'introduction de ces derniers dans des liposomes [167] ou par l'encapsulation de PS à l'intérieur de nanoparticules ;
- l'adressage par conjugaison du photosensibilisateur à des vecteurs pour avoir des interactions spécifiques avec des récepteurs membranaires surexprimés sur les cellules tumorales, permet d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis du tissu cancéreux par comparaison au tissu sain.

Cette thèse s'inscrit dans la poursuite de l'effort dans l'élaboration de nouveaux PS plus sélectifs utilisables pour la PDT, vers la création de molécules « hybrides », composées d'un principe actif photoactivable et d'un vecteur permettant la reconnaissance biologique.

Afin d'introduire les travaux de thèse à proprement parler, ce manuscrit débute avec une introduction sur le ciblage tumoral (CHAPITRE 2).

III.6 PS de 4ième génération

Le théranostique est l'association d'une thérapeutique et d'un test diagnostique. Les PS de quatrième génération sont des PS couplés avec un système de détection. Le développement de nanoparticules adressées, permettant un traitement par PDT et une visualisation de la tumeur par IRM est en plein essor. Un exemple est cité dans la sous partie II.3.f ([6, 46, 168]). Ceci ne fait pas l'objet de cette thèse, aussi cette partie ne sera pas plus détaillée.

CHAPITRE 2

LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT

Une des limitations de la thérapie photodynamique (PDT) est la faible sélectivité des photosensibilisateurs pour les tissus tumoraux ou les néovaisseaux. Aussi, l'amélioration de l'affinité des PS pour les cellules cancéreuses est devenue un enjeu majeur en PDT. Même si les PS présentent une certaine sélectivité pour les tissus tumoraux, elle doit être optimisée. Les stratégies les plus communes de ciblage sont l'encapsulation ou la conjugaison des PS à des molécules ou assemblages moléculaires. On distingue généralement deux approches pour le ciblage appelées **ciblage passif** et **ciblage actif**.

I LE CIBLAGE ACTIF

Si la cible est identifiée/identifiable par des caractéristiques biochimiques ou immunologiques, il est possible de diriger le PS spécifiquement vers cette cible en le couplant à une ou des molécules capables de la reconnaître. Le « site d'adressage » de la cible peut être un récepteur membranaire particulier surexprimé dans le tissu malade.

I.1 Ciblage actif direct (ciblage de la cellule cancéreuse)

Il repose sur l'internalisation du PS au niveau des cellules tumorales. La surexpression de récepteurs à la surface des cellules tumorales permet d'obtenir une bonne affinité du PS par reconnaissance de la molécule d'adressage. Ces molécules doivent posséder une grande affinité par rapport à des molécules uniques de signature (antigènes ou récepteurs) se trouvant à la surface des cellules à cibler [46].

Dans la suite, le PS est présenté en rouge tandis que le vecteur apparaît en bleu. Nous allons décrire les différents types de récepteurs ayant déjà fait l'objet d'études en PDT.

I.1.a Les récepteurs à œstrogène

Les récepteurs des œstrogènes (RE) sont des protéines liant naturellement les œstrogènes, qui sont les principales hormones stéroïdes sexuelles féminines dans l'organisme. L'activité du facteur de transcription RE est capitale pour une prolifération normale des cellules mammaires. Les RE sont surexprimés dans les cancers du cerveau, des ovaires et surtout du sein [169].

James et al. [170] ont synthétisé un complexe œstradiol-porphyrine constitué d'un noyau de type tétraphénylporphyrine relié à l'œstradiol par le biais d'un bras espaceur (Figure 73). L'internalisation de ce conjugué est meilleure dans des cellules exprimant les récepteurs à œstrogènes (MCF-7) par rapport aux cellules ne les exprimant pas (ex : MDA-MB-231) mais l'efficacité de l'activité photodynamique du PS n'a pas été améliorée [171]. Une autre étude fait intervenir la phéophorbide-a couplée à un motif œstrogénique [172]. El-Akra et al. ont prouvé que le phéophorbide a conjugué à l'œstradiol se localise préférentiellement dans le noyau cellulaire. De plus, celui-ci possède une efficacité photodynamique 7 fois supérieure à celle observée pour le PS seul.

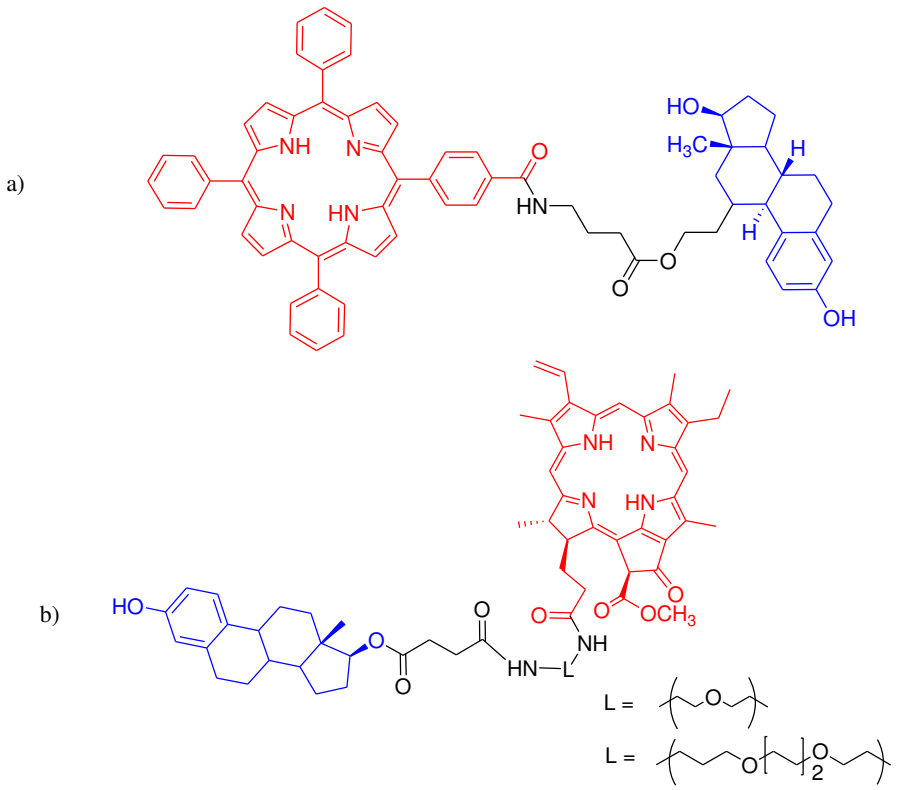


Figure 73. Structures chimiques des composés porpyrine-œstradiol (a) et phéophorbide a-œstradiol (b) [171, 172].

I.1.b Les récepteurs aux sucres : les lectines

Les lectines sont des protéines qui interviennent dans divers processus biologiques, au niveau de la reconnaissance entre les cellules (par exemple lors de réponses immunitaires, d'infections). Leurs fonctions cellulaires sont directement associées à leur capacité à interagir avec les glycanes. En effet, elles sont toutes constituées d'au moins une cavité de reconnaissance glycanique qui possède une plasticité et leur permet d'interagir plus spécifiquement avec certains glycoconjugués que d'autres [173]. Leur rôle dans le déclenchement de la phase métastatique du cancer, la migration de cellules de la tumeur originelle dans la circulation sanguine pour donner naissance à des tumeurs filles, a aussi été mis en évidence. La synthèse de PS-glycoconjugués est apparue alors comme sujet intéressant afin de cibler les lectines, récepteurs aux sucres présents à la surface des cellules cancéreuses.

Par exemple, notre équipe a montré l'incorporation préférentielle d'une molécule composée d'une porphyrine et de dérivés glucosamine dans les cellules HT29 surexprimant ces récepteurs par rapport à la porphyrine non conjuguée (Figure 74) [174].

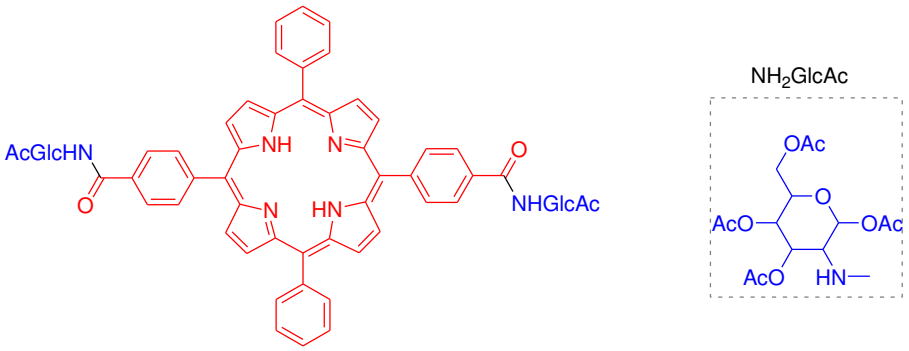


Figure 74. Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres [174].

L'équipe de P. Maillard s'intéresse également au ciblage cellulaire par des porphyrines glycosylées reconnaissant des lectines membranaires surexprimées par certaines cellules tumorales pour le

traitement du rétinoblastome, la tumeur de l'œil la plus fréquente chez l'enfant. Maillard et al. ont synthétisé des porphyrines portant des sucres acétylés (acétyl-β-D-glucose, acétylmaltose) [175, 176]. Les PS ainsi obtenus présentent les avantages d'être hydrophiles, non-ionisables et non agrégés du fait de l'encombrement stérique dû aux sucres. Le α-D-mannopyranose a été couplé avec succès à des nanoparticules mésoporeuses, dans l'équipe de J.O. Durand [177-179]. Les dérivés tri-glycosylés ont montré une plus grande activité photodynamique que leurs composés parents. Les conjugués tétra-glycosylés possèdent la meilleure internalisation dans les cellules de carcinome humain HT29. Cet effet est attribué en partie à un mécanisme d'endocytose médié par des récepteurs avec une localisation préférentielle dans les mitochondries. De plus, l'activité photodynamique est quatre fois supérieure à celle de la *m*-THPC [107, 180].

I.1.c Le récepteur de l'acide folique (RAF)

Le récepteur à l'acide folique est un récepteur surexprimé dans plusieurs types de cancer notamment ceux de l'ovaire, du rein, du sein, du cerveau, du poumon…, et est localisé sur la membrane apical des cellules de l'épithélium. Ce récepteur possède une forte affinité pour son ligand et sa densité augmente avec l'avancement du stade cancéreux [181, 182].

Ces récepteurs sont donc des cibles privilégiées. Notre équipe a montré que la 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Figure 75) possède une phototoxicité nettement augmentée comparée au PS seul et une excellente internalisation dans la cellule [183]. Par la suite, Gravier et al. ont synthétisé un composé similaire : seule la porphyrine a été remplacée par la *m*-THPC dans la structure du conjugué. L'accumulation dans les tissus de ce conjugué *in vivo* montre une sélectivité de ce conjugué pour les tissus tumoraux *versus* les tissus normaux élevée (5:1) [184].

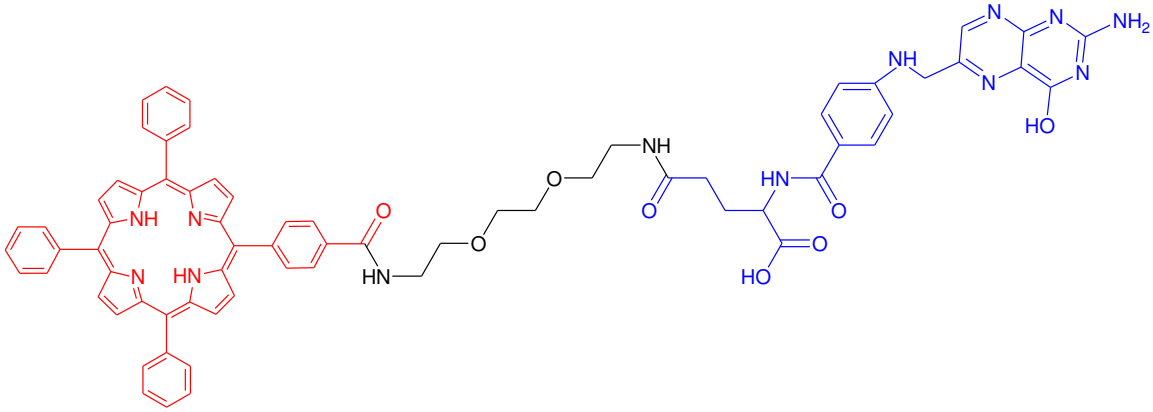


Figure 75. Structure chimique du conjugué porphyrine-acide folique [183].

Le ciblage par le récepteur de l'acide folique (folate) sera détaillé dans le chapitre 3 où je décrirai le travail effectué sur la synthèse et l'étude photophysique de nouveaux conjugués photosensibilisateur–acide folique pour l'amélioration du ciblage tumoral en PDT.

I.1.d Les polyamines

Au lieu de cibler les récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, il est également possible d'utiliser leur hyperactivité métabolique. En effet, les cellules cancéreuses se trouvant dans une phase de développement intense, en comparaison avec les cellules normales, ont un métabolisme accru qui, par l'intermédiaire du PAT (*polyamine transport system*), favorise l'accumulation des polyamines de type spermine, spermidine et putrécines nécessaires à leur croissance [185]. Leur utilisation comme vecteurs a été envisagée et a conduit à la synthèse de plusieurs molécules (exemples dans la Figure 76). L'équipe de Vincent Sol a montré que la protoporphyrine IX (PpIX) couplée à deux motifs polyaminés présente une internalisation et une cytophotoxicité supérieures à celles du Photofrin® [186].

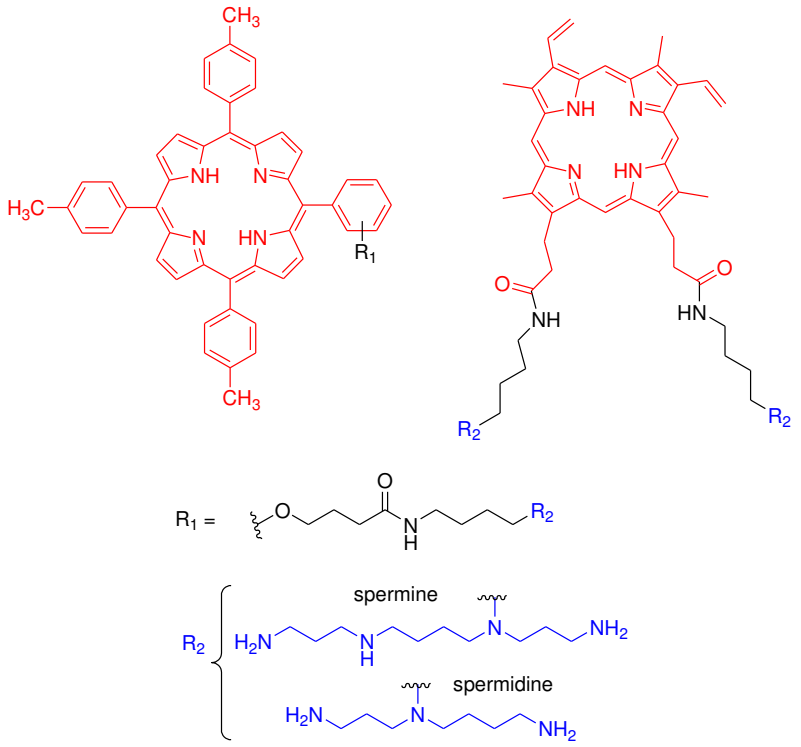


Figure 76. Structures des conjugués meso-tritolylporphyrine (gauche) et protoporphyrine IX (droite) avec les polyamines spermine et spermidine [186].

I.1.e Les récepteurs couplés aux protéines G

Les protéines G sont des protéines qui permettent le transfert d'informations à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment une famille de récepteurs membranaires chez les mammifères.

I.1.e.i La bombésine

In vivo, Dubuc et al. ont trouvé une efficacité 2,5 fois supérieure de la PDT en couplant la phtalocyanine AlPcS4 à la bombésine (Figure 77) très affine pour les récepteurs RCPG présents à la surface des cellules d'adénocarcinome prostatique [187].

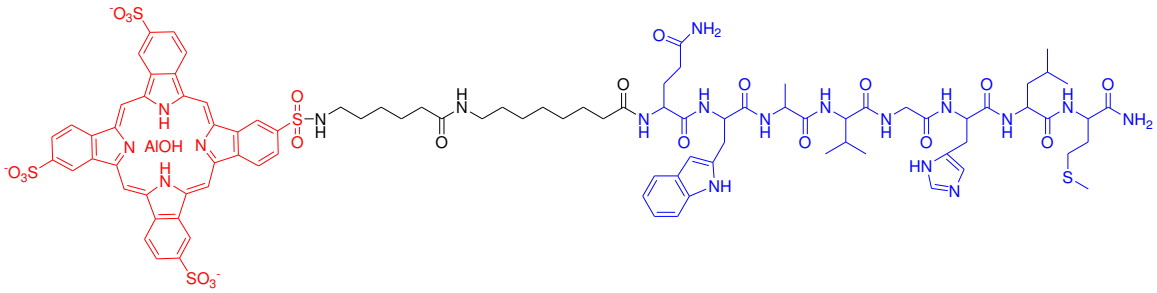


Figure 77. Structure du conjugué AlPcS4-bombésine [187].

I.1.e.ii La somatostatine

Le récepteur de la somatostatine (SST) représente une option attrayante pour le ciblage tumoral car surexprimé dans un grand nombre de cancers [12]. Parmi les cinq sous-types de SST, la sst2 prédomine [12,13]. Des études antérieures ont montré que les vaisseaux angiogéniques, ainsi que les celulles péri-tumorales expriment essentiellement des sst2 [17-20]. Il est admis que la somatostatine agit localement sur la croissance de la tumeur, soit par une action directe sur les cellules tumorales et / ou par une action sur les vaisseaux péri-tumoraux [21]. En 2014, Kaščáková et al. ont développé une approche pour améliorer la PDT par conjugaison directe de la chlorine e6

avec la somatostatine octréotate synthétique, métaboliquement stable (Figure 78). L'étude de l'activité photodynamique des conjugués *in vitro* dans les cellules K562 érythroleucémiques humaines ont montré que la conjugaison de [Tyr3]-octréotate à la chlorine e6 augmente l'affinité (par un facteur 2) pour des cellules surexprimant sst2 [188].

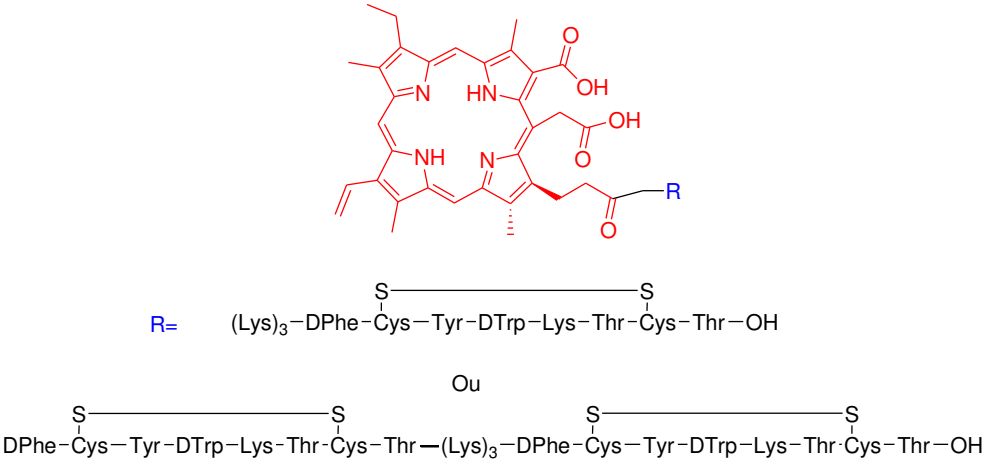


Figure 78. Structure des conjugués somatostatine Ce6-[Tyr3]-octréotate [188].

I.1.f Les récepteurs de la transferrine

Les récepteurs de la transferrine, présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme, permettent le passage transmembranaire du fer lié à la transferrine. Ce sont des glycoprotéines formées de deux sous-unités identiques, capables de lier une molécule de transferrine. La densité de récepteurs d'une cellule est directement proportionnelle aux besoins en fer de cette cellule. Les cellules à fort indice de prolifération nécessitent un flux continu en fer, d'où la surexpression de ces récepteurs pour certaines cellules tumorales [189]. La transferrine a été couplée à l'Hp montrant que l'incorporation par endocytose du conjugué Hp-transferrine dans les cellules NIH-3T-3 et HT29 est récepteur-dépendante. En effet, l'incorporation du conjugué a été partiellement inhibée en présence d'un excès de LDL et augmentée en présence d'un chélateur de fer [190]. La chlorine e6 a également été couplée à la transferrine. Le conjugué s'est révélé 10 fois plus phototoxique *in vitro* que la chlorine e6 seule pour des cellules d'adénocarcinome mammaire (MCF7 et MTLn3) [191]. Un autre PS hydrophile, la phtalocyanine d'aluminium tétrasulfonée ($AlPcS_4$) a été encapsulée dans un liposome pégylé conjugué à la transferrine. L'étude a montré que le liposome adressé était incorporé par les cellules AY27 en quantité 100 fois plus importante que le liposome sans transferrine [192].

I.2 Ciblage actif indirect (ciblage de la néovascularisation)

Une voie thérapeutique relativement nouvelle dans l'arsenal anti-cancéreux consiste à inhiber le processus d'angiogenèse (thérapie anti-angiogénique) ou à détruire les vaisseaux nouvellement formés par élimination des cellules endothéliales proliférantes de phénotype angiogénique (thérapie anti-néovasculaire), afin de bloquer l'apport en nutriments et en oxygène à la tumeur, dans le but de l'asphyxier et de la faire régresser. Dans le cadre d'un traitement par thérapie photodynamique, cette stratégie est nommée VTP pour *Vascular Targeted Photodynamic therapy*. La VTP apparaît comme une stratégie prometteuse dans le traitement du cancer par comparaison à des approches plus conventionnelles visant les cellules tumorales [193]. Elle vise à détruire les cellules endothéliales incontrôlables qui expriment des marqueurs que les cellules endothéliales normales n'expriment pas ou faiblement (antigènes, récepteurs aux facteurs de croissance etc.). Parmi les récepteurs, on peut citer les intégrines $\alpha_v\beta_3$, les récepteurs des tyrosines kinases, des éphrines et ceux du VEGF… Les molécules d'adressage utilisées peuvent être des peptides, des anticorps ou

d'autres ligands reconnaissant spécifiquement des protéines surexprimées dans les néo-vaisseaux [194].

I.2.a Les intégrines $\alpha_v \beta_3$

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, c'est-à-dire des protéines transmembranaires dont l'une des extrémités interagit en général avec des protéines de la matrice extracellulaire situées à l'extérieur de la cellule (quelques intégrines peuvent interagir avec des protéines transmembranaires de cellules voisines), l'autre extrémité interagissant avec des constituants intracellulaires, notamment des molécules de signalisation contrôlant la migration, la survie, la prolifération et la différenciation. Certaines intégrines jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse et peuvent ainsi être utilisées comme cible pour des stratégies antivasculaires.

Le tripeptide RGD posséde une forte affinité et spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [195] : plusieurs équipes ont étudié la conjugaison d'un PS avec le motif RGD [196-199]. Notre équipe a montré que le couplage entre la 5-(4-carboxyphényl)–10,15,20–triphénylchlorine et une séquence RGD (cyclique ou linéaire), améliorait fortement, *in vitro*, l'activité photodynamique du PS sur des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) alors que le PS non conjugué, malgré un meilleur rendement quantique d'oxygène singulet, n'a engendré aucun effet photodynamique [200].

I.2.b Les récepteurs au VEGF (VEGFRs et NRPs)

La **famille des VEGF** comprend six membres, que sont le VEGF-A, le PlGF, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-F. Ce sont des glycoprotéines homodimériques qui jouent un rôle critique dans la vasculogenèse, la lymphangiogenèse et l'angiogenèse au cours du développement embryonnaire [201].

Les membres de cette famille se retrouvent autour d'une structure commune, caractérisée par huit résidus cystéines espacés par un domaine VEGF homologue. Ils se distinguent par leurs propriétés biologiques et physiologiques, ainsi que leurs affinités aux récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3.

Les **récepteurs au VEGF** ont initialement été découverts à la surface des cellules endothéliales vasculaires. Le VEGF se lie à deux récepteurs tyrosine kinase, VEGFR1 et VEGFR2. Ces récepteurs possèdent sept domaines immunoglobulines extracellulaires, une région transmembranaire et une séquence tyrosine kinase consensus interrompue par un domaine tyrosine kinase [201]. Le VEGFR3 est un membre de la famille de ces récepteurs, il ne lie pas le VEGF, mais fixe le VEGF-C et D. À côté de ces récepteurs, le VEGF interagit avec une autre famille de récepteurs, les **neuropilines**. Cette famille de récepteurs est constituée de deux formes (NRP-1 et NRP-2) qui possèdent des structures tridimensionnelles homologues. La forme NRP-1 est localisée de façon primordiale au niveau des cellules endothéliales des artères alors que les NRP-2 sont localisées au niveau de l'endothélium veineux et lymphatique [202, 203]. De ce fait, les NRPs sont donc exprimées dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales humaines.

Afin de cibler les récepteurs au VEGF, le peptide H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR), identifié initialement comme spécifique du VEGFR-2 [204], mais reconnaissant en fait la NRP-1 [205-207], a été conjugué à la verteporfine modifiée avec un polymère d'alcool polyvinylique (PVA), afin de traiter la DMLA, tout en n'induisant pas de dommages aux photorécepteurs [208].

Notre équipe a travaillé sur l'étude du ciblage de NRP-1 par ATWLPPR conjugué à la chlorine TPC-COOH *via* un bras espaceur : l'acide aminohexanoïque (Ahx) [207] (Figure 79). Il a été

démontré que la TPC-COOH ne présentait aucune affinité vis-à-vis de NRP-1, contrairement à TPC-Ahx-ATWLPPR. *In vitro* l'incorporation du conjugué a été améliorée d'un facteur 10 sur une lignée sur-exprimant NRP-1 (MDA-MB-231).

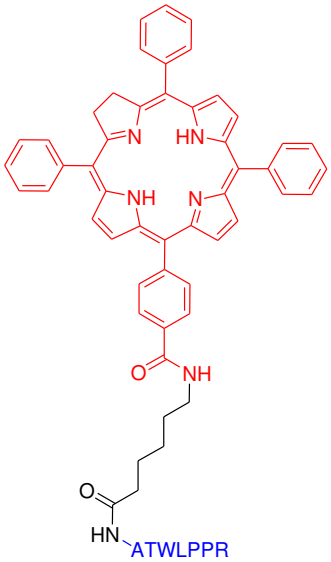


Figure 79. Structure chimique du composé TPC-Ahx-ATWLPPR.

D'autres études ont impliqué l'utilisation de nanoparticules multifonctionnelles pour améliorer la stabilité du peptide d'une part et l'affinité pour NRP-1 d'autre part (thèse d'Aymeric Sève [46]).

I.2.c Le récepteur de l'EGF

Une des caractéristiques des cancers est la croissance incontrôlée des cellules qui peut être expliquée par la surexpression de récepteurs à certains facteurs de croissance [209]. L'EGF (*epidermal growth factor*) fait partie d'une famille de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement normal de différents organes. L'action de ces facteurs est médiée par une famille de quatre récepteurs transmembranaires dont les récepteurs à l'EGF (EGFR) sont les plus étudiés et les plus utilisés comme cible pour l'adressage de molécules anticancéreuses. En effet, ceux sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (appelés RTK) qui sont surexprimés dans de nombreux types de cancers.

Un anticorps anti-EGFR (C225) a été couplé à la chlorine e6 pour cibler des cellules tumorales surexprimant l'EGFR. L'étude a été réalisée chez le hamster sur un modèle de carcinome de joue. Ces travaux ont montré que cette stratégie permettait de diagnostiquer la zone tumorale et d'améliorer la réponse à la PDT des cellules surexprimant l'EGFR [210]. La benzoporphyrine dérivée (BPD) a également été conjuguée à l'anticorps C225 montrant que la PDT avec le conjugué induisait une phototoxicité pour des carcinomes épidermoïdes surexprimant l'EGFR (A-431) mais pas pour des cellules EGFR négatives (NR6) [211].

II LE CIBLAGE PASSIF

Les cellules tumorales se distinguent des cellules saines par un métabolisme plus important, lié à leur cycle de division rapide. En conséquence la structure des tissus tumoraux diffère de celle des tissus sains de façon à faciliter la pénétration des nutriments dans les cellules.

En particulier, l'endothélium, tissu entourant les organes et propice au développement des tumeurs, y est moins dense et permet un passage plus facile des molécules de la circulation sanguine au milieu intercellulaire. Le faible développement du système lymphatique contribue à allonger le temps de vie du PS dans ces tissus. Ce phénomène est appelé effet EPR pour *Enhanced Permeation and Retention effect* (Figure 80). La taille des interstices dans le tissu endothélial est d'environ 600 à 800 nm [212]. Des objets de cet ordre de grandeur passent plus facilement de la circulation vers la tumeur que vers les tissus sains. L'injection de tels objets provoque, après un certain temps, leur accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux.

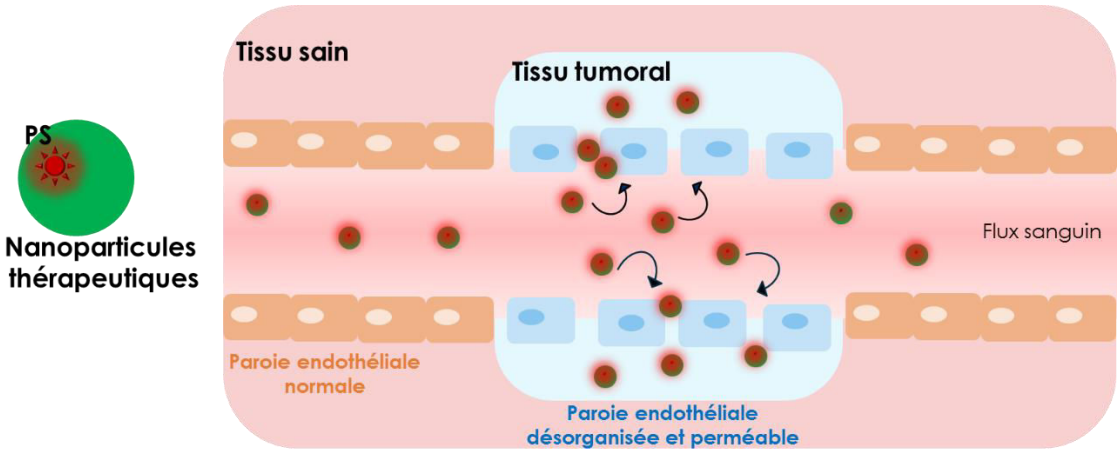


Figure 80. Représentation schématique du ciblage tumoral avec des nanoparticules par l'intermédiaire de l'effet EPR, adaptée de la référence [213].

Le ciblage passif des cellules tumorales en PDT consiste à vectoriser les PSs grâce à différents systèmes de formulation facilitant leur transport et leur incorporation dans les cellules cancéreuses.

Les nanoparticules (NP) sont définies comme des objets dont la taille est de l'ordre de 1 à 100 nm, toutefois les applications en médecine font appel à des nano-objets pouvant aller jusqu'à 1 000 nm [214]. La grande variété de supports pour leur développement : silice, métaux, polymères… offre une large gamme de propriétés physiques, optiques, chimiques. Les progrès réalisés dans leur synthèse permettent d'en varier la taille, la forme ainsi que la fonctionnalisation et en font des plateformes particulièrement intéressantes pour la PDT ciblée passive [215].

En ce qui concerne leurs applications en PDT, deux grandes familles de nanoparticules permettant d'adresser des molécules sont utilisées. Celles-ci regroupent les nanoparticules de type organiques (liposomes, nanoparticules polymériques, des nanomatériaux de carbone), les nanoparticules de type inorganiques (nanoparticules céramiques, nanoparticules d'or, quantum dots, nanoparticules magnétiques, des nanoparticules pour l'*up-conversion*).

Nous allons rappeler brièvement les différents types de nanoparticules utilisées en recherche pour améliorer la sélectivité de la PDT. Il est intéressant de noter qu'à ce jour, seul un PS de troisième génération est utilisé en clinique, il s'agit de la Visudyne pour le traitement de la DMLA, encapsulé dans un liposome.

II.1 Les nanoparticules organiques

II.1.a Les liposomes

Les liposomes représentent d'intéressants vecteurs de PSs en PDT du fait de leur nature amphiphile et de leur compatibilité avec les systèmes biologiques. Ce sont des vésicules unilamellaires ou multilamellaires composées de phospholipides et de cholestérol pouvant incorporer des PSs aussi bien lipophiles qu'hydrophiles. Le cholestérol apporte la rigidité à la bicouche membranaire en réduisant la perméabilité des molécules encapsulées et en augmentant la stabilité de la bicouche en présence des fluides. L'encapsulation des PSs dans des vésicules liposomales permet d'augmenter leur perméabilité et leur rétention [216].

L'Hématoporphyrine a été encapsulée dans un liposome unilamellaire composé de dipalmitoylphosphatidyl-choline (DPPC). Le profil pharmacocinétique a été comparé à la forme dissoute dans un tampon salin phosphate (PBS). L'étude *in vivo* réalisée chez la souris sur un modèle de fibrosarcome (MS-2) a montré une meilleure incorporation tumorale pour la forme liposomale [217]. La forme liposomale du dérivé de benzoporphyrine mono acide cycle A (BPD-MA) s'incorpore dans les tissus tumoraux plus rapidement (demi-vie de 16,1 h *versus* 16,9 h) et à plus forte concentration (ratio tumeur/muscle 19,2 *versus* 12,6) que sa forme non liposomale [218]. Le Photofrin® sous une forme liposomale présente une meilleure incorporation tumorale (8,6 *versus* 3,6 $\mu g.g^{-1}$ dans la tumeur) et s'est révélé plus efficace (18 % de tissus nécrotique *versus* quelques cellules nécrotiques après PDT) pour un gliome malin humain, en comparaison à la forme non liposomale [219]. La bactériochlorine-a (BCA) a été vectorisée dans le liposome DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine). Des travaux ont montré que la forme liposomale présente une meilleure efficacité photodynamique, la consommation en oxygène est neuf fois plus élevée et l'efficacité de la PDT augmentée jusqu'à 5 fois, pour un modèle de cellules cancéreuses de colon humain (WiDr). Ces résultats peuvent être expliqués par l'augmentation de l'incorporation intracellulaire du PS et par une diminution du phénomène d'agrégation des PSs [122]. Le Foslip® est une forme liposomale (DPPC) de la *m*-THPC facilitant son administration par voie intra-veineuse. Une étude récente a montré une différence de temps de vie de fluorescence entre le Foscan® et le Foslip® (6,6 *versus* 8,4 ns) traduisant une différence de localisation cellulaire [220]. Un exemple de réussite de PS encapsulé dans des liposomes est la Visudyne®, qui est actuellement utilisée cliniquement pour traiter des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [221]. La Visudyne® (MedKoo Biosciences, Inc., Chapel Hill, NC, USA) utilise la verteporfin (BPD-MA) comme PS. La formulation de la Visudyne® est la suivante : BPD-MA: phosphatidyl glycérol d'oeuf: choline phosphatidyl dimyristoyl. Des composés inactifs sont ajoutés à cette formulation : lactose, ascorbyle palmitate (E304) et butylhydroxytoluène (E321). Le traitement se fait par injection intraveineuse de la Visudyne® suivi d'un traitement non-photothermal avec une source laser à 689 nm [222].

II.1.b Les polymères

Dans le but de réduire l'agrégation des bactériochlorophylles (BChl) en solution aqueuse, des nanoparticules de copolymères de lactide et glycolide (poly(DL-lactide-coglycolide), PLGA) chargées avec de la BChl-a ont été testées sur des macrophages. La majorité des nanoparticules sont phagocytées 2 h après incubation par ces cellules. Le processus de relargage a lieu en deux étapes : l'adhérence des particules à la surface de la cellule suivie par la libération du PS conduisant à des photodommages de la surface cellulaire après PDT [223, 224]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules de PLGA contenant de la méso-tétra (*p*-hydroxy-phényl) porphyrine (p-THPP) incubées en présence de cellules cancéreuses mammaires de souris (EMT-6) [225]. Deux autres PSs, la méso-tétraphénylporphyrine et le méso-tétra-phénylporpholactol (*m*-TPPPL) ont été encapsulés dans des nanoparticules de PLGA. Une comparaison de la photocytotoxicité entre les nanoparticules internalisées ou non a démontré que 95% des photodommages, pour un modèle *in vivo* de cancer de la prostate, ont été causés par les nanoparticules internalisées [226]. L'Hypéricine (Hy) a également été encapsulée dans des

nanoparticules de polymère de lactide (poly(DL-lactide), PLA) présentant une nette amélioration de la phototoxicité par comparaison au PS libre [227]. Le bleu de méthylène encapsulé dans une nanoparticule de polyacrylamide ORMOSIL (*organically modified silica*) s'est révélé significativement phototoxique sur une lignée cellulaire de gliome de rat [228]. Le PS HPPH (2-(1-Héxyloxyéthyl)-2-devinyl pyrophéophorbide-a) a été encapsulé dans une nanoparticule de céramique. L'étude *in vitro* a montré des taux de mort cellulaire significatifs sur un modèle de carcinome ovarien humain [229]. La *m*-THPC a également été encapsulée dans une nanoparticule ORMOSIL. Les travaux ont révélés que la forme encapsulée permettait une meilleure production d'oxygène singulet [230].

II.1.c Emulsions et micelles

Les émulsions et les micelles améliorent la solubilité des PSs, leur dispersion et leur internalisation cellulaire [231, 232]. L'huile de dispersion la plus utilisée pour réaliser des émulsions de PSs est le Cremophor® (CMR) [167]. Deux formulations du PS $SnET_2$ (Tin étiopurpurine) ont été comparées : une émulsion de CMR et une forme liposomale de DPPC. Sur un modèle de cancer de vessie chez le rat, l'émulsion s'est révélée plus phototoxique que la forme liposomale [119]. Une phtalocyanine, notée SiPc (bis(méthyl-oxyéthylèneoxy)silicon-phtalocyanine), a également été testée, transportée dans ces deux formulations. Le PS a été testé sur un carcinome de poumon chez la souris. L'émulsion a permis une incorporation dans la tumeur à des taux deux fois plus importants que la forme liposomale [233]. Des études ont montré que des micelles polymériques peuvent être une bonne alternative aux formulations de CMR pour le transport de PS. La phtalocyanine d'aluminium chlorée (AlClPc) sous forme micellaire présente par exemple, une meilleure phototoxicité *in vitro* (EMT-6) que sous forme d'émulsion. *In vivo,* la forme micellaire permet d'éviter les réactions secondaires [234].

II.1.d Les nanoplateformes de carbone

On distingue principalement les fullerènes, le graphène et les nanotubes de carbone (NTC).

Les **fullerènes** sont une famille de composés du carbone. La forme la plus connue est le fullerène C_{60}. Les fullerènes peuvent prendre une forme géométrique rappelant celle d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube ou d'un anneau. Grâce à leurs caractéristiques physiques, chimiques, propriétés électriques et optiques, les fullerènes et leurs dérivés sont incorporés dans des nouveaux dispositifs ou matériaux. Les fullerènes ont été couplés à des photosensibilisateurs comme par exemple une porphyrine zinguée (Figure 81) ou une chlorine (comme la chlorine e6). Les complexes formés montrent une meilleure internalisation dans les cellules tumorales que les PS seuls dans les cellules tumorales [238]. Les dérivés de C_{60} réagissent à un rayonnement lumineux en formant des espèces réactives de l'oxygènes et peuvent ainsi être également utilisés seuls comme photosensibilisateurs pour la PDT. Les fullerènes peuvent présenter un pic d'absorption jusqu'à 1 µm, ce qui est un véritable avantage pour le traitement en PDT, permettant une pénétration tissulaire de la lumière plus importante [239].

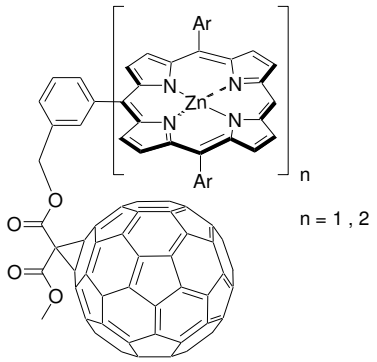


Figure 81. Exemples de porphyrines conjuguées à des fullerènes pour la PDT [238].

Le **graphène** est un matériau bidimensionnel cristallin forme allotropique du carbone dont l'empilement constitue le graphite. Wang et al. ont développé une nanoparticule à base d'oxide de graphène entourée de polyéthylène glycol et couplée à une phtalocyanine (la ZnPc). Ces nanoparticules peuvent former de l'oxygène singulet sous excitation de la lumière et convertissent très rapidement l'énergie laser à 808 nm en énergie thermique. Ces nanostructures présentent donc un intérêt comme sonde théranostique pour la PDT et pour la photothermie guidée par imagerie [240].

Les **nanotubes de carbone** sont utilisables, pour la thérapie photodynamique, seuls ou après avoir été couplés à des photosensibilisateurs tels que la chlorine e6 [241] ou des phtalocyanines (Figure 82).

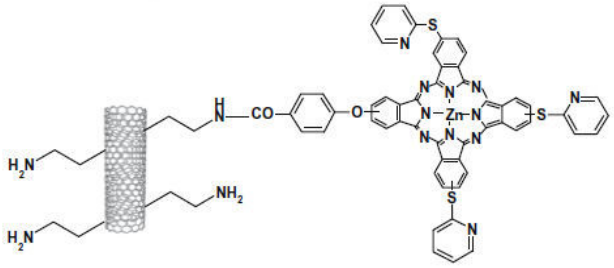


Figure 82. Représentation chimique du composé ZnPc-SWCNT (*Single-Walled carbon nanotubes* = nanotubes en carbone à une seule paroi) [242].

II.2 Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules ne sont pas l'objet de cette thèse, pour plus de détails, plusieurs revues peuvent être consultées ([235, 236]). J'ai eu l'opportunité de participer un chapitre de livre sur la production d'oxygène singulet par des PS encapsulés ou liés par covalence à des nanoparticules inorganiques. Ce chapitre de livre est joint à la fin de cette thèse [237]. Seuls quelques principaux exemples seront décrits dans cette partie.

II.2.a Les puits quantiques (les *quantum dots*)

Les ***quantum dots*** sont des nanostructures de semi-conducteurs et sont couramment composés d'atomes des groupes II-VI (ex : CdSe, CdTe, CdS, ZnSe), III-V (InP, InAs), IV-VI (PbSe) du tableau périodique des éléments. Ils sont constitués de quelques centaines à quelques milliers d'atomes métalliques qui forment un monocristal possèdant la structure cristalline des métaux et dont les tailles s'étendent entre 2 et 10 nm. Ils possèdent des propriétés électroniques et optiques uniques dues à la création d'une paire électron-trou à leur surface et qui ne sont présentes ni au niveau atomique ni dans les molécules constitutives de base et les cristaux massifs. Après excitation, ces nanomatériaux fluorescent à une longueur d'onde d'émission qui est directement liée à la taille des QD, elle-même contrôlable lors de la synthèse. De plus, ils possèdent un fort coefficient d'extinction molaire (jusqu'à $5x10^5$ $cm^{-1}.M^{-1}$) et leur spectre d'émission de fluorescence est composé d'un seul pic d'émission [46].

Tekdas et al. rapportent la synthèse de QD CdTe-TGA couplés à différents types de phtalocyanines métallées afin de tester l'effectivité et l'efficacité du transfert d'énergie par FRET. Ils ont montré indirectement la production d'$^1O_2$ par les phtalocyanines conjuguées aux QD en étudiant les propriétés photochimiques des PS en présence de 1,4-benzoquinone (*quencher*) [243]. Hsu et al. ont, quant à eux, rapporté le couplage de la *m*-THPC à des QD sur lesquels est greffée une enzyme, la *Renilla luciferase 8* (RLuc8). Le principe consiste à exposer l'enzyme à son substrat (la coélentérazine) afin d'obtenir un transfert d'énergie (BRET ou *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) depuis le complexe « enzyme-substrat » vers le QD qui va ensuite transférer cette énergie à la *m*-THPC. Ils ont ainsi traité des souris greffées avec des cellules tumorales de type A549

auxquelles ils ont injecté les RLuc8-*m*-THPC ainsi que le substrat puis ils ont constaté une faible augmentation de la taille des tumeurs traitées en fonction du temps (20 jours) [244].

II.2.b Les nanoparticules d'oxyde de fer

Elles sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif (fer, nickel, cobalt) obtenu suivant différentes stratégies de synthèse. Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques et d'oxyde de fer superparamagnétiques sont utilisées pour le ciblage magnétique cellulaire ou comme agents de contraste pour l'imagerie IRM car elles présentent l'avantage de donner un effet de rehaussement de contraste en imagerie par résonance magnétique.

Primo et al. [245] ont développé des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique, faite de maghémite (γ-Fe_2O_3), fonctionnalisées avec des phosphates (surfactants) dont ils se sont servis pour créer une émulsion huile-eau où du Foscan® était contenu dans l'huile. L'application topique de cette solution a montré une diffusion du Foscan® par voie cutanée dans l'épiderme et le derme. Ils n'ont cependant pas procédé au traitement PDT. En 2011, une nanoparticule d'oxyde de fer magnétique d'environ 20 nm enrobée d'une couche de siloxane sur laquelle a été fixée la chlorine e6 par liaison covalente a été développée par Huang et al., en vue de traiter les cancers gastriques [246]. Ces nanoparticules ont montré, après injection intraveineuse, une efficacité dans le contrôle du développement des cellules tumorales gastriques chez la souris.

II.2.c Les nanoparticules d'or

De par leur photostabilité, les nanoparticules d'or peuvent servir à vectoriser des molécules pour la PDT. Du fait de l'interaction entre les nanomatériaux métalliques et l'état excité des fluorophores, les électrons libres du métal oscillent avec ceux du fluorophore associé, ce qui reproduit le comportement d'un dipôle augmentant l'absorption et les propriétés photophysiques du fluorophore qui leur est couplé (effet plasmon) [46]. Des photosensibilisateurs, telle que la protoporphyrine IX, ont été couplés à des nanoparticules d'or [247, 248] et les premiers résultats biologiques ont montré l'efficacité de ces nanoparticules à faciliter la circulation du photosensibilisateur vers la tumeur plutôt que vers les tissus sains (Figure 83).

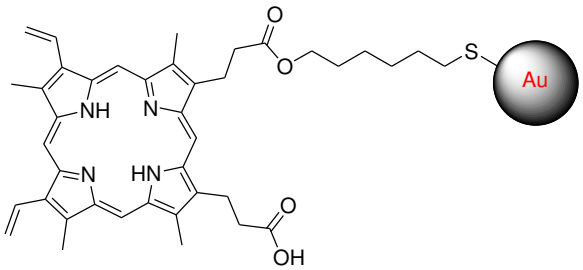


Figure 83. Représentation schématique du conjugué protoporphyrine IX – nanoparticules d'or [247].

II.2.d Les nanoparticules à base de lanthanides

Elles présentent l'avantage de présenter un caractère paramagnétique qui implique qu'elles peuvent être utilisées en temps qu'agent de contraste positif pour l'imagerie IRM et une luminescence due aux lanthanides qui les constituent, offrant ainsi une alternative intéressante pour l'imagerie de résonance et la photoluminescence.

Récemment, Abliz et al. ont montré la possibilité d'utiliser les microparticules (diamètre environ de 20 µm) de $Gd_2O_2S:Tb^{3+}$ pour le diagnostic en thérapie photodynamique par activation clinique par rayons X. La PDT classique permet d'activer directement l'agent photosensibilisant par la lumière. Mais cette méthode présente des limites du fait de la faible profondeur de pénétration de la lumière (2 à 5 mm) dans les tissus et ne peut s'appliquer qu'aux tumeurs de surface telles que les mélanomes. Une nouvelle méthode non invasive basée sur l'utilisation des **rayons X** pour activer indirectement un agent photosensibilisant, la Photofrine II, a été proposée. A l'intérieur du corps,

le photosensibilisateur (Photofrin) s'accumule préférentiellement dans la tumeur. Sous excitation par RX, les particules de Gd_2O_2S :Tb^{3+} émettent de la lumière dans le visible, laquelle lumière permet d'activer le photosensibilisateur. Lors de cette activation par absorption de photons émis par Gd_2O_2S :Tb^{3+}, il y a génération d'oxygène singulet $^1O_2$ cytotoxique dans la tumeur. Les résultats montrent une réduction dramatique (≈ 90%) de la viabilité des cellules du glioblastome humain lorsqu'elles sont traitées avec les particules et la Photofrine II [249].

Plus récemment, en 2014, une équipe chinoise a réussi à synthétiser un système infrarouge pour la PDT basé sur des nanoparticules LiYF4:Yb/Er UCNPs (*lanthanide-doped up-conversion nanoparticles*) couplées directement à la β-carboxyphtalocyanine (ZnPc-COOH) par attraction électrostatique. La proche distance, du fait du couplage direct, de la phtalocyanine et des UCNPs favorise le transfert d'énergie entre les deux (efficacité du transfert d'énergie = 96,3%). En conséquence, une production extrêmement élevée d'$^1O_2$, à savoir, la consommation de 91% des sondes $^1O_2$, a été observée. L'application potentielle de ce nouveau système dans l'imagerie guidée et pour la PDT infrarouge pour le théranostic a été démontrée [250].

Récemment, notre équipe a développé des nanoparticules en oxyde de terbium (Figure 84). Après excitation par rayons X de la nanoparticule, le transfert d'énergie entre le terbium excité et la porphyrine couplée de façon covalente dans la couche de polysiloxane a permis la formation d'oxygène singulet, détecté à l'aide de deux sondes, le SOSG et l'AFP [251].

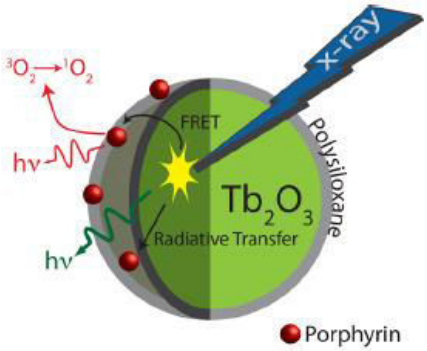


Figure 84. Schéma de la nanoparticule en oxyde de terbium développée par Bulin et al. [251].

II.2.e Les nanoparticules à base de silice

Du fait de la polyvalence au niveau de leur fonctionnalisation, il est possible de les utiliser pour l'imagerie de fluorescence et/ou pour l'IRM, pour la thérapie dans le cadre du transport de molécules actives ou encore pour la PDT.

Pour traiter le gliobastome par PDT, notre équipe s'est intéressé à coupler un peptide ATWLPPR, à un photosensibilisateur (la chlorine) *via* un bras espaceur Ahx (acide aminohexanoïque) (cf. I.2.b). *In vivo,* le peptide ATWLPPR est dégradé par le système réticulo-endothélial et l'assemblage présente une affinité moindre pour NRP-1 par rapport au peptide seul. Une autre approche a été envisagée afin de limiter la dégradation du peptide ATWLPPR, d'augmenter le nombre de peptides et de PS. La solution qui a été retenue consiste à greffer les photosensibilisateurs et les peptides sur des nanoparticules multifonctionnelles de type cœur-coquille (*core-shell*) constituées d'un cœur d'oxyde de gadolinium (Gd_2O_3) enrobé d'une couche de polysiloxane biocompatible (SiO_x) qui possède des fonctions amines libres (NH_2) en surface. Des agents chélatants (nommés également surfactants) sont greffés sur ces fonctions amines libres par la formation d'une liaison amide ; les peptides sont greffés sur les fonctions acides carboxyliques des surfactants par la formation d'une liaison amide. Ces nano-objets multifonctionnels, nommés également SRP (*small rigid platforms*) permettent ainsi d'allier les différentes composantes du traitement en un objet unique pouvant être utilisé en théranostique. Une étude *in vivo* sur des cellules du cancer du sein (MDA-MB-231) ont montré un effet photodynamique. Cette étude a fait l'objet de plusieurs thèses (Pierre Couleaud, 2011 [168], Denise Bechet, 2011 [6], Aymeric Sève, 2013 [46]).

III CONTROLE DE LA PRODUCTION D'OXYGENE SINGULET

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 son activation.

De nombreuses stratégies d'activation des 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, et peuvent être utilisés dans le but de réguler la production d'oxygène singulet en PDT.

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 [252].

Au cours des dernières années, de nouveaux types de PS capables de déclencher l'effet dynamique au sein de la tumeur mais de rester inactifs dans la circulation ou dans les cellules saines ont été synthétisés. De tels PS sont dit activables car leur propriétés photosensibilisatrices sont déclenchées par un stimulus spécifique aux cellules malignes. Ce paragraphe présente les progrès effectués dans ce domaine.

III.1 PS activable grâce à son environnement

L'efficacité de la production d'oxygène singulet d'un photosensibilisateur dépend des propriétés du solvant comme le pH et l'hydrophobie. Comme montré dans la Figure 85, le rendement quantique de production d'oxygène singulet du photosensibilisateur bactériophéophorbide-a de palladium est divisé par deux lorsqu'il passe d'un solvant hydrophobe (l'acétone) à un environnement micellaire dans l'eau deutérée [253].

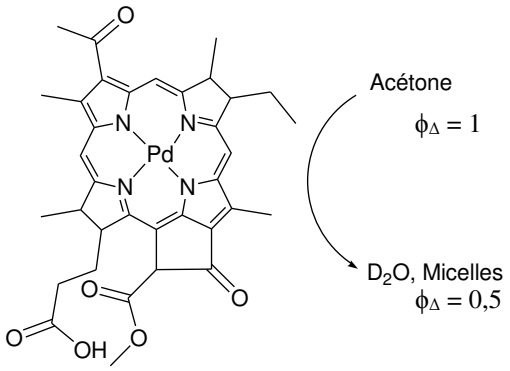


Figure 85. Changement de rendement quantique de production d'oxygène singulet dans des solvants d'hydrophobies différentes, pour la bactériophéophorbide-a de palladium [253].

Une équipe coréenne a reporté l'utilisation de micelles contenant des photosensibilisateurs pour une utilisation en PDT et dont la stabilité est dépendante du pH [254]. Ces travaux font suite à de précédentes études dans lesquelles une micelle polymérique MPEG poly-(acides β–aminés) peut se décomposer en milieu acide [255, 256]. Utilisant ce principe, la micelle a été chargée avec de la protoporphyrine IX. 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 sa capacité à fluorescer et à produire de l'$^1O_2$ (Figure 86).

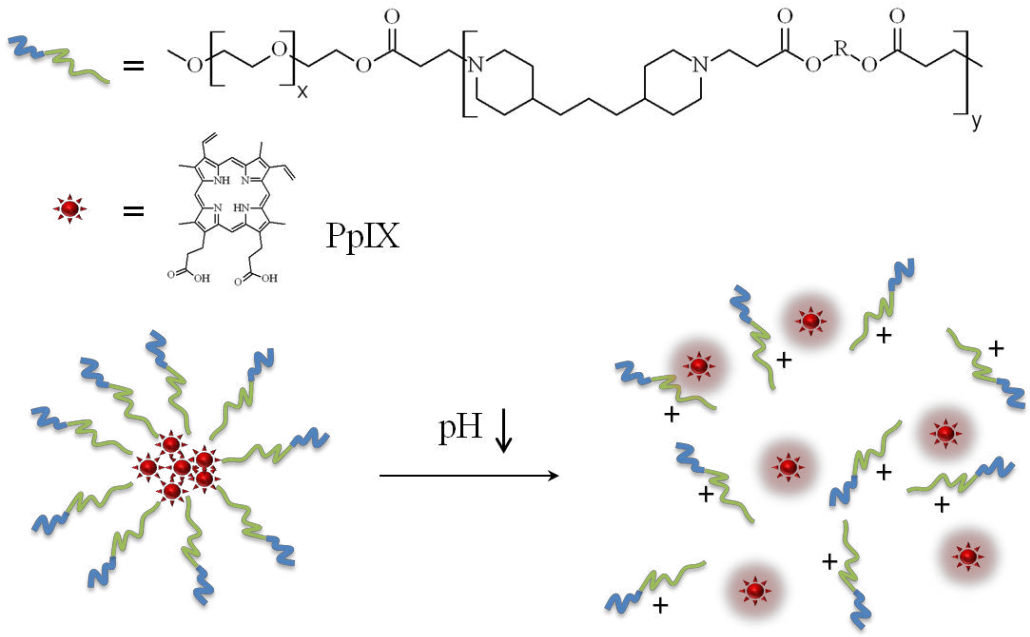


Figure 86. Schéma de la micelle polymérique MPEG poly-(acides β–aminés) chargée avec le photosensibilisateur (PpIX), puis sa destruction en milieu acide.

Ces micelles, de 120 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 PS activable par phénomène de désagrégation

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 leur potentiel à former de l'$^1O_2$. Après internalisation dans la cellule cancéreuse, la nanoparticule se dégrade et libère les PS, qui retrouvent ainsi leur phototoxicité et leur fluorescence (Figure 87).

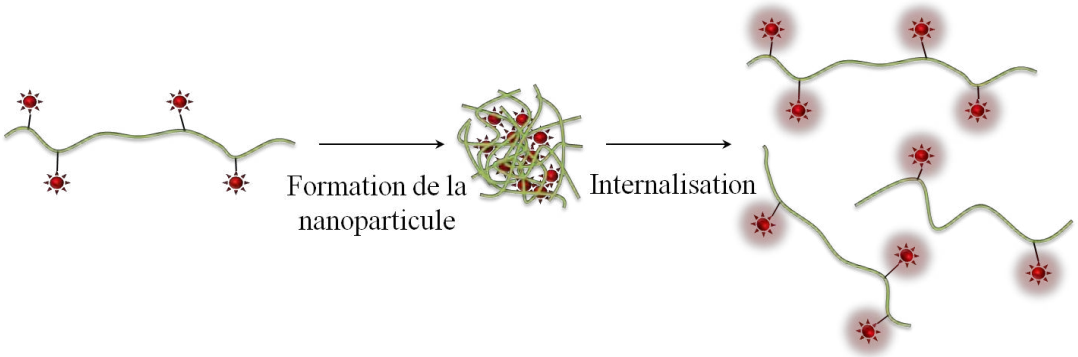


Figure 87. Schéma de la stratégie de désagrégation passive des nanoparticules dégradables.

Une stratégie consiste en l'utilisation d'un polymère de glycol chitosane et de la PpIX comme PS. Ces molécules s'auto-assemblent dans l'eau pour former des nanoparticules de 280 nm où aucune formation d'$^1O_2$ n'a été détectée. 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 [257].

III.3 *Photodynamic molecular beacons* (PMBs)

Les *molecular beacons* sont des constructions moléculaires caractérisées par un changement de propriétés photophysiques après activation par une cible biologique.

III.3.a Application

La spécificité d'un *molecular beacon* (MB) tient du vecteur spécifique d'une cible biologique, souvent peptidique, permettant au PS de retrouver ses propriétés photophysiques : 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 [258].

En imagerie, les *molecular beacons* sont composés d'une paire de fluorophores. Sous irradiation lumineuse dans la zone d'absorption d'un donneur D, l'énergie est transférée à l'accepteur 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. 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 [258, 259], où chaque nouveau brin d'ADN ou d'ARN produit amplifie le signal du MB,
- 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 [259-261],
- les « *DNA biosensors* » [262-265],
- les interactions protéine – ADN [266],
- la détection de l'ARN *in vivo* [267-269],
- la détection d'enzymes.

En thérapie, le même principe peut être appliqué en utilisant un photosensibilisateur (PS) et un *quencher* (Q). On parle alors de *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB). 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 phototoxiques du PS sont ainsi restaurées après activation en présence de la cible thérapeutique [8, 270]. Comme vu précédemment (cf. partie II.3.a. chapitre 1), le *quencher* chimique réagit une seule fois avec l'$^1O_2$ et, sitôt dégradé, il ne pourra plus assurer son rôle par la suite. Cette stratégie ne peut donc pas être utilisée pour un *photodynamic molecular beacon* (PMB). Le *quenching* physique est le transfert d'énergie de l'$^1O_2$ vers une tierce molécule, appelée accepteur, sans réaction chimique. Dans le cadre de la synthèse de PMB, le transfert d'énergie qui nous intéresse est le FRET. Rappelons que le FRET est un transfert d'énergie entre états singulets excités qui influe de manière indirecte sur la production d'état triplet et donc d'oxygène singulet, comme représenté dans la Figure 88.

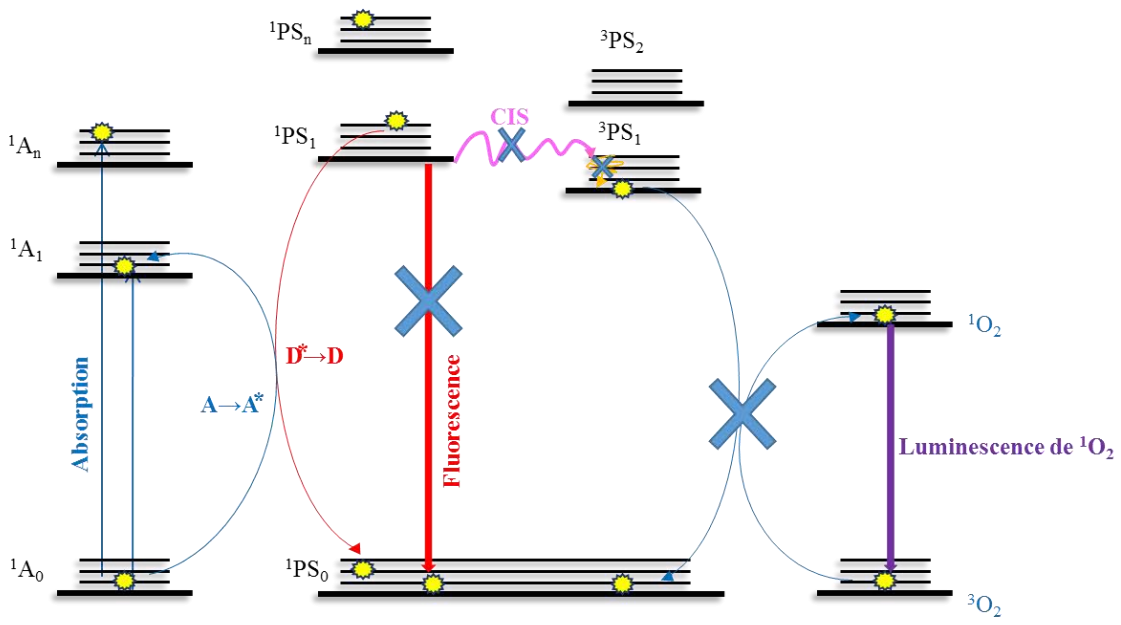


Figure 88. Diagramme de Jablonski simplifié du transfert d'énergie par résonance.

Les *molecular beacons* en PDT sont appelés *photodynamic molecular beacons*, ou encore *killer beacons*. Des exemples vont être décrits dans la partie suivante.

III.3.b PS activables par ciblage d'acide nucléique

Le greffage de PS à des oligonucléotides (courtes chaines d'ADN) permet d'en réguler l'activité, deux brins d'ADN complémentaires portant l'un le PS, l'autre le *quencher* Q. Leur hybridation conduit à l'inactivation du PS par transfert d'énergie (Figure 89). En présence de l'oligonucléotide ciblé, l'un des brins est déplacé et conduit au désappariement du PS et de Q rendant possible la production d'oxygène singulet [271].

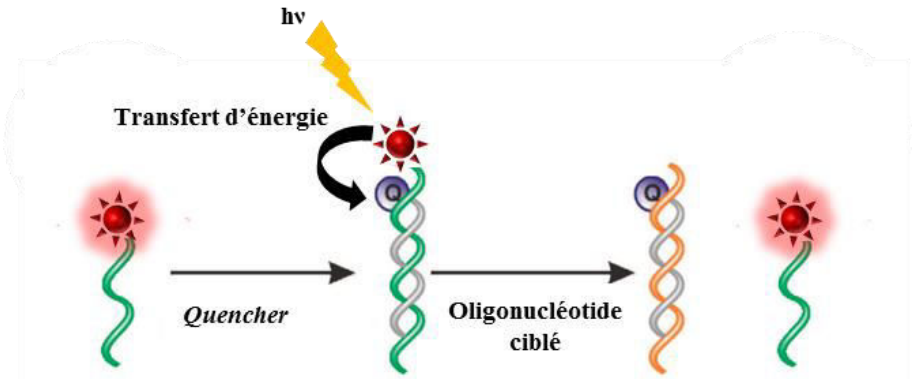
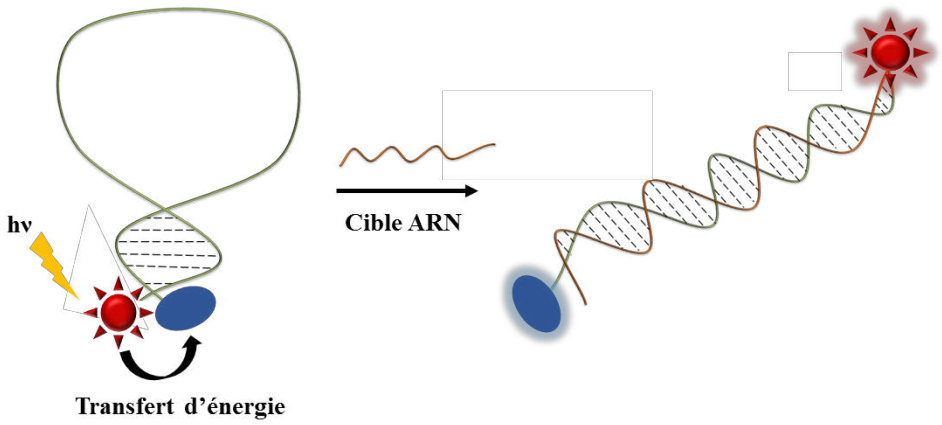


Figure 89. Activation de PS conjugués à des oligonucléotides par déplacement de l'hybridation.

Des séquences d'ARN peuvent aussi être utilisées. Lovell et al. ont décrit un oligonucléotide portant à la fois le *quencher* et le PS. Les extrémités de l'oligonucléotide sont autocomplémentaires et peuvent s'hybrider de façon à rapprocher le *quencher* Q du PS et à désactiver ce dernier (Figure 90 A). L'hybridation de la boucle avec la séquence ciblée provoque le dépliement du brin, permettant la photosensibilisation de l'oxygène. Ils ont synthétisé un PMB ciblant l'ARN messager cRAF-1 utilisant la pyrophéophorbide a comme photosensibilisateur et un caroténoïde pour le *quencher* (Figure 90 B) [272]. Un an plus tard, en 2009, une autre équipe a synthétisé un composé similaire à l'aide d'une phtalocyanine jouant le rôle du photosensibilisateur et du *quencher* [273] s'appuyant

sur la capacité de cette molécule à s'« auto-*quencher* », ce n'est qu'après hybridation que les phtalocyanines peuvent retrouver leur fluorescence.

A)



B)

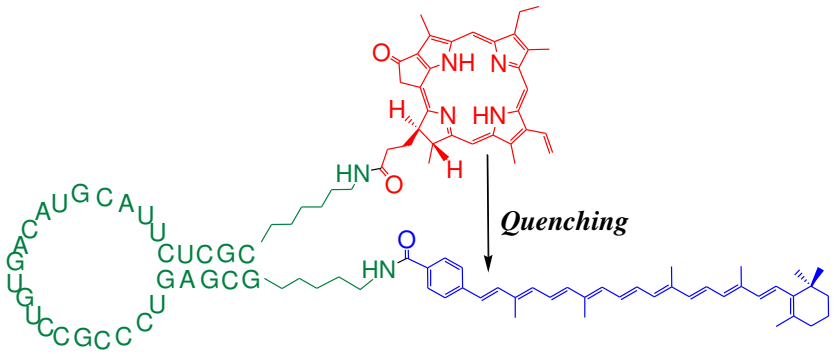


Figure 90. Oligonucléotide d'ARN auto-complémentaire activé par hybridation avec l'ARN messager cRAF-1.

III.3.c Photosensibilisateurs activables par clivage enzymatique

A ce jour, deux squelettes différents pour les photosensibilisateurs activables par clivage enzymatique *via* un peptide sont décrits dans la littérature : 1) le squelette polymérique : les photosensibilisateurs (en rouge) proches crée un phénomène de « *self-quenching* » ; 2) le squelette avec un peptide court : le photosensibilisateur est relié à un *quencher* grâce à un peptide (Figure 91).

1) 2)

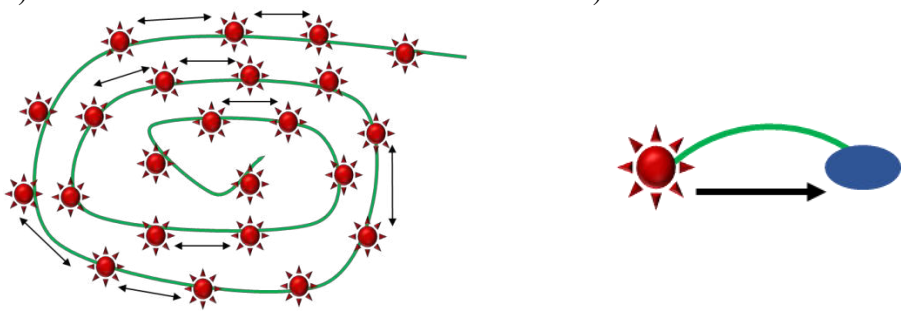


Figure 91. Représentation des squelettes possibles pour les photosensibilisateurs activables par clivage enzymatique *via* un peptide [274]. Le transfert d'énergie du photosensibilisateur au *quencher* est représenté par une flèche.

Les enzymes sont des espèces catalytiques diverses omniprésentes dans toutes les fonctions cellulaires et sont, par conséquent, d'excellentes cibles pour les PMBs. Comme les enzymes sont corrélées dans la plupart des cas à certaines maladies, la réactivation du PS peut être confinée seulement à la localisation des enzymes cibles, tandis que dans les tissues n'exprimant pas ces enzymes, le PS reste inactif.
Parmi ces enzymes, notre équipe s'intéresse tout particulièrement à la famille d'endopeptidases surexprimée pendant la néo-angiogenèse : les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces enzymes suscitent 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 [275-279].

L'équipe de Ralph Weissleder a été la première à faire l'imagerie des MMPs en utilisant un *beacon* [275] constitué d'un squelette de polylysine sur lequel est greffé un peptide substrat des MMPs et un fluorophore (Figure 92). Le fluorophore utilisé est une fluorescéine : la FITC (fluorescéine isothiocyanate) et le peptide est substrat des MMP-2 : GPL*GV*RGKC, où le site de clivage (indiqué en italique) se situe entre Gly et Val [280].

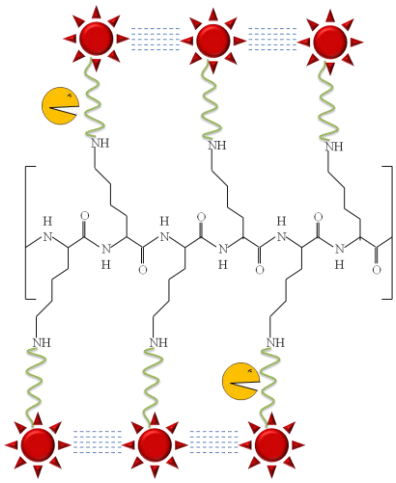


Figure 92. Schéma du *molecular beacon* ciblant les MMP-2 et MMP-9. Sur le squelette de polylysine est attaché le peptide GPLGVRGKC (en vert). Sur la lysine du peptide est greffé le fluorophore FITC (en rouge).

Les fluorophores sont suffisamment proches les uns des autres pour s'« auto-*quencher* », ce n'est qu'après clivage du peptide par les MMP-2 que les fluorophores sont libérés et peuvent retrouver leur fluorescence. Cette stratégie a été reprise en 2005 par Chen [276] utilisant cette fois le peptide SGKPRQITA, substrat des MMP-2 et MMP-9 [281]. De nombreux autres *photodynamic molecular beacon* utilisant l'agrégation des PS comme processus de *quenching* ont été développés pour cibler d'autres enzymes telles que la thrombine [282], l'urokinase [283, 284], la cathépsine B [285]…

Par la suite, d'autres stratégies ont ciblé les MMPs utilisant un *molecular beacon* pour l'imagerie, composé d'un *quencher* différent du fluorophore : Cy5.5-G*PLGV*RGK(BHQ-3)GG-*R*, où le fluorophore est le Cy5.5, *quenché* par le *Black Hole Quencher* BHQ-3. *R* représente une fonction particulière à la stratégie : du chitosan immobilisé sur une surface pour « kit MMP » [286], une nanoparticule [287], des fonctions polyéthylène glycol [277] ou un RGD cyclique [278]. Notons néanmoins que le peptide utilisé n'est pas spécifique des MMP-2 et MMP-9, car il est aussi utilisé pour observer les MMP-13 [277].

Seulement trois équipes travaillent sur la synthèse de *photomolecular beacons,* composés d'un *quencher* différent du PS, activables par clivage enzymatique pour une application en thérapie photodynamique (stratégie représentée schématiquement Figure 93). Une liste des PMBs synthétisés dans la littérature est répertoriée Tableau 3.

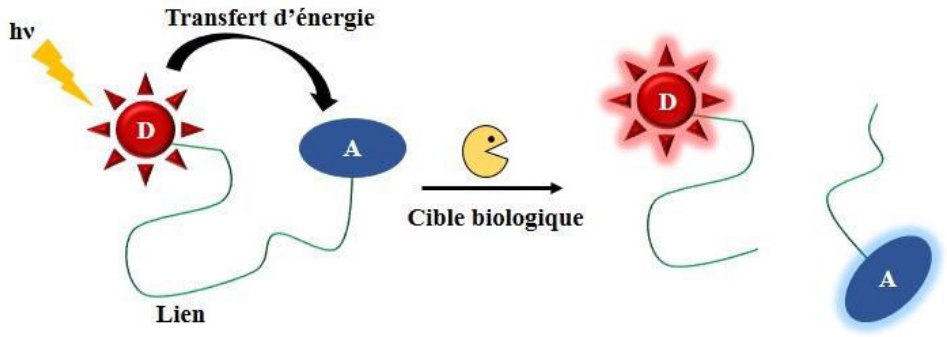


Figure 93. Schéma d'activation par clivage enzymatique d'un PMB pour la thérapie photodynamique.

Le premier PMB, utilisant un *quencher* différent du PS, a été rapporté par l'équipe de G. Zheng, de l'Université de Toronto : une molécule de pyrophéophorbide a été liée à un caroténoïde ou un *Black Hole Quencher* grâce à un peptide spécifique des caspases-3. Puis, d'autres PMBs ciblant de nouveaux substrats telles que la protéine d'activation des fibroblastes ou des phospholipases ont été synthétisés [288, 289]. Cette même équipe a également développé un *molecular beacon* ciblant les MMP-7. Ce *beacon* est composé d'un photosensibilisateur (la pyrophéophorbide-a) et d'un *quencher* (BHQ-3) reliés par un peptide substrat des MMP-7 : GPLGLARK. Le pyrophéophorbide pouvant fluorescer, ce PMB est donc à la fois utile pour la détection des MMP-7 et pour la destruction des cellules tumorales. Liu et al. ont utilisé les capacités fluorescentes de ce PMB pour la détection des métastases dans la colonne vertébrale issues du cancer du sein [290]. 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.

Une étude récente utilise les propriétés de *quenching* de nanoparticules d'or pour inhiber la production d'oxygène singulet générée par le pyrophéophorbide a [291]. Ce *molecular beacon* est activé par le clivage du peptide H-GPLGVRG-OH, séquence spécifique de la MMP-2 (Figure 94).

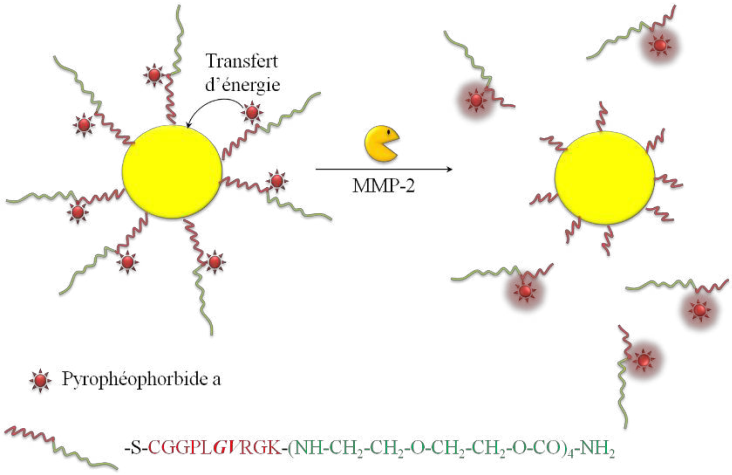


Figure 94. Schéma du PMB utilisant le pyrophéophorbide a quenché par une nanoparticule d'or, liés par le peptide GPL*GV*RGK, substrat des MMP-2 (site de clivage indiqué en italique).

Le PMB obtenu est caractérisé par une inhibition efficace de la fluorescence (Φ_F = 0,004) et de la production d'oxygène singulet (Φ_Δ = 0,0089) dans le PBS. 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 est restaurée dans la lignée cellulaire HT1080.

Par la suite, notre équipe a étudié la synthèse, les propriétés photophysiques et l'évaluation biologique d'une nouvelle famille de PMBs spécifiques des MMP-2 et -9 et séparés par des peptides

de longueur différente. L'intensité de fluorescence et la production d'$^1O_2$ du photosensibilisateur, la 5-(4-carboxyphényl)–10,15,20–triphénylchlorine (TPC-COOH), ont été efficacement inhibées dans les différents PMBs mais aucun d'entre eux n'ont été clivés par les enzymes ciblées [292].

Tableau 3. Liste des PMBs activés par clivage enzymatique, synthétisés dans la littérature, adaptée et complétée de la référence [274].

PS	Q	Lien	Cible	Ref.	Equipe
Pyrophéophorbide	caroténoïde	GDEVDGSGK	Caspase-3	**2004** [293]	**Zheng (Canada)**
Pyrophéophorbide	BHQ-3	GDEVDGSGK	Caspase-3	**2006** [294]	
Pyrophéophorbide	BHQ-3	GPLGLARK	MMP-7	**2007** [295]	
Pyrophéophorbide	BHQ-3	TSGPNQEQK	Fibroblastes	**2009** [289]	
Pyrophéophorbide	BHQ-3	GPLGLARK – structure hairpine	MMP-7	**2009** [296]	
Pyrophéophorbide	BHQ-3	Phospholipide	Phospholipases	**2010** [288]	**Delikatny (Etats-Unis)**
Pyrophéophorbide	nanoparticules d'or	GPLGVRG	MMP-2	**2012** [291]	**Choi (République de Corée)**
TPC-COOH	BBQ-650	GPLGIAGQK	MMP-2 et MMP-9	**2012** [292]	**Notre équipe (France)**

III.3.d Encapsulation de PS

L'agrégation des PS dans les vésicules spécifiques provoque l'inhibition de la fluorescence et de la production d'oxygène singulet (« *auto-quenching* »). Ces vésicules spécifiques chargées de donneur (PS) ciblent sélectivement les cellules cancéreuses (par exemple, dans le cas des LDL, le ciblage des récepteurs des LDL), puis libèrent ce donneur à l'intérieur des cellules cibles, donneur qui retrouvent ainsi ces propriétés photophysiques (Figure 95) [297, 298].

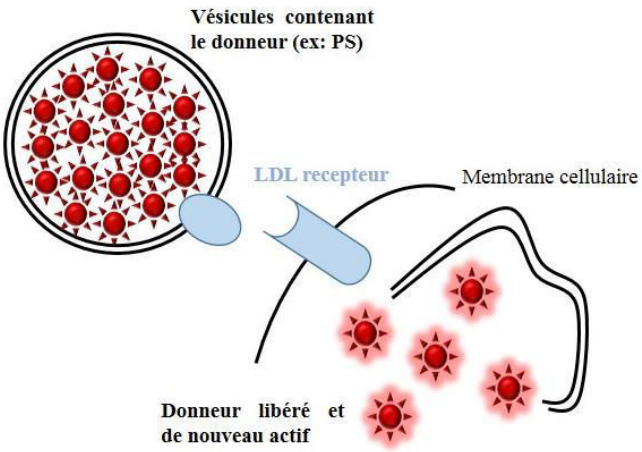


Figure 95. Schéma des voies classiques de l'activation d'un PMB d'encapsulation.

III.3.e Autre mécanisme

Comme décrit Figure 96, l'idée de coupler à des nanotubes de carbone, un dérivé photosensibilisateur-aptamère se développe. Les nanotubes de carbone permettent de *quencher* efficacement la production d'oxygène singulet. Une fois la cible de l'aptamère présente, l'aptamère se dissocie des nanotubes de carbone. Zhu et al. utilisèrent cette stratégie avec un aptamère spécifique de la thrombine et la chlorine e6 comme photosensibilisateur [299].

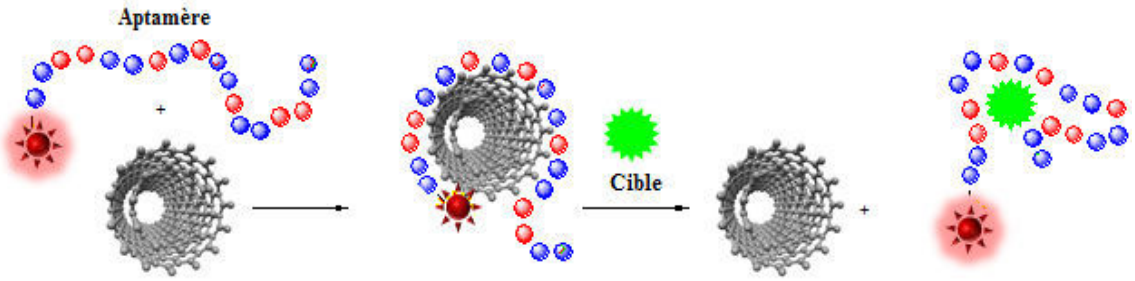


Figure 96. Aptamère-photosensibilisateur (AP)-nanotube de carbone. AP : GGTTGGTGTGGTTGG-Chlorine e6 [299].

IV OBJECTIFS DE LA THESE

Trois stratégies différentes de ciblage tumoral sont explorées dans cette thèse (résumées dans le Tableau 4) :

- La première stratégie (décrite dans le CHAPITRE 3) est de concevoir, de synthétiser et de caractériser de nouveaux photosensibilisateurs couplés à l'acide folique (AF), la finalité étant d'isoler le meilleur candidat pour le traitement ciblé des métastases péritonéales ovariennes. Pour cela, nous avons choisi d'appliquer la méthode de ciblage actif direct développée en PDT pour la reconnaissance moléculaire par les récepteurs à l'acide folique surexprimés par les cellules du cancer de l'ovaire.

- La seconde approche (développée dans le CHAPITRE 4) consiste à utiliser le ciblage actif indirect des récepteurs neuropiline-1 (NRP-1) impliqués dans la progression tumorale et surexprimés au niveau des cellules tumorales de médulloblastome. Pour se faire, un PS (la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, P1-COOH) est couplée à un peptide, ligand spécifique des NRP-1, à l'aide d'une lysine.

- Le troisième objectif suivi dans ce travail (décrit dans le CHAPITRE 5) est de contrôler la production d'oxygène singulet uniquement lorsque le PS a atteint sa cible, les métalloprotéinases membranaires MT1-MMP, enzymes surexprimées dans les cellules tumorales du glioblastome multiforme (GBM), à l'aide de nouvelles constructions moléculaires appelées *Photodynamic Molecular Beacon* (PMB).

Tableau 4. Stratégies utilisées dans cette thèse.

	CHAP. 3	CHAP. 4	CHAP. 5
CANCER	Métastases péritonéales ovariennes	Médulloblastome	Glioblastome multiforme (GBM)
CIBLE	Récepteurs à l'acide folique (FR)	Récepteurs neuropiline-1 (NRP-1)	Métalloprotéinases (MMP-2, 9 et 14)
SOLUTION	Ciblage actif direct	Ciblage actif indirect	Ciblage + Contrôle de la production d'$^1O_2$
OUTIL	Adressage	Adressage	*Photodynamic molecular beacon* (PMB)
MOLECULE POUR LE CIBLAGE	Acide folique (AF)	Peptide DKPPR	Peptide GRIGFLRTAKGG
SYSTEME UTILISE			

CHAPITRE 3

PHOTOSENSIBILISATEURS CONJUGUES A L'ACIDE FOLIQUE POUR LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT

Etudiante de master 2 (synthèse chimique) :
Gulim JETPISBAYEVA
Etudiant de master 1 (photophysique) :
Romain WALCK

Collaborateurs :
Henri AZAÏS (gynécologue)
Soraya KHODJA-BACH (MS)
Alfred BASSIL (MS)
Serge MORDON (DR INSERM)

Collaborateurs :
Cédric BOURA (MdC)
Thierry BASTOGNE (MdC)

I RECEPTEURS DE L'ACIDE FOLIQUE : UNE CIBLE DE CHOIX POUR LES THERAPIES CIBLEES DES CARCINOMES OVARIENS

I.1 Métastases péritonéales ovariennes

Le cancer de l'ovaire conserve une réputation redoutable, d'abord parce qu'il est la quatrième cause de mortalité par cancer chez la femme en France où il provoque chaque année 3 500 décès, ensuite parce que la plupart des malades rechutent au niveau de la cavité abdominale, ce qui les conduit à une phase terminale particulièrement pénible dominée par l'occlusion intestinale [300].

La dissémination des cancers de l'ovaire peut se faire selon quatre voies :

- **infiltration directe** aux organes adjacents : utérus, recto-sigmoïde, grêle et plus rarement la vessie,
- **péritonéale**, ce cancer conduit à l'envahissement du péritoine par des tumeurs malignes secondaires conduisant à une **carcinose péritonéale** (CP). C'est la voie la plus fréquente. Le péritoine est une membrane séreuse annexée au tube digestif abdominal et à certains organes génito-urinaires qu'elle enveloppe ou recouvre. Il est composé d'un feuillet pariétal qui tapisse la face interne de la paroi abdominale et d'un feuillet viscéral qui enveloppe les organes,
- **lymphatique** avec 3 voies de drainage : lombo-aortique, ilio-obturatrice et inguinale. Elle peut se faire de façon bilatérale,
- **hématogène** survenant tardivement et donnant des localisations hépatique, pulmonaire et cérébrale.

Le choix et l'ordre des traitements dépendent de l'étendue du cancer (son stade) et du degré d'agressivité des cellules cancéreuses (le grade histologique).

Pour déterminer le stade du cancer, les médecins prennent en compte :
- la localisation précise de la tumeur et son étendue ;
- l'atteinte ou non des organes voisins, du péritoine et des ganglions lymphatiques du bassin (métastases régionales) et la taille de ces métastases ;
- la présence ou non de métastases dans d'autres parties du corps (métastases à distance).

En fonction de ces différents critères, le cancer est ensuite classé dans l'un des 4 stades définis par la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO). Ces stades sont numérotés de I à IV (Tableau 5) :
- le stade I correspond aux cancers limités aux ovaires ;
- le stade II regroupe les cancers ayant atteint d'autres organes du petit bassin (portion inférieure du bassin) : l'utérus, les trompes de Fallope, la vessie…

Ces deux stades sont considérés comme précoces.
- le stade III correspond aux cancers qui se sont étendus au péritoine ou aux ganglions lymphatiques situés dans le bassin (ganglions pelviens). On parle de métastases régionales ;
- le stade IV réunit les cancers qui se sont disséminés dans d'autres parties plus éloignées du corps (les poumons, le foie), sous forme de métastases à distance.

Ces deux stades sont des formes avancées du cancer de l'ovaire.

Tableau 5. Stades définis par la FIGO pour les cancers de l'ovaire [301].

Stades FIGO	Explication
Stades I	**Le cancer est limité aux ovaires.**
Stade IA	Le cancer est limité à un seul ovaire et reste contenu à l'intérieur.
Stade IB	Le cancer atteint les deux ovaires et reste contenu à l'intérieur.
Stade IC	Le cancer touche un ou les deux ovaires, mais la tumeur peut avoir traversé la capsule ovarienne ou s'être propagée à la surface de l'ovaire. On retrouve des cellules cancéreuses dans le liquide de l'abdomen.
Stades II	**La tumeur s'est étendue localement, aux organes du bassin (organes pelviens).**
Stade IIA	La tumeur s'est propagée à l'utérus ou aux trompes de Fallope. On ne retrouve pas de cellules cancéreuses dans l'abdomen.
Stade IIB	La tumeur s'est propagée à d'autres organes pelviens (vessie, rectum…). On ne retrouve pas de cellules cancéreuses dans l'abdomen.
Stade IIC	La tumeur s'est propagée aux organes pelviens (comme pour les stades IIA ou IIB) et on retrouve des cellules cancéreuses dans le liquide abdominal.
Stades III	**La tumeur s'est étendue au péritoine ou aux ganglions lymphatiques situés dans le bassin (ganglions pelviens). On parle de métastases régionales.**
Stade IIIA	Des métastases microscopiques sont découvertes sur le péritoine, lors de l'analyse au microscope réalisée après la chirurgie ou après une biopsie.
Stade IIIB	Les métastases du péritoine mesurent jusqu'à 2 centimètres, mais aucun ganglion pelvien n'est atteint.
Stade IIIC	Certaines métastases du péritoine mesurent plus de 2 centimètres et/ou le cancer s'est propagé aux ganglions pelviens.
Stade IV	**Le cancer s'est propagé vers des organes éloignés : la plèvre (enveloppe des poumons), le foie.**

I.2 Epidémiologie

Le cancer de l'ovaire n'est pas, à la différence du cancer du sein, un cancer très fréquent. En revanche, c'est un cancer caractérisé par une extrême gravité (Tableau 6) [302].

Tableau 6. Survie à cinq ans en fonction du stade du cancer de l'ovaire.

	Incidence (%)	Survie à 5 ans (%)
Stade I	15	50 à 85
Stade II	10	37 à 79
Stade III	70	7 à 18
Stade IV	5	2 à 8

Comme pour la plupart des cancers, l'âge est un facteur de risque important puisque l'incidence annuelle est multipliée par six entre 40 et 70 ans (de 5,6 à 39,7 pour 100 000 femmes) [303]. En 2000, l'âge médian au diagnostic était de 65 ans. Seulement 7 % des cas de cancer de l'ovaire surviennent avant 40 ans et environ 10 % entre 40 et 50 ans. Le cancer de l'ovaire est donc pour l'essentiel une tumeur de la femme ménopausée.

L'incidence des cancers de l'ovaire est très variable selon les régions du monde. Comparée aux autres pays européens, la France est un pays à faible risque de cancer de l'ovaire. La Suède, la Finlande, l'Angleterre et le Danemark présentent des taux d'incidence de 50 à 70 % supérieurs à ceux de la France. L'Espagne est le pays européen qui semble le moins touché par ce cancer (14 % d'incidence en moins que le taux français) [303]. Globalement, les facteurs de risque du cancer de l'ovaire sont mal connus, mais cette variabilité géographique indique que le mode de vie ou des facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle dans l'apparition de la maladie.

Le nombre de nouveaux cas de cancers de l'ovaire en 2012 en Europe a été estimé à 65 500 et le nombre de décès à 42 700 [304].

La présence d'une carcinose péritonéale témoigne d'une maladie néoplasique évoluée et est habituellement associée à un mauvais pronostic avec une médiane de survie de 6 mois.

I.3 Traitements

Le traitement classique de la carcinose péritonéale d'origine ovarienne est l'association de la **chirurgie** et de la **chimiothérapie** par voie intraveineuse. La chirurgie a pour objectif d'ôter tout tissu atteint visible et/ou palpable pour le chirurgien. L'atteinte microscopique (invisible) est, elle, traitée par la chimiothérapie. Il existe de nombreux médicaments de chimiothérapie. Un médicament peut être employé seul (monothérapie) ou, le plus souvent, associé à d'autres médicaments (polythérapie). Pour les cancers de l'ovaire, la chimiothérapie associe généralement deux types de médicaments : un sel de platine (comme le carboplatine) et un taxane (comme le paclitaxel) (Figure 97) [301].

La **chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale** est un traitement qui combine chimiothérapie et chirurgie. Ce traitement se déroule en une fois, à la fin de la chirurgie, après que le chirurgien a enlevé tous les foyers cancéreux visibles à l'œil nu. Les médicaments de chimiothérapie (du cisplatine, Figure 97) sont dilués dans une solution lipidique et chauffés à 42°C pendant une heure. Ils sont ensuite introduits dans la cavité péritonéale où ils circulent pendant quelques dizaines de minutes avant d'être aspirés par une pompe. Le chirurgien referme ensuite l'abdomen. Le fait de chauffer le liquide contenant les médicaments a pour objectif d'augmenter l'effet destructeur de la chimiothérapie sur les tissus cancéreux. La chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (CHIP) est un traitement récent, toujours en cours d'évaluation. Il ne peut être proposé que dans le cadre de protocoles d'évaluation ou d'essais cliniques. Ce traitement peut être indiqué si la chirurgie a permis de supprimer la totalité des tissus cancéreux visibles ou si les tissus restants sont inférieurs à 1 centimètre de diamètre. Il est également parfois utilisé pour traiter une récidive du cancer [301].

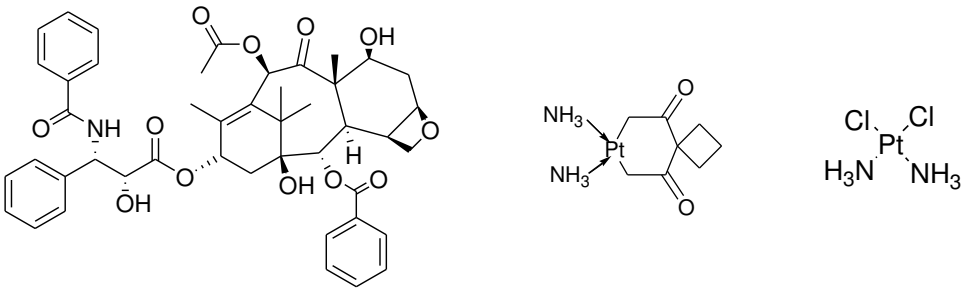


Figure 97. Structures chimiques du paclitaxel, du carboplatine et du cisplatine (de gauche à droite).

Malgré les progrès et la standardisation des techniques chirurgicales, la chirurgie de cytoréduction macroscopiquement complète, associée à une chimiothérapie efficace, ne prévient pas la survenue des récidives qui concerneront 60% des femmes en rémission à l'issu de ce traitement [305]. Parmi

les hypothèses expliquant ce taux élevé de récidive, l'existence de lésions microscopiques résiduelles à l'issu de la chirurgie est évoquée. La pression de sélection des traitements systémiques pourrait par ailleurs expliquer le développement de contingents tumoraux résistants à la chimiothérapie et en particulier aux sels de platine. Le traitement de cette maladie microscopique représente un nouveau défi à relever pour les oncologues et les chirurgiens, et de nouvelles stratégies sont à développer dans ce domaine [306].

L'imagerie de fluorescence préopératoire pourrait aider le chirurgien oncologue à mieux visualiser l'extension tumorale et exciser plus radicalement la tumeur. L'une des premières applications porte sur le cancer de l'ovaire, dont l'exérèse la plus complète influe le pronostic. Il est difficile pour le chirurgien de déterminer les marges précises de la tumeur ; il n'est guidé pour cela que par ses sens visuel et tactile et par son expérience. Le récepteur alpha du folate, surexprimé dans 90 à 95 % des cancers de l'ovaire et absent sur les cellules saines, représente une excellente cible pour l'agent fluorescent. Dans un essai pilote, van Dam et al. [307] ont utilisé comme traceur fluorescent couplé à de l'acide folique, l'isothiocyanate de fluorescéine (folate-FITC). Ils ont injecté ce traceur par voie intraveineuse à 10 femmes qui subissaient une laparotomie exploratrice pour suspicion de cancer ovarien. Parmi ces femmes, 4 furent diagnostiquées avec un cancer épithélial de l'ovaire, 1 avec une tumeur séreuse *borderline* et 5 avec une tumeur bénigne de l'ovaire. Les résultats sont prometteurs par cette identification spécifique et sensible du tissu tumoral. La fluorescence est détectée chez les 3 patientes dont la tumeur maligne exprime le récepteur alpha du folate, mais elle est toutefois absente chez une patiente dont la tumeur maligne n'exprimait pas ce récepteur ; cette limitation peut être surmontée en identifiant les patientes FR-alpha-positive avant ou pendant l'exploration chirurgicale. Par ailleurs, chez une patiente ayant une dissémination péritonéale du cancer, la fluorescence visualise bien cette extension. Le tissu sain, lui, ne montre aucune fluorescence.

Dans le cadre d'une cytoréduction maximale et en complément d'une chirurgie de réduction tumorale maximale complète, des stratégies thérapeutiques sont envisageables en fin d'intervention comme la **thérapie photodynamique péritonéale**. L'objectif est de développer une technique alternative déjà appliquée dans d'autres disciplines, en proposant le photodiagnostic et la thérapie photodynamique des lésions de carcinose péritonéale ovarienne. La réalisation d'une séance de thérapie photodynamique prophylactique en complément d'une chirurgie de cytoréduction maximale permettrait la destruction des lésions microscopiques et la diminution du taux de récurrence péritonéale.
L'utilisation de la PDT sur le péritoine a été rapportée dans le cadre de carcinose péritonéale sur un modèle murin [308-310]. Une étude clinique américaine de phase I montre des résultats significatifs de la PDT intrapéritonéale en adjuvant [311]. Le Photofrin était administré en intraveineux 48 à 72 heures avant chirurgie d'exérèse par laparotomie. Seules les patientes présentant un reliquat tumoral nul étaient incluses et recevaient un cycle de PDT (0,2-5,0 J/cm^2) sur le péritoine immédiatement après la chirurgie. Sur 18 patientes incluses, 4 d'entre elles présentaient une survie sans récidive de 3 à 27 mois après traitement. La même équipe a publié les résultats d'une étude de phase II concernant la PDT intrapéritonéale en adjuvant dans le cadre de tumeurs péritonéales disséminées (ovariennes, gastro-intestinales et sarcomes) [312]. 100 patientes étaient incluses dans l'étude. 71 patientes pouvaient bénéficier de la PDT (dont 23 cancers de l'ovaire). Le Photofrin® était administré 48 heures avant la chirurgie d'exérèse à la dose de 2,5 mg.kg^{-1}. En termes d'efficacité, la survie sans récidive et la survie totale étaient respectivement de 3,0 et 22,0 mois en cas de cancer de l'ovaire traité par PDT. La PDT intrapéritonéale était réalisable en cas de tumeurs de l'ovaire disséminées. Néanmoins, aucune réponse complète et aucun contrôle de la maladie à long terme n'ont été observés. Ces résultats ne sont pas rédhibitoires quant au développement de la PDT en oncologie gynécologique car le manque d'efficacité de la PDT intrapéritonéale utilisant le Photofrin® peut s'expliquer par le défaut d'absorption tumorale du photosensibilisateur, le manque de spécificité de la répartition du photosensibilisateur (ratio tumeur/ tissu sain peu important), la déplétion en oxygène du tissu tumoral (illumination continue) et l'hétérogénéité des propriétés optiques des tissus.

A ce jour, la plupart des travaux de recherche menés sur la thématique de la carcinose péritonéale ont eu recours à l'utilisation de protoporphyrine IX (PpIX), un PS endogène dont la synthèse tissulaire est stimulée par l'administration d'un précurseur (héxaminolévulinate). Il a été constaté que cette technique permettait d'induire la nécrose des tissus cibles [313], mais que la spécificité insuffisante du photosensibilisateur était responsable d'une mauvaise tolérance de la procédure et d'une morbi-mortalité importante du modèle animal (en particulier en raison de la toxicité hépatique). Un des enjeux principaux est donc de disposer d'un photosensibilisateur plus spécifique.

I.4 Cancer de l'ovaire et récepteurs α de l'acide folique (FRα)

I.4.a L'acide folique

L'**acide folique** (folate, vitamine B9, Figure 98), vitamine hydrosoluble, est le précurseur métabolique d'une coenzyme, le tétrahydrofolate (FH_4 ou THF), impliquée notamment dans la synthèse des bases nucléiques, purines et pyrimidines, constituant les acides nucléiques (ADN et ARN) du matériel génétique. L'acide folique (**AF**) a donc une importance particulière pour la division et la croissance cellulaire.

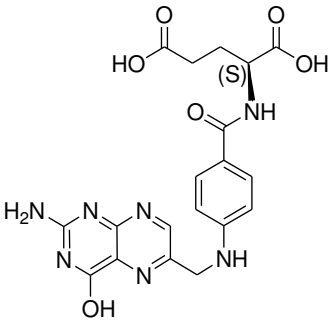


Figure 98. Structure chimique de l'acide folique.

L'acide folique est présent dans de nombreux aliments : foie, lait, fromages fermentés, légumes verts (asperges, épinards, choux verts, carottes). Les besoins quotidiens sont élevés : de 100 à 400 microgrammes selon l'âge et l'état physiologique du sujet. Cependant, une alimentation diversifiée en apporte des quantités suffisantes.

Les folates pénètrent dans les cellules par 3 modalités : le transporteur des folates réduits (faible affinité), le transporteur des folates couplés aux protons et le récepteur à l'acide folique à haute affinité (FR). Le FR est une protéine membranaire de glycosylphosphatidyinositol qui permet l'internalisation du AF par les cellules (sous forme oxydée) dans des vésicules [314, 315]. Il existe trois isoformes de ce récepteur, α, β, γ. Chacune d'entre elle possède une distribution tissulaire spécifique et une capacité différente à fixer le folate [316].

L'acide folique rassemble de nombreuses qualités requises pour une molécule d'adressage :

- sa forte affinité pour le récepteur ($K_d = 10^{-10}$ M) ;
- sa petite taille (permettant de conférer au conjugué de meilleurs propriétés pharmacocinétiques) ;
- facilement disponible et peu onéreux ;
- compatible avec des solvants organiques et des solvants aqueux [317].

I.4.b Le récepteur α de l'acide folique (FRα)

Le récepteur α de l'acide folique est une glycoprotéine transmembranaire de poids moléculaire 38-40 kDa ancrée à la membrane des cellules et est l'isoforme le plus exprimé dans les tissues adultes [318].
Le FRα est surexprimé dans environ 40 % des tumeurs solides, en particulier dans les cancers d'origine épithéliale de l'ovaire, du sein, du rein et du poumon [319]. 72 à 100% des carcinomes ovariens le surexpriment [319-321]. Le récepteur est absent de la majorité des tissus normaux [316]. Il a été montré que le profil d'expression du récepteur entre la lésion primitive et les localisations secondaires (péritonéales et ganglionnaires) est le même. De la même manière, les récurrences adoptent le même profil d'expression que la tumeur initiale [320]. C'est pourquoi le ciblage thérapeutique du récepteur alpha de l'acide folique semble prometteur pour le traitement des cancers ovariens.

Le développement d'un photosensibilisateur de nouvelle génération ciblant les cellules de carcinose péritonéale ovarienne par l'intermédiaire du récepteur au folate α, permet d'envisager le traitement de ces lésions par thérapie photodynamique prophylactique ciblée, ceci dans l'optique de proposer une stratégie innovante complémentaire de la chirurgie, permettant la destruction prophylactique des lésions microscopiques.

II ETAT DE L'ART : LES CONJUGUES DE L'ACIDE FOLIQUE EN PDT

L'utilisation de PS conjugué à l'acide folique en thérapie photodynamique a fait l'objet d'une revue écrite par notre équipe, publiée dans *Current Medicinal Chemistry* en 2015, intitulée « The interest of folic acid in targeted photodynamic therapy ». Cette revue est disponible en annexe.

Cette revue présente un inventaire des données de la littérature concernant l'utilisation de l'acide folique comme molécule de ciblage pour améliorer la sélectivité des photosensibilisateurs ou nanoparticules pour les récepteurs de l'acide folique. De nombreux systèmes (PS, nanoparticules, liposomes…) ont été couplés à l'acide folique directement ou *via* un bras espaceur. Dans cette revue, nous discutons des différentes stratégies de synthèse développées ainsi que l'influence de la présence de l'acide folique sur les propriétés photophysiques des différents objets et leurs effets sur la sélectivité et la phototoxicité *in vitro* et *in vivo*.

III CONTEXTE DU PROJET

En 2005, le LRGP et le CRAN ont publié un article sur une porphyrine couplée à un folate, la P1-PEG-FA (Figure 99), premier article de la littérature montrant l'intérêt du couplage du folate sur un photosensibilisateur, *in vitro* [183].

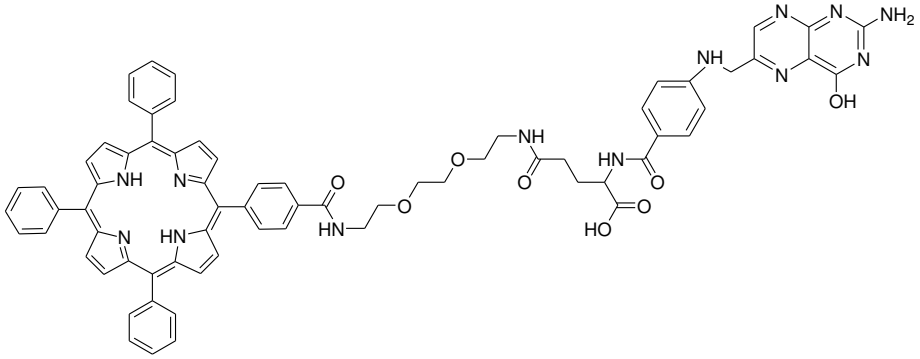


Figure 99. Structure chimique développée de la P1-PEG-FA.

En 2008, des études *in vivo* ont été publiées par les mêmes équipes utilisant un composé similaire (*m*-THPC couplée à l'AF) [184]. L'INSERM 703, en étroite collaboration avec l'équipe de cliniciens du département de chirurgie gynécologique oncologique du CHRU de Lille, a montré l'intérêt pour le ciblage par le folate de la molécule P1-PEG-FA [322] et a montré la spécificité du photosensibilisateur pour les lésions de carcinose péritonéale sur modèle préclinique (ratio tumeur / tissu sain : 9,6, supérieur au ratio observé sur modèle préclinique et lors des essais cliniques utilisant des photosensibilisateurs de première génération [323] et [324]). La publication acceptée est jointe à la fin de ce manuscrit.

Cependant, trois verrous doivent être levés. En effet, la molécule P1-PEG-FA se révèle instable en solution, ce qui rend sa purification et son stockage difficiles. D'autre part, des expériences de visualisation par fluorescence *in vivo* se sont révélées infructueuses, la fluorescence était très faible. Il se pourrait que cela soit dû à une mauvaise solubilité du composé, entraînant une agrégation, et des désactivations non radiatives au détriment des désactivations radiatives. De plus, la molécule ayant déjà été publiée, il n'est pas possible de la breveter pour envisager une phase I.

Suite à ces essais préliminaires très encourageants mais non satisfaisants, il nous a fallu développer un nouveau photosensibilisateur couplé à de l'acide folique, le plus efficace possible, dont le cahier des charges est extrêmement précis :

- synthèse aisée et propre,
- purification aisée,
- propriétés photophysiques permettent un effet thérapeutique (formation d'oxygène singulet) et une détection (fluorescence),
- soluble dans un milieu biologiquement compatible,
- sélectif pour le récepteur à l'acide folique,
- non toxique en absence de lumière,
- facilement administrable,
- présentant une bonne biodistribution,
- stable,
- pouvant être utilisé cliniquement donc brevetable.

IV SYNTHESE ET ETUDE PHOTOPHYSIQUE DE PHOTOSENSIBILISATEURS CONJUGUES A L'ACIDE FOLIQUE POUR AMELIORER LE CIBLAGE TUMORAL EN PDT

Ce travail a porté sur la synthèse de nouveaux photosensibilisateurs couplés à l'acide folique à l'aide ou non d'un bras espaceur (Figure 100). Les objectifs de ce travail étaient de synthétiser et d'étudier les propriétés photophysiques de ces nouveaux composés afin d'évaluer l'influence de la nature du PS et de la distance de l'acide folique au PS sur les propriétés photophysiques.

Différentes molécules ont été synthétisées (Figure 100). La porphyrine couplée à l'acide folique *via* un bras de type PEG a servi de référence. L'influence d'ajouter un bras espaceur a été évaluée (supprimer le bras espaceur peut diminuer l'affinité pour le récepteur à l'acide folique, mais une étape de synthèse de moins est rentable d'un point de vue économique). La pyrophéophorbide a également été testée car possède une structure moins encombrée que la porphyrine, pouvant engendrer une meilleure affinité pour le récepteur à l'acide folique. L'utilisation d'une chlorine, TPC-PEG-FA, peut présenter un avantage car les chlorines possèdent des coefficients d'absorption molaires aux grandes longueurs d'onde plus importants que les porphyrines, permettant une meilleure absorption de la lumière donc une activité photodynamique accrue.

Afin de vérifier que les composés synthétisés peuvent être utilisés *in vitro* et *in vivo* pour des applications en thérapie photodynamique, les caractéristiques photophysiques ont été déterminées, à savoir les coefficients d'extinction molaires, les rendements quantiques de fluorescence et de formation d'oxygène singulet. Des mesures de durée de vie ont également été réalisées, afin d'évaluer un éventuel *quenching* par l'acide folique de l'oxygène singulet produit par le photosensibilisateur.

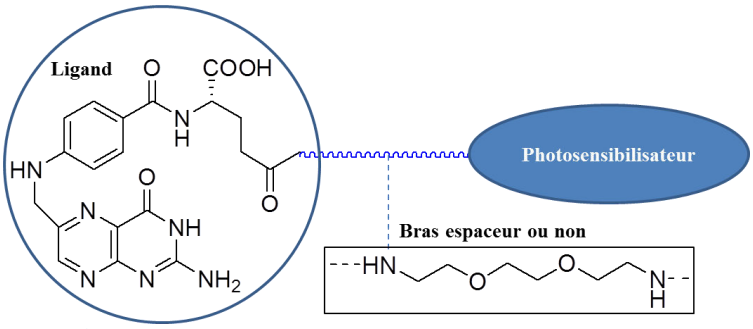


Figure 100. Représentation schématique des systèmes synthétisés à partir d'acide folique.

IV.1 Synthèse

La synthèse des conjugués PS-acide folique (**13-15**) a été effectuée en trois étapes, décrites dans la Figure 101 :
(1) la première étape consiste en la préparation des différents photosensibilisateurs,
(2) la deuxième vise à coupler un bras espaceur, un PEG, le 2,2'-(éthylènedioxy)-diéthylamine, au photosensibilisateur,
(3) enfin, la fonction terminale NH_2 du photosensibilisateur est conjuguée à une des fonctions acide carboxylique de l'acide folique pour donner les conjugués correspondants.

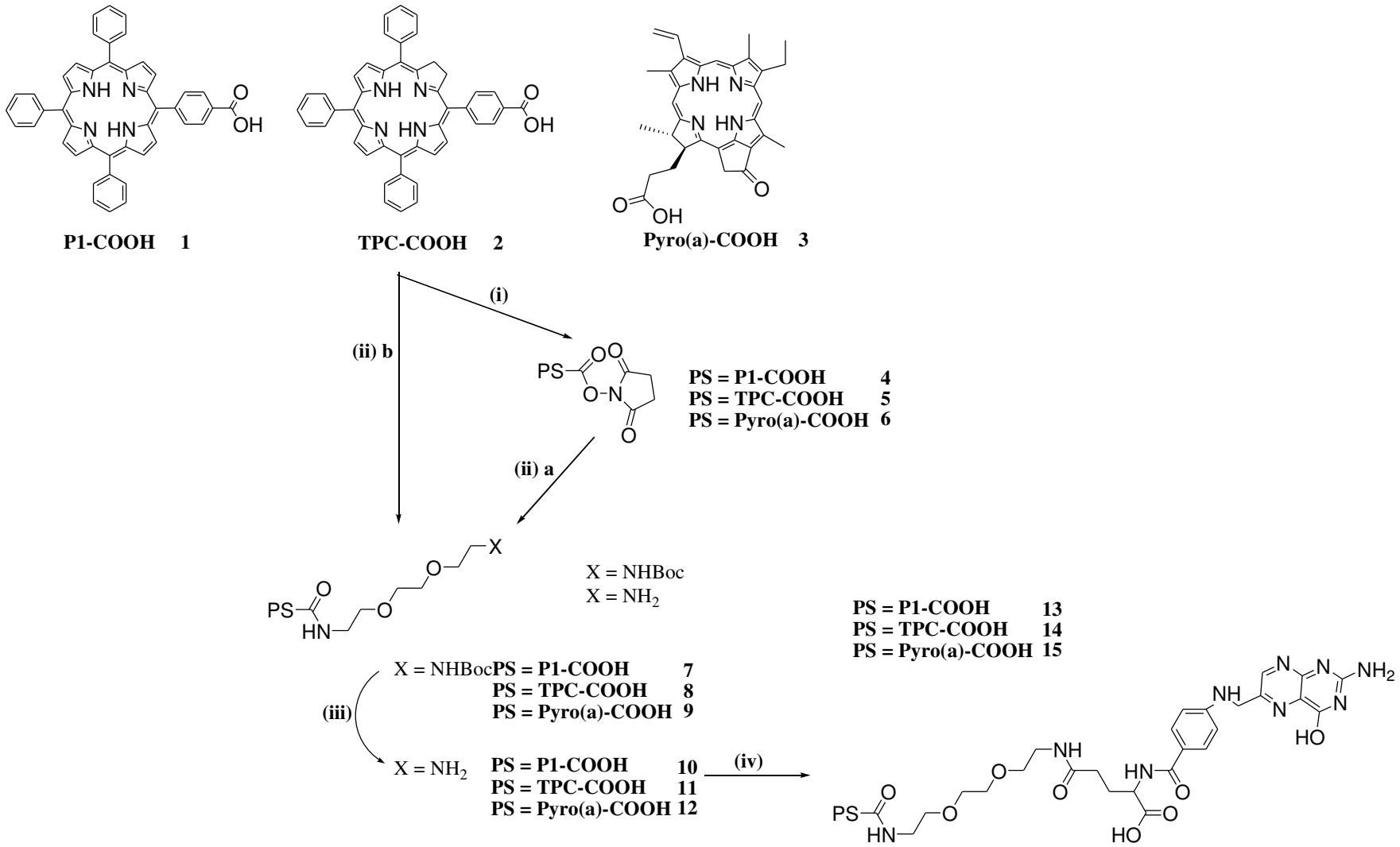


Figure 101. Stratégie de synthèse des dérivés PS-spacer-FA (13, 14, 15). (i) NHS, DCC, CH_2Cl_2, 45 °C, 16h. (ii, a) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), THF, r.t., 18h. (ii, b) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (iii) TFA, r.t., 2h. (iv) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 24h ou 48h.

Tous les modes opératoires détaillés sont décrits dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

IV.1.a Les photosensibilisateurs (PS)

La porphyrine monocarboxylée **P1-COOH** est synthétisée suivant la méthode de Lindsey [80] qui consiste à condenser quatre équivalents de pyrrole avec un équivalent de 4-carboxybenzaldéhyde et trois équivalents de benzaldéhyde préalablement distillés. Cette réaction, effectuée dans le DCM anhydre en présence de $BF_3.OEt_2$ et sous argon, donne un intermédiaire porphyrinogène qui est oxydé en porphyrine (P1-COOH) par ajout de *p*-chloranil (2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone) (Figure 102). Le DCM est ensuite évaporé et le brut réactionnel est solubilisé dans un mélange DCM/EtOH (97:3, v/v) avant d'être filtré sur silice pour enlever la majorité des goudrons formés. Ce brut est ensuite purifié par plusieurs colonnes chromatographiques successives. Elles sont effectuées avec une phase stationnaire de silice normale et un éluant isocratique DCM/EtOH (97:3, v/v). Cette synthèse donne un rendement moyen d'environ 10 %, dû à la formation importante de goudrons engendrés par l'ajout de *p*-chloranil (Figure 102).

La **TPC-COOH** est obtenue suivant la méthode de Whitlock (réduction diimide) [105] (Figure 102). Cette méthode consiste à réduire la porphyrine par le *p*-TSH (*para*-toluènesulfonylhydrazine) en présence de K_2CO_3 dans la pyridine distillée, à reflux et sous argon. La P1-COOH est réduite en la bactériochlorine correspondante en ajoutant directement 40 équivalents de *p*-TSH et 80 équivalents de K_2CO_3 puis en portant le mélange à reflux pendant 4 heures. Il se forme alors un mélange de bactériochlorine et de chlorine. Le brut réactionnel de la bactériochlorine est ensuite dissout dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) et placé sous argon. Cette molécule est réduite en sa chlorine correspondante par des ajouts successifs d'*o*-chloranil (3,4,5,6-tétrachloro-1,2-benzoquinone) en quantité définie et préalablement dissout dans l'AcOEt (C = 600 $mg.mL^{-1}$). Cette étape consiste à réoxyder la bactériochlorine en chlorine sans pour autant pousser la réaction jusqu'à l'oxydation totale qui conduirait à la formation de porphyrine. Pour cela, la solution d'*o*-chloranil est ajoutée progressivement (un ajout toutes les 15 minutes) et un spectre UV-visible de la solution est enregistré avant chaque nouvel ajout (Figure 103). Lorsque le spectre correspond à celui de la chlorine sans bactériochlorine (des traces de porphyrine peuvent être présentes), la réaction est stoppée par l'ajout d'un volume d'eau conséquent (100 mL) afin d'éviter la réduction de la TPC-COOH en P1-COOH.

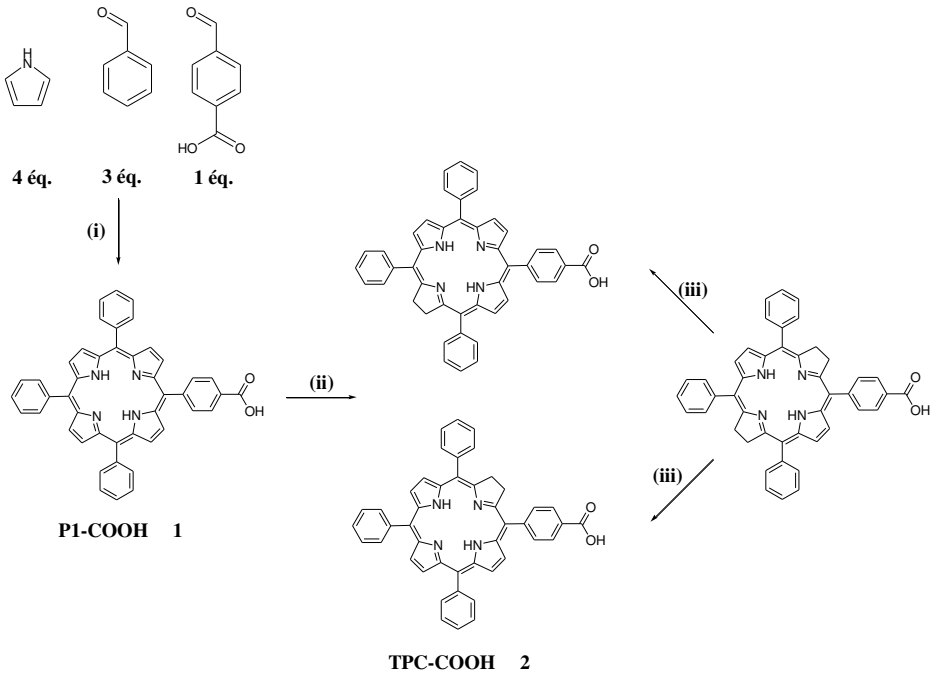


Figure 102. Synthèses des photosensibilisateurs P1-COOH 1 et TPC-COOH 2. (i) BF_3,OEt_2, DCM, reflux, 16h et ensuite ajout de *p*-chloranil, 60°C, 2h. (ii) *p*-TSH, K_2CO_3, pyridine, reflux, 16h. (iii) EtOAc, *o*-chloranil.

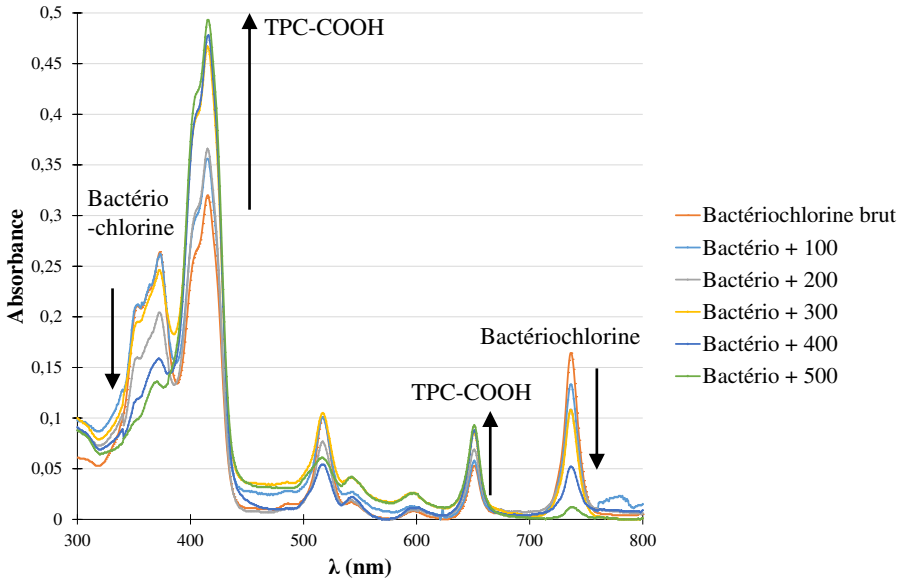


Figure 103. Evolution du spectre UV-Visible du brut réactionnel de la bactériochlorine en fonction de la quantité d'*o*-chloranil ajouté (volumes en µL) dans l'éthanol.

La fonction acide carboxylique des PS choisis, P1-COOH, TPC-COOH et Pyro(a)-COOH est ensuite activée (Figure 101). Le PS est solubilisé (200 mg pour 20 mL) dans le DCM sous agitation magnétique et sous argon, puis 1,5 équivalent de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) est ajouté avec 1,5 équivalent de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Ce mélange est laissé à réagir à reflux du DCM pendant 4 heures. Le brut réactionnel est ensuite purifié par colonne chromatographique. Les rendements pour la **P1-NHS** et la **TPC-NHS** sont compris entre 75 et 90 %. La **Pyro-NHS** a été obtenue avec un rendement de 46 %.

IV.1.b Couplage avec un bras espaceur (PS-S-NHBoc et PS-S-NH_2)

Deux approches ont menées à la synthèse des dérivés PS-bras espaceur protégé Boc (**PS-S-NHBoc**) (Figure 101).

- Les conjugués P1- et TPC-S-NHBoc (**7**, **8**) ont été synthétisés à partir des P1- et TPC-NHS (**4**, **5**) respectivement avec un équivalent de bras espaceur, (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine) dans le THF à température ambiante pendant 24 h selon la procédure de Schneider et al. [183]. Les rendements obtenus sont compris entre 70 et 75 %.
- Gravier et al. [184] décrivent une autre méthode : la synthèse d'un composé similaire le *m*-THPC-S-NHBoc a été effectuée à partir de la chlorine non activée (la *m*-THPC) avec le même bras espaceur en présence d'un agent de couplage, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), et d'une base la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), pendant 24 h à température ambiante. La synthèse des composés **7** et **8** par cette méthode a diminué le rendement de 20 % par rapport à la première et la purification de ces composés a été complexifiée du fait du nombre de co-produits plus importants formés. Cependant, nous avons préféré utiliser cette seconde procédure pour le Pyro-S-NHBoc (**9**) obtenu avec un bon rendement de 52 %, pour éviter trop de perte de produit dû au mauvais rendement d'activation de la Pyro(a)-COOH.

Pour la purification de ces composés (**7-9**) sur colonne de silice, le système de solvants DCM/(EtOH ou MeOH) a été privilégié au système acétone/DCM/hexane précédemment décrit par Schneider et al. [183]. Une bonne séparation des co-produits a pu être observée sans l'utilisation d'hexane.

La déprotection du groupement protecteur Boc à l'aide de l'acide tifluoroacétique (TFA) a permis d'obtenir les photosensibilisateurs (**10-12**) possédant une fonction amine libre (**PS-S-NH_2**).

IV.1.c Couplage avec l'acide folique

Ces PS-S-NH_2 ont été finalement couplés à l'acide folique à l'aide d'un agent de couplage (*N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC) dans un mélange pyridine/DMSO. La réaction est laissée entre 24 et 48 h à température ambiante. Les conjugués PS-S-FA (**13-15**) ont été obtenus après purification sur HPLC phase inverse avec des rendements de 10 à 20 % environ. L'optimisation des rendements du couplage du PS-S-NH_2 avec l'acide folique est en cours : l'utilisation d'autres agents de couplage que le DCC comme le HOBt est à l'étude.

Schneider et al. [183] ont montré qu'il est possible également de faire la synthèse autrement, c'est-à-dire : 1) couplage du bras espaceur avec l'acide folique pour obtenir les composés FA-S-NH_2 puis 2) couplage du PS pour obtenir les conjugués PS-S-FA. Notre équipe a décidé de limiter les réactions avec la molécule d'acide folique du fait du problème de solubilité de cette dernière dans les solvants organiques habituels. Le couplage du bras espaceur sur le PS nous a semblé être un choix plus judicieux.

IV.1.d Comparaison avec un conjugué breveté (Ce6-S-FA)

En 2009, une équipe coréenne a déposé un brevet sur la synthèse d'un nouveau conjugué chlorine e6-acide folique (Figure 104), couplage réalisé *via* le même bras espaceur que dans notre étude. Dans ce brevet, ils décrivent les propriétés photophysiques du nouveau composé et montrent également une meilleure efficacité *in vitro* de ce conjugué pour la PDT par rapport à la chlorine e6 seule (test d'affinité de cytotoxicité et de phototoxicité sur des cellules Hela qui surexpriment les récepteurs à l'acide folique). Des tests *in vivo* sur des rats avec des sarcomes M-1 sont également détaillés et concluent sur le meilleur effet photodynamique du conjugué chlorine e6-acide folique que la chlorine e6 seule [325]. Il est important et nécessaire dans notre étude de comparer les propriétés photophysiques et biologiques de nos différents conjugués PS-acide folique à ce conjugué déjà breveté. Nous avons décidé de synthétiser le conjugué Ce6-S-FA comme deuxième référence. La chlorine e6 (Figure 104) possède trois fonctions carboxyliques ce qui complexifie la synthèse du conjugué avec l'acide folique. La chlorine e6 (Ce6) a été obtenue chez Frontier Scientific. L'activation d'une seule fonction carboxylique de la chlorine e6 a été tout d'abord tentée en ajoutant un seul équivalent de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pour éviter la formation de sous-produits tels que les composés avec deux ou trois fonctions carboxyliques activées. La formation de nombreux composés a été malheureusement observée et les tentatives de purification sur colonne de silice et sur phase inverse C18 en HPLC ont échoué. Il s'est avéré que la synthèse du composé Ce6-S-NHBoc à partir de la chlorine e6 non activée avec un équivalent du bras espaceur en présence d'un agent de couplage (EDC) et d'une base (DMAP), pendant 24 h à température ambiante, aboutit seulement à la formation de deux produits dont l'un en majorité, tous deux correspondants à la masse du composé attendu Ce6-S-NHBoc. Des traces du composé Ce6-(S-NHBoc)$_2$ ont également été détectées. Les deux fractions majoritaires ont été isolées par HPLC phase inverse (colonne C18) utilisant un gradient acétonitrile/eau (10/90 % à 100/0 % en 25 min, 100/0% pendant 15 min, acétonitrile/eau, v/v). Une étude RMN 2D sur ces composés doit être effectuée afin de déterminer sur quelle fonction acide carboxylique le bras espaceur s'est préférentiellement couplé. La déprotection du groupement protecteur Boc de la fraction majoritaire à l'aide de TFA a permis d'obtenir le photosensibilisateur avec une fonction amine libre Ce6-S-NH_2. Enfin, le couplage de ce dernier composé avec l'acide folique a été tenté dans les mêmes conditions que décrites précédemment (DCC dans un mélange pyridine/DMSO pendant 48h à température ambiante) (Figure 104). L'analyse LCMS du brut de cette réaction a montré la formation unique et majoritaire de deux isomères d'un composé de masse inférieure de 176 g/mol par rapport à la masse attendue. Le composé attendu de couplage est formé et subit immédiatement une dégradation au cours de la réaction.

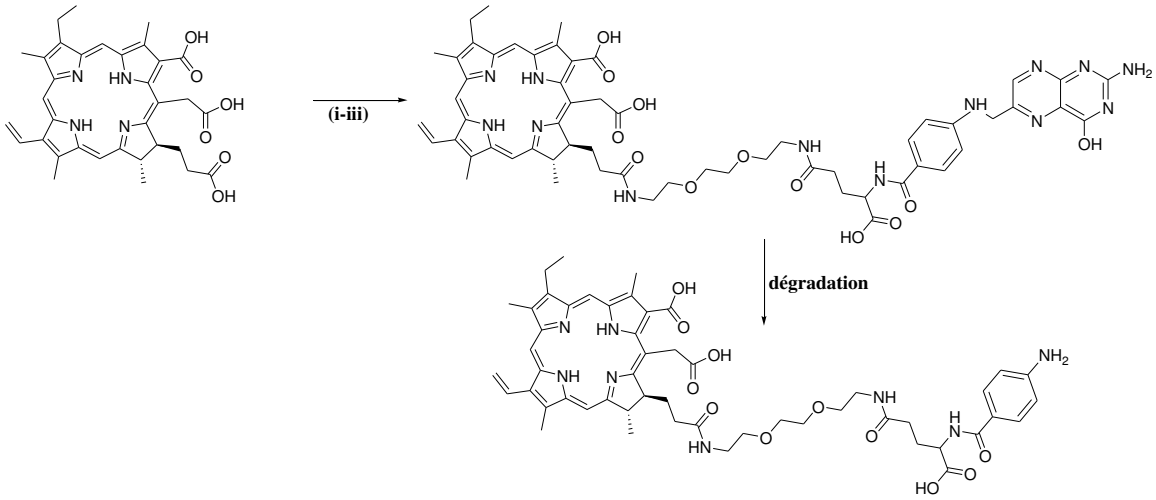


Figure 104. Tentative de synthèse du dérivé Ce6-S-FA. (i) EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (ii) TFA, r.t., 2h. (iii) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h.

IV.1.e Influence du couplage de plusieurs unités d'acide folique

Dans la littérature, aucune publication, à notre connaissance, ne relate le couplage de plusieurs unités d'acide folique sur un même photosensibilisateur possédant plusieurs fonctions carboxyliques. Il est toujours question d'un rapport en unité 1 : 1 = PS : AF. Le couplage de n unités d'acide folique sur un même PS va-t-il avoir un effet sur les propriétés photophysiques du PS ou améliorer l'affinité du conjugué correspondant pour les récepteurs à l'acide folique ? Pour analyser cet effet, nous avons entrepris de synthétiser les deux conjugués suivants afin de comparer leurs propriétés photophysiques et biologiques : (1) PpIX-S-FA et (2) PpIX-(S-FA)$_2$ (Figure 105).

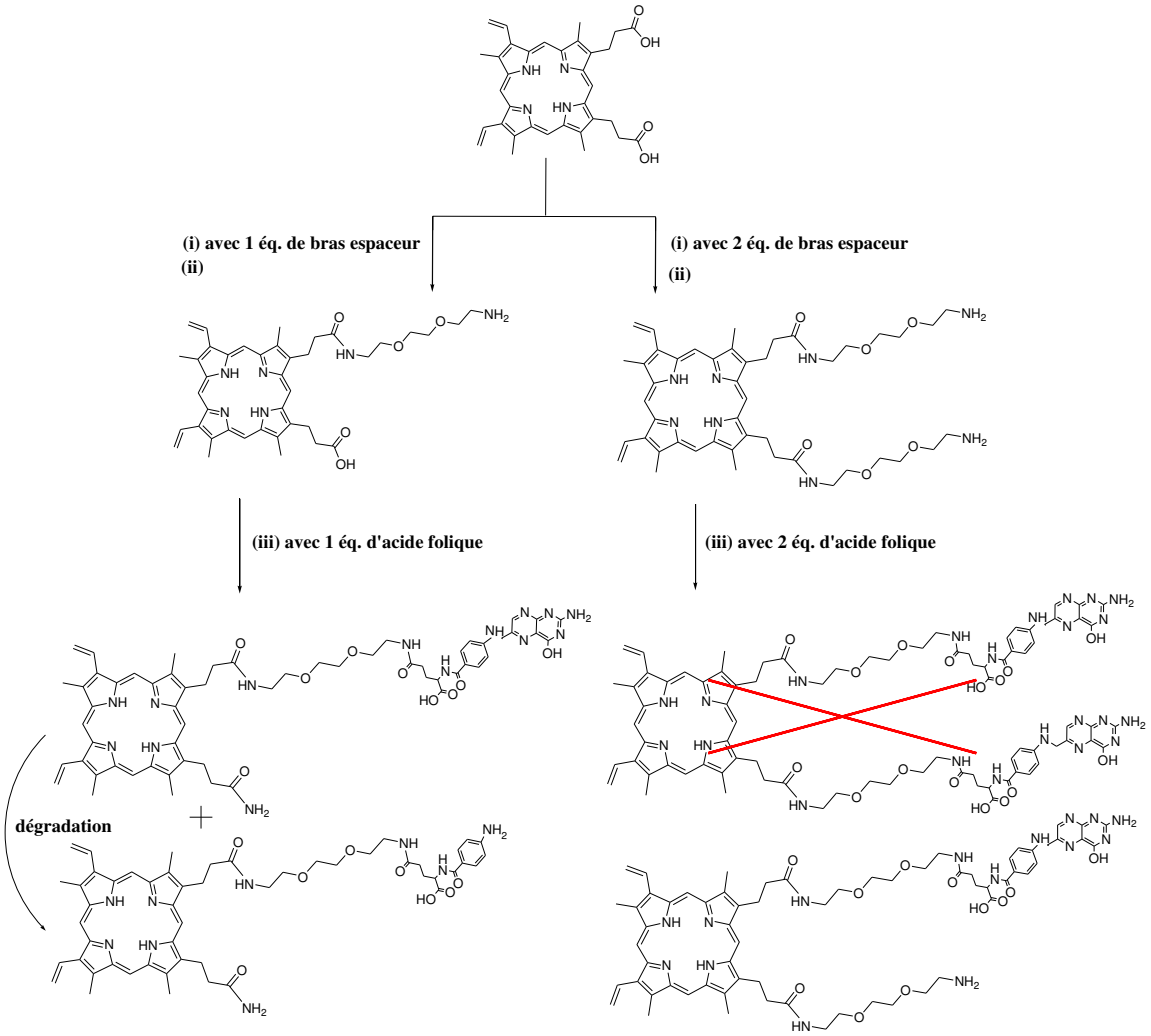


Figure 105. Tentative de synthèse des dérivés PpIX-S-FA et PpIX-(S-FA)$_2$. (i) Bras espaceur (*N*-Boc-2,2´-(éthylènedioxy)diéthylamine), EDC, DMAP, THF, r.t., 24h. (ii) TFA, r.t., 2h. (iii) Acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h.

Nous avons choisi pour cette étude la protoporphyrine IX (PpIX) car elle possède deux fonctions carboxyliques identiques, à la différence de la chlorine e6 (3 fonctions carboxyliques différentes).
Le dérivés PpIX-S-NHBoc et PpIX-(S-NHBoc)$_2$ ont été obtenus avec des rendements respectifs de 83 % et 64 %. Ces synthèses ont été effectuées à partir de PpIX non activée avec respectivement un et deux équivalents de bras espaceur en présence d'un agent de couplage (EDC) et d'une base (DMAP), pendant 24 h à température ambiante (Figure 105). Dans les deux cas, les deux composés sont formés mais le composé attendu est toujours formé en majorité. Les fractions majoritaires ont été isolées par HPLC phase inverse (colonne C18) utilisant un gradient acétonitrile/eau (10/90 % à 100/0 % en 25 min, 100/0 % pendant 15 min, acétonitrile/eau, v/v).
La déprotection du groupement protecteur Boc de la fraction majoritaire à l'aide de TFA a permis d'obtenir les photosensibilisateurs correspondants possédant une fonction amine libre PpIX-S-NH_2 et PpIX-(S-NH_2)$_2$ avec des rendements d'environ 85 %.
Le couplage avec l'acide folique a été tenté dans les mêmes conditions que décrites précédemment (DCC dans un mélange pyridine/DMSO pendant 48h à température ambiante) (Figure 105) en utilisant pour PpIX-S-NH_2 un équivalent d'acide folique et pour PpIX-(S-NH_2)$_2$ deux équivalents d'acide folique.

Les analyses LCMS des mélanges réactionnels montent que :

- dans le premier cas : les isomères de position du composé PpIX-S-FA ont été détectés mais la fraction majoritaire correspond à deux autres isomères d'un composé de masse inférieure

de 176 g/mol par rapport à la masse attendue. Le composé attendu de couplage est formé et subit rapidement une dégradation.

- dans le deuxième cas : le produit attendu PpIX-(S-FA)$_2$ n'a pas été détecté. Cependant, le composé correspondant au couplage d'une seule unité d'acide folique PpIX-(S)$_2$-FA ainsi que son produit de dégradation correspondant (-176 g/mol) ont été trouvés en MS. Le couplage de deux unités d'acide folique sur le même PS semble donc plus difficile à mener que le couplage d'une seule unité d'AF : ceci est peut être dû à l'encombrement stérique engendré par le couplage du premier acide folique sur un des bras espaceur empêchant ainsi la seconde unité d'acide folique d'atteindre le second bras espaceur pour le couplage. Pour obtenir le composé PpIX-(S-FA)$_2$, deux solutions pourraient être envisagées : 1) de placer un excès d'AF et non 2 équivalents seulement lors de la réaction ; 2) de « réengager » le composé PpIX-(S)$_2$-FA dans une réaction de couplage avec une unité d'acide folique. Faute de temps, ces alternatives n'ont pas été testées.

Les derniers résultats obtenus sur les tentatives de synthèse des derniers conjugués à partir de Ce6 et de PpIX mènent à penser qu'une fois coupler à un PS, l'acide folique se dégrade (perte de -176 g/mol) rapidement. L'étude de la dégradation des conjugués PS-acide folique semble nécessaire pour trouver les causes de cette dégradation et ainsi trouver des solutions pour remédier à ce problème.

IV.1.f Influence de la distance entre l'acide folique et le PS

Afin de déterminer l'influence de la distance de l'acide folique au PS sur les propriétés photophysiques du PS, un nouveau conjugué (**16**) a été synthétisé où un PS (la tétraphénylporphyrine) est directement couplé à l'acide folique. Ainsi une comparaison entre les propiétés photophysiques des composés P1-S-FA (**13**) et TPP-FA (**16**) permettra de savoir si la distance entre le PS et l'acide folique a une incidence sur celles-ci.

Le couplage direct de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-(triphényl)porphyrine (TPP-NH$_2$) à l'acide folique a été effectué en présence d'un agent de couplage (*N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC) dans un mélange pyridine/DMSO à température ambiante pendant 48h (Figure 106). Le conjugué TPP-FA (**16**) a été obtenu après purification sur HPLC phase inverse avec un rendement faible de 4 %.

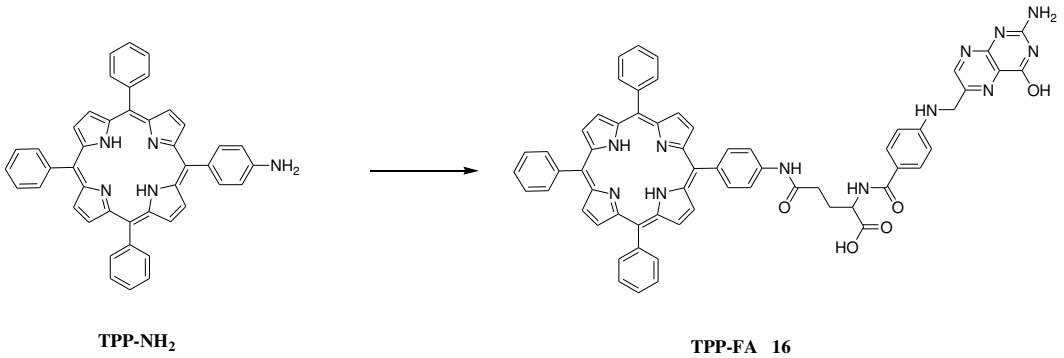


Figure 106. Synthèse du composé TPP-FA (16) : acide folique, DCC, pyridine, DMSO, r.t., 48h.

A l'aide de la même procédure, nous avons également tenté le couplage de l'acide folique avec une porphyrine présentant une meilleure solubilité dans l'eau, grâce à l'ajout de groupements sulfonates, la PSO$_3$H-NH$_2$ (obtenue commercialement chez PorphyChem, Dijon) (Figure 107). Cependant, cette réaction de couplage n'a pas fonctionné. La porphyrine de départ n'a pas été consommée ou même dégradée avec un temps de réaction plus long et une augmentation du nombre d'équivalent d'agent de couplage (DCC). Nous avons pensé que cela pouvait venir du fait que la fonction amine de la PSO$_3$H-NH$_2$ est trop désactivée pour réagir sur un ester activé. Des alternatives seraient envisageables : 1) essayer de coupler la PSO$_3$H-COOH *via* un PEG comme précédemment ou 2) la fonction amine peut être activée par du bromure de bromoacétyle permettant d'acyler l'amine tout en ajoutant un atome de brome nucléofuge [326]. Faute de temps, cette synthèse n'a pas été réalisée.

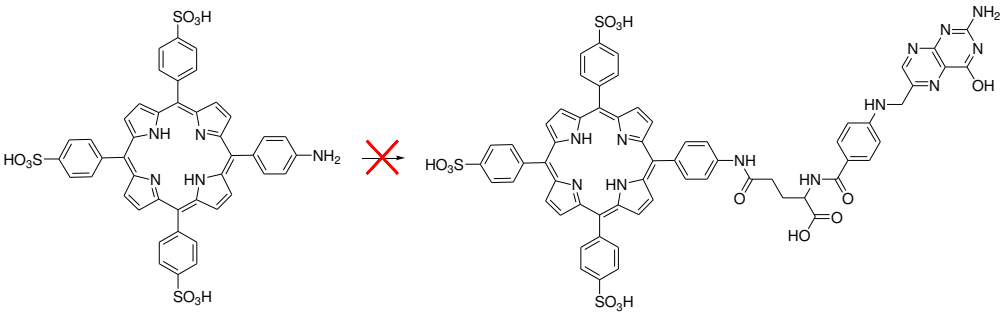


Figure 107. Tentative de synthèse du conjugué PSO3H-FA.

IV.2 Hydrophobie des molécules

La relative hydrophobie des photosensibilisateurs limite leur solubilité dans les milieux biologiques, inconvénient limitant leur utilisation. Dans cette partie, il nous a donc semblé intéressant de savoir si l'hydrophobie des conjugués photosensibilisateurs-acide folique synthétisés augmentait ou diminuait par rapport à celle des PS correspondants.

Le LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. En effet, si le LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement, si le Log P est négatif cela signifie que la molécule considérée est hydrophile. La plus classique et la plus fiable des méthodes de détermination du LogP est la méthode dite du "flacon agité". La méthode classique de détermination du LogP consiste à mélanger une quantité connue de soluté dans un volume connu d'octanol et d'eau, puis de mesurer la distribution du soluté dans chaque solvant. La méthode la plus courante pour mesurer cette distribution est la spectroscopie UV/Visible. Une méthode plus rapide de détermination du LogP utilise la chromatographie liquide haute performance en comparant les temps de rétention de chaque soluté.

Nous avons choisi de comparer les temps de rétention de chaque molécule en HPLC phase inverse (colonne C18) utilisant un gradient acétonitrile/eau (10/90 % à 100/0 % en 25 min, 100/0% pendant 15 min, acétonitrile/eau, v/v). La comparaison des temps de rétention et par conséquent des hydrophobies est décrite Figure 108. Un temps de rétention élevé indique une haute hydrophobie et *vice versa*. Tous les composés couplés à l'acide folique présentent de plus faibles temps de rétention que les photosensibiliteurs seuls. Le couplage avec l'AF augmente le caractère hydrophile des PS.

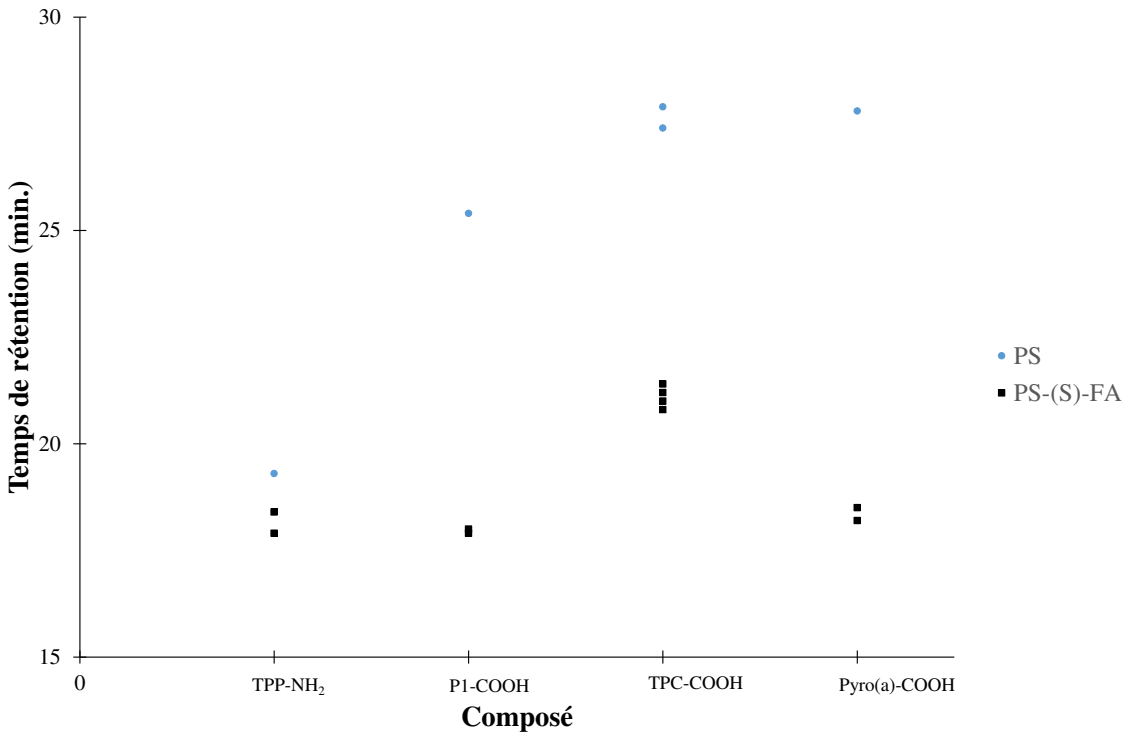


Figure 108. Comparaison des temps de rétention des PS et des dérivés PS-(S)-FA.

Les trois PS avec une fonction carboxylique présentent bien une plus forte hydrophobie que la TPP-NH_2 dû au caractère plus polaire de la fonction amine par rapport à la fonction carboxylique. Il est intéressant également de remarquer que le bras espaceur ne semble pas influencer le caractère hydrophile ou hydrophobe du conjugué : P1-S-FA et TPP-FA ont des temps de rétention égaux. La taille du bras espaceur n'est peut être pas suffisante pour observer une influence comparée à l'influence plus importante engendrée par le couplage avec l'acide folique. La TPC-COOH et la Pyro(a)-COOH ont des temps de rétention très proches (écart d'environ 0,2 min) mais les conjugués correspondants avec l'acide folique ont des temps de rétention assez différents (écart d'environ 3 min). Le couplage avec l'AF augmente de façon plus conséquente le caractère hydrophile dans le cas de la Pyro(a)-COOH que dans le cas de la TPC-COOH. Le phénomène est peut être lié à la structure des conjugués tridimensionnelle. En effet, l'encombrement stérique, dû aux groupements phényl en position méso sur la TPC-COOH, pourrait amoindrir le rapprochement entre le PS et l'acide folique dans l'espace. La solubilité est un facteur clé de la PDT et il conviendrait de retenir les trois composés P1-S-FA, TPP-FA et Pyro-S-FA, plutôt que la TPC-S-FA.

IV.3 Propriétés photophysiques

L'acide folique est un composé peu voire non fluorescent. Cela est principalement dû à la présence de son groupement glutamyle qui joue le rôle de *quencher* interne [327, 328]. Cependant, le groupement ptérine de l'acide folique est libéré et transformé sous l'action des UV. Les dérivés ptériniques obtenus après photolyse sont eux fortement fluorescents contrairement à l'acide folique [327, 329]. Une étude photophysique sur les différents conjugués photosensibilisateur-acide folique a été réalisée afin d'évaluer un éventuel effet de *quenching* par l'acide folique des caractéristiques photophysiques du PS, primordiales pour l'application en PDT. Les valeurs sont reportées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Résumé des propriétés photophysiques des différents conjugués dans l'éthanol. $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (pour émission de fluorescence et production d'oxygène singulet) et $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (pour les durées de vie correspondantes).

Composé	$\varepsilon_{bande\ de\ soret}$ (L.mol^{-1}.cm^{-1})	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} (L.mol^{-1}.cm^{-1})	ϕ_F (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
P1-COOH (1)	348 096	643	4 164	0,10	0,53	9,8	15
P1-S-NHBoc (7)	328 952	643	3 648	0,09	0,51	9,8	15
P1-S-FA (13)	225 102	642	2 245	0,11	0,53	9,7	16
TPC-COOH (2)	182 857	650	42 448	0,22	0,69	9,2	17
TPC-S-NHBoc (8)	192 731	650	42 951	0,25	0,69	9,0	17
TPC-S-FA (14)	111 836	650	26 122	0,26	0,66	9,3	17
Pyro(a)-COOH (3)	76 326	668	33 265	0,34	0,52	6,7	13
Pyro-S-NHBoc (9)	82 557	668	37 964	0,33	0,52	6,8	12
Pyro-S-FA (15)	74 081	668	35 306	0,30	0,54	6,4	13
TPP-NH_2	316 735	647	4 489	0,13	0,55	8,5	16
TPP-FA (16)	152 245	643	3 265	0,12	0,58	9,9	15

ε : coefficient d'extinction molaire ; Q : bande Q ; ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

Pour plus de détails, des précisions sur les appareils, les conditions des mesures photophysiques et les formules utilisées pour les calculs de rendement quantique sont fournies en partie expérimentale.

Le couplage de l'acide folique est confirmé par l'apparition sur les spectres UV-visible des différents conjugués PS-(S)-FA d'une bande d'absorption plus intense à 285 nm, longueur d'onde à laquelle l'acide folique seul absorbe (encadrés Figure 109).
Comme attendue, la bande Q_I est beaucoup plus intense pour les chlorines et les pyrophéophorbides a que pour les porphyrines. L'intensité et la position des bandes Q dépendent en effet de la structure/symétrie du macrocycle (modèle de Gouterman [66, 67], vu précédemment dans le chapitre I). Par conséquent, l'interruption de la conjugaison pour les chlorines et la présence d'un cycle pentanoïque sur une unité pyrrole pour les pyrophéophorbides a sont à l'origine de ces modifications de spectres d'absorption : les composés chlorines et pyrophéophorbides a, obtenus ici, sont moins symétriques que les porphyrines étudiées. L'interruption de la conjugaison pour les chlorines engendrent même une assez forte asymétrie telle que les bandes B_x et B_y (ou bande de Soret) ne sont plus confondues.
D'après les calculs des coefficients d'extinction molaire (ε), le couplage de l'acide folique avec la P1-COOH ou la TPP-NH_2 a un effet inhibant sur l'intensité des bandes de Soret des PS, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres photosensibilisateurs étudiés. Pour la TPC-COOH, une inhibition significative de l'absorption de la bande Q_I est observée après couplage avec l'acide folique.

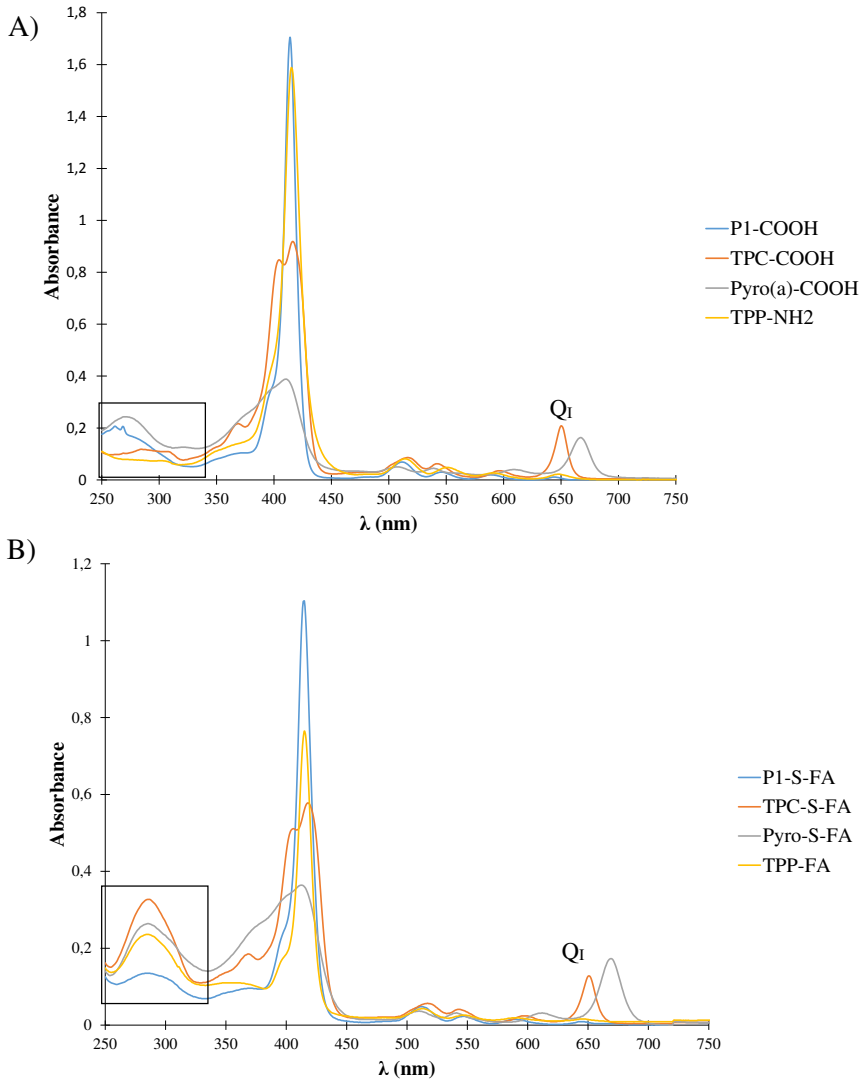


Figure 109. Spectres UV-Visible des PS (A) et des conjugués PS-(S)-FA (B) dans l'éthanol (C = 4,90 x 10^{-6} mol/L).

Tous les spectres d'émission de fluorescence des composés dans l'éthanol (EtOH) sont obtenus après excitation à 414 nm (A_{414} = 0,2). L'excitation des bandes de Soret se traduit par deux bandes d'émission $^1PS_1 \rightarrow {}^1PS_0$ centrées à (Figure 110) :

- 650 nm ($^1PS_1(Q_I) \rightarrow {}^1PS_0$) pour le pic le plus intense et à 720 nm ($^1PS_1(Q_{II}) \rightarrow {}^1PS_0$) pour les composés P1-S-FA, TPP-FA et TPC-S-FA. Une augmentation de la première bande d'émission et une diminution de la seconde bande d'émission dans le cas de la TPC-S-FA sont observées. Ce qui est en accord avec les spectres d'absorption correspondants : A_{QII} (TPC-COOH) > A_{QII} (P1-COOH ou TPP-NH_2) pour une même absorption à 414 nm égale à 0,2.

- 674 nm pour le pic le plus intense et à 720 nm pour le conjugué Pyro-S-FA.

Les valeurs obtenues pour les rendements quantiques de fluorescence des différentes PS sont proches de celles reportées dans la littérature : 0,14 (P1-COOH dans EtOH) et 0,23 (TPC-COOH dans EtOH) [46]. Le rendement quantique de fluorescence pour la Pyro(a)-COOH est plus faible (0,30) dans l'EtOH que celui reporté dans le méthanol (MeOH) de 0,49 [330] mais comparable au rendement quantique de fluorescence de la phéophorbide a (composé similaire avec en plus –$COOCH_3$ sur le cyclopenténone) dans l'EtOH égal à 0,28 [331].

Les composés Pyro-S-FA et TPC-S-FA présentent les plus hauts rendements quantiques de fluorescence et semblent être les plus intéressants pour des applications en diagnostique.

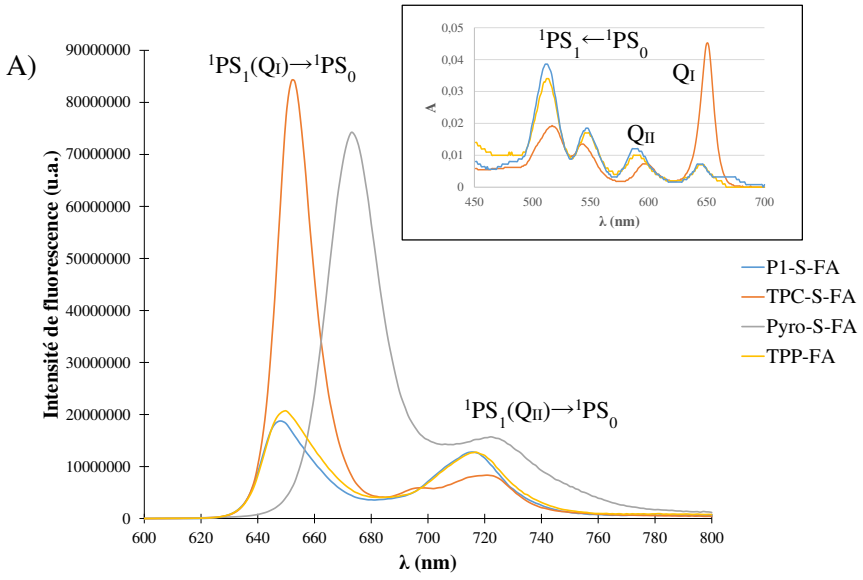


Figure 110. Spectres d'émission de fluorescence des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (A_{414nm} = 0,2).

La formation d'oxygène singulet est détectée à partir de sa luminescence dans le proche infrarouge, dont le maximum se situe à 1270 nm, après excitation du PS à 414 nm. Les spectres possèdent une allure de gaussienne centrée vers le maximum d'émission à 1270 nm (Figure 111).

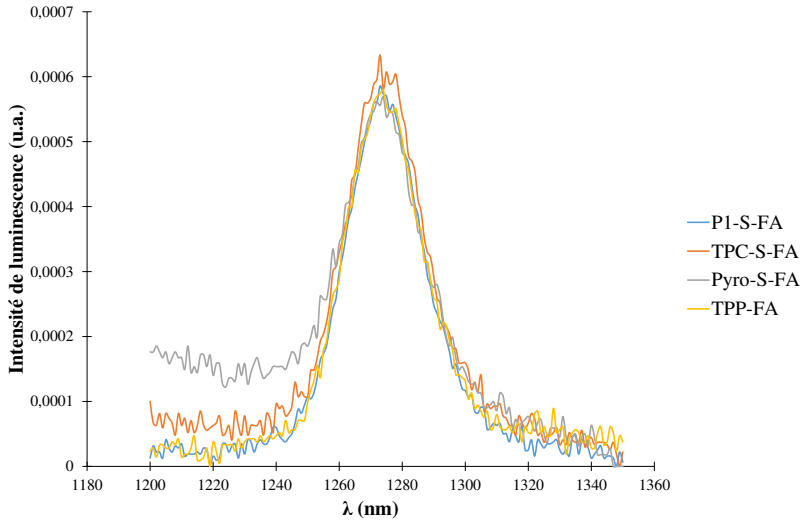


Figure 111. Spectres de production d'oxygène singulet (B) des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 414 nm (A_{414nm} = 0,2).

Les valeurs obtenues pour les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des différentes PS sont proches de celles reportées dans la littérature : 0,50 (P1-COOH dans EtOH) [332], 0,70 (TPC-COOH dans EtOH) [46] et 0,52-0,53 (Phéophorbide a et Pyro(a)-COOH dans EtOH [333, 334] ou MeOH [331]).
La TPC-S-FA présente le rendement quantique de production d'oxygène singulet dans l'éthanol le plus élevé (0,66) par rapport à ceux des trois autres composés (du même ordre de grandeur : 0,50-0,55). Ces valeurs indiquent que ces composés sont parfaitement adaptés à des applications en PDT en raison de leur rendement de production d'oxygène singulet élevé.

Les temps de vie de fluorescence sont mesurés 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. Les déclins des quatre composés étudiés sont montrés Figure 112 ; le déclin est monoexponentiel. Les résultats sont comparables à ceux des PS seuls. Les valeurs avoisinent 9 - 10 ns pour tous les composés, valeurs proches de celles de la littérature [332], sauf pour les composés contenant la pyrophéophorbide a qui présentent un déclin plus faible proche des 6 - 7 ns, également proches de celles de la littérature pour la phéophorbide a, la Pyro(a)-COOH et leurs dérivés comprises entre 5,6 et 6,5 ns dans le MeOH ou dans l'EtOH [330, 331, 333, 334].

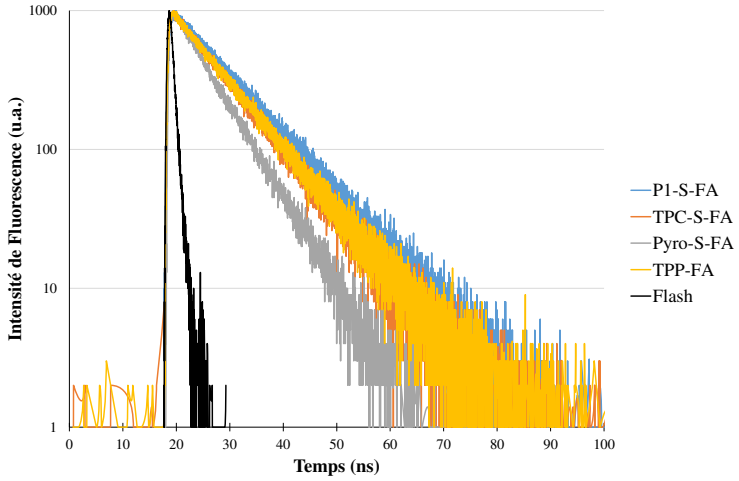


Figure 112. Durées de vie de fluorescence des conjugués PS-(S)-FA dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (A_{408nm} = 0,2).

Les temps de vie de production d'oxygène singulet sont mesurés par un spectromètre TEMPRO-01, utilisant une diode pulsée à 415 nm pour l'excitation. Les déclins des quatre composés étudiés sont montrés Figure 113. Le déclin est monoexponentiel pour tous les composés sauf les composés à partir de pyrophéophorbide a. Le déclin est biexponentiel. Le premier déclin n'a pu être déterminé car trop rapide pour la sensibilité de l'appareil (indiqué par une flèche sur la Figure 113). Des études sont toujours en cours pour mieux comprendre ce phénomène. Les valeurs avoisinent 16 µs pour tous les composés sauf pour les composés contenant de la pyrophéophorbide a qui présentent un second déclin plus faible proche de 13 µs, valeur comparable à celle trouvée dans la littérature (10 µs dans le MeOH [330]).

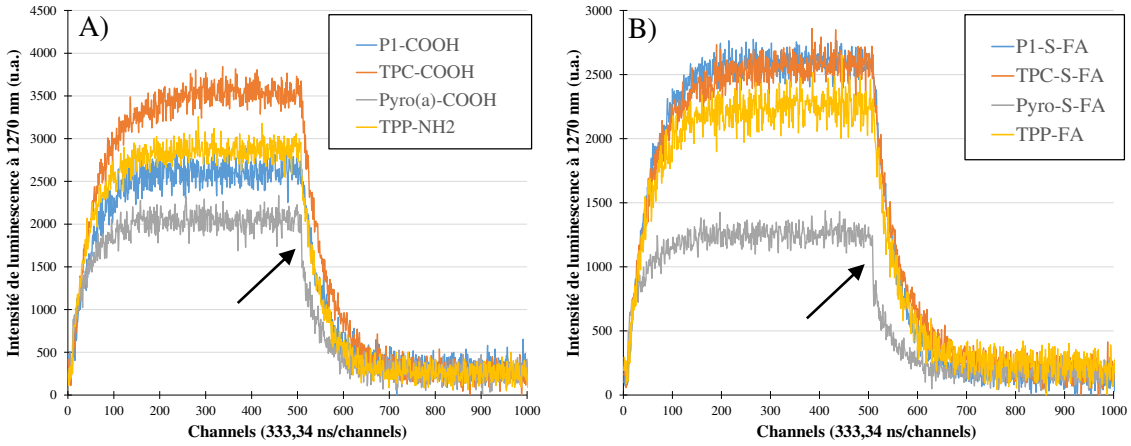


Figure 113. Durées de vie de production d'oxygène singulet des PS (A) et des conjugués PS-(S)-FA (B) dans EtOH, $\lambda_{exc.}$ = 415 nm (A_{415nm} = 0,2).

IV.4 Dégradation des composés PS-(S)-FA

Le problème récurrent de toutes ces molécules synthétisées est leur instabilité. En effet, nous avons observé que tous les conjugués photosensibilisateur-acide folique se dégradent, plus ou moins rapidement : dans chaque cas, une coupure s'effectue pour libérer le résidu ptérine de l'acide folique (Figure 114).

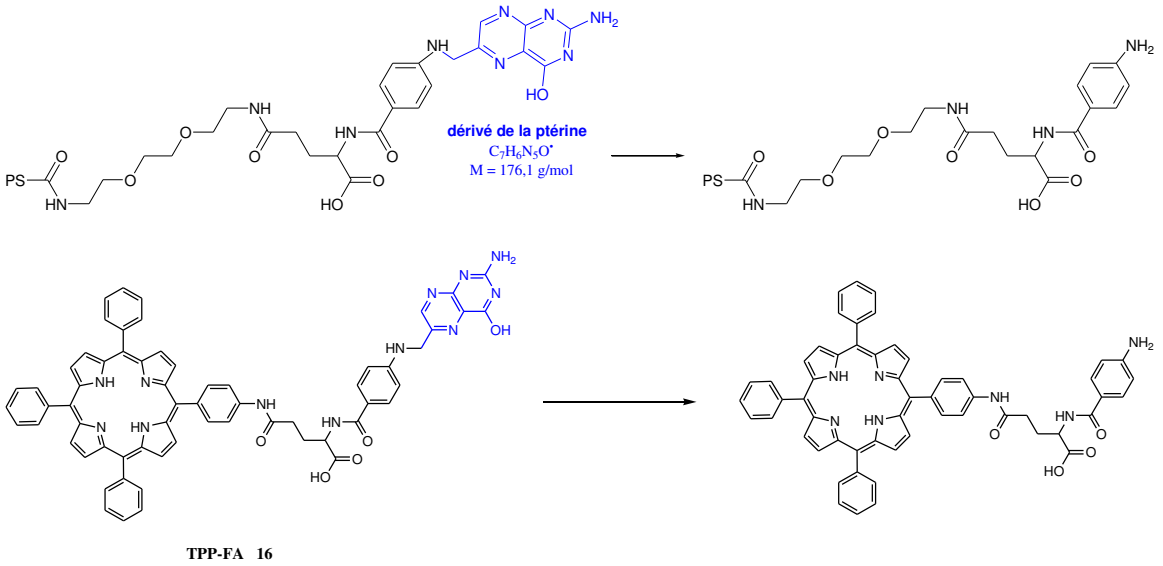


Figure 114. Réaction de dégradation des conjugués PS-S-FA et de la TPP-FA.

Récemment, des analyses structurelles et mutationnelles ont montré que le résidu ptérine était nécessaire pour l'insertion de l'acide folique dans la poche de fixation du récepteur. Il permet de faciliter la disponibilité du groupe glutamate pour la conjugaison avec d'autres molécules, sans affecter défavorablement les interactions entre le ligand et le récepteur [335]. Comprendre et remédier au mieux à la dégradation de ces molécules semblent donc être nécessaire pour l'élaboration de nouveaux PS ciblant les récepteurs à l'acide folique. Il a été également rapporté que l'acide folique serait sensible à la lumière du soleil, la lumière visible et les UV ainsi qu'à la chaleur et au pH [336, 337].

Différents facteurs peuvent être à l'origine de la dégradation des différents conjugués PS-(S)-FA. La température, la lumière, la présence d'oxygène, le temps de stockage et la nature du solvant semblent être les principales causes de cette dégradation. Un plan d'expériences (Tableau 8) a été élaboré par Thierry Bastogne (CRAN, UMR 7039) pour permettre de déterminer les facteurs déterminant et les influences de chacun des facteurs provoquant cette dégradation. L'utilité d'élaborer un plan d'expérience pour cette étude prend toute sa mesure lorsque l'on compare les 78 expériences (26 expériencces répétées 3 fois) issus de celui-ci aux 2304 expériences (768 expériencces répétées 3 fois) qu'il aurait fallu réaliser si cette stratégie n'avait pas été mise en place. Les expériences sont en cours.

Tableau 8. Plan d'expériences pour l'étude de la dégradation du conjugué Pyro-S-FA.

N°Exp	Lumière	Oxygène	Molécule	Temps	Température	Solvant
1	obscurité	sans	AF	1 h	Tamb (20-25°C)	DMSO
2	obscurité	avec	Pyro-S-FA	1 semaine	Frigo (4°C)	DMSO
3	obscurité	sans	Pyro-S-FA	24 h	Congel (-20°C)	DMSO
4	lumière	avec	AF	15 min	Etuve (40°C)	DMSO
5	lumière	sans	AF	15 min	Tamb	ACN
6	obscurité	avec	AF	24 h	4°C	ACN
7	obscurité	avec	Pyro-S-FA	1 semaine	-20°C	ACN
8	obscurité	sans	Pyro-S-FA	1 h	40°C	ACN
9	obscurité	avec	AF	24 h	Tamb	H_2O-pH4
10	lumière	sans	Pyro-S-FA	1 semaine	Tamb	H_2O-pH4
11	obscurité	avec	AF	1 h	4°C	H_2O-pH4
12	obscurité	sans	AF	1 h	-20°C	H_2O-pH4
13	obscurité	sans	Pyro-S-FA	15 min	40°C	H_2O-pH4
14	lumière	sans	AF	24 h	Tamb	H_2O-pH7
15	obscurité	avec	AF	1 semaine	Tamb	H_2O-pH7
16	obscurité	sans	Pyro-S-FA	24 h	4°C	H_2O-pH7
17	obscurité	avec	AF	15 min	-20°C	H_2O-pH7
18	lumière	avec	Pyro-S-FA	1 h	40°C	H_2O-pH7
19	obscurité	avec	Pyro-S-FA	15 min	Tamb	H_2O-pH9
20	obscurité	sans	Pyro-S-FA	1 h	4°C	H_2O-pH9
21	obscurité	sans	AF	1 semaine	-20°C	H_2O-pH9
22	lumière	avec	AF	24 h	40°C	H_2O-pH9
23	lumière	avec	Pyro-S-FA	1 h	Tamb	Poudre
24	obscurité	sans	AF	15 min	4°C	Poudre
25	obscurité	avec	Pyro-S-FA	24 h	-20°C	Poudre
26	obscurité	sans	AF	1 semaine	40°C	Poudre

Répétition 3 fois des expériences = 78 expériences.

V CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette partie, différents photosensibilisateurs couplés directement à l'acide folique ou *via* un bras espaceur ont été synthétisés, caractérisés et leurs propriétés photophysiques étudiées.

Les propriétés photophysiques des différents PS restent les mêmes après couplage avec l'acide folique. Ces mesures permettent de vérifier que la partie photoactivable des nouveaux conjugués conserve ses propriétés phototoxiques pour une éventuelle utilisation de ces conjugués en thérapie photodynamique.

Cependant, même si le couplage de l'acide folique avec un photosensibilisateur est possible dans tous les cas, une dégradation plus ou moins importante des conjugués a été constatée. Ne connaissant pas l'origine exacte de cette dégradation, notre équipe a décidé de réaliser un plan d'expériences pour déterminer les facteurs (température, $^1O_2$, solvants, irradiation par la lumière…) provoquant cette dégradation.

Une fois cette étude menée, il devrait être possible de trouver de meilleures conditions de couplage de l'acide folique avec un PS enrayant la dégradation du conjugué. Les conjugués PpIX-S-FA, PpIX-(S-FA)$_2$ et Ce6-S-FA pourront alors être isolés. Une étude photophysique comparative des composés PpIX-S-FA et PpIX-(S-FA)$_2$ devra être effectuée suivie d'une étude d'affinité de ces composés pour les récepteurs à l'acide folique et ainsi connaître l'influence du couplage d'un PS avec plusieurs unités d'acide folique.

La sélectivité des différents conjugués et des composés dégradés sera évaluée sur des cellules de carcinome exprimant le récepteur à l'acide folique (cellules KB) en compétition avec l'acide folique seul par le suivi de fluorescence des photosensibilisateurs par spectrofluorométrie (M200, TECAN). Cette approche de spectrofluorométrie permettra notamment de faire un suivi de la cinétique d'incorporation des composés *in vitro*. Par la suite, l'efficacité *in vitro* des composés pour la PDT sera également évaluée par mesure de la viabilité cellulaire (Xcelligence, Roche) après exposition à la lumière. Afin de vérifier la localisation cellulaire des différents composés, nous envisagons une approche par imagerie de fluorescence. Cette technique de choix nous permettra, grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques d'organites cellulaires comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries ou les lysosomes de connaître la localisation des composés PS-FA au niveau cellulaire (Cédric Boura, CRAN, UMR7039).

Le meilleur candidat en termes de 1) facilité de synthèse et de purification 2) solubilité, 3) cytotoxicité, 4) phototoxicité et 5) stabilité sera testé *in vivo* (Henri Azaïs, INSERM U1189).

CHAPITRE 4

INTERET DE CIBLER NRP-1 POUR AMELIORER LE TRAITEMENT DU MEDULLOBLASTOME : EVALUATION D'UN NOUVEAU COMPOSE PEPTIDIQUE CONJUGUE A UNE PORPHYRINE

<u>Collaborateurs :</u>

Cédric BOURA (MdC)

Muriel BARBERI-HEYOB (Pr)

Julie VALDUGA (MS)

I LES TUMEURS INTRACRANIENNES

I.1 Le système nerveux

Le système nerveux est composé de deux parties : le système nerveux central et le système nerveux périphérique.

- **Le système nerveux central (SNC)** regroupe l'encéphale et la moelle épinière. Cette dernière transmet l'information entre le cerveau et le reste de l'organisme. L'encéphale correspond à la partie du SNC contenue dans la boîte crânienne (cerveau, tronc cérébral et cervelet) (Figure 115).
- **Le système nerveux périphérique** regroupe les nerfs et les ganglions nerveux qui assurent la transmission des messages entre la moelle épinière et les organes périphériques (bras, jambes, organes…).

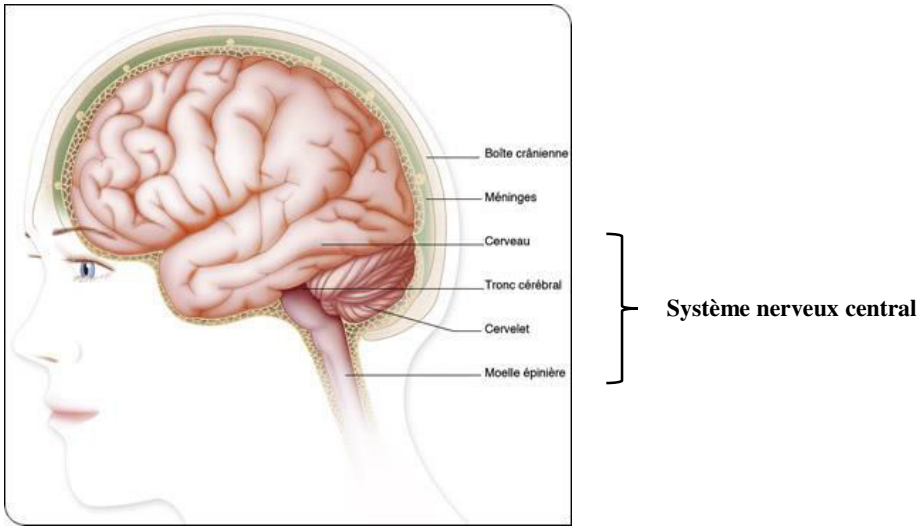


Figure 115. Schéma explicatif des différentes parties constitutives du système nerveux central (SCN) adapté de la référence [338].

Les éléments cellulaires du SNC sont : les neurones (cellules spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations) et les cellules gliales (parfois névroglie ou tout simplement glie, du grec gloïos, « la colle ») qui forment l'environnement des neurones. La macroglie comprend les **astrocytes**, les **oligodendrocytes** et les cellules **épendymères**. La microglie est composée de cellules microgliales qui appartiennent au groupe des macrophages résidents et qui assurent des fonctions immunitaires [6]. Les **cellules gliales** constituent le tissu de soutien du système nerveux assurant le lien avec les vaisseaux sanguins et apportant les nutriments essentiels à son fonctionnement métabolique.

Les tumeurs intracrâniennes regroupent toutes les tumeurs bénignes ou malignes qui se trouvent dans la boîte crânienne et qui se développent aux dépens du cerveau ou des structures anatomiques voisines : méninges, nerfs crâniens, hypophyse...
Il existe un grand nombre de tumeurs du cerveau. Selon leur localisation, leur taille et leur agressivité, c'est-à-dire la vitesse à laquelle elles se développent, ces tumeurs n'entraînent pas les mêmes symptômes et n'ont pas la même gravité.

I.2 Epidémiologie

Dans le monde, environ 238 000 nouveaux cas de cancer du cerveau ou autres tumeurs du système nerveux central sont diagnostiqués chaque année [339].

Le taux de mortalité annuel moyen aux États-Unis entre 2007 et 2011 est de 4,26 pour 100 000 avec 69 789 décès attribués à des tumeurs du système nerveux central [340].

En Europe, le taux d'incidence des tumeurs malignes du système nerveux central a augmenté régulièrement de 1 % par an sur la période 1980-2005 [341].

Il est important de séparer les tumeurs dites primitives et les métastases :

- les tumeurs primitives (à partir d'un tissu présent dans le crâne). Les tumeurs du système nerveux central sont les plus fréquentes des tumeurs solides de l'enfant, deuxième cancer (20 %) derrière les leucémies (30 %). L'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives de l'adulte est de 10 pour 100 000 habitants par an (6 000 nouveaux cas par an en France).

- Les métastases cérébrales sont beaucoup plus fréquentes que les tumeurs primitives intracrâniennes. Leur incidence est sous-évaluée car restant souvent asymptomatiques du vivant des patients. Les études autopsiques suggèrent qu'elles compliquent l'évolution de 20 % des cancers. En dehors des cancers du poumon, où les métastases cérébrales peuvent être révélatrices du cancer dans 20 % des cas, celles-ci surviennent tardivement dans l'histoire naturelle du cancer et trois quarts des patients ont déjà des métastases dans d'autres localisations [342].

La classification utilisée pour les tumeurs primitives est celle de l'OMS, qui distingue les tumeurs en fonction de leur cellule d'origine et de leur grade de malignité (Tableau 9).

Tableau 9. Classification de l'OMS des tumeurs cérébrales primitives.

Gliomes	**Tumeurs astrocytaires :** - astrocytome pilocytique (grade I) - astrocytome diffus (grade II) - astrocytome anaplasique (grade III) **- glioblastome (grade IV)** Tumeurs oligodendrogliales : - oligodendrogliome (grade II) - oligodendrogliome anaplasique (grade III) Gliomes mixtes : - oligo-astrocytome (grade II) - oligo-astrocytome anaplasique (grade III)
Autres tumeurs	Tumeurs épendymaires : épendymome Tumeurs neuronale et glioneuronales : - gangliogliome - tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique (DNET) Tumeurs pinéales : germinome **Tumeurs embryonnaires : médulloblastome** ou tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET)
Tumeurs méningées primitives	Méningiome
Lymphome primitif du système nerveux central	
Tumeurs de la région sellaire	Adénome et carcinome hypophysaire Craniopharyngiome

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux types de tumeurs primitives du système nerveux central :
- le **médulloblastome**, une tumeur maligne du cervelet survenant le plus souvent chez l'enfant (décrit dans ce chapitre) ;
et - le **glioblastome multiforme** (GBM), correspondant à un cancer du cerveau (décrit dans le chapitre 5).

II LE MEDULLOBLASTOME

II.1 Définition et origine

Le médulloblastome est une tumeur embryonnaire maligne du cervelet survenant le plus souvent chez l'enfant. Étant une tumeur de grade IV, à même titre que plusieurs autres tumeurs cérébrales, elle est hautement agressive et invasive. De plus, en raison de sa proximité au liquide cérébro-spinal, la fréquence d'apparition de métastases à d'autres sites du système nerveux central est élevée [343]. L'imagerie par résonance magnétique permet de préciser la localisation de la tumeur (Figure 116) ; la visualisation de la tumeur est classiquement rehaussée le plus souvent de façon homogène par l'injection de produit de contraste paramagnétique.

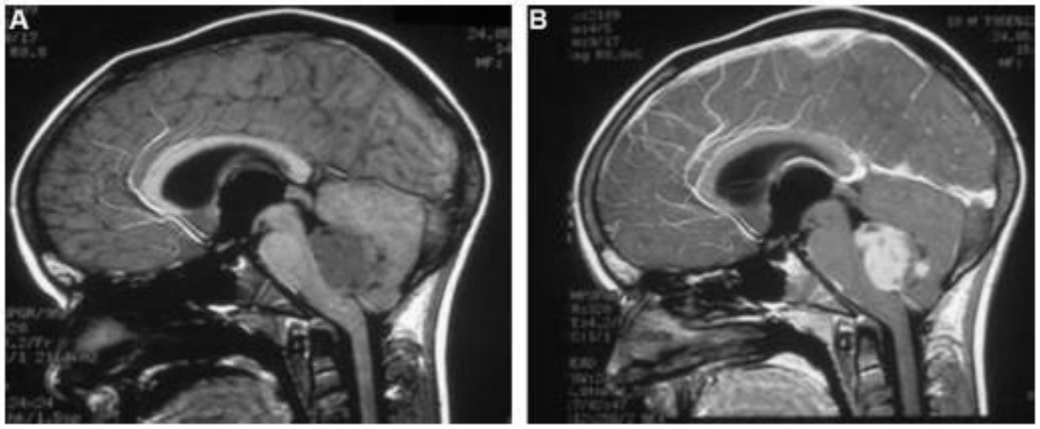


Figure 116. Coupe sagittale. A : IRM pondération T1 sans injection, localisation médiane. B : IRM pondération T1 avec injection, localisation médiane [344].

II.2 Epidémiologie

Le médulloblastome peut survenir à tous les âges (fœtus - 88 ans), mais 75 % des tumeurs sont diagnostiquées chez l'enfant avec un âge médian de six ans [345].

Près de 80 % des cas adultes sont diagnostiqués entre 20 et 40 ans avec un âge médian à 25 ans. Cette maladie est plus fréquente dans le genre masculin (sex-ratio 1,5/1). Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge des enfants atteints de médulloblastome, la survie à 10 ans est de l'ordre de 50 % [346].

L'incidence pédiatrique est d'un peu moins de deux cas pour 100 000 enfants ce qui correspond à environ 150 nouveaux cas par an en France [347]. Chez l'adulte, le nombre estimé de cas incidents est de 0,05 à 0,1/100 000 soit environ 1 % de l'ensemble des tumeurs diagnostiquées [348].

II.3 Cellules souches cancéreuses dans le médulloblastome

L'OMS a publié récemment une classification des tumeurs du système nerveux central, incluant les 5 types histologiques de médulloblastome suivants [349] :

- médulloblastome classique (environ 70%) ;
- médulloblastome desmoplasique/nodulaire, de meilleur pronostic (environ 15%) ;
- médulloblastome à nodularité extensive ;
- médulloblastome anaplasique ;
- médulloblastome à grandes cellules.

Les médulloblastomes sont des tumeurs malignes présentant une certaine hétérogénéité clinique, morphologique et moléculaire, et ces différences ont pu être rapportées à la présence des cellules souches de médulloblastome. Certaines études ont mis en évidence le lien entre ces cellules souches et le développement cérébelleux, la structure histologique et le sous-type moléculaire des médulloblastomes [350].

Ce sont les cellules souches cancéreuses, également appelées cellules initiatrices de tumeur, qui sont impliquées dans les phénomènes de radiorésistance et de rechute, en raison, entre autres, de leurs propriétés de résistance accrue et de quiescence. Elles utilisent des voies de signalisation particulières, comme la voie Wingless (WNT) ou la voie Sonic Hedgehog (SHH), ce qui permet d'envisager l'utilisation de nouvelles thérapeutiques ciblées.

Leur proportion au sein des tumeurs est variable selon le type tumoral, et elles constituent une cible thérapeutique privilégiée. Cependant, ces cellules restent difficiles à isoler dans les tumeurs solides, en raison de l'absence de marqueurs spécifiques du caractère souche de ces cellules (variabilité selon la localisation et le type histologique de tumeur).

L'étude de ces cellules, afin de déterminer, dans un premier temps, des marqueurs spécifiques des cellules souches cancéreuses en fonction du type tumoral considéré, pourrait alors constituer une approche intéressante dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. Dans un second temps, le ciblage de ces cellules, impliquées dans les phénomènes de radiorésistance et de récidive, pourrait permettre d'améliorer la prise en charge thérapeutique, et donc le pronostic vital des patients, tout en limitant les effets secondaires liés aux traitements, responsables d'une morbidité importante.

Le type de médulloblastome, combiné à l'âge et au statut métastatique, permet de classer les patients en groupes à risque, avec des pronostics différents. Plusieurs études ont ainsi rapporté la possibilité d'une classification fondée sur le risque moléculaire. Par exemple, Northcott et al. [351] ont montré, par l'analyse des profils d'expression des différents gènes, que les médulloblastomes pouvaient être subdivisés en 4 sous-groupes aux caractéristiques démographiques, histologiques, cliniques et génomiques distinctes :

- avec activation de WNT, dans environ 10% des cas ;
- avec activation de la voie SHH, dans environ 30 % des cas ;
- groupe 3 (amplification du proto-oncogène Myc), dans environ 25% des cas ;
- groupe 4 (voie de signalisation neuronale), dans environ 35% des cas.

Ces sous-types moléculaires correspondent à des caractéristiques cliniques et pourraient, à terme, bénéficier de thérapies ciblées.

II.4 Traitements

Le traitement des médulloblastomes dépend des facteurs suivants :

- taille et emplacement de la tumeur ;
- propagation du cancer ;
- et âge.

Le traitement conventionnel de ce type de cancer consiste premièrement en la résection **chirurgicale** de la masse tumorale, si cela est possible, puis en un traitement intensif de **radiothérapie**.

La **radiothérapie** consiste à utiliser les radiations à haute énergie des rayons X, rayons gamma, neutrons, protons et autres sources pour détruire les cellules cancéreuses et pour faire diminuer la taille d'une tumeur. Les radiations peuvent venir d'un appareil à l'extérieur du corps (radiothérapie externe) ou peuvent provenir de matériel radioactif placé à l'intérieur du corps près de la tumeur

(curiethérapie). La radiothérapie systémique utilise des substances radioactives telles que des anticorps monoclonaux marqués avec des éléments radioactifs injectés par voie sanguine.

La **chimiothérapie** occupe aussi une place de plus en plus prépondérante depuis les 10 dernières années, démontrant des signes encourageants de guérison même chez certains cas de tumeurs malignes métastasées. Les molécules administrées sous forme de comprimés ou par des injections, permettent de ralentir et parfois même d'arrêter la progression des tumeurs ainsi que leur propagation vers d'autres parties du corps (métastase). La chimiothérapie est un traitement puissant non sélectif qui affecte tout le corps, et par conséquent les cellules normales. Les dommages causés aux cellules normales sont responsables d'effets secondaires. L'un des médicaments phares de ces dernières percées médicales est le **Vismodegib** (ou Erivedge®) (Figure 117). Le vismodegib est un agent antinéoplasique inhibiteur de la voie Hedgehog, administré par voie orale. Le mécanisme de signalisation de la voie Hedgehog, à travers la protéine transmembranaire SMO, entraîne l'activation des facteurs de transcription GLI (*Glioma Associated Oncogene*) qui migrent dans le noyau et induisent la transcription des gènes cibles de Hedgehog. La plupart de ces gènes sont impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Le vismodegib se lie à la protéine SMO et l'inhibe, bloquant ainsi la transduction du signal Hedgehog [352, 353].

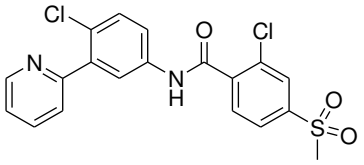


Figure 117. Structure chimique du Vismodegib [352].

Le **témozolomide**, un agent alkylant, a fait ces dernières années l'objet de plusieurs essais cliniques de phase II, seul et en association avec d'autres agents de chimiothérapie. Ces études ont montré des résultats encourageants concernant l'utilisation des agents alkylants dans le traitement des médulloblastomes [354]. D'autres essais cliniques portent sur l'utilisation d'inhibiteurs de topoisomérase (Irinotécan et Etoposide) ou encore de composés interférant avec la polymérisation des microtubules (Docetaxel, Vinorelbine et paclitaxel) [355].

Il existe un risque important de séquelles à long terme, dues au développement du médulloblastome mais aussi aux conséquences des traitements, notamment la radiothérapie. Les principales séquelles sont de type endocriniens (retard de croissance) et cognitifs (retard de développement, troubles de l'apprentissage,…). Elles sont d'autant plus importantes si le traitement est débuté à un âge jeune et en cas de complications liées à l'intervention chirurgicale [356]. Il apparaît donc important de trouver des traitements plus sélectifs vis-à-vis des cellules tumorales et entraînant moins d'effets secondaires (ou délétères) chez ces jeunes patients.

La **thérapie photodynamique** pourrait être envisagée comme traitement contre les tumeurs cérébrales en particulier dans le cas des médulloblastomes. Il a déjà été montré que l'administration d'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et de son ester héxylique suivi d'une irradiation d'une lignée cellulaire du médulloblastome TE-671 en plus d'un effet photocytoxique peut induire la diminution de la migration cellulaire (diminution de l'expression de MMP-2 et -9) et de la prolifération et l'immortalisation cellulaire (diminution de l'expression de la télomérase) [357]. Dans une récente étude, l'incorporation cellulaire de l'hypéricine, d'un dérivé de l'acide 5-aminolevulinique et de la protoporphyrine PpIX, ont été comparées dans des cellules du médulloblastome *in vitro*. La photocytotoxicité de l'Hy, comparée à la PpIX, est démontrée par une DL_{50} 8 à 13 fois moins élevée. Ainsi, l'Hy semble être une molécule prometteuse pour la visualisation intraopérative et pour le traitement photodynamique de médulloblastomes [358].

Dans un contexte de morbidité importante liée aux effets secondaires du traitement par radiothérapie (séquelles endocriniennes et cognitives), la thérapie photodynamique semble être une

alternative intéressante. Néanmoins, pour augmenter son efficacité et limiter ses effets secondaires, il convient d'augmenter la sélectivité du photosensibilisateur pour les cellules tumorales.

II.5 Le médulloblastome et NRP-1

II.5.a La neuropiline-1 (NRP-1)

Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires. Cette famille de **récepteurs** est constituée de deux formes (NRP-1 et NRP-2) qui possèdent des structures tridimensionnelles homologues dont la similarité de leurs motifs est de 44 %. La forme NRP-1 est localisée de façon primordiale au niveau des cellules endothéliales des artères alors que les NRP-2 sont localisées au niveau de l'endothélium veineux et lymphatique [202, 203]. Les neuropilines sont impliquées dans des domaines variés comme l'immunité, le développement cardiovasculaire, la migration neuronale et cellulaire, l'angiogenèse et la pathogenèse cancéreuse.

NRP-1 agit comme co-récepteur de nombreux ligands extracellulaires, dont :

- les sémaphorines de classe III et IV (rôle dans la guidance axonale),
- le VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*-A),
- et d'autres ligands plus récemment étudiés comme le TGF-β (*Transforming Growth Factor beta*), le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et les intégrines [359].

Toutes ces molécules ont un rôle majeur dans la néoangiogenèse tumorale.

II.5.b Le rôle de la NRP-1 dans la progression du médulloblastome

Récemment, il a été montré que l'inhibition de la neuropiline-1 (NRP-1) engendrait une inhibition de la croissance et de la propagation de ce type de tumeur [360]. Son implication dans le devenir des cellules initiatrices de tumeurs a également était montrée dans les tumeurs cérébrales adultes.

Des travaux récents ont mis en évidence le rôle de la neuropiline-1, récepteur situé à la surface des cellules de certains types tumoraux, dans la progression tumorale et la diminution de la réponse clinique aux traitements [361]. Son expression au niveau des cellules de médulloblastome a été mise en évidence par l'équipe de Snuderl et le lien entre la présence de NRP-1 à la surface des cellules cancéreuses de médulloblastome et la progression de la maladie a pu être établi [360].

Les cellules du médulloblastome sécrètent une protéine, la SHH. La SHH reste importante chez l'adulte, en contrôlant la division cellulaire des cellules souches adultes et est impliquée dans le développement de certains cancers. En s'associant aux cellules stromales, elle produit une autre protéine : le facteur de croissance placentaire (PlGF pour *placental growth factor*). Ensuite, ces protéines placentaires vont se fixer aux NRP-1 des cellules tumorales, communiquant les signaux nécessaires à la croissance et à la progression de la tumeur (Figure 118) [362].

Le ciblage de la NRP-1 pourrait donc présenter un intérêt thérapeutique important dans la prise en charge du médulloblastome.

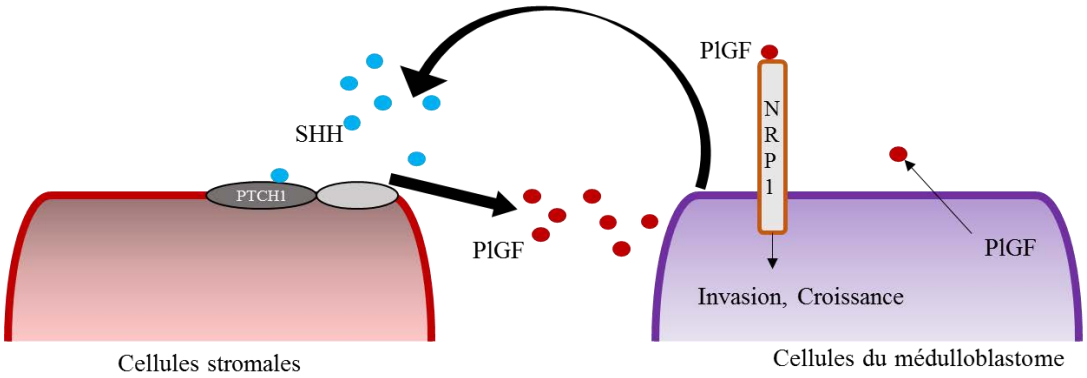


Figure 118. Représentation schématique du rôle de la NRP-1 dans la croissance et la progression du médulloblastome, adapté de la référence [360]. PTCH1 (*protein patched homolog 1*), récepteurs des SHH.

III SYNTHESE DU K(P1)DKPPR

III.1 Présentation du composé

Afin de cibler les NRP-1, nous avons choisi la séquence peptidique DKPPR. En effet, il a été récemment montré par notre équipe (résultats non publiés) que la séquence peptidique DKPPR (IC_{50} = 1 µM) possède une meilleure affinité pour les NRP-1 que le précédent peptide synthétisé à cet effet, ATWLPPR (IC_{50} = 19 µM [207] et IC_{50} = 7 µM [363], cf. chapitre 2, I.2.b) [364].

L'inconvénient de ce nouveau peptide est l'absence d'un acide aminé possédant des propriétés de fluorescence comme l'ancien peptide ATWLPPR avec le tryptophane (W, fluorescence : λ_{exc} = 280 nm ; $\lambda_{ém}$ = 350 nm) qui permettait sa détection. Pour remédier à ce problème, nous avons donc décidé de conjuguer ce peptide à une porphyrine, la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P1-COOH).

Le but de ce projet était de trouver un nouveau composé ayant 1) une efficacité photodynamique (fort rendement quantique d'oxygène singulet), 2) une sélectivité pour les NRP-1 et 3) greffable à des nanoparticules. Ainsi, nous avons entrepris de synthétiser le composé K(P1)DKPPR (Figure 119).

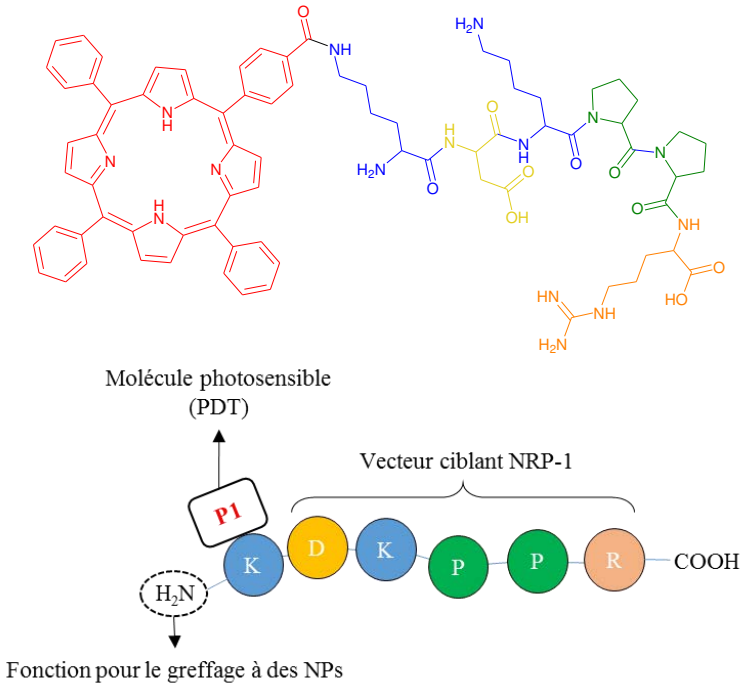


Figure 119. Structure chimique et représentation schématique du composé K(P1)DKPPR.

III.2 Généralités sur les peptides

Les **acides aminés** (AA) sont les éléments constitutifs des peptides et des protéines. Ils sont liés entre eux par des liaisons amides (Figure 120A) pour former ces biopolymères que sont les **peptides** et les **protéines**. On admet généralement que les peptides sont des molécules constituées de moins de 50 acides aminés et qu'ils ne possèdent souvent pas de structure tertiaire, contrairement aux protéines. Les acides aminés dont on parle le plus couramment sont des acides α-aminés. Ce sont les AA constitutifs de plus de 90% des peptides et protéines dans le règne supérieur ; l'α d'acides α-aminés indique que la fonction amine et la fonction carboxylique sont toutes deux directement liées au carbone α porteur de plus de la chaîne latérale. Leur structure générale est donnée dans la Figure 120B. Ce carbone α, excepté pour la glycine est stéréochimique, conférant aux acides aminés une activité optique (dextrogyre (+) ou lévogyre (-)). Deux stéréoisomères (L ou D) sont donc possibles (Figure 120C). La liaison du carbone carbonyle avec l'azote dans la liaison peptidique (1,33Å) est plus courte que la liaison simple C-N (1,49 Å) et plus longue que la liaison double C=N (1,27 Å). Ainsi, le caractère partiellement double de la liaison peptidique empêche la rotation autour de la liaison C-N : la liaison peptidique est confinée dans un plan (Figure 120D) [365].

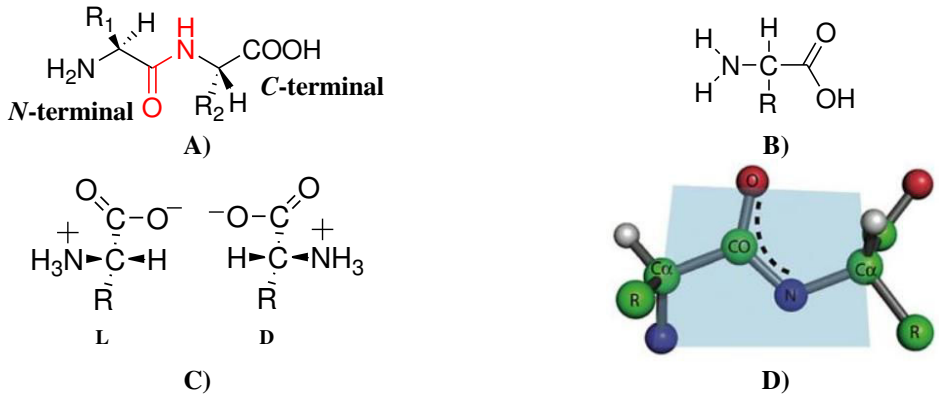
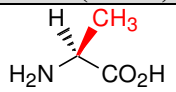
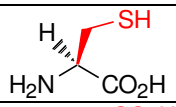
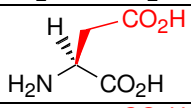
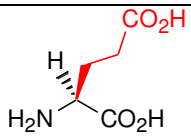
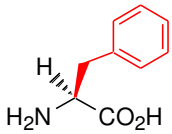
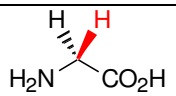
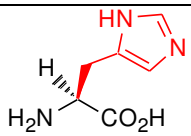
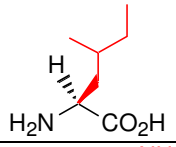
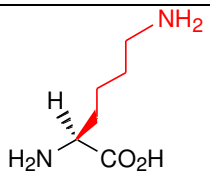
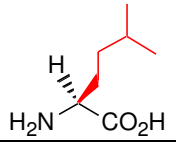
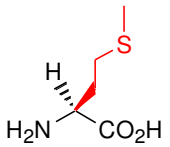
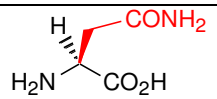
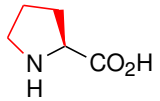
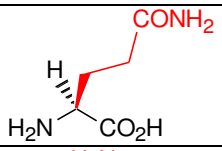
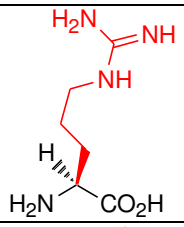
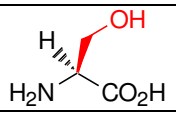
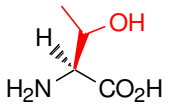
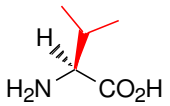
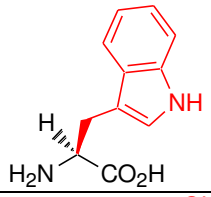
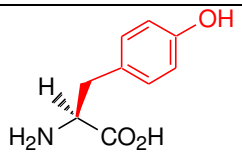


Figure 120. (A) Structure d'un dipeptide (en rouge, la liaison amide). (B) Forme générale des acides α-aminés. (C) Isomères optiques des acides aminés dus à l'asymétrie du C_α. (D) La liaison peptidique (ou amide) ne permet pas la rotation, gardant les deux atomes C_α et les trois atomes de la liaison peptidique dans un même plan (en bleu) [365].

Il existe une centaine d'acides α-aminés, mais vingt d'entre eux sont quasi exclusivement impliqués dans la construction des peptides et protéines naturels (Tableau 10) : ils sont dits protéinogéniques. 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 en compte également le sens du peptide, il est représenté avec l'extrémité *N*-terminale sur la gauche et l'extrémité *C*-terminal sur la droite (Figure 120A). La majorité des acides aminés naturels possèdent la configuration L mais il est possible de trouver quelques acides aminés de configuration D dans certaines protéines.

Tableau 10. Structure chimique des acides aminés naturels [366].

Code monolettre X	Code trilettre Xxx	Nom de l'acide aminé H-X-OH ou H-Xxx-OH	Structure de l'acide aminé (L ou S)
A	Ala	Alanine	
C	Cys	Cystéine	
D	Asp	Acide Aspartique	
E	Glu	Acide Glutamique	
F	Phe	Phénylalanine	
G	Gly	Glycine	
H	His	Histidine	
I	Ile	Isoleucine	
K	Lys	Lysine	
L	Leu	Leucine	
M	Met	Méthionine	

N	Asn	Asparagine	
P	Pro	Proline	
Q	Gln	Glutamine	
R	Arg	Arginine	
S	Ser	Sérine	
T	Thr	Thréonine	
V	Val	Valine	
W	Trp	Tryptophane	
Y	Tyr	Tyrosine	

III.3 La synthèse peptidique sur phase solide (SPPS)

La synthèse peptidique sur support solide a été introduite en 1963 par R. B. Merrifield [367] qui a obtenu le Prix Nobel en 1984. Ce dernier a obtenu le tétrapeptide H-Leu-Ala-Gly-Val-OH grâce à cette nouvelle voie de synthèse. Elle met en jeu un support constitué par de petites billes d'un polymère (P), appelé **résine**, insoluble et inerte dans les conditions de la synthèse. En revanche, ces polymères ont la particularité de gonfler dans les solvants utilisés, ce qui assure une bonne diffusion des réactifs.

Un premier avantage de la synthèse peptidique sur phase solide est que le composé intermédiaire d'intérêt, est ancré sur le support, ce qui supprime les étapes de purification car de simples lavages suffisent pour éliminer les réactifs restés en solution. Le second avantage de l'ancrage de molécules sur un support solide, qui découle du premier est que la synthèse sur support solide permet l'utilisation d'un excès de réactifs, puisque la molécule d'intérêt reste sur le support solide jusqu'à la fin de la synthèse et à nouveau l'excès peut être éliminé par de simples lavages. La synthèse de peptides consiste donc en une répétition d'étapes de couplage et de déprotection jusqu'à obtention

du peptide désiré, qui est ensuite séparé du support par coupure chimique et ensuite purifié et analysé. La simplicité de cette méthode facilite son automatisation.

Le principe de la SPPS peut se diviser en plusieurs étapes décrites ci-dessous [368] :

III.3.a Choix du polymère (la résine)

L'avancée réalisée par la chimie peptidique en phase solide a contribué au développement de nombreux supports solides, ainsi qu'au développement de nouvelles chimies pour l'activation et la protection des acides aminés. En SPPS, il existe principalement deux grandes stratégies pour réaliser une synthèse : les stratégies **Boc/Bzl** et **Fmoc/*t*Bu** (Figure 121) [369].

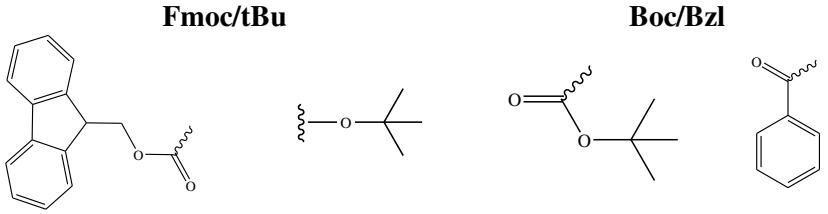


Figure 121. Formules développées planes des groupements Fmoc (9-fluorénylmethyloxycarbonyle), tBu (tert-butyl ester) et Boc (tertio-butyloxycarbonyle), Bzl (benzoyle).

Celles-ci diffèrent par le choix du groupe protecteur *N*-terminal (Boc ou Fmoc) et les groupements protecteurs orthogonaux utilisés pour protéger les chaînes latérales des acides aminés (respectivement Bzl ou *t*Bu mais aussi d'autres plus spécifiques de certains acides aminés, Tableau 11).

Tableau 11. Structure chimique des protections utilisées dans cette thèse pour protéger les chaînes latérales des acides aminés [370, 371].

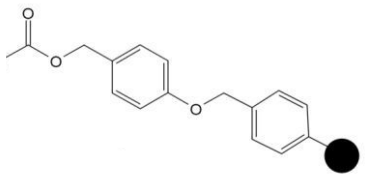
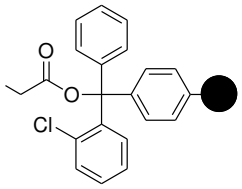
Diminutif	Nom	Acide aminé protégé	Structure
Mtt	4-méthyltrityl	Lysine	
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl	Arginine	
tBu	tert-butyl ester	Thréonine	
Boc	*tertio*-butyloxycarbonyl	Lysine	

Les Fmoc-AA-OH sont plus onéreux que les Boc-AA-OH mais la stratégie Fmoc/*t*Bu s'avère plus versatile, notamment grâce au développement de nombreux groupements protecteurs orthogonaux au Fmoc permettant des synthèses de molécules plus complexes. Nous avons donc choisi cette dernière stratégie pour la construction de nos vecteurs peptidiques.

Le choix de la résine dépend de la stratégie choisie. Le premier acide aminé (AA1) est greffé par l'extrémité *C*-terminale sur la résine, il est ensuite allongé par l'extrémité *N*-terminale. Notre choix dans cette thèse s'est porté sur la **résine de Wang** sur laquelle est greffé le premier acide aminé protégé par un Fmoc. Par ailleurs, certaines résines permettent de synthétiser des peptides protégés sur leurs chaînes latérales et qui peuvent avoir un intérêt pour le greffage ultérieur d'une molécule d'intérêt (PS par exemple) ou pour produire des peptides plus longs par synthèse par fragments.

Dans ce cas, les résines de type trityl ou dialkoxybenzyl sont utilisées [369]. Nous avons choisi dans cette thèse la **résine 2-chlorotrityl** (Tableau 12).

Tableau 12. Les résines utilisées dans cette thèse pour la SPPS [369].

Synthèse en stratégie Fmoc	
Synthèse de peptide déprotégé	Synthèse de peptide protégé
AA1  Wang	AA1  H-Gly-2-Chlorotrityl résine

III.3.b Déprotection du Fmoc

En ce qui concerne la stratégie Fmoc/*t*Bu, le Fmoc s'élimine dans des conditions basiques en présence de **pipéridine** par exemple, utilisé dans notre cas (Figure 122) [372].

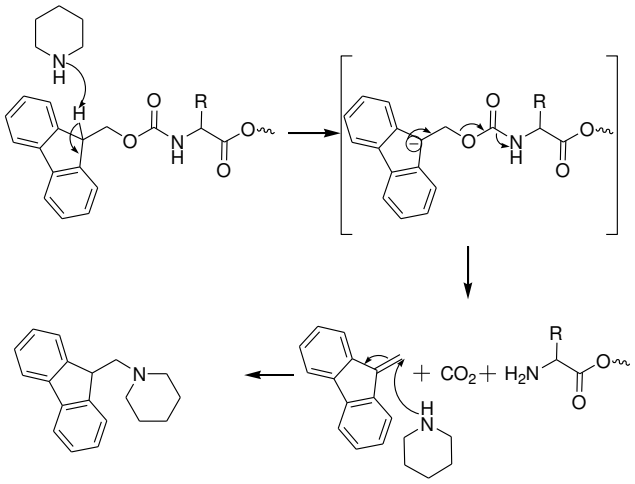


Figure 122. Mécanisme de déprotection d'un groupe Fmoc par utilisation de pipéridine.

III.3.c Allongement de la chaîne

La liaison amide issue de la réaction entre la fonction acide carboxylique de l'AA2 et la fonction amine de l'AA1 n'étant pas spontanée, il est nécessaire d'activer la fonction carboxylique à l'aide d'un activateur tel que le HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium, Figure 123, [373]) en présence d'une base, la NMM (*N*-méthylmorpholine). De la NMP (*N*-méthylpyrrolidone) est également ajoutée car il s'agit d'un solvant plus polaire que le DCM, qui dissout efficacement certains acides aminés et permet d'améliorer les rendements de couplage. Une fois couplé, l'AA2 peut être déprotégé pour une nouvelle réaction d'acylation, le tout n-1 fois (n étant le nombre total d'AA du peptide).

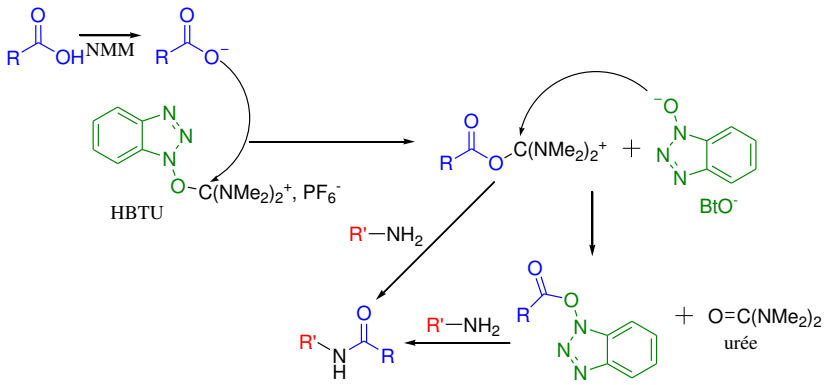


Figure 123. Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés, par activation au HBTU.

III.3.d Capping

Bien que des excès de réactifs et catalyseurs soient utilisés, des délétions sont engendrées par des couplages non quantitatifs. Pour limiter la formation des sous-produits indésirables, une étape supplémentaire de *capping* des fonctions NH_2 est effectuée après chaque couplage. Il s'agit de faire réagir de l'anhydride acétique avec la fonction NH_2 libre de l'acide aminé AA1 (pour le premier couplage) déprotégé à la pipéridine, qui n'aurait pas réagi avec l'acide aminé suivant AA2 (Figure 124). Cette étape stoppe définitivement la croissance des peptides délétères et permet de limiter le nombre de sous-produits formés.

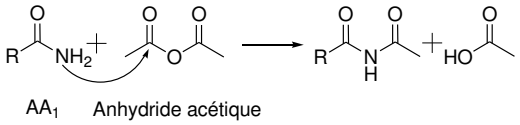


Figure 124. Schéma chimique de l'étape du capping en présence d'anhydride acétique.

III.3.e Vérification des couplages

Des tests colorimétriques permettent de révéler si les couplages entre acides aminés se sont produits ; ceci permet de déterminer le nombre de couplage entre deux acides aminés suffisant pour avoir un rendement de couplage maximal. Différents tests existent : le test à la ninhydrine ou test de Kaiser (non valable pour les amines secondaires telles que la proline) [374], le test au chloranil (pour le couplage de proline) [375] et le test à l'acide trinitrobenzène sulfonique (ATNBS).

III.3.f Clivage du peptide de la résine

Le clivage du peptide de la résine dépend de la nature de la résine et du souhait de garder ou non les protections des chaînes latérales du peptide.
Par exemple, s'il s'agit d'une **résine Wang**, un mélange [TFA (acide trifluoroacétique)/ TIPS (triisopropylsilane) / eau : 92,5/5/2,5 : v/v/v] est utilisé et le peptide obtenu est entièrement **déprotégé**. En revanche, s'il s'agit d'une **résine 2-chlorotrityl**, un mélange [AcOH (acide acétique) / TFE (2,2,2-trifluoroéthanol) / DCM (dichlorométhane) : 2/2/6 : v/v/v] ou un mélange 1-5 % TFA dans du DCM contenant 5 % de TIPS [376]. Ce type de mélange permet de garder les protections (Pbf, Boc, Fmoc…) sauf le groupement protecteur Mtt.

III.3.g Purification du peptide par HPLC

Les peptides sont enfin purifiés par HPLC avec un gradient ACN/eau (contenant 0,1% TFA, seulement dans le cas des peptides déprotégés).

III.4 Synthèse chimique

Pour la synthèse du K(P1)DKPPR, nous avons choisi de coupler dans un premier temps en phase liquide, la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (notée P1, synthèse décrite dans le

chapitre 3, IV.1.) à la fonction amine latérale de la lysine afin d'obtenir la Fmoc-Lys(P1)-OH. La fonction acide carboxylique de la P1-COOH est activée et la réaction de couplage avec la lysine a été ensuite réalisée dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine (TEA) sous argon à température ambiante pendant 24 h (Figure 125). La Fmoc-Lys(P1)-OH a été obtenue avec un très bon rendement de 82 %.

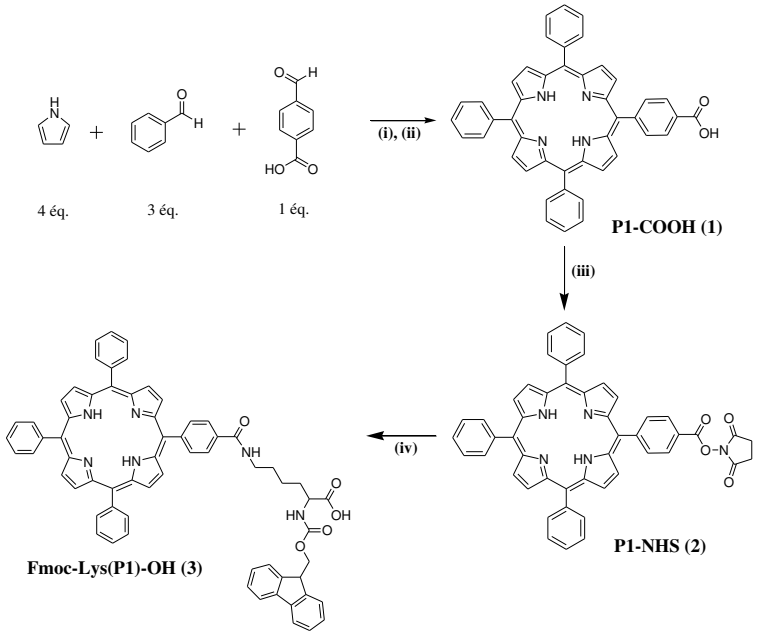


Figure 125. Préparation de la Fmoc-Lys(P1)-OH. (i) BF_3, OEt_2, DCM, reflux, 16 h. (ii) *p*-chloranile, 60°C, 2h. (iii) NHS, DCC, CH_2Cl_2, 45°C, 16 h. (iv) Fmoc-Lys-OH.HCl dilué dans un minimum de DMF, TEA, DCM, 24 h.

Le composé H-K(P1)DKPPR-OH a été synthétisé à l'aide d'un synthétiseur automatique sur phase solide selon la stratégie Fmoc/tBu utilisant une résine de Wang chargée avec le premier acide aminé dont la chaîne latérale est protégée, l'arginine (Fmoc-Arg(Pbf)-Wang, Figure 126).

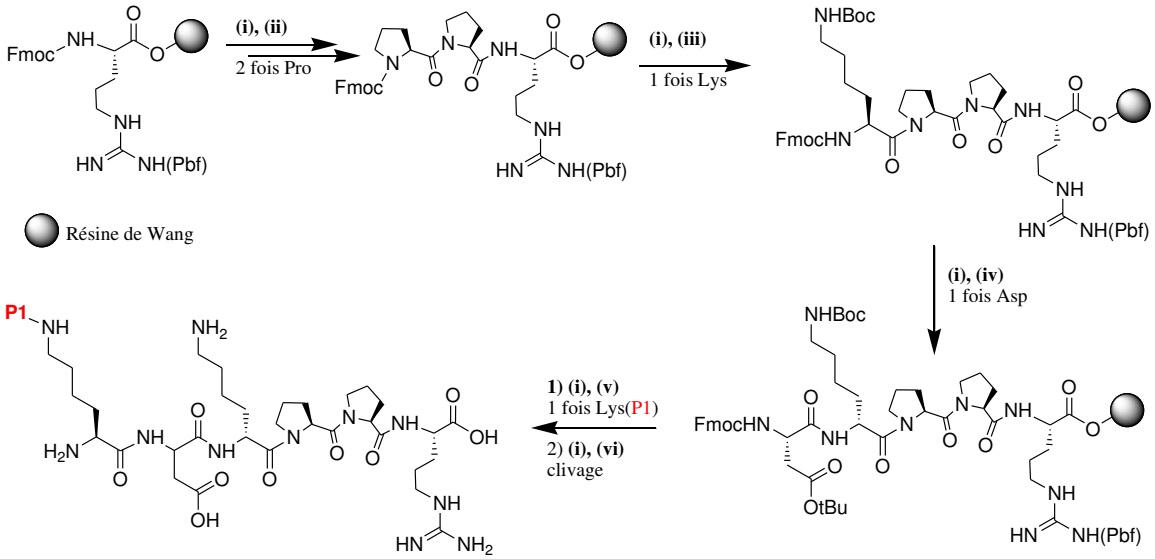


Figure 126. Synthèse du K(P1)DKPPR : (i) 20% pipéridine, DMF. (ii) Fmoc-Pro-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (iii) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (iv) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (v) Fmoc-Lys(P1)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF. (vi) Clivage: TFA / TIPS / H_2O (92,5/5/2,5 % vol.).

Deux couplages pour chaque acide aminé sont nécessaires, en utilisant comme agent de couplage le HBTU. Le couplage de la Fmoc-Lys(P1)-OH (2 éq.) a été réalisé une seule fois et a été agitée pendant une durée de 5 jours. La protection finale Fmoc est enlevée grâce à une solution à 20 % en

pipéridine dans la DMF. La résine est ensuite séchée et le peptide est clivé de la résine en utilisant un mélange TFA/triisopropylsilane (TIPS)/eau (92,5/5/2,5%) pendant 2 h. Le peptide brut est ensuite purifié par HPLC-phase inverse (C18). Le composé K(P1)DKPPR est isolé sous forme d'une poudre rouge avec un rendement de 11 %. La pureté du peptide a été vérifiée par LCMS et RMN.

III.5 Propriétés photophysiques

Afin de vérifier que les propriétés photophysiques et phototoxiques de la P1-COOH ne sont pas modifiées par l'ajout du peptide, les spectres de fluorescence et de luminescence ont été enregistrés.

Les mesures d'absorption, de fluorescence et de production d'oxygène singulet (Figures 127-129) montrent que les propriétés de la P1-COOH restent les mêmes après couplage avec la lysine ou avec le peptide. Les valeurs sont reportées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Propriétés photophysiques des composés P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-COOH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol.

Composé	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_F (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
P1-COOH	645	4 276	0,09	0,64	10,0	16
Fmoc-Lys(P1)-OH	645	3 940	0,09	0,62	10,0	16
K(P1)DKPPR	645	4 926	0,09	0,61	10,0	16

λ_{QI} : longueur d'onde de la bande Q_I ; ε_{QI} : coefficient d'exctinction molaire de la bande Q_I ; ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

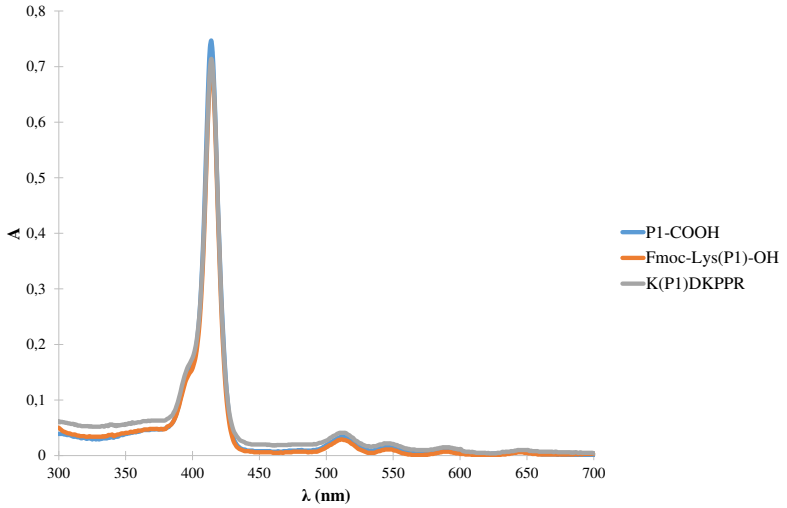


Figure 127. Spectres UV-Visible des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-COOH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (2,03 x 10^{-6} mol/L).

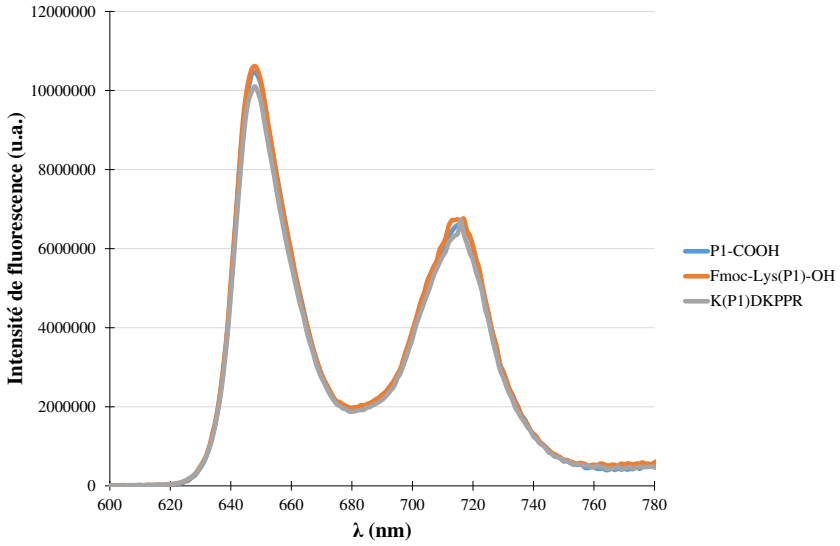


Figure 128. Spectres d'émission de fluorescence des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-OH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (A_{414nm} = 0,2).

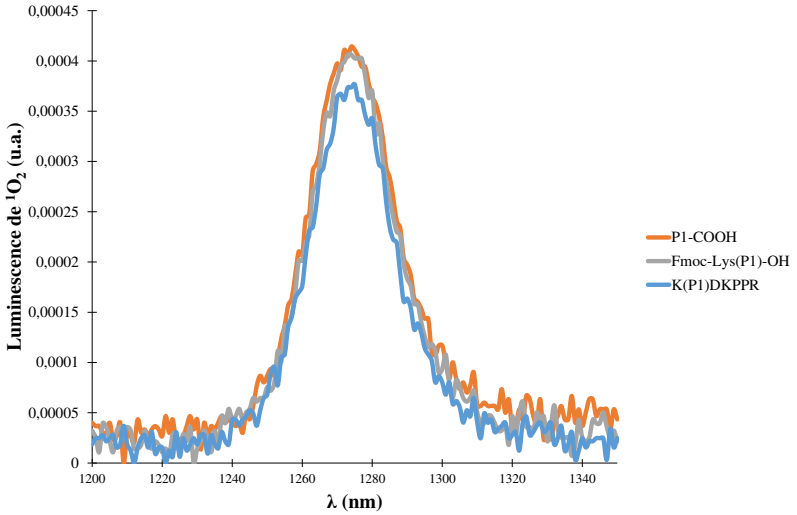


Figure 129. Spectres d'émission d'oxygène singulet des espèces: P1-COOH, Fmoc-Lys(P1)-OH et K(P1)DKPPR dans l'éthanol (A_{414nm} = 0,2).

IV EFFET DU K(P1)DKPPR SUR LES CELLULES SOUCHES DE MEDULLOBLASTOME [377]

L'objet de ce travail effectué par une **équipe du CRAN (Julie Valduga, Cédric Boura et Muriel Barberi-Heyob)** était de tester, dans un premier temps, l'affinité du K(P1)DKPPR pour les NRP-1, puis, d'étudier l'effet de ce composé sur la viabilité cellulaire.

La tuftsine est un tétrapeptide de structure primaire Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR) issu du clivage du fragment cristallisable (région Fc) des chaînes lourdes d'immunoglobuline G et essentiellement produite au sein de la rate [378]. Il a été montré que ce composé peptidique peut être utilisé en tant qu'agent thérapeutique destiné à la prophylaxie et/ou au traitement du cancer, de maladies auto-immunes, de maladies fibreuses, de maladies inflammatoires, de maladies neurodégénératives, de maladies infectieuses, de maladies pulmonaires, de maladies cardiaques et vasculaires et de maladies métaboliques [379]. La tuftsine se lie sélectivement à la neuropiline-1 et empêche ainsi le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) de se lier à ce récepteur. De nombreux dérivés de la tuftsine ont été synthétisés en vue de cibler les cellules tumorales surexprimant le récepteur NRP-1 pour des applications en imagerie ou thérapeutiques [380, 381]. Il nous a paru intéressant de comparer l'affinité du DKPPR et du K(P1)DKPPR pour NRP-1 avec celle de la tuftsine.

L'équipe a étudié comparativement trois composés capables de cibler sélectivement NRP-1 : la tuftsine, le peptide DKPPR et le composé K(P1)DKPPR (Figure 130). L'affinité et l'effet de ces composés ciblant NRP-1 sur la viabilité cellulaire ont été testés.

Tuftsine (TKPR)

DKPPR

K(P1)DKPPR

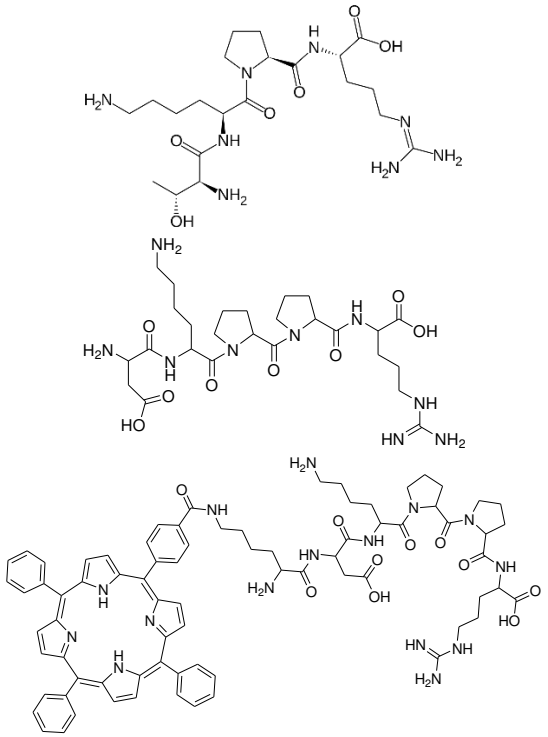


Figure 130. Structures chimiques des trois composés utilisés pour les tests.

Dans la suite, le n désignera le nombre de fois que l'expérience a été répétée et le p correspond au seuil de significativité du test statistique pour lequel on considère qu'il y a une différence significative en comparaison au contrôle et ceci est représenté par un symbole * sur le graphe.

IV.1 Affinité pour les NRP-1

Les affinités des trois composés pour le récepteur NRP-1 ont été estimées et on trouve une affinité maximale pour le K(P1)DKPPR (IC_{50} = 6,5 µmol/L, Tableau 14 et Figure 131).

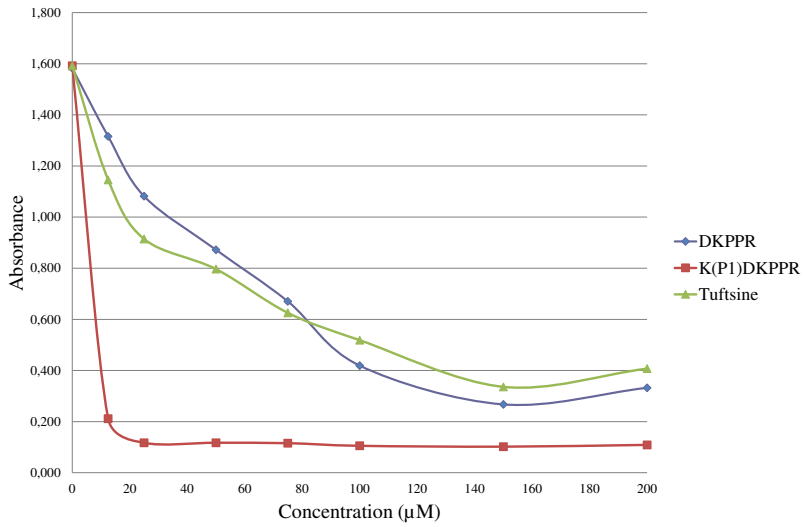


Figure 131. Tests ELISA sur tuftsine, DKPPR et K(P1)DKPPR.

Tableau 14. Principales caractéristiques des deux composés étudiés ciblant NRP-1.

	Tuftsine	DKPPR	K(P1)DKPPR
Description	Peptide	Peptide	Peptide couplé à un PS (une porphyrine)
Masse moléculaire	500,6 g/mol	611,7 g/mol	1380,59 g/mol
Concentration de la solution mère	10 mmol/L	10 mmol/L	10 mmol/L
Milieu utilisé	Eau distillée	Eau distillée	DMSO
Affinité pour le récepteur NRP-1 (IC_{50}*)	28 µmol/L	24,25 µmol/L	6,5 µmol/L

IC_{50}* : la concentration inhibitrice médiane représente la concentration d'un médicament qui est requise pour une inhibition à 50 % *in vitro*.

Ces résultats permettent de conclure à l'hypothèse d'une meilleure incorporation du composé K(P1)DKPPR par rapport au peptide DKPPR et à la tuftsine. L'introduction d'une lysine en bout de chaîne du peptide DKPPR ou l'effet coopératif de la porphyrine couplée au peptide peuvent être à l'origine de cette meilleure incorporation du K(P1)DKPPR par rapport au DKPPR.

IV.2 Liaison du K(P1)DKPPR aux cellules de médulloblastomes

Les lignées cellulaires différenciées utilisées pour l'obtention des cellules souches de médulloblastomes sont :

- La lignée DAOY (ATCC→ HTB-186™) est une lignée de médulloblastome humain de type desmoplasique cérébral, développé chez un enfant de 4 ans de sexe masculin. Il s'agit de cellules adhérentes de morphologie polygonale.
- La lignée D283 Med (ATCC→ HTB-185™) est une lignée de médulloblastome humain, dérivée d'un site métastatique péritonéal, chez un enfant de 6 ans de sexe masculin. Il s'agit de cellules en suspension, avec agrégats multicellulaires et quelques cellules adhérentes. La morphologie des cellules adhérentes est de type épithélial.

- La lignée D341 Med (ATCC→ HTB-187™) est une lignée de médulloblastome humain, développé chez un enfant de 3,5 ans de sexe masculin. Il s'agit de cellules en suspension, de morphologie sphéroïde.

Lorsque la concentration du K(P1)DKPPR augmente, la fluorescence augmente pour chaque lignée cellulaire (par manque de temps la lignée D341 n'a pu être étudiée, Figure 132). Aucun plateau n'est observé aux concentrations utilisées ce qui reflète qu'il n'y a pas de saturation des récepteurs NRP-1. On ne peut conclure sur la spécificité des composés pour NRP-1. Toutefois, le composé K(P1)DKPPR est internalisé dans les cellules des deux lignées étudiées.

Notre équipe a retrouvé une expression basale de NRP-1 pour les 3 modèles de cellules cultivés en médullosphères. Cependant, le niveau d'expression semble plus important pour les cellules D283 et D341 par rapport aux cellules DAOY [377]. Ce qui pourrait expliquer pourquoi nous pouvons observer une fluorescence supérieure pour les cellules D283 que pour les cellules DAOY.

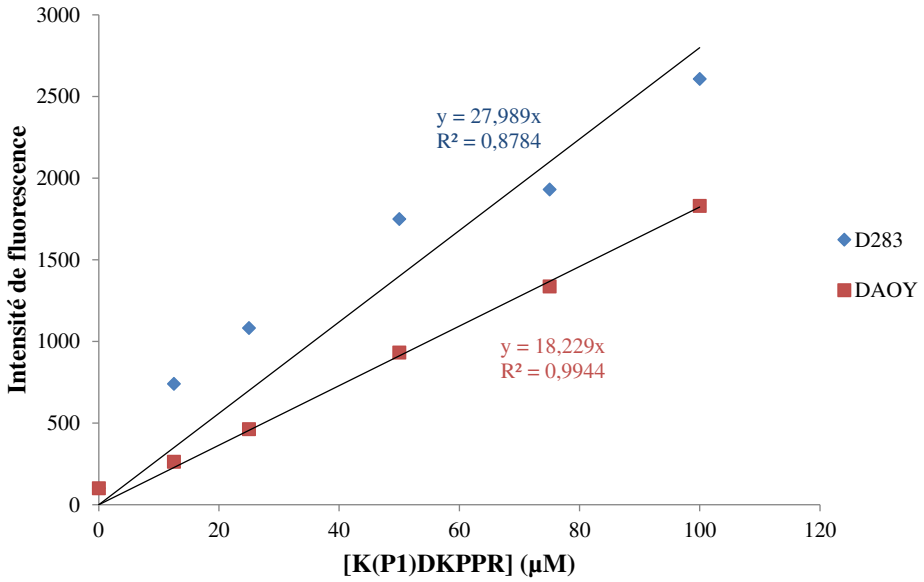


Figure 132. Incorporation du K(P1)DKPPR déterminée par mesure de la fluorescence du K(P1)DKPPR après 3h d'incubation à 37°C ($\lambda_{excitation}$ = 450 nm et $\lambda_{émission}$ = 650 nm) dans les lignées DAOY et D283.

IV.3 Effet des composés sur la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des différents composés DKPPR et K(P1)DKPPR a été évaluée à la concentration de 25 µmol/L sur les cellules de DAOY, D283 et D341. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité rapporté au pourcentage de viabilité des cellules non traitées (Tableau 15).

Les différentes cellules souches de médulloblastome étudiées ont été ensemencées en présence des composés peptidiques à la concentration cellulaire de 60 000 cellules/mL pour les DAOY et les D341, et 75 000 cellules/mL pour les D283) dans des plaques de culture 24 puits. Après 72 h de culture, une mesure de la viabilité a été réalisée à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (TC20, Biorad, France). Les cellules ont été préalablement dissociées avec de l'Accumax puis rapidement mises en contact avec une solution de bleu trypan (Biorad). Elles ont ensuite été déposées sur une lame de comptage (TC20, Biorad). L'appareil muni d'une caméra réalise alors un comptage des cellules viables (les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables ou en nombre de cellules vivantes).

Tableau 15. Nombre de cellules vivantes rapporté au nombre de cellules vivantes du témoin négatif après 72 h de contact avec les composés tuftsine, DKPPR, K(P1)DKPPR et P1-COOH.

	Tuftsine	DKPPR	K(P1)DKPPR	P1-COOH
	$N / N_{(Témoin\ négatif)}$ (en %)			
DAOY	54 ± 1	65 ± 3	94 ± 5	42 ± 1
D283	72 ± 2	80 ± 3	15 ± 1	66 ± 3
D341	75 ± 10	56 ± 5	14 ± 2	91 ± 5

Ces expériences de viabilité cellulaire sur les médullosphères traitées par les différents composés (Figure 133) ne montreraient de différences significatives en matière de survie cellulaire qu'après traitement par le K(P1)DKPPR pour les D283 et les D341 (diminution de la viabilité cellulaire). Cette diminution ne peut pas être attribuée à la porphyrine seule, qui est un cytotoxique activé par la lumière, car il n'y a pas de différences significatives en matière de survie cellulaire après traitement par la P1-COOH seule pour les trois lignées (Figure 133). Par ailleurs, le K(P1)DKPPR montre la plus forte affinité à NRP-1 comparée à la tuftsine et au DKPPR. Par conséquent, l'affinité pourrait être un facteur important pouvant expliquer ces effets cellulaires. Le niveau d'expression de NRP-1 semble également être un élément à prendre en compte dans la réponse. Il a été montré que le niveau d'expression de NRP-1 est plus important pour les cellules D341 et D283 que pour les cellules DAOY [377]. Il semblerait donc que les cellules exprimant le plus NRP-1 (D341) soient aussi les plus sensibles au peptide couplé à la porphyrine.

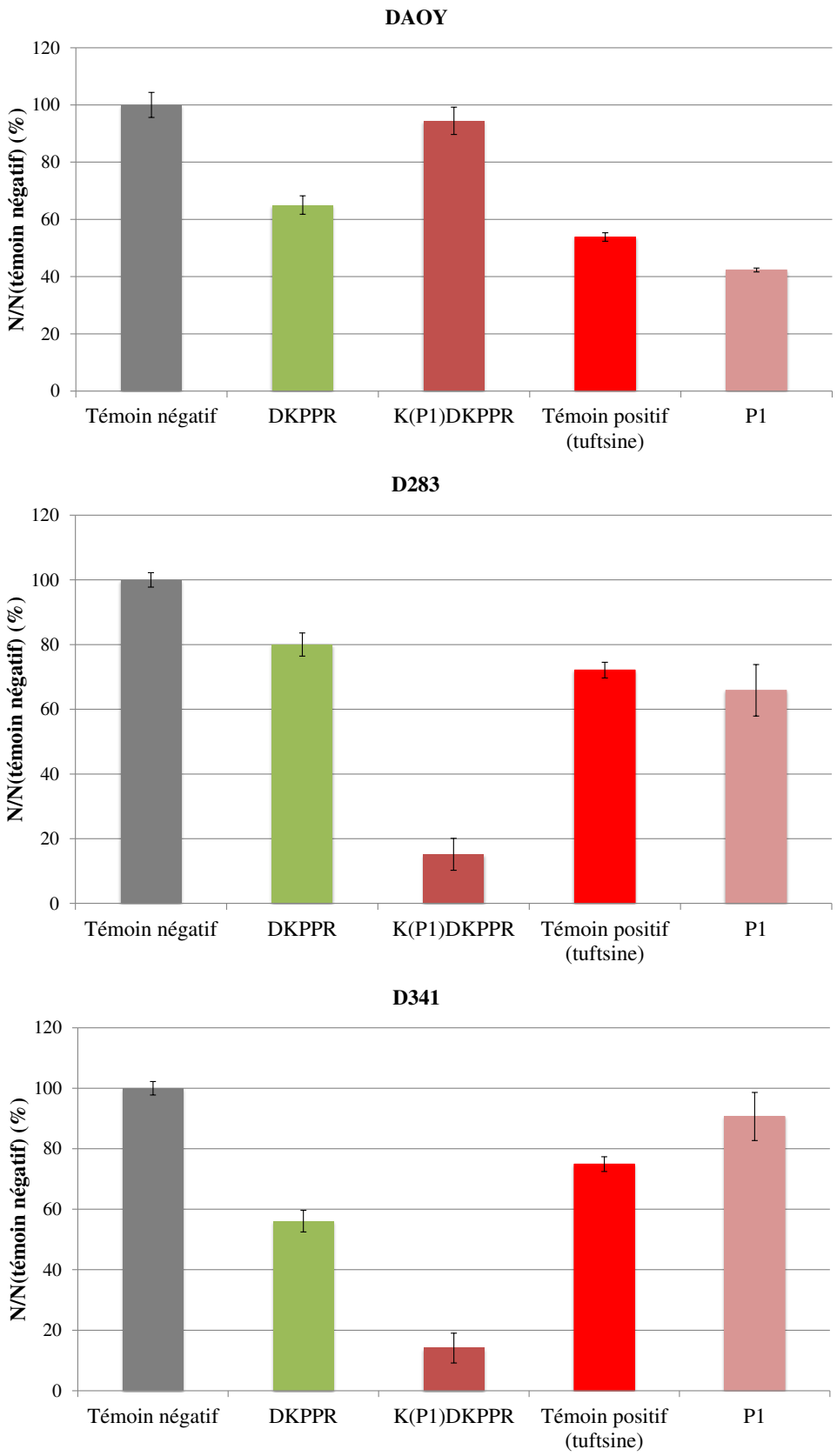


Figure 133. Viabilité cellulaire des cellules cultivées en médullosphères pour les lignées DAOY, D283 et D341, après 72h d'exposition des différents composés (la tuftsine, DKPPR, K(P1)DKPPR et P1-COOH) (n = 6, * $p < 0,05$ *versus* témoin négatif).

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le médulloblastome représente la première cause de tumeur cérébrale, mais aussi de mortalité par cancer chez l'enfant, bien que des progrès importants aient été réalisés dans la prise en charge thérapeutique [382]. L'optimisation des traitements nécessite la compréhension des mécanismes de résistance et de récidive, résultant notamment de la présence d'une sous-population cellulaire particulière, les cellules initiatrices de tumeurs plus communément appelées cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont particulièrement chimio- et radiorésistantes et présentent un potentiel tumorigène élevé, ainsi que d'importantes capacités d'invasion et de migration. Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont difficiles à éradiquer avec les standards thérapeutiques actuels et sont directement responsables des récidives dans les médulloblastomes. Des travaux récents viennent de montrer l'importance de la voie de signalisation du récepteur neuropiline-1 (NRP-1) dans la progression du médulloblastome. D'autres auteurs ont également montré récemment que les CSC dans les tumeurs cérébrales adultes peuvent exprimer NRP-1. Pour ces différentes raisons, NRP-1 apparait comme une cible thérapeutique séduisante dans les perspectives thérapeutiques du médulloblastome, afin d'améliorer l'efficacité des traitements entrepris, et donc d'améliorer la survie, tout en diminuant leurs effets secondaires, responsables d'une grande morbidité chez les patients.

Notre stratégie a été de synthétiser un nouveau composé le K(P1)DKPPR : un PS (la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, P1-COOH) a été couplé à un peptide à l'aide d'une lysine. Le peptide sélectionné (DKPPR) est un ligand spécifique du récepteur NRP-1.

Dans un premier temps, la connaissance précise des propriétés photophysiques du nouveau composé K(P1)DKPPR est fondamentale pour une application en PDT. Nous avons ainsi vérifié que le couplage de la P1-COOH sur le peptide n'a aucune incidence sur ses propriétés photophysiques du PS, seules les propriétés physico-chimiques sont affectées. En effet, les rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet sont toujours de 0,09 et de 0,6 respectivement dans l'éthanol, mais nous avons observé une différence dans le caractère hydrophile des composés, avec des temps de rétention par HPLC nettement différents : pour un même gradient, le K(P1)DKPPR (R_t = 17,8 min) est plus hydrophile que la porphyrine seule (R_t = 25,4 min).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié trois lignées distinctes de médulloblastome : DAOY, D283 et D341. Les cellules ont été cultivées dans un milieu spécifique permettant l'obtention de médullosphères, et donc la sélection des cellules souches de médulloblastome. De façon surprenante, le nouveau composé K(P1)DKPPR a montré une meilleure affinité pour NRP-1 que DKPPR. La présence de la porphyrine ne gêne pas l'affinité du composé pour NRP-1 et semble même augmenter l'incorporation. Cet effet est à ce jour inexpliqué mais des expériences de modélisation pourraient nous permettre de mieux comprendre ce phénomène. La comparaison des affinités pour NRP-1 du K(P1)DKPPR et du KDKPPR pourrait permettre de conclure si l'introduction d'une lysine en bout de chaîne du peptide DKPPR est à l'origine de la meilleure incorporation du K(P1)DKPPR par rapport au DKPPR. Pour savoir si il existe un effet coopératif venant de la porphyrine, l'affinité pour NRP-1 d'un autre composé le K(coumarine)DKPPR sera évaluée. Enfin, une diminution de la viabilité cellulaire pour le K(P1)DKPPR sur ces mêmes lignées a été observée, peut-être liée au niveau d'expression de NRP-1 à l'obscurité. Une étude sur la sélectivité tumorale et la phototoxicité est prévue pour compléter ces premiers résultats très encourageants.

CHAPITRE 5

NOUVEAUX PHOTODYNAMIC MOLECULAR BEACONS COMME AGENTS CIBLANT LES MT1-MMP POUR TRAITER LE GLIOBLASTOME MULTIFORME PAR PDT

Collaborateurs :

Tests de clivage enzymatique
Jérôme DEVY (MdC)
Nicolas ETIQUE (MdC)

Synthèse peptidique
Régis VANDERESSE (CR)

Synthèse enzymatique
Isabelle CHEVALOT (Pr)
Cédric PARIS (IR)

Perméabilisation membranaire
Stéphanie BONNEAU (MdC)

Synthèse et purification de porphyrines
Claude GROS (Pr)
Nicolas DESBOIS (MdC)
Clément MICHELIN (D)

Dans cette partie, notre but est d'essayer de contrôler la production d'oxygène singulet uniquement lorsque le PS a atteint sa cible, à l'aide de nouvelles constructions moléculaires appelées *Photodynamic Molecular Beacons* (PMB). Nous avons choisi comme cible les métalloprotéinases membranaires MT1-MMP, enzymes surexprimées entre autre au niveau des cellules tumorales du glioblastome multiforme (GBM).

I LE GLIOBLASTOME MULTIFORME (GRADE IV)

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à une tumeur astrocytaire de grade IV, le **glioblastome multiforme**.

I.1 Définition et origine

Le glioblastome représente 20,3 % de toutes les tumeurs cérébrales primaires et approximativement 50 % des astrocytomes (Central Brain Tumor Registry of the United States - CBTRUS). Tumeur astrocytaire la plus maligne, elle est composée d'astrocytes néoplasiques très peu différenciés. Ce type de tumeur se développe et se propage très rapidement. Ce sont les tumeurs les plus agressives et avec le plus mauvais pronostic. On les appelle aussi **glioblastomes multiformes** (**GBM**, Figure 134).

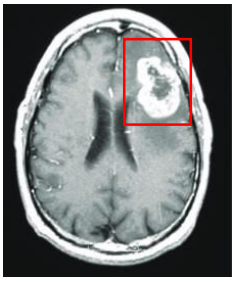


Figure 134. Image IRM d'un glioblastome multiforme [383].

L'un des aspects les plus importants dans la caractérisation d'une tumeur est sa composition. Les glioblastomes multiformes sont constitués d'une masse tumorale, région de cellules cancéreuses collées les unes aux autres, d'une zone centrale nécrotique et d'une zone de cellules tumorales infiltrantes autour de la masse tumorale (Figure 135) [384]. Enlever la masse tumorale est possible par chirurgie mais enlever les cellules tumorales infiltrantes dans les zones entourant la masse tumorale est très complexe. En effet, la résection des cellules infiltrantes peut avoir des répercussions sur le fonctionnement du cerveau car des cellules fonctionnelles et saines du cerveau co-existent avec les cellules cancéreuses dans cette zone.

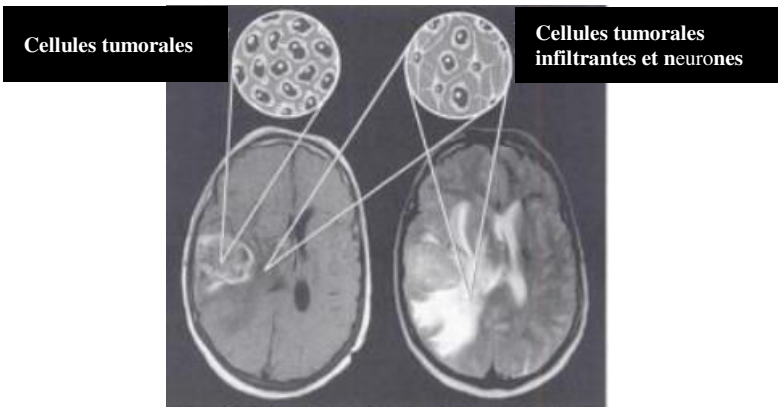


Figure 135. Anatomie histologique d'un glioblastome multiforme : sur la gauche, l'image IRM (pondérée en T1) montre la masse tumorale qui est composée de cellules tumorales collées les unes aux autres et sur la droite, l'image IRM (pondérée en T2) montre les cellules tumorales infiltrantes autour de la masse tumorale [384].

Les glioblastomes peuvent être classés selon deux sous-types principaux : les glioblastomes primaires (GBM I) ou *de novo* et les glioblastomes secondaires (GBM II) qui sont des gliomes de stade II ou III ayant évolué en glioblastomes de stade IV [385, 386].

Les **glioblastomes primaires** constituent la majorité des cas (60 %) [387]. Le terme *de novo*, qui définit ce sous-type, est donné du fait d'un manque d'identification du précurseur de la tumeur. Ce type de tumeur est caractérisé par un développement rapide des symptômes cliniques, chez des patients d'environ 55 ans [33] avec une plus grande incidence chez les hommes que chez les femmes par rapport aux GBM secondaires [388].

Les glioblastomes secondaires (40 % des cas, [387]) sont caractérisés par une évolution lente et par un passage par tous les grades. Ils atteignent des patients plus jeunes avec une moyenne d'âge de 45 ans. On y retrouve les marqueurs des astrocytomes de grade II et III [389, 390].

Plusieurs types de GBM moins communs ont été décrits : GBM à cellule géante, gliosarcome, GBM à petites cellules et GBM avec des caractéristiques d'oligodendrogliome [391].

I.2 Epidémiologie [392]

Le glioblastome est une tumeur rare qui est codée par le numéro 9440-3 selon la classification internationale des maladies oncologiques (ICD-O en anglais). Le premier chiffre indique la morphologie de la tumeur et le deuxième chiffre sa topographie, /0 pour les tumeurs bénignes, /3 pour les tumeurs malignes et /1 pour les tumeurs dont on ne connait pas exactement le comportement [391].

L'incidence annuelle du GBM est de 2 à 3 cas pour 100 000 personnes en Europe et aux Etats-Unis [393]. Il représente 25 % de toutes les tumeurs du système nerveux et 50 % des tumeurs gliales. Le taux d'incidence du glioblastome est supérieur dans les pays développés comme l'Australie ou les Etats-Unis que dans les pays en voie de développement comme l'Inde [394].

La médiane de survie d'un ensemble de patients est la durée au bout de laquelle la moitié des patients de l'étude sont décédés. Celle des patients atteints d'un GBM est d'environ 12 mois. Seulement, entre 3 et 5 % des patients survivent plus de 3 ans et sont surnommés « les survivants à long-terme » [395]. Le taux de récidive des glioblastomes est très élevé et quasiment inévitable (plus de 90 % des cas). Cela est dû au fait que les cellules cancéreuses peuvent s'infiltrer dans le cerveau et progressent de nouveau quelques mois après chirurgie, en général dans un périmètre de 2 cm autour de la tumeur d'origine.

Il existe une différence de prévalence en fonction du sexe du patient, les GBM primaires apparaissent plus fréquemment chez les hommes avec un ratio homme/femme de 1,33. En revanche, la tendance est inversée dans les GBM secondaires avec un ratio homme/femme de 0,65 [396].

I.3 Traitements

Divers traitements sont proposés aux patients atteints d'un glioblastome multiforme. Le choix est fait en fonction, entre autre, du stade de la maladie au diagnostic et de la localisation de la tumeur. Généralement, la chirurgie est le traitement primaire pour le cancer du système nerveux. Cependant, si la tumeur est inaccessible ou située dans un endroit délicat tel que le centre de la parole, de la vision ou des fonctions motrices, la chimiothérapie est privilégiée. Certaines tumeurs sont tellement agressives qu'elles nécessitent également l'utilisation de la radiothérapie. D'autres techniques existent ; les plus importantes seront décrites dans cette partie.

- La ***chirurgie*** est généralement le traitement choisi pour la plupart des GBM. Il s'agit d'ouvrir le crâne (craniotomie) pour enlever la tumeur mais cette technique peut causer des dommages au cerveau. Son utilisation dépend donc de la localisation de la tumeur et de l'environnement de la masse tumorale.

Le prolongement de la durée de vie des patients grâce à la chirurgie est discutable car la tumeur n'est jamais totalement enlevée. Cependant, plusieurs études suggèrent que la survie des patients atteints de GBM est corrélée avec la quantité de tumeurs résiduelles [397].

Afin d'augmenter son efficacité, l'ablation chirurgicale peut être couplée à la neuronavigation. Cette technique permet une résection guidée par une imagerie individuelle selon une relation interactive directe entre la position de l'outil chirurgical au sein du foyer opératoire et sa transposition virtuelle sur l'imagerie préopératoire (Figure 136A).

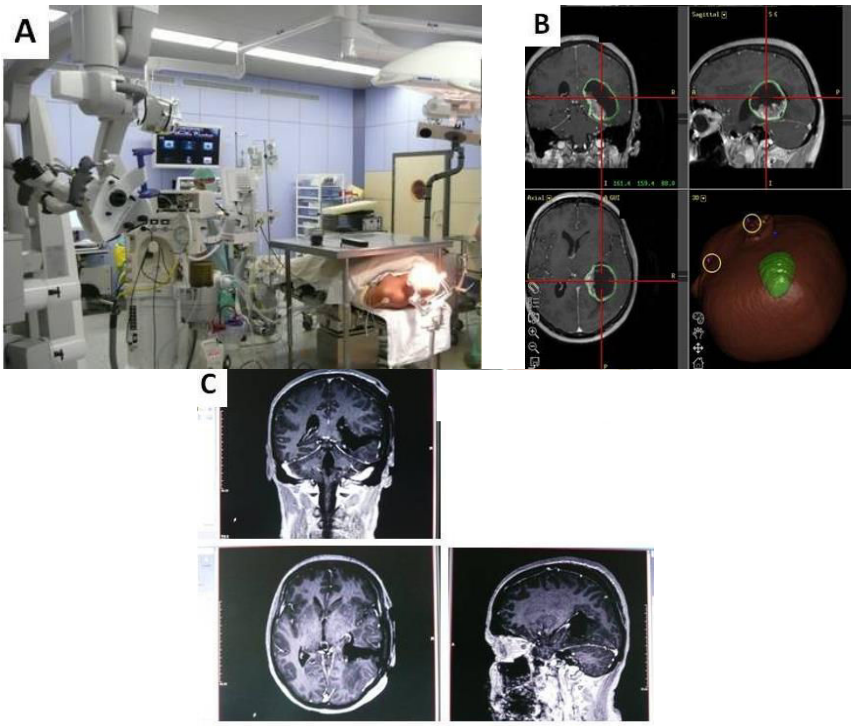


Figure 136. (A) Matériel pour une neuronavigation. (B) Images préopératoires. (C) Images après intervention chirurgicale (neuronavigation) [398].

Cette méthode interactive de visualisation du geste chirurgical par rapport aux images préopératoires (Figure 136B) bénéficie du développement de consoles de traitement d'images qui intègrent en routine des données multiples de scanner, d'IRM, d'IRM fonctionnelle investiguant le parenchyme cérébral, de tractographie qui met en évidence les faisceaux de fibres, et enfin de reconstruction en trois dimensions de volume et de métabolisme tumoraux dans la programmation de la résection tumorale chirurgicale. Grâce à la précision qu'elle apporte, cette technique utilisée maintenant en routine, permet de rendre la résection optimale des tumeurs cérébrales (Figure 136C) [398].

- La ***radiothérapie*** peut être nécessaire après la chirurgie pour traiter une tumeur qui n'aurait pas complètement été enlevée. Elle peut aussi être utilisée quand la chirurgie n'est pas possible ou pour des tumeurs qui sont réapparues après la chirurgie ou la chimiothérapie. Il a été montré que l'addition de la radiothérapie à la chirurgie augmente la durée de vie de 3-4 mois à 7-12 mois [399, 400].

- La ***chimiothérapie*** peut être nécessaire après la chirurgie associée ou non à la radiothérapie. Il a été montré que l'addition de la chimiothérapie à la radiothérapie pour d'autres types de cancers tels que le cancer des cervicales ou de la gorge améliore la survie des patients atteints de ces cancers mais la plupart des études menées pour la survie des patients atteints de GBM montrent qu'il n'y a aucun effet bénéfique sur la durée de vie des patients. Cependant, un essai clinique sur 575 participants a été réalisé pour connaître la différence entre l'effet de la radiothérapie seule et l'effet de la radiothérapie combinée à la chimiothérapie par le témozolomide (Figure 137).

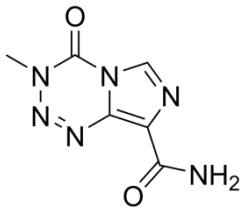


Figure 137. Formule semi-développée du témozolomide.

La durée de vie des patients recevant la radiothérapie combinée à la témozolomide chimiothérapie est de 14,6 mois contre 12,1 mois pour la durée de vie des patients recevant seulement la radiothérapie (Figure 138) [401].

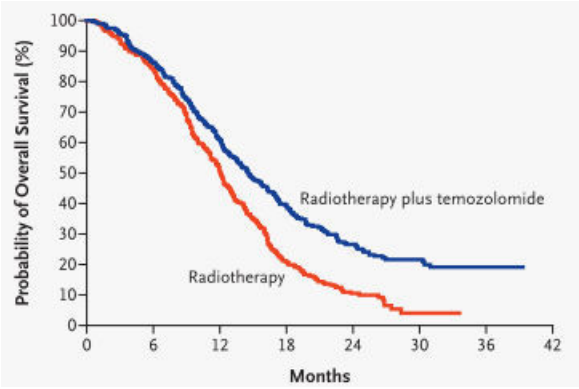


Figure 138. Courbe de Kaplan-Meyer estimant la survie globale des patients atteints de glioblastome selon le traitement administré [401].

L'Avastin, aussi connu sous le nom de **Bevacizumab,** appartient au groupe de médicaments que l'on appelle des antinéoplasiques. Son utilisation couplée à de la **chimiothérapie** a été approuvée en France pour le cancer colorectal [402]. Les études sur l'utilisation de cet anti-angiogénique pour traiter les glioblastomes se multiplient et certaines études montrent des effets bénéfiques [403]. Après deux études cliniques qui montrèrent que l'Avastin réduisait la taille de la tumeur chez certains patients atteints d'un glioblastome, l'*US food and drug Administration* l'a approuvé pour le traitement de certains cas de glioblastomes [404]. Cependant, les résultats des études, dans le cas de GBM, sur les effets de la chimiothérapie associée à l'Avastin ne sont pas significatifs par rapport à l'utilisation de l'Avastin seul. En effet, cette molécule réduit l'œdème cérébral mais n'a apparemment aucune action sur la tumeur en elle-même [387].

- ***La thérapie à base de protéines*** peut être également utilisée pour traiter les glioblastomes. Ce traitement a réellement pris de l'ampleur au début de l'année 2010 avec l'utilisation de la protéine APG101. Une étude a comparé l'efficacité du traitement combinant l'utilisation de l'APG101 associée à la radiothérapie par rapport à la radiothérapie seule. L'APG101 permet d'inhiber la croissance invasive des cellules cancéreuses, qui a pour conséquence de réduire également l'infiltration et la migration de ces cellules tumorales dans les parties saines [405].

- ***L'immunothérapie***

Les cellules tumorales expriment des antigènes qui peuvent être reconnus par le système immunitaire de l'hôte. Ces antigènes peuvent être injectés chez le patient porteur d'un cancer dans le but d'induire une réponse immune systémique pouvant résulter en la destruction des cellules cancéreuses dans différents tissus du corps [406]. Des études récentes rapportent l'utilisation de cellules dendritiques activées par des antigènes tumoraux pour traiter avec plus ou moins de succès des modèles murins de métastases cérébrales et de gliomes [407]. Quelques auteurs [408, 409] ont rapporté qu'une telle vaccination chez des patients porteurs de gliome malin provoque une cytotoxicité systémique et une infiltration cérébrale par des lymphocytes de type T. Une équipe de neurochirurgie de l'hôpital

universitaire de Louvain a publié ses résultats chez 56 patients présentant un glioblastome en récidive [410]. Ils ont montré que ce traitement peut induire une survie à long terme et que l'âge du patient ainsi qu'un volume tumoral résiduel minimal au moment de la vaccination sont des facteurs importants. Cette approche par immunothérapie apporte un bénéfice thérapeutique réel pour les patients jeunes ayant bénéficiés au préalable d'une résection chirurgicale macroscopiquement complète de leur glioblastome.

- ***La thérapie génique*** intervient dans la recherche de nouveaux traitements contre les GBM pouvant remplacer la radiothérapie et la chirurgie. Les premiers tests cliniques ont été menés en 1992. Trois approches ont été étudiées pour cette technique [411] :
  (1) la méthode du gène suicide consiste en un transfert de gènes rendant les cellules cibles sensibles à un médicament. L'objectif est l'activation spécifique uniquement au sein des cellules tumorales d'une pro-drogue non toxique pour former une drogue cytotoxique. Le principe est de transférer *in vivo*, dans les cellules tumorales, un gène codant pour une enzyme normalement absente du patrimoine des cellules. Cette enzyme a la capacité de transformer la pro-drogue non toxique en un métabolite toxique.
  (2) la thérapie faisant intervenir des cytokines telles que les interleukines. Le virus HSV (*Herpes simplex virus)* a été utilisé pour délivrer les interleukines IL-4, IL-10 et IL-12 dans des études précliniques. Ces dernières montrent une augmentation de la survie chez les souris implantées avec des tumeurs et traitées par IL-4 et IL-12 par rapport à des souris implantées aves des tumeurs non traitées [412].
  (3) la thérapie virale oncolytique : différents vecteurs ont été construits afin de cibler les molécules de régulation du cycle cellulaire. Ainsi, l'adénovirus ONYX-015, un virus oncolytique, a été utilisé dans une étude de phase I pour sa capacité à se répliquer spécifiquement dans les cellules présentant une altération de la voie p53. Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une phosphoprotéine nucléaire dont la fonction est altérée dans plus de 50 % des cancers humains [413].

La sécurité du traitement et des signes encourageants en termes de survie des patients avec une bonne qualité de vie ont été enregistrés.

- ***Les thérapies ciblées***

Le traitement des GBM échoue souvent car ce genre de tumeur est hautement résistant aux chimiothérapies conventionnelles et à la résection tumorale surtout en seconde ligne. La recherche sur les thérapies ciblées pourrait améliorer la prise en charge des patients en rechute et beaucoup de ces agents sont encore en phase d'essais cliniques. La plupart de ces agents sont de petites molécules inhibitrices de tyrosine-kinase (par exemple l'Erlotinib utilisé dans certains cas de carcinome pulmonaire et dans le carcinome du pancréas) ou des anticorps monoclonaux. Les tyrosine-kinases sont des enzymes impliquées dans divers processus biologiques comme la croissance, la différentiation, le métabolisme et l'apoptose. De récentes avancées ont montré le rôle clé de ces enzymes dans la pathophysiologie des cancers [414]. Les voies de l'oncogenèse ciblées incluent des facteurs de croissance tumorale (EGF-*Epidemial Growth factor*, PDGF-*Platelet Derived Growth Factor*, etc), l'angiogenèse (VEGF-*Vascular Endothelial Growth Factor*) et des signalisations intracellulaires (voie PI3/Akt, protéasome, etc). Les molécules et leurs cibles sont résumées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Thérapies ciblées pour le traitement des récidives de GBM ; exemples de molécules en essais cliniques [415].

Molécule	Cible	Essai clinique
Erlotinib	EGFR	Phase II
Lapatinib	EGFR, ErbB2	Phase II
Sunitinib	PDGFR, VEGFR, c-Kit	Phase II
Imatinib	PDGFR, c-Kit, BCR-ABL	Phases I et II
Sirolimus	Inhibiteur de mTor	Phase II
Everolimus	Inhibiteur de mTor	Phase II
Bortezomib	Inhibiteur du protéasome	Phase II

BCR-ABL : gène de fusion ayant une forte activité tyrosine kinase ; c-Kit : *Mast/stem cell growth factor receptor* (SCFR), aussi connue sous les noms de tyrosine-protein kinase Kit ou CD117 ; ErbB2 : *Receptor tyrosine-protein kinase* ; mTor : cible de la rapamycine chez les mammifères.

Les thérapies ciblées demeurent à un stade expérimental et leur efficacité reste très modeste au vue des premiers résultats observés. Le coût de ces molécules et le manque de preuve d'efficacité montrent que ces traitements ne trouveraient leur intérêt que dans une population plus restreinte. Seules les molécules ciblant l'angiogenèse ont à ce jour donné des résultats prometteurs dans la prise en charge des récidives de GBM [416].

• La **PDT** est devenue une technique intéressante pour le traitement par la lumière des tumeurs cérébrales [417]. La PDT est une thérapie qui a un grand potentiel en s'associant avec la chirurgie des tumeurs malignes du cerveau [418-420]. La combinaison d'un diagnostic par fluorescence avec la résection de la tumeur peut améliorer le traitement. Cette technique constitue une approche intéressante soit pour augmenter les chances de contrôle local, soit dans les cas où la localisation rend l'exérèse impossible. Ainsi, Kostron et al. ont montré que la résection guidée par fluorescence (FGR) suivie par PDT peropératoire prolongeait significativement la survie des patients avec une tumeur maligne cérébrale [421]. Les photosensibilisateurs les plus utilisés pour traiter les tumeurs du cerveau en PDT sont actuellement l'ALA (acide 5-aminolévulinique), le Photofrin® et le Foscan®. La concentration de photosensibilisateurs accumulés dans les tumeurs atteint des ratios supérieurs par rapport à celle dans les cellules saines du cerveau [422]. L'acide 5-aminolévulinique (Gliolan®) est indiqué chez les adultes dans la visualisation des tissus malins au cours du traitement chirurgical du gliome malin (grade III et IV de l'OMS) [423]. Le motexafin gadolinium (MGd, Figure 139) est une texaphyrine (molécule de la famille des porphyrines) complexée avec le gadolinium (III). Cette texaphyrine est donc paramagnétique et peut être ainsi localisée au sein des tumeurs par IRM. Le MGd (ou Xcytrin®) est actuellement testé en essais cliniques de phase III pour le traitement des métastases du cerveau et de phase I aux Etats-Unis pour les tumeurs du cerveau tel que le GBM [424].

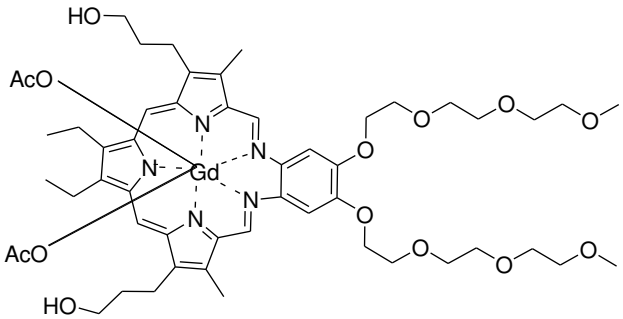


Figure 139. Structure du motexafin gadolinium.

D'autres études cliniques se déroulent actuellement pour évaluer le potentiel de plusieurs autres photosensibilisateurs de deuxième génération comme par exemple pour le BOPP (porphyrine portant un atome de bore) [425].

II LES MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPS)

II.1 Définition et classification

Les MMPs, ou matrixines, sont des enzymes activement impliquées dans la protéolyse de la matrice extra-cellulaire (MEC), c'est-à-dire qu'elles sont toutes capables de dégrader au moins un composant de la MEC [426]. Il existe 26 MMPs [427]. Tandis que la plupart des MMPs sont sécrétées dans la MEC environnante, certaines MMPs restent liées à la membrane cellulaire et sont appelées MMP de type membranaire (MT-MMP). Les MMPs peuvent être classées en six classes en fonction de leurs différences structurales, résumées dans le Tableau 17. Les MMPs ont été nommées selon leur substrat [428].

Tableau 17. Classification des MMPs [427].

MMPs sécrétées	Collagénases	Collagénase interstitielle Collagénase neutrophile Collagénase-3 Collagénase-4	MMP-1 MMP-8 MMP-13 MMP-18
	Matrylysines	Matrylysine-1 Matrylysine-2	MMP-7 MMP-26
	Gélatinases	Gélatinase A Gélatinase B	MMP-2 MMP-9
	Stromélysines	Stromélysine-1 Stromélysine-2 Stromélysine-3 Homologie à la stromélysine-2	MMP-3 MMP-10 MMP-11 MMP-27
	Autres MMPs	Matalloélastase du macrophage RASI 1 Enamélysine MMP identifiée sur le chromosome 1 MMP identifiée sur le chromosome 1 De l'ADNc ovarien Epilysine Pas de nom	MMP-12 MMP-19 MMP-20 MMP-21 MMP-22 MMP-23 MMP-28 MMP-29
MMPs membranaires	MT-MMPs	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP MT6-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24 MMP-25

II.2 Structure

Les MMPs possèdent des structures dont les séquences présentent des similitudes (Figure 140). Toutes les MMPs possèdent à leur extrémité *N*-terminale un **pré-domaine**, nécessaire à leur transport intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire qui est éliminé au cours de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique [429, 430]. Ce pré-domaine est suivi d'un **pro-domaine** responsable du maintien des MMPs sous forme inactive grâce à une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le **site catalytique** des MMPs [431]. Ce dernier est caractérisé par une séquence qui contient trois résidus histidine qui chélatent l'atome de **zinc** du site actif [432]. A l'exception de la MMP-7 et de la MMP-26 (matrilysine-l et -2), la plupart des MMPs possèdent un quatrième domaine *C*-terminal, le domaine de l'**hémopexine** [433]. Ce domaine est responsable de la liaison des MMPs à leurs substrats, ainsi qu'aux inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) [434]. En outre, la gélatinase A (MMP-2) et B

(MMP-9) contiennent, de plus, **un domaine de type II de la fibronectine** relié à leur domaine catalytique permettant à ces gélatinases de dégrader le collagène et l'élastine [435, 436].

Ainsi, toutes les MMPs sont secrétées dans le milieu extracellulaire, excepté les six d'entre-elles qui sont ancrées dans la membrane plasmique soit :

- *via* un **domaine transmembranaire hydrophobe** localisé à leur extrémité C-terminale suivie par un court **domaine cytoplasmique** qui sert pour la transduction de signal intracellulaire (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP).
- *via* un **groupement GPI** (*Glycosyl Phosphatidylinositol*) (MT4-MMP et MT6-MMP) [437].

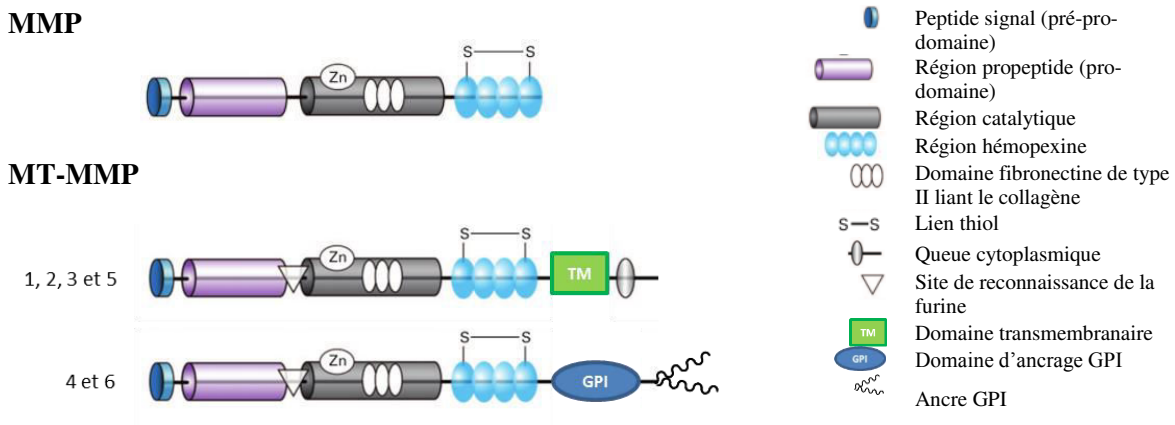


Figure 140. Schéma de la structure des domaines des deux types de MMP adapté de la référence [438].

II.3 Action dans la progression tumorale

Les MMPs semblent être mobilisées tout au long des phases initiales de la progression tumorale (prolifération, survie, angiogenèse, invasion et réponse immunitaire), comme l'illustre la Figure 141. Elles seraient ainsi impliquées dans la régulation de la croissance de la tumeur en libérant des facteurs de prolifération cellulaire, tels que le facteur de croissance de type insuline (IGF) [439]. Elles pourraient aussi activer les précurseurs de facteurs de croissance liés à la membrane cytoplasmique ou présents dans la matrice extracellulaire péritumorale [440].

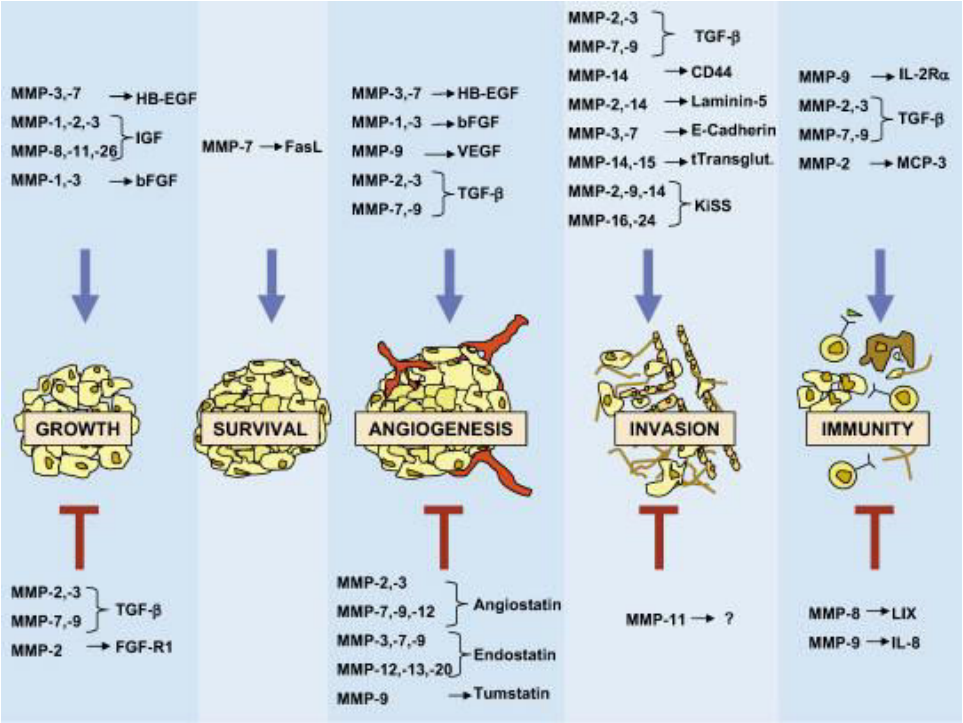


Figure 141. Dualité fonctionnelle des MMPs au cours de la progression tumorale. Le symbole bleu indique une activité pro-tumorale, alors que le symbole rouge indique un effet anti-tumoral [441].

La cellule cancéreuse, comme toutes les cellules de l'organisme, est extrêmement dépendante de son apport énergétique en oxygène et en nutriments pour croître. Pour se développer, les tumeurs, dès qu'elles atteignent 1 à 2 mm^3 manquent de nutriments et d'oxygène (1) et sécrètent de nombreuses cytokines (2). Ces cytokines vont aller rejoindre les vaisseaux environnants, stimulant les cellules endothéliales (CEs) qui constituent le vaisseau. Pour ce faire, des métalloprotéases situées à la périphérie des CEs vont dégrader la matrice extracellulaire (3,4) permettant aux CEs de se frayer un chemin et de migrer jusqu'à la tumeur (5). La formation d'un nouveau réseau de vaisseaux sanguins permet à la tumeur de retrouver l'énergie et l'oxygène nécessaire à sa croissance et à son expansion dans les tissus avoisinants (6, 7) (Figure 142) [442].

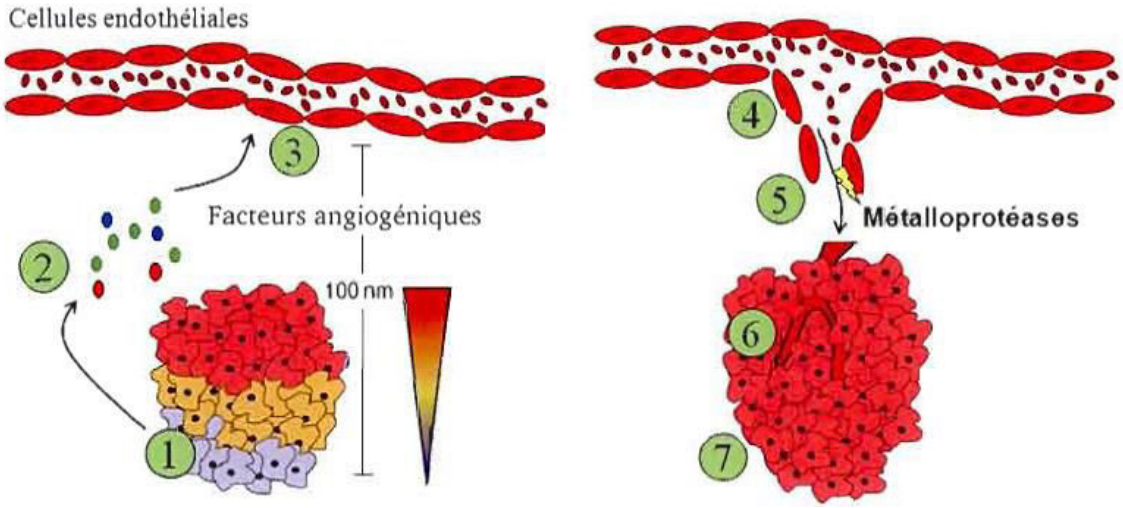


Figure 142. L'angiogenèse tumorale [442].

Une corrélation générale entre les niveaux d'expression des MMPs et la progression tumorale a été observée à plusieurs reprises. Le rôle crucial des MMPs dans l'invasion tumorale et la formation des métastases a encouragé le développement d'agents thérapeutiques pouvant inhiber la synthèse ou l'activité de ces enzymes afin de prévenir ou diminuer la progression des cancers [443, 444]. Dans cette optique, les MMPs ancrées dans la membrane sont plutôt attrayantes du fait de la présence du domaine cytoplasmique pouvant avoir des impacts sur des voies de signalisation menant à la malignité. En raison de leur localisation membranaire, ces enzymes jouent un rôle unique par rapport aux MMPs sécrétées dans la dégradation localisée de la MEC.

La MT1-MMP est une des MMPs membranaires la plus étudiée comme contributeur au processus d'invasion tumorale et dans la formation de métastases [445]. Il a été démontré que la MT1-MMP participe aux mécanismes impliqués dans la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans les cellules tumorales cérébrales [446]. L'expression de la MT1-MMP et l'activation de la proMMP-2 ont été observées et corrélées dans plusieurs types de tumeurs, dont le poumon, l'estomac, le côlon, le foie, le sein, la vessie, la tête et le cou, la thyroïde, les ovaires, le cervelet et le cerveau. Des transcrits de cette protéase ont été trouvés dans les cellules tumorales et les cellules stromales les entourant [447-449]. Le niveau d'expression de la MT1-MMP est directement lié au taux d'invasion et à l'agressivité des tumeurs [450]. Jusqu'à présent, la MTl-MMP est la seule MMP qui a été trouvée comme étant essentielle pour la survie [447].

Le ciblage d'une ou plusieurs MMPs semble être une piste prometteuse pour le traitement des GBM. Tout particulièrement, les MMP-2, MMP-9 et leur activateur la MMP-14 sont impliqués dans la migration et l'invasion des cellules humaines du GBM [451-454]. Des essais cliniques en phase II utilisant un inhibiteur de MMPs, le marimastat, en accompagnement de la chimiothérapie (témozolomide, Figure 137), ont été réalisés sur des patients ayant un GBM. Tandis que le traitement par chimiothérapie utilisant le temozolomide présente un taux de survie à 6 mois (sans progression) de 21%, le traitement combinant temozolomide et marimastat montre un taux de survie à 6 mois (sans progression) de 39%. Même si il est assez difficile de comparer deux études cliniques en phase II, ces résultats suggèrent que la combinaison d'un inhibiteur de MMPs avec une chimiothérapie cytotoxique conventionnelle peut être bénéfique [455, 456].

Se concentrer sur l'activité de la MMP-14 (aussi appelée MT1-MMP) semble être une piste très intéressante car cette MMP-14 joue un rôle central dans le remodelage de la MEC en tant que protéase membranaire capable d'activer d'autres MMPs : la MMP-2 et la MMP-13 [454]. L'expression de la MT1-MMP dans les cellules du mélanome est associée à l'activation de la MMP-2 et augmente le développement et la vascularisation de la tumeur [457]. Outre ce rôle d'activatrice, beaucoup de nouvelles fonctions de la MT1-MMP ont été récemment associées à l'angiogenèse des prostaglandines PGE_2 induites, à la mobilisation des plaquettes de calcium, à la régulation des signaux proinflammatoires et la radiorésistance dans les cellules du gliome et les cellules endothéliales [458]. Des études de Nakada et al. [459] ont montré que le taux de MT1-MMP augmentait avec l'augmentation du grade pathologique dans les tumeurs astrocytaires. Les investigations de Guo et al. [460] ont prouvé que le niveau d'expression de la MT1-MMP corrèle positivement avec les gliomes malins grâce à des spécimens de gliomes de différents grades pathologiques.

Les rôles cruciaux qu'exerce la MT1-MMP à différents niveaux de la progression tumorale, ainsi que son implication dans la résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie, font de cette enzyme un candidat pour le développement de médicaments anticancéreux.

II.4 Membrane-type 1 (MMP 14)

La plupart des MMPs sont des enzymes protéolytiques synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, appelés **zymogènes**. Leur activation nécessite le clivage de leur prodomaine par des protéinases et peut être inhibée par différents inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP). La MT1-MMP peut activer la proMMP-2, la proMMP-13 et, indirectement, la proMMP-9 [447, 461].

L'activation de la MMP-2 est uniquement observée à la membrane plasmique des cellules et fait intervenir la MT1-MMP. Le processus d'activation est basé sur la formation d'un complexe trimoléculaire entre MT1-MMP, TIMP-2 et proMMP-2 qui se forme à la surface des cellules. Dans un premier temps, une molécule de MT1-MMP se lie *via* son domaine catalytique au domaine *N*-terminal de la TIMP-2. Le complexe MT1-MMP/TIMP-2 sert alors de récepteur pour la proMMP-2 [462] : l'interaction entre ces deux molécules s'accomplit *via* le domaine *C*-terminal du TIMP-2 et le domaine hémopexine de proMMP-2. Une fois le complexe MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2 formé, une deuxième molécule de MT1-MMP avoisinante active et libre, clive la proMMP-2 en position Asn^{37}-Leu^{38} de son prodomaine. Dans un deuxième temps, la liaison Asn^{80}-Tyr^{81} du prodomaine de MMP-2 est clivée soit par auto-clivage, soit par action de la plasmine [463] ou d'autres MMPs actives (MMP-l, -2 et -7), afin de générer la forme active de la MMP-2 [464].

L'ancrage de la MT1-MMP à la membrane cellulaire est requis pour son activité invasive. Lorsque les cellules sont stimulées et migrent, la MT1-MMP est relocalisée dans les **lamellipodes**, tel qu'illustré dans la Figure 143 [465-467]. Cette localisation polarisée semble particulièrement adéquate pour l'invasion des tissus par les cellules. En effet, la concentration des MT1-MMPs dans les lamellipodes au front de migration [466, 467] permet une régulation spatiotemporelle de la protéolyse de la MEC, facilitant l'invasion par les cellules tumorales et les cellules endothéliales [468].

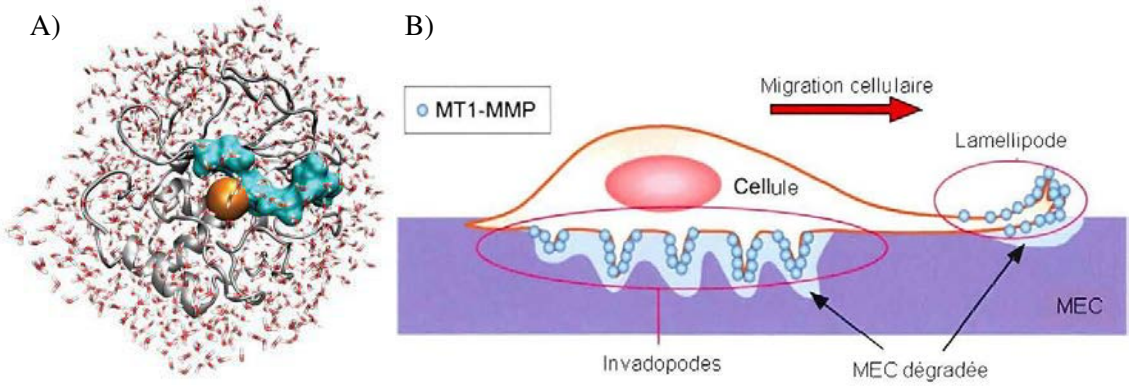


Figure 143. A) MT1-MMP humaine (en gris, domaine catalytique, résidus 114-291) entourée de molécules d'eau (*sticks* rouge et blanc) et liée à un substrat peptide (en cyan). L'ion catalytique zinc est représenté par une sphère orange [469]. B) Localisation de la MT1-MMP dans la migration cellulaire [442].

II.5 Mécanisme d'action : la coupure protéolytique

Les **peptidases** (ou **protéases** ou **enzymes protéolytiques**) sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. On parle alors de coupure protéolytique ou de protéolyse. Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau, ce qui les classe parmi les hydrolases. Les zymogènes sont en général activés par une coupure protéolytique qui libère l'enzyme fonctionnelle et déclenche ainsi l'activité. Il existe ainsi des processus de protéolyse en cascade, en particulier dans la coagulation.

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles mécanistiques, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. On distingue ainsi :

- Les **protéases à sérine** qui possèdent une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine (d'où leur nom), une histidine et un acide aspartique. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique. Parmi les protéases à sérine, on peut citer :
    - la trypsine du pancréas, spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine,
    - la chymotrypsine du pancréas qui s'attaque à des liaisons peptidiques où le carboxyle engagé est un acide aminé hydrophobe ou aromatique,
    - la thrombine qui clive le fibrinogène en fibrine lors de la coagulation sanguine,
    - les activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) ou urokinase (uPA) sont des protéases à sérine capables de cliver le plasminogène pour le transformer en sa forme active, la plasmine (sérine-protéase jouant un rôle important dans la protéolyse matricielle). La tPA est retrouvée essentiellement durant les phases précoces de la progression tumorale alors que l'uPA intervient lors de la dissémination métastatique.

- Les **protéases à thiol** qui possèdent une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné. Parmi les protéases à thiol, on peut citer :
    - la papaïne, protéine végétale spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est un acide aminé basique, aromatique ou apolaire,
    - les caspases, protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée.

- Les **protéases acides** agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique sur leur site actif. Par exemple :
    - la pepsine : spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique (fonction amine),
    - la protéase du VIH-1.

- Les **métalloprotéases** qui possèdent un cation métallique, en général un atome de zinc, fixé fortement à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique. Par exemple :
    - la thermolysine,
    - les protéases de la matrice extracellulaire.

- Les **protéases à thréonine** (ou thréonine protéases).
- Les **protéases à acide glutamique** [470].

Seul le mécanisme d'action de la famille des métalloprotéases sera décrit dans cette thèse. Plusieurs études ont été menées afin de déterminer le mécanisme réactionnel de protéolyse par les MMPs. Ces études suggèrent que le carbonyle de la liaison peptidique scissile réagit avec le site actif comprenant l'ion Zn(II). Ce carbonyle est attaqué par une molécule d'eau qui est à la fois : (i) liée par liaison hydrogène à un acide aminé **1** de la MMP et (ii) complexée à la l'atome de Zn (II). Durant ce processus, la charge positive de l'ion Zn(II) aide à stabiliser la charge négative du carbone de la liaison peptidique scissile et un acide aminé **2** aide à stabiliser la charge positive de l'atome d'azote de la liaison peptidique scissile [471-474].

La Figure 144 décrit schématiquement le mécanisme réactionnel de protéolyse par les MMPs.

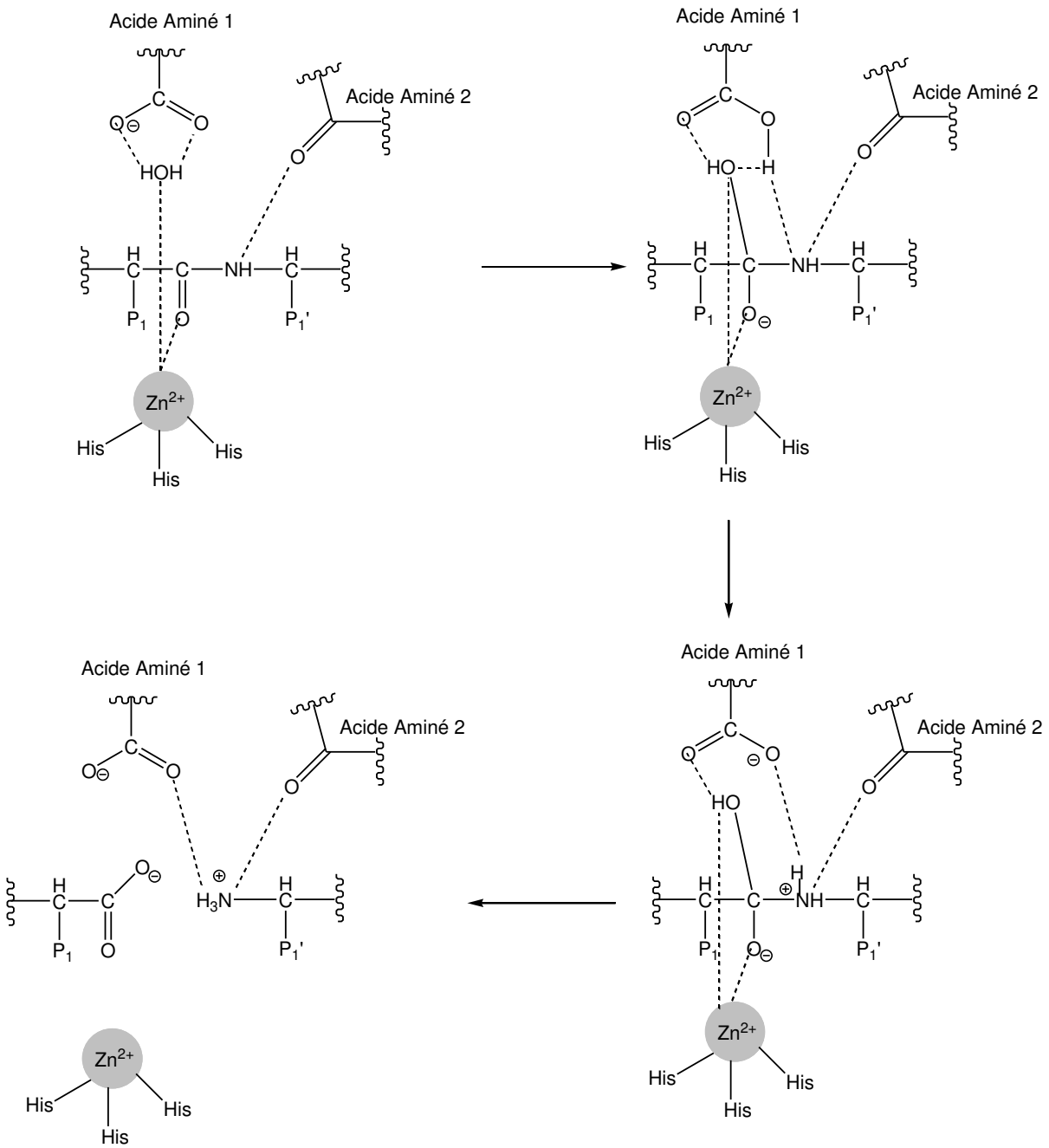


Figure 144. Mécanisme réactionnel pour le clivage d'un peptide par les MMPs, adapté des références [472, 473].

II.6 Peptides spécifiques de la MT1-MMP

Différents peptides sont clivés par la MT1-MMP et sont répertoriés dans le Tableau 18. Le peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH a été choisi pour notre étude pour deux raisons :

1 - Kridel et al. [475] ont répertorié une liste de plusieurs peptides clivés par les MMP-2, MMP-9 et la MT1-MMP et les ont classés selon leur aptitude à être hydrolysé. Le peptide H-SGRIGFLRTA-OH a montré les meilleurs taux d'hydrolyse pour les trois MMPs. Ce peptide est sélectif de la MT1-MMP : le taux d'hydrolyse est en effet de 88 % pour la MT1-MMP contre 30 % et 18 % respectivement pour la MMP-2 et la MMP-9. Le site de clivage se trouve entre la phénylalanine (F) et la leucine (L).

2 - Zhu et al. [476] ont synthétisé une sonde fluorescente spécifique de la MT1-MMP (Figure 145), Cy5.5-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH, de structure similaire du *photodynamic molecular beacon* envisagé dans notre étude. La cystéine 5.5 et le BHQ-3, un *quencher*, sont liés par le peptide spécifique de la MT1-MMP, le H-GRIGFLRTAKGG-OH. Le clivage de ce composé a été observé. Le site de clivage est le même que pour le peptide de Kridel et al. : il se trouve entre la phénylalanine (F) et la leucine (L).

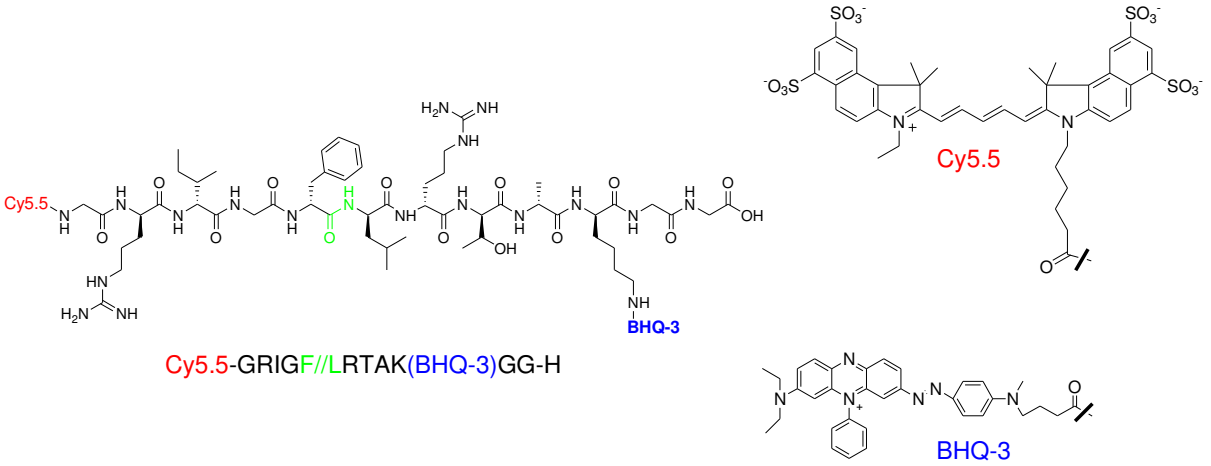


Figure 145. Structure chimique de la sonde fluorescente spécifique de la MT1-MMP synthétisée par Zhu et al. [476]. Cy5.5 : Cyanine 5.5 ; BHQ-3 : *Black hole quencher* – 3.

Dans cette thèse, il a donc été décidé d'utiliser le peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH comme lien peptidique spécifique de la MT1-MMP pour la synthèse des différents *photodynamic molecular beacons*.

Tableau 18. Liste des peptides clivés par la MT1-MMP.

MMP	Peptide	Référence
MMP-14	SGRIGF//LRTA	[475]
MMP-2 et 9 MMP-14	WLPSSI RLPLGI	
MMP-2 MMP-14	LLGLRN QLLGFL	
MMP-9 MMP-14	VASGIY YAPYGL	
MMP-14	GRIGF//LRTAKGG	[477]
MMP-14	RRKR//Y	[478-480]
MMP-14	QQLY//GG QQLYG//G SDPSA//I	[480, 481]
MMP-14	PGPQG//IAGQR PGPG//LLGAPG//ILGLP	[482]
	DCYSG//DENPD	[483]
	PGIKY//LYLRN HIDEK//AFENV TVNEN//LENYY LEVNQ//LEKFD	[484]
	ITKRD//LALSE RRQ//LDP KRE//APS KRE//ITE RRE//LEP KRD//VHV RKV//LDC	[485]
MMP-14 MT-MMP 2 MT-MMP 3	CGPVP//VRAKI EAFTR//ANH//LNKLA	[486]
MMP-14	KGEYR//TNPED SSSER//SSTRG STSGG//YIFYT	[487]
MMP-14	PEPTG//LEATA GASQG//LLDRK	[488]
MMP-14	AVLPR//SAKELRCQC WAVEG//SGKSF (SLPI)* PALAA//YRLEDTF RDLSL//ISP//LA//QA//VRSSS	[489]
MMP-2 MMP-14	ISYGN//DALMP = APP-IP** (Clivage si Asp-N-treated APP-IP, sinon juste inhibition des MMPs) DVLAN//MISEP (Homme)	[490]
MMP-14	ALRRLLG//LFG RAARVLG//LET	[491]
MMP-14	mPEG-KLGWSRL//PLPG	[492].
MT1,2,3-MMP MMP-2,9	GPLG//IAG	[493]
MMP-14 MMP-2 (MMP-9)	GPLG//LRSW GPLP//LRSW	[494]

SLPI*= protein
APP-IP**= APP-(*beta-amyloid precursor protein) derived inhibitory peptide*.

III SYNTHESE DE NOUVEAUX PMBS COMME AGENTS DE CIBLAGE POUR LA PDT

III.1 Objectif du projet

Nous nous sommes concentrés sur la synthèse de PMBs, activables par clivage enzymatique, composés de deux entités : une partie photosensible et une partie inhibitrice, différentes et reliées entre elles par un peptide assurant une proximité spatiale (Chapitre 2 : III.3.c). Nous avons décidé de cibler les métalloprotéinases matricielles MMP-14 (MT1-MMP), qui contribuent au processus d'invasion tumorale et à la formation de métastases, cible intéressante pour le traitement des glioblastomes multiformes par thérapie photodynamique (voir parties précédentes du Chapitre 5). Ce ciblage se fait par utilisation d'un peptide substrat : H-GRIGFLRTAKGG-OH, décrit par Kridel et al. en 2002.

Nous avons souhaité étudier l'influence de plusieurs paramètres sur le clivage enzymatique du peptide substrat (Figure 146), qui sont :

1) l'ordre et la conformation des acides aminés de la séquence peptidique ;
2) la nature du PS ;
3) la position du PS dans la séquence peptidique ;
4) la distance entre le PS et le peptide ;
5) la nature du *quencher*.

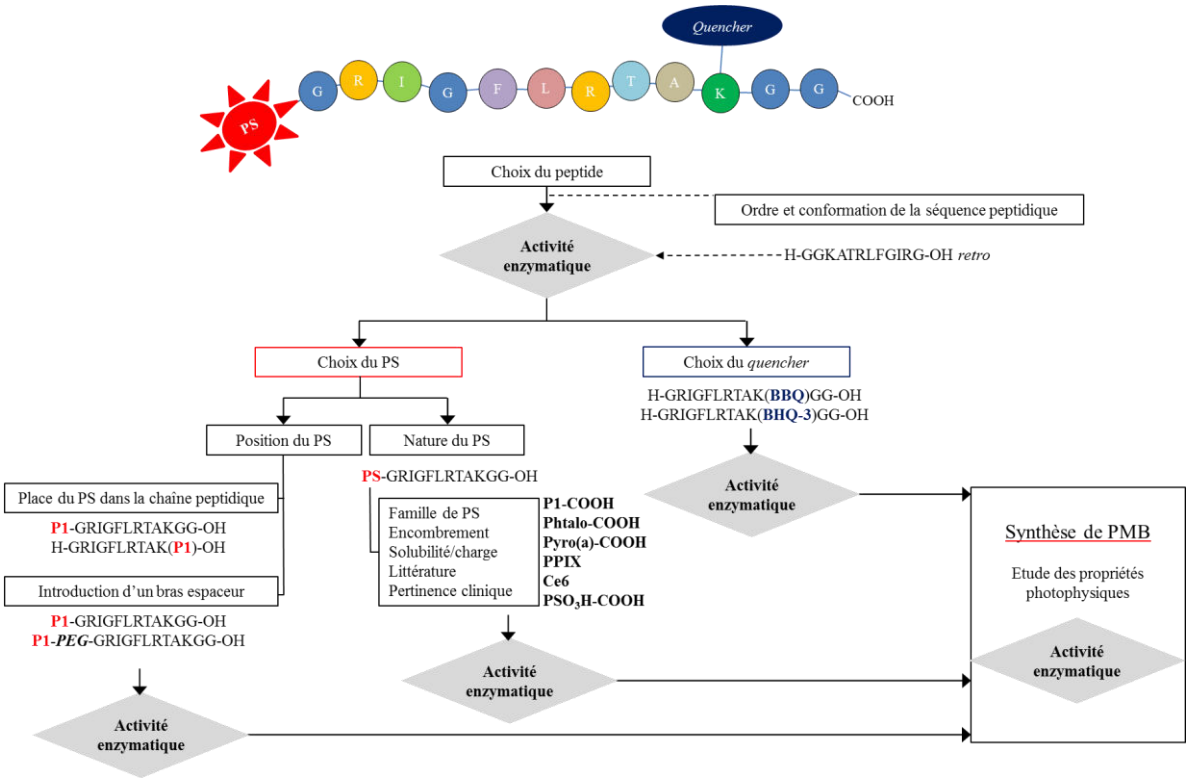


Figure 146. Représentation schématique du plan de ce chapitre.

Dans la suite de ce chapitre, nous rapportons la synthèse chimique détaillée, les propriétés photophysiques et l'activation enzymatique des différents peptides, des dérivés PS-peptide, peptide(*quencher*) et des différents PMBs.
Une alternative originale à la synthèse chimique consistant à utiliser le potentiel catalytique d'enzymes pour coupler le *quencher* à la lysine du peptide a été explorée. Les propriétés de sélectivité et de

spécificité d'enzymes telles que les lipases ou les acylases, devraient permettre de synthétiser le dérivé peptidique choisi en une seule étape en limitant la formation de produits secondaires.

Enfin, une étude des interactions de type non spécifique de la partie du PMB clivé contenant le PS avec un modèle de membrane cellulaire a été réalisée afin de conclure sur l'internalisation à travers les membranes de ces composés.

III.2 Le peptide substrat H-GRIGFLRTAKGG-OH

Nous avons tout d'abord souhaité vérifier les données de la littérature [475] à propos du clivage enzymatique du peptide choisi H-GRIGFLRTAKGG-OH, c'est-à-dire :

- déterminer les taux d'hydrolyse pour les MMP-2, -9 et -14 afin de confirmer que ce peptide est bien sélectif de la MMP-14 ;
- et déterminer le site de clivage (par analyse LCMS).

III.2.a Synthèse

Le peptide **H-GRIFGLRTAKGG-OH** est synthétisé par méthode classique sur phase solide en utilisant la stratégie Fmoc. La résine utilisée est une résine Wang sur laquelle la glycine (protégée Fmoc en *N*-terminal) est déjà liée *via* son extrémité *C*-terminale par une liaison ester. Le groupement protecteur Fmoc est éliminé par une solution 20% de pipéridine dans du DMF. Le couplage de chaque acide aminé (protégé Fmoc en *N*-terminal et dont la chaîne latérale est également protégée si elle est fonctionnelle) est répété deux fois à l'exception de la première arginine et de la première glycine, quatre et six couplages successifs étaient respectivement nécessaires. Les extrémités de ces acides aminés sont activées *via* leurs groupements carboxyle par l'utilisation d'un agent de couplage, le HBTU. Un mélange TFA/TIPS/eau (92,5/5/2,5 : v/v/v) permet de cliver le peptide de la résine et de le récupérer entièrement déprotégé (Figure 147).

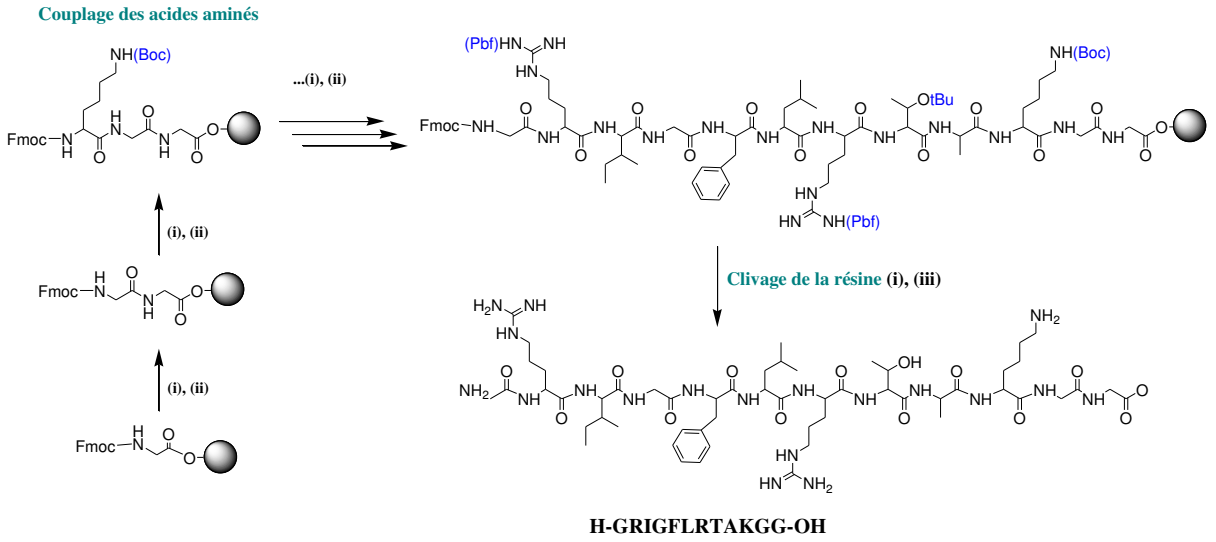


Figure 147. Synthèse du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau.

Le peptide de référence, **H-GRIFG-OH**, a été également synthétisé afin de déterminer les conditions HPLC à utiliser pour détecter le peptide parent et le peptide clivé. La même méthode est appliquée pour synthétiser le peptide H-GRIGF-OH, en utilisant une résine couplée à une phénylalanine.

La purification de ces deux peptides s'effectue sur phase inverse (C18).

Le peptide **H-GRIFGLRTAKGG-OH** est obtenu avec un rendement de 23 % tandis que le peptide **H-GRIF-OH,** possédant moins d'acides aminés, est obtenu avec un rendement de 38 %.

III.2.b Clivage enzymatique

III.2.b.i Généralités sur les tests de clivage

Nous avons étudié la capacité des MMP-2, MMP-9 et/ou MMP-14 actives à cliver les liens peptidiques des différents peptides, dérivés PS-peptide, peptide-(*quencher*) et PMB synthétisés.
Pour chaque composé étudié, quatre échantillons sont préparés :

- le composé (100 µM) sans enzyme ;
- le composé (100 µM) en présence de MMP-2 (7,5 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/13 333 ;
- le composé (100 µM) en présence de MMP-9 (6 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/16 666 ;
- et le composé (100 µM) en présence de MMP-14 (58 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/1 724.

Après incubation pendant 8h à 37°C, les échantillons sont analysés en HPLC avec détection UV-Vis (214 nm) et fluorescence (λ_{exc} = 256 nm et $\lambda_{ém}$ = 280 nm) pour étudier le clivage enzymatique (pour plus de détails, voir partie expérimentale). Une étude complémentaire en LCMS permet de vérifier ensuite le site de clivage.

III.2.b.ii Vérification du clivage du peptide substrat par les enzymes

Une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au peptide à 8,2 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 8,6 min après incubation avec les MMP-2 et les MMP-14 (Figure 148). Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 550 et $[M+2H]^{2+}$: 276 correspondant bien à une partie clivée du peptide, le H-GRIGF-OH. Comme attendu, les enzymes MMP-14 et MMP-2 clivent le peptide libre H-GRIGFLRTAKGG-OH entre la phénylalanine (F) et la leucine (L), avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-14. Nous n'avons pas pu détecter le clivage de ce peptide par la MMP-9. Le taux d'hydrolyse étant plus faible que pour les deux autres MMPs, dans les mêmes conditions, le composé H-GRIGF-OH s'il est formé, est en trop faible quantité pour être détecté en UV-Vis ou en fluorescence.

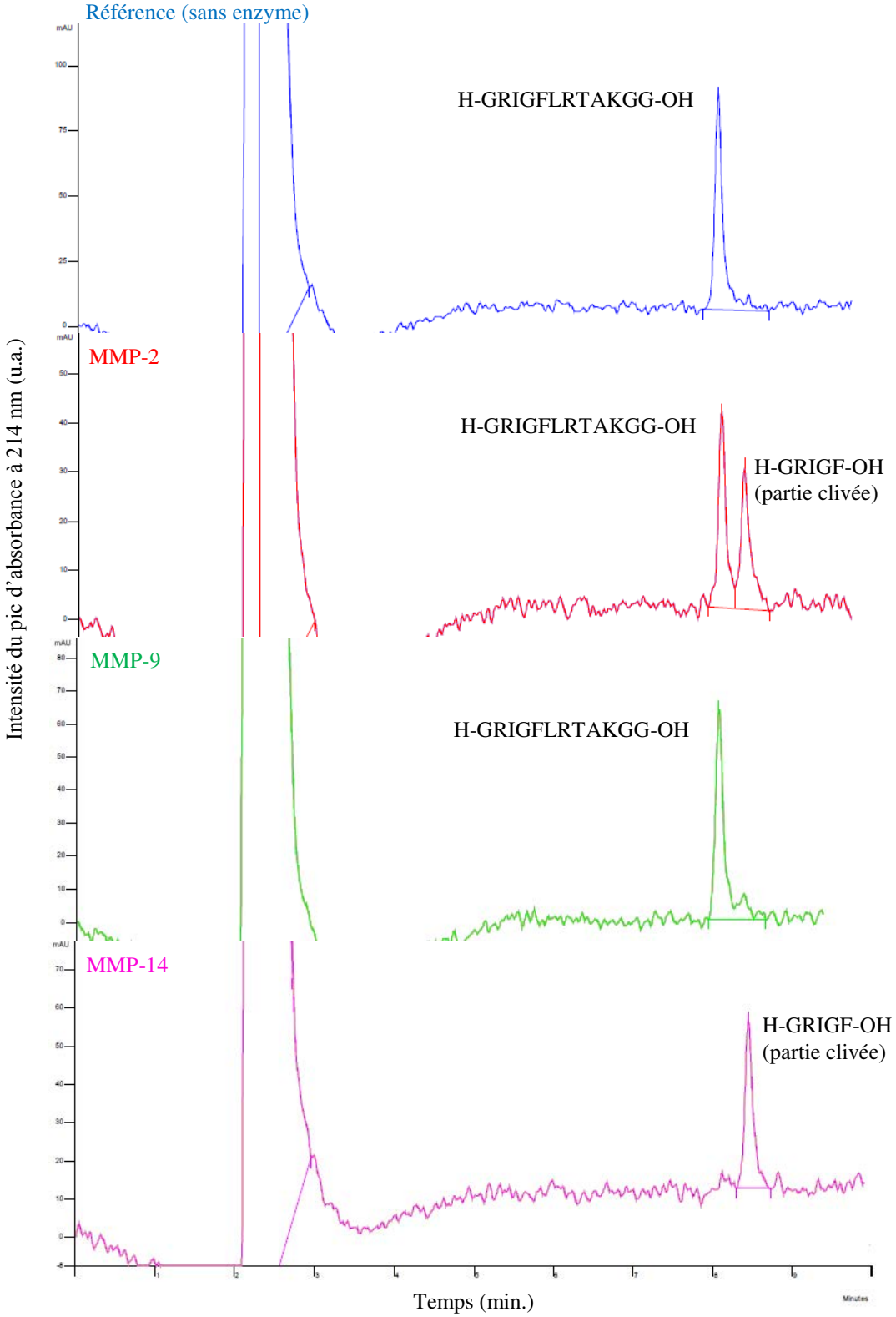


Figure 148. Chromatogrammes HPLC analytique du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

III.2.c Conclusion

Le peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH est bien sélectif de la MT1-MMP : le taux d'hydrolyse est en effet de 99 % pour la MT1-MMP contre 26 % pour la MMP-2 (Tableau 19). Le taux d'hydrolyse étant très faible pour la MMP-9, nous n'avons pu le déterminer dans les conditions de notre étude. Une analyse LCMS a permis de vérifier que le site de clivage se trouve entre la phénylalanine (F) et la leucine (L) comme décrit dans la littérature.

Tableau 19. Résultats des tests de clivage enzymatique pour le peptide parent.

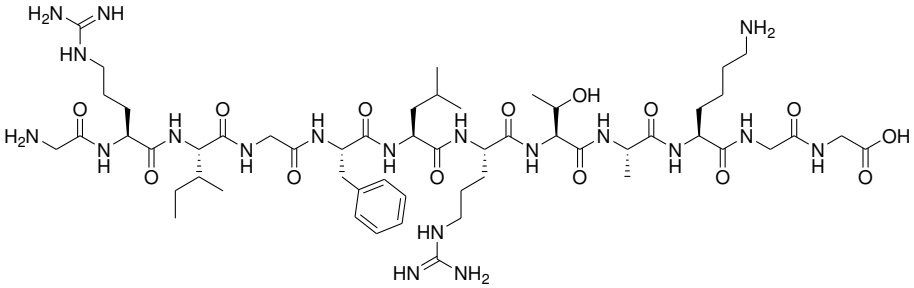
(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (99)**

III.3 Ordre et conformation des acides aminés dans la séquence peptidique

Nous avons souhaité connaître l'influence de l'ordre et de la conformation des acides aminés au sein de la séquence peptidique sur le clivage enzymatique du peptide. Le ***rétro*-peptide H-GGKATRLGFIRG-OH** (Figure 149) a été synthétisé : il est composé des mêmes acides aminés que le peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH mais l'ordre des acides aminés est inversé.

GRIGFLRTAKGG



GGKATRLFGIRG

retro

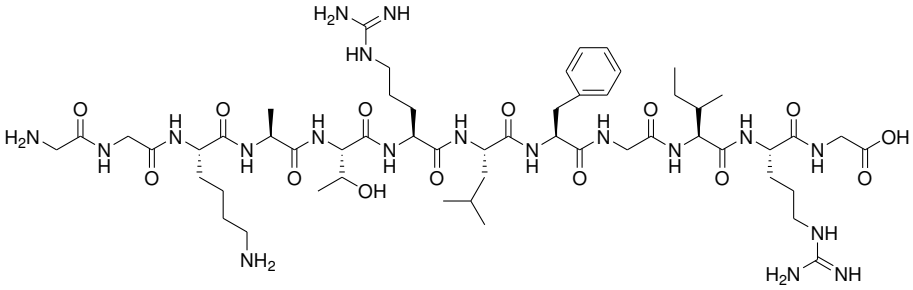


Figure 149. Structures chimiques du peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH et du *retro*-peptide H-GGKATRLFGIRG-OH.

III.3.a Synthèse des peptides

Le ***rétro* peptide H-GGKATRLGFIRG-OH** est synthétisé par la même méthode classique que son homologue, sur phase solide (SPPS) en utilisant la stratégie Fmoc, à une différence près, la seconde arginine a requis six couplages.

L'ordre de couplage des acides aminés semble influencer le rendement, le *rétro*-peptide **H-GGKATRLGFIRG-OH** est en effet obtenu avec un rendement de 60 %, soit trois fois celui du peptide correspondant.

III.3.b Clivage enzymatique

Le *rétro*-peptide H-GGKATRLFGIRG-OH n'est clivé que par les MMP-9 et -14 avec un taux d'hydrolyse plus important pour la MMP-14 (Figure 150). Comparé à celui du peptide, le taux d'hydrolyse pour les MMP-14 du *rétro*-peptide est plus faible. Une diminution de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au peptide à 13,1 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 12,4 min après incubation avec les MMP-9 et les MMP-14. Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 550 et $[M+2H]^{2+}$: 276 correspondant bien à une partie clivée du peptide, le H-FGIRG-OH. L'ordre de la séquence peptidique a un impact sur le clivage enzymatique mais pas sur le site de clivage.

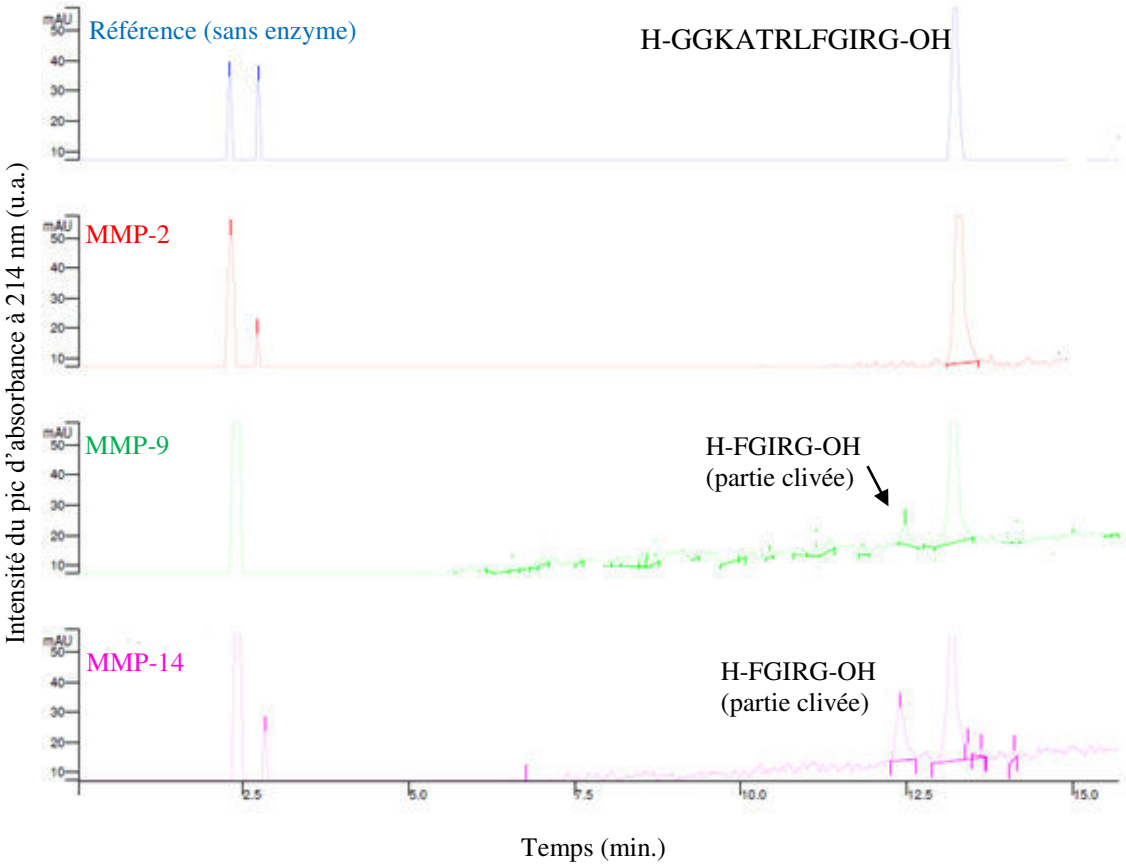


Figure 150. Chromatogrammes HPLC analytique du *rétro*-peptide H-GGKATRLFGIRG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

III.3.c Conclusion

Les résultats des tests de clivage des deux peptides sont résumés dans le Tableau 20.

Tableau 20. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les trois peptides étudiés.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (99)**
H-GGKATRL//FGIRG-OH, *rétro*-peptide	Non	**Oui (10)**	**Oui (33)**

Dans le peptide natif, les acides aminés de configuration L sont reliés par des liaisons -CO-NH- dans une séquence numérotée 1, 2, 3…, n à partir du *N*-terminal. Le *rétro* peptide contient lui des résidus L

mais dans une séquence inversée n, …, 3, 2, 1. Les acides aminés sont également reliés par des liaisons -CO-NH- mais la disposition spatiale des chaînes latérales n'est pas la même (Figure 151). Le clivage enzymatique diverge, cela est dû à la disposition spatiale des chaînes latérales.

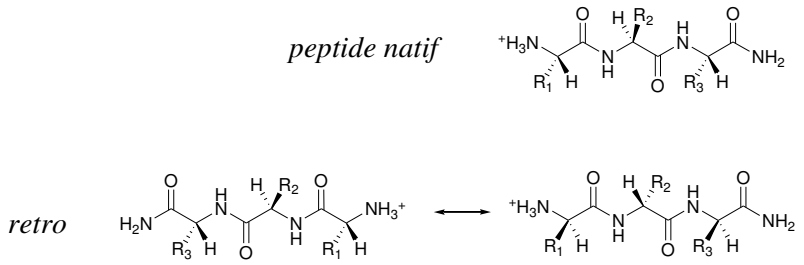


Figure 151. Structures simplifiées du peptide natif et du *rétro* peptide.

III.4 Effet du couplage d'un PS sur le peptide

Cette partie est consacrée à l'étude du couplage d'un PS (la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, P1-COOH, synthétisée au laboratoire) avec les peptides substrats précédents sur le clivage enzymatique de ces derniers.
Cette étude est divisée en plusieurs étapes :

(i) la synthèse des nouveaux composés **P1-GRIGFLRTAKGG-OH** et **P1-GGKATRLFGIRG-OH**,
(ii) l'étude photophysique des différents conjugués et principalement des parties du PMB correspondant clivé contenant le photosensibilisateur,
(iii) l'étude du clivage enzymatique des deux nouveaux conjugués synthétisés.

III.4.a Synthèse des dérivés « P1-peptide »

La synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine nommée P1-COOH a été décrite dans le Chapitre 3 (IV.1 Figure 102).
La synthèse du dérivé **P1-GRIGFLRTAKGG-OH** débute avec celle du peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH sur résine Wang comme décrite précédemment. Le couplage du photosensibilisateur (1,2 éq.) est effectué sur phase solide en présence de HBTU, de NMM et de NMP dans du DMF pendant 3 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un mélange TFA/TIPS/eau (92,5/5/2,5 : v/v/v) permet de cliver le dérivé PS-peptide de la résine et de le récupérer entièrement déprotégé (Figure 152).

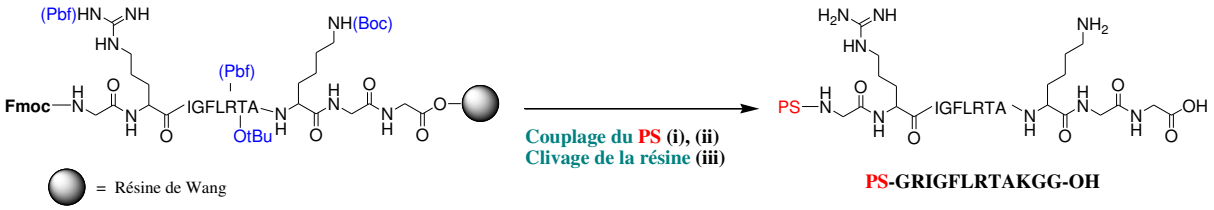


Figure 152. Schéma de synthèse des dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) PS-COOH, HBTU, NMM, DMF, 3 jours. (iii) Clivage : TFA/TIPS/Eau.

La synthèse du dérivé **P1-GGKATRLFGIRG-OH** débute avec celle du *rétro*-peptide sur résine Wang comme décrite précédemment. Le couplage de la P1-COOH et le clivage du dérivé de la résine s'effectue dans les mêmes conditions que pour le dérivé P1-GRIGFLRTAKGG-OH.

Le peptide de référence pour l'étude du clivage enzymatique **P1-GRIGF-OH** a été synthétisé de la même manière que les dérivés précédents. Par manque de temps, le composé **P1-GGKATRL-OH** n'a pu être synthétisé.

La purification de tous les dérivés s'effectue sur phase inverse (C18).

P1-GGKATRLFGIRG-OH est obtenu avec un rendement de 25 % et le dérivé **P1-GRIFGLRTAKGG-OH** avec un rendement de 22%. L'ordre de couplage des acides aminés ne semble pas influencer le rendement total. Le dérivé **P1-GRIGF-OH** est obtenu avec un rendement de 50 %, deux fois plus élevé que le dérivé P1-GRIFGLRTAKGG-OH : comme vu précédemment, le rendement final de synthèse pour un peptide de 12 acides aminés est plus faible que celui obtenu pour un peptide de 5 acides aminés.

III.4.b Propriétés photophysiques

Comme montré dans le Tableau 21, aucun changement significatif n'a été observé entre les propriétés photophysiques de la P1-COOH et des dérivés correspondants PS-peptide synthétisés. Les propriétés photophysiques du P1-GRIGFLRTAKGG-OH et du P1-GRIGF-OH sont les mêmes, la longueur de la séquence peptidique n'a donc aucune influence sur les propriétés d'absorption, d'émission de fluorescence et de formation d'$^1O_2$.

Les spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet correspondants à la P1-COOH, ainsi que les courbes de durées de vie de fluorescence et de production d'oxygène singulet, ont été montrés dans les deux précédents chapitres et ne seront pas redécrits ici.

Tableau 21. Propriétés photophysiques des dérivés PS-peptide dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm).

Composé	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_F (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
P1-COOH	645	4 276	0,10	0,64	10,0	14
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	645	3 606	0,11	0,67	10,2	16
P1-GRIGF-OH	645	4 262	0,10	0,66	10,1	15
P1-GGKATRLFGIRG-OH	645	4 642	0,09	0,66	10,2	15

ε : coefficient d'extinction molaire ; λ_{QI} : longueur d'onde de la bande Q_I ; ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

III.4.c Clivage enzymatique

Même si les peptides sont clivés par au moins deux des enzymes étudiées, les dérivés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et P1-GGKATRLGFIRG-OH ne sont malheureusement clivés par aucune de ces MMPs.

Les résultats des tests de clivage des dérivés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et P1-GGKATRLFGIRG-OH sont résumés dans le Tableau 22.

Tableau 22. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les dérivés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et P1-GGKATRLFGIRG-OH comparés à ceux des deux peptides correspondants.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (99)**
H-GGKATRL//FGIRG-OH, *retro*-peptide	Non	**Oui (10)**	**Oui (33)**
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	Non	Non
P1-GGKATRLFGIRG-OH	Non	Non	Non

III.4.d Conclusion

Le couplage du PS au peptide n'a aucune influence sur les propriétés photophysiques de ce dernier. Le composé P1-GRIGF-OH est parfaitement adapté à des applications en PDT en raison tout particulièrement de son rendement de production d'oxygène singulet élevé.
Une hypothèse à cette absence de clivage enzymatique pour les dérivés « P1-peptide » est l'encombrement stérique dû aux groupements phényls de la P1-COOH, empêchant le peptide d'accéder à la partie catalytique des enzymes.

III.5 Influence de la place du PS

Des solutions aux deux problèmes précédents ont été proposées et étudiées dans cette partie :

(a) Si la P1-COOH n'est plus couplée en bout de chaîne peptidique mais sur la chaîne latérale de la lysine du peptide, la conformation structurale du dérivé obtenu (H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH) permet-elle de restaurer le clivage enzymatique du peptide ?

(b) L'introduction d'un bras espaceur entre le peptide et la P1-COOH pourrait-il permettre de diminuer l'encombrement stérique autour du peptide et de retrouver ainsi le clivage enzymatique du peptide ?

III.5.a Place du PS sur la séquence peptidique

Pour cette étude, la porphyrine P1-COOH est couplée sur le NH_2 terminal ou sur le NH_2 de la chaîne latérale de la lysine du peptide spécifique, pour obtenir les dérivés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et **H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH**. La comparaison des propriétés photophysiques et du clivage enzymatique de ces deux dérivés permet de conclure sur une éventuelle influence de la place du PS sur la séquence peptidique.

III.5.a.i Synthèse

Les synthèses de la forme activée la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine, P1-NHS et du dérivé Fmoc-Lys(P1)-OH ont été décrites précédemment dans les Chapitre 3 (IV.1 Figure 102) et 4. (III.4. Figure 125).

Le composé **H-GRIFGLRTAK(P1)GG-OH** est synthétisé par SPPS. Le composé Fmoc-Lys(P1)-OH (2 éq.) est couplé comme les acides aminés protégés classiques durant la procédure SPPS, à l'exception que le couplage dans ce cas précis prend 5 jours et est protégé de la lumière. Le composé est enfin clivé de la résine Wang comme précédemment et récupéré entièrement déprotégé (Figure 153).

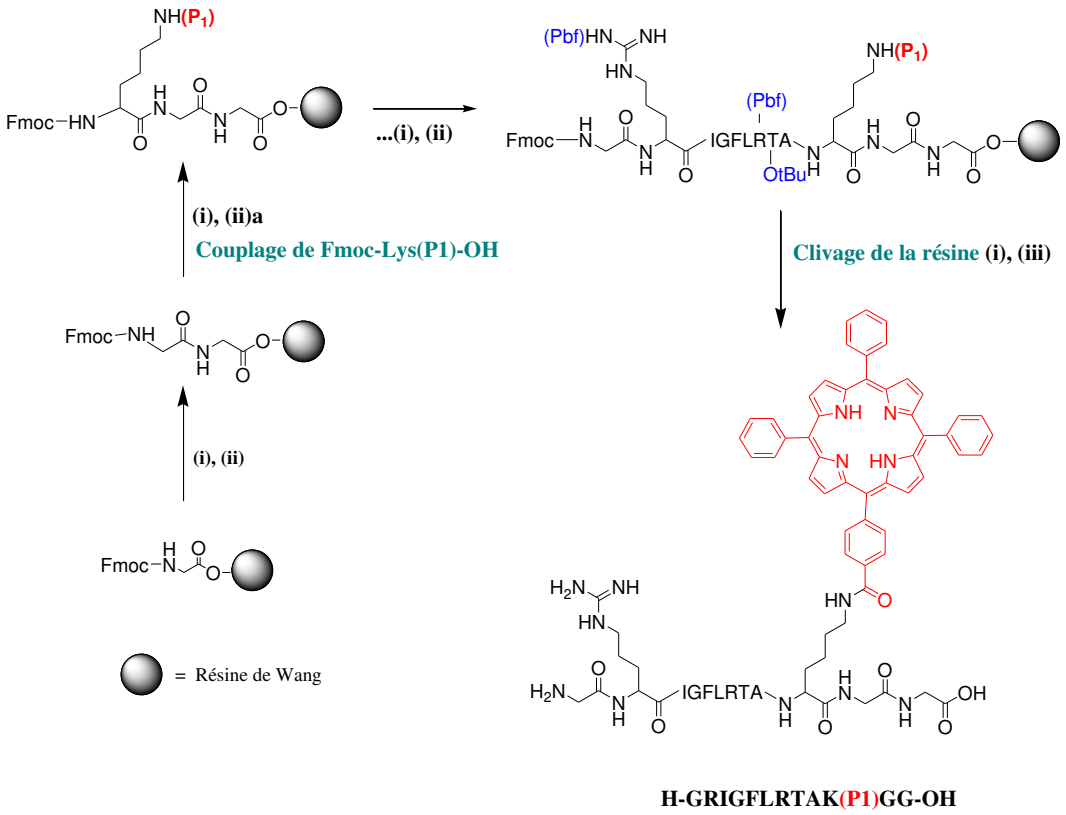


Figure 153. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (ii)a Fmoc-Lys(P1)-COOH, HBTU, NMM, DMF, 5 jours. (iii) Clivage : TFA/TIPS/Eau.

Le dérivé de référence pour l'étude du clivage enzymatique, **H-LRTAK(P1)GG-OH**, a été synthétisé de la même manière que le dérivé précédent.

La purification de tous les dérivés s'effectue sur phase inverse (C18).

H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH est obtenu avec un rendement de 17 % contre 22 % pour **P1-GRIFGLRTAKGG-OH**. L'utilisation directe de la Fmoc-Lys(P1)-OH comme un acide aminé protégé classique durant la procédure SPPS ne provoque pas une diminution significative du rendement de synthèse. **H-LRTAK(P1)GG-OH** a été obtenu avec un rendement de 13 %.

III.5.a.ii Propriétés photophysiques

Une étude photophysique des conjugués P1-GRIGF-OH et H-LRTAK(P1)GG-OH était nécessaire afin d'évaluer un éventuel effet de *quenching* par le peptide des caractéristiques photophysiques du PS, primordiales pour l'application en PDT.

Aucun changement significatif n'a été observé entre les propriétés photophysiques de la P1-COOH et des dérivés correspondants PS-peptide synthétisés.
Les spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet sont identiques pour les composés P1-GRIGFLRTAKGG-OH et H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH ainsi que pour les deux références associées P1-GRIGF-OH et H-LRTAK(P1)GG-OH ce qui signifie que les propriétés photophysiques des photosensibilisateurs ne changent pas, quelle que soit la position de celui-ci sur le peptide (Tableau 23).

Les spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet correspondants à la P1-COOH, ainsi que les graphes des durées de vie de fluorescence et de production d'oxygène singulet, ont été montrés dans les deux précédents chapitres et ne seront pas redécrits ici.

Tableau 23. Propriétés photophysiques des dérivés synthétisés dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm).

Composé	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_F (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
P1-COOH	645	4 276	0,10	0,64	10,0	14
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	645	3 606	0,11	0,67	10,2	16
P1-GRIGF-OH	645	4 262	0,10	0,66	10,1	15
H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH	645	4 347	0,09	0,61	10,1	18
H-LRTAK(P1)GG-OH	645	4 197	0,10	0,58	9,8	14

ε : coefficient d'extinction molaire ; λ_{QI} : longueur d'onde de la bande Q_I ; ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

III.5.a.iii Clivage enzymatique

Le dérivé H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH n'est pas clivé par les trois MMPs étudiées tout comme P1-GRIGFLRTAKGG-OH. La place du PS sur la séquence peptidique dans notre cas, n'influence pas la réponse des composés aux enzymes.

Le Tableau 24 résume les résultats des tests enzymatiques du peptide et des deux dérivés H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH et P1-GRIGFLRTAKGG-OH.

Tableau 24. Influence de la place du PS sur le clivage enzymatique.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (99)**
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	Non	Non
H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH	Non	Non	Non

III.5.a.iv Conclusion

Les propriétés photophysiques de P1-GRIGF-OH et H-LRTAK(P1)GG-OH sont parfaitement adaptées à des applications en PDT en raison tout particulièrement de leur rendement de production d'oxygène singulet élevé.

Le couplage de la P1-COOH sur la chaîne latérale de la lysine du peptide n'a pas permis de retrouver le clivage enzymatique du peptide. La raison viendrait d'un trop grand encombrement stérique dû à la structure de la molécule de P1-COOH.

III.5.b Introduction d'un bras espaceur (PEG) entre le PS et le peptide

L'introduction d'un bras espaceur entre le PS et le peptide de ciblage devrait donner quelques informations quant à l'influence de l'encombrement stérique. Il est à noter que le bras espaceur ne doit pas être long pour conserver le phénomène de *quenching*.

III.5.b.i Synthèse

Le **H-PEG-GRIFGLRTAKGG-OH** est tout d'abord synthétisé, pour connaître l'influence sur le clivage enzymatique de l'introduction d'un PEG. La synthèse de ce composé débute avec celle du peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH sur résine Wang comme décrite plus haut. Le couplage du bras espaceur protégé Fmoc-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-COOH (PEG) est effectué comme un acide aminé protéinogénique sur phase solide en présence de HBTU, de NMM et de NMP dans du DMF pendant 16 h. La protection Fmoc terminale du PEG est retirée avec une solution de pipéridine à 20% dans du DMF et le composé est clivé de la résine Wang comme précédemment (Figure 154).

Le composé **P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH** est obtenu en couplant dans un premier temps le PEG sur la fonction déprotégée N-terminale du peptide sur phase solide dans du DMF comme vu pour H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH. Après déprotection du groupement Fmoc terminal du PEG à l'aide d'une solution de pipéridine à 20 % dans du DMF, la P1-COOH est couplée sur la fonction NH_2 du PEG, toujours sur phase solide, en présence de HBTU, de NMM et de NMP dans du DMF pendant 3 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le composé est clivé de la résine Wang comme précédemment et récupéré entièrement déprotégé (Figure 154).

Les produits attendus du clivage par les MMPs, à savoir **H-PEG-GRIGF-OH** et **P1-PEG-GRIGF-OH**, sont synthétisés de la même manière à partir d'une Fmoc-Phe-Wang résine.

La purification de tous les dérivés s'effectue sur phase inverse (C18).

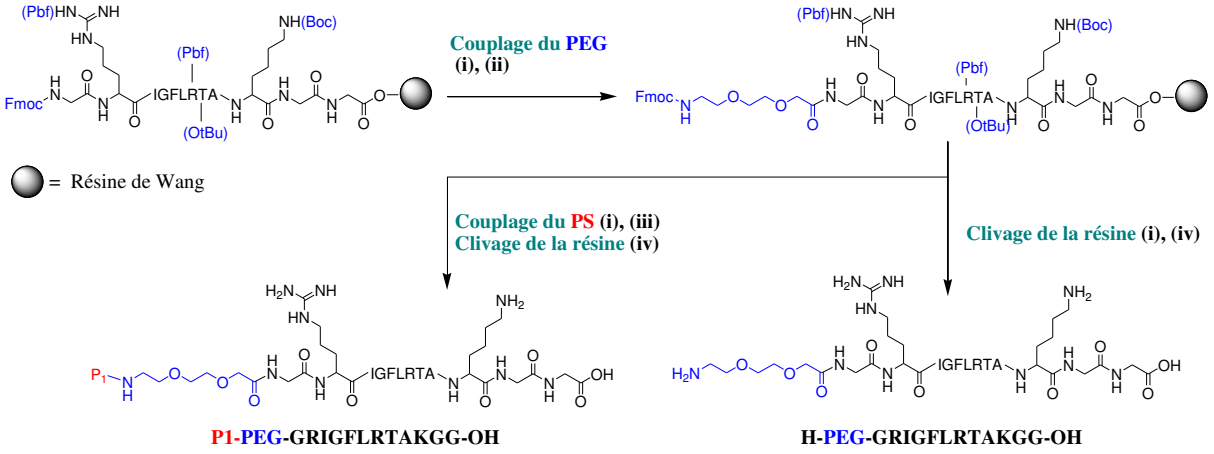


Figure 154. Synthèse du peptide H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH et du dérivé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Fmoc-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-COOH (PEG), HBTU, NMM, DMF, 16h. (iii) P1-COOH, HBTU, NMM, DMF, 3 jours. (iv) Clivage: TFA/TIPS/Eau.

Les rendements des différents composés synthétisés sont répertoriés dans le Tableau 25. Les rendements de synthèse diminuent lorsque l'on ajoute le bras espaceur PEG.

Tableau 25. Rendements η de synthèse des peptides et de leurs dérivés P1-peptide.

Composé	η (%)	Composé	η (%)
H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH	10	**H-GRIGFLRTAKGG-OH**	23
H-PEG-GRIGF-OH	26	**H-GRIGF-OH**	38
P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH	12	**P1-GRIGFLRTAKGG-OH**	25
P1-PEG-GRIGF-OH	38	**P1-GRIGF-OH**	50

III.5.b.ii Propriétés photophysiques

L'introduction d'un bras espaceur entre les peptides et la P1-COOH n'engendre pas de modification des propriétés photophysiques de la porphyrine (Tableau 26).

Les spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet correspondants à la P1-COOH, ainsi que les courbes de durée de vie de fluorescence et de production d'oxygène singulet, ont été montrés dans les deux précédents chapitres et ne seront pas redécrits ici.

Tableau 26. Propriétés photophysiques des dérivés P1-PEG-peptide dans l'éthanol (λ_{exc} = 414 nm).

Composé	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_F (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
P1-COOH	645	4 276	0,10	0,64	10,0	14
P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH	645	4 934	0,10	0,62	10,2	14
P1-PEG-GRIGF-OH	645	3 618	0,09	0,63	10,1	14

ε : coefficient d'extinction molaire ; λ_{QI} : longueur d'onde de la bande Q_I ; ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

III.5.b.iii Clivage enzymatique

Le couplage d'un PEG sur le peptide substrat améliore mais ne modifie pas le clivage enzymatique du peptide. Les trois enzymes actives étudiées clivent le peptide H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH entre la phénylalanine (F) et la leucine (L) avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-14 (100 %) que pour la MMP-2 (20 %) et enfin que pour la MMP-9 (1 %). Ces taux sont plus élevés que ceux pour le peptide substrat. Une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH à 7,9 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 8,4 min après incubation avec les MMP-2 et MMP-9. Dans le cas des MMP-14, seul ce dernier pic a été détecté. Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 694 et $[M+2H]^{2+}$: 348 correspondant bien à la partie clivée H-PEG-GRIGF-OH (Figure 155).

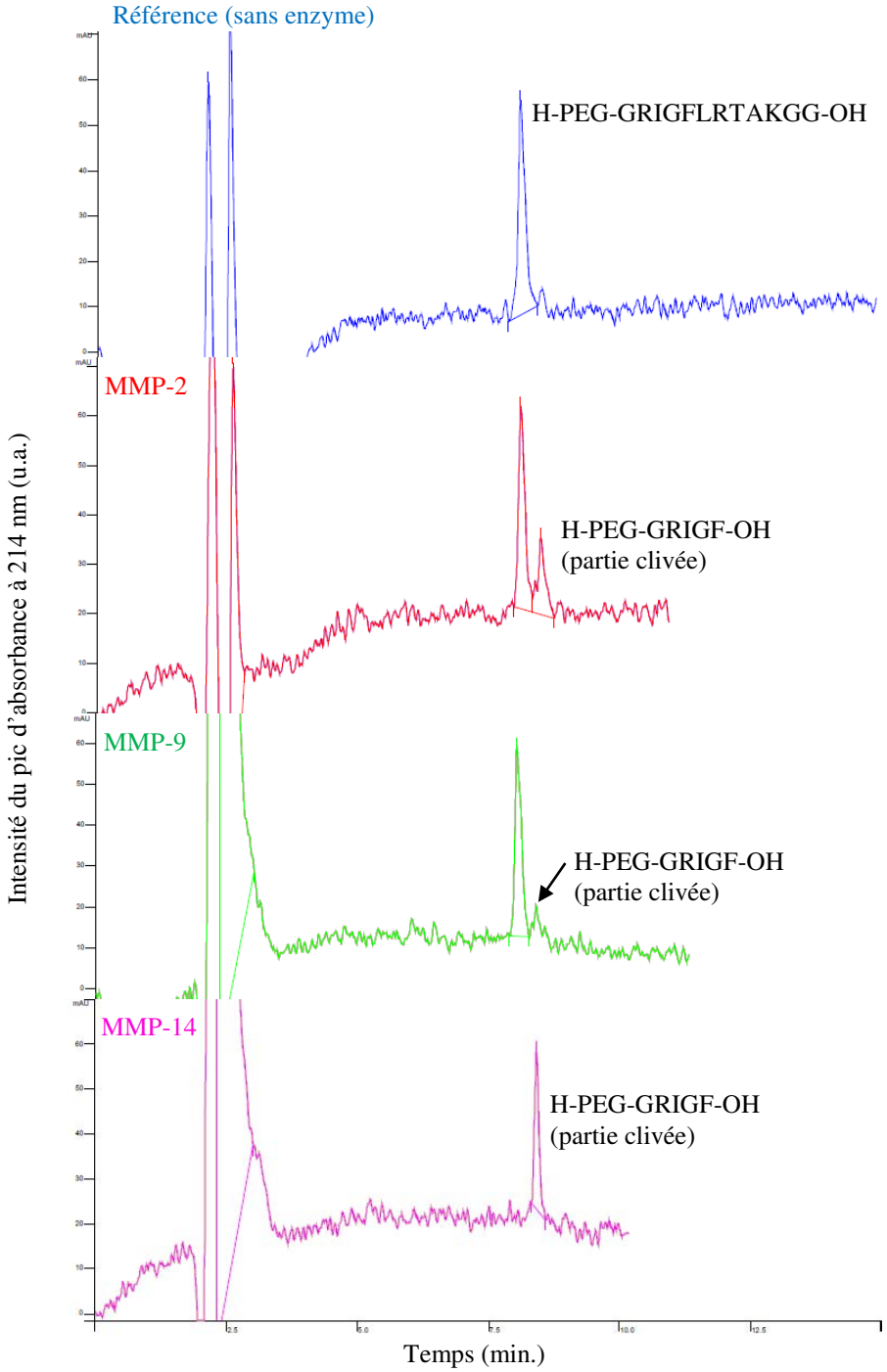


Figure 155. Chromatogrammes HPLC analytique du peptide H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 214 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Le composé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH est très faiblement clivé par les enzymes actives MMP-9 et MMP-2 avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-2. Ces taux d'hydrolyse sont pratiquement négligeables (2 et 3 %). Dans ces deux derniers cas, une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH à 18,5 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 20,5 min après incubation avec les MMP-2 et les MMP-9. Ce nouveau pic a pour masses $[M+2H]^{2+}$: 668 correspondant bien à la partie clivée P1-PEG-GRIGF-OH (Figure 156).

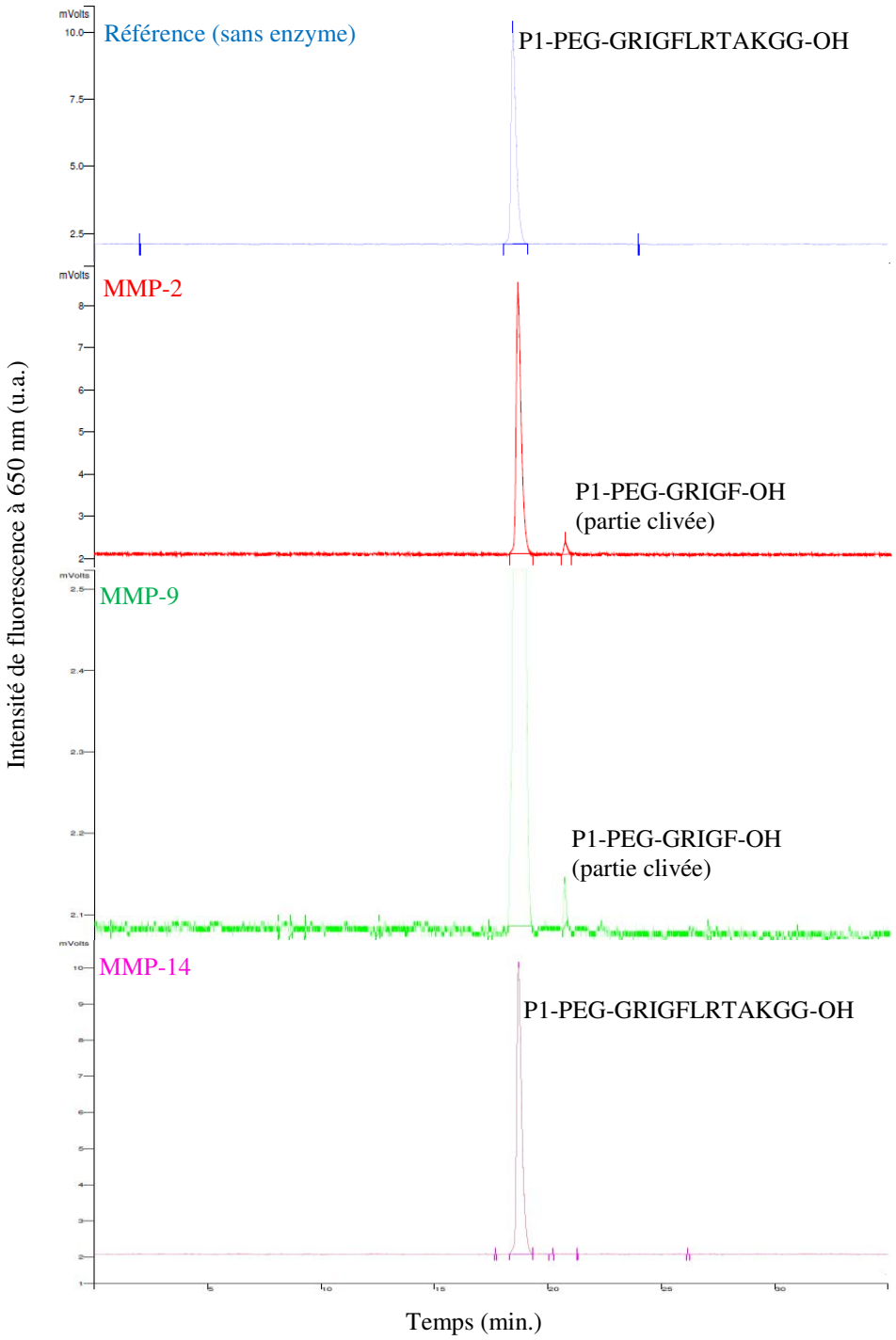


Figure 156. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

III.5.b.iv Conclusion

Les propriétés photophysiques du P1-PEG-GRIGF-OH sont parfaitement adaptées à des applications en PDT en raison tout particulièrement de son rendement de production d'oxygène singulet élevé.

Le Tableau 27 résume les résultats des tests de clivage enzymatique du peptide, du PEG-peptide et de leurs dérivés PS-peptide. L'introduction d'un bras espaceur entre le peptide et la P1-COOH a permis le clivage du composé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH par deux des enzymes étudiées. Le site de clivage reste le même que le peptide natif, entre la phénylalanine et la leucine. La spécificité du peptide pour les enzymes n'est pas la même : le P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH possède un taux d'hydrolyse le plus élevé pour la MMP-2 tandis que le peptide natif possède un taux d'hydrolyse le plus élevé pour la MMP-14.

Tableau 27. Influence de l'introduction d'un bras espaceur sur le clivage enzymatique.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (99)**
H-PEG-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (20)**	**Oui (1)**	**Oui (100)**
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	Non	Non
P1-PEG-GRIGF//LRTAKGG-OH	**Oui (3)**	**Oui (2)**	Non

L'introduction d'un bras espaceur entre le peptide et la P1-COOH permettrait ainsi de diminuer l'encombrement stérique autour du peptide et de retrouver un clivage enzymatique mais différent car non sélectif des MMP-14. De la modélisation moléculaire permettrait de mieux comprendre ce phénomène. Une étude de l'influence de la taille du PEG entre le PS et le peptide sur le clivage enzymatique du peptide pourrait venir compléter ce travail. Il serait intéressant de savoir à partir de quelle taille, le dérivé synthétisé P1-$(PEG)_n$-GRIGFLRTAKGG-OH possède des taux d'hydrolyse identiques à ceux du peptide seul.

III.6 Influence de la nature du PS

La question à ce stade est de savoir si l'encombrement stérique est la seule cause de la perte du clivage enzymatique. Le problème ne viendrait-il pas de la solubilité du dérivé, de sa charge, de son appartenance à une famille précise de PS… ?
Aussi, cette partie est-elle ainsi consacrée à l'étude de l'influence de la nature du PS sur le clivage enzymatique des MMPs sur les conjugués.
Ce travail est divisé en plusieurs étapes :

(i) la synthèse des PS choisis et des nouveaux composés **PS-GRIGFLRTAKGG-OH**,
(ii) l'étude photophysique des six conjugués et en particulier les fragments du PMB comportant le photosensibilisateur,
(iii) la détermination du clivage enzymatique des dérivés synthétisés.

III.6.a Choix du PS

Les photosensibilisateurs possédant au minimum une fonction acide carboxylique sont choisis comme réactifs de départ pour être couplés au NH_2 terminal du peptide substrat et ainsi obtenir les dérivés correspondants « PS-peptide ».
Pour cette étude, six photosensibilisateurs ont été choisis selon différents critères :

1 - Ces PS appartiennent à des familles différentes : porphyrine (P1-COOH), chlorine (Ce6) et phtalocyanine (Phtalo-COOH) ;

2 - Les groupes en position méso ou β sont de tailles différentes : l'effet éventuel de l'encombrement autour des noyaux pyrroliques sera étudié (P1-COOH *vs* PpIX) ;
3 - L'hydrophobie des PS est différente (PSO_3H-COOH *vs* P1-COOH) ;
4 - Dans la littérature, les seuls PMB activables par clivage enzymatique sont synthétisés sans exception avec la pyropheophorbide a (Pyro(a)-COOH) comme photosensibilisateur (voir Tableau 3, chapitre 2). Ainsi, dans notre étude, nous avons choisi ce PS comme référence pour comparer nos résultats aux données de la littérature.

III.6.b Synthèse des PS

La synthèse de la 2-(4-carboxyphénoxy) métallophtalocyanine de zinc fonctionnalisée avec un groupement carboxylique (Figure 157) se fait par tétramérisation statistique de l'acide 4-(3,4-dicyanophénoxy)benzoïque avec du 1,2 dicyanobenzène, catalysée par de l'alkoxyde de lithium avec un rendement de 19%. Elle a été développée par Kliesch et al. [495, 496].

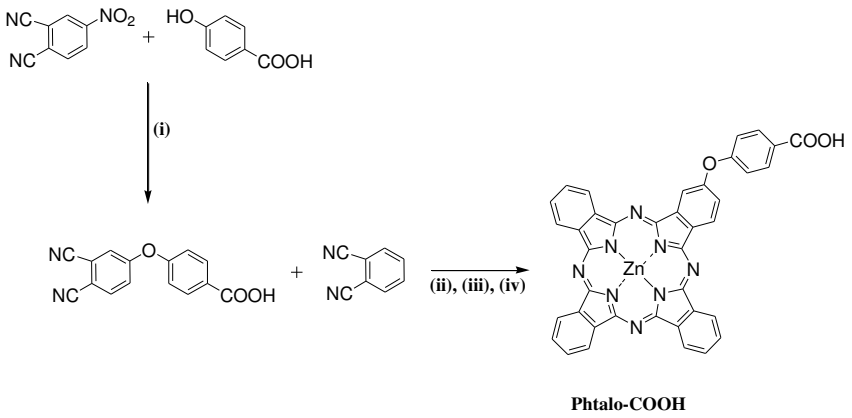


Figure 157. Synthèse de la phtalocyanine Phtalo-COOH (4) : (i) K_2CO_3, DMSO, 6 jours. HCl. (ii) Li, pentanol, reflux, 15 min. (iii) CH_3COOH. (iv) $Zn(CH_3COO)_2$, DMF.

La 5-phényl-10,15,20-tris(4-sulfo)phényl porphyrine, ici notée PSO_3H-COOH, a été obtenue à partir de la P1-COOH, placée dans de l'acide sulfurique à 120°C pendant 4 heures sous agitation (Figure 158). La purification a été effectuée sur chromotagraphie flash en phase inverse C18 à l'aide d'un gradient eau/méthanol. Le rendement de cette synthèse est de 32%.

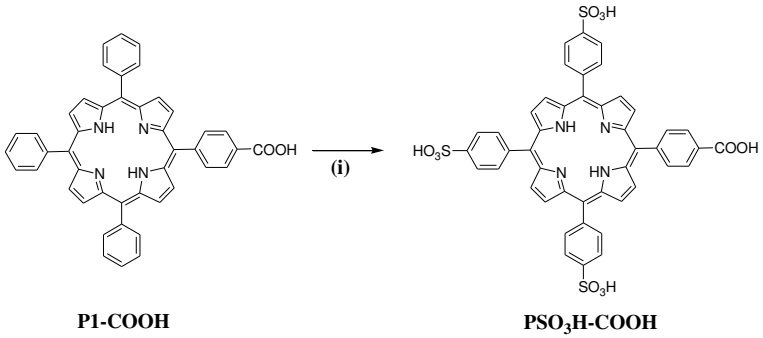
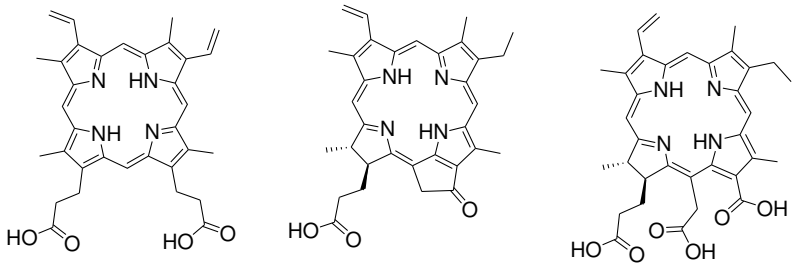


Figure 158. Synthèse de la porphyrine PSO_3H-COOH: (i) H_2SO_4, 120°C, 4h.

La protoporphyrine IX (PPIX), la pyrophéophorbide a (Pyro(a)-COOH) et la chlorine e6 (Ce6) ont été obtenues chez Sigma Aldrich et Frontier Scientific (Figure 159).



PPIX **Pyro(a)-COOH** **Ce6**

Figure 159. Structures chimiques de la PPIX, de la Pyro(a)-COOH et de la Ce6.

III.6.c Synthèse des PS-GRIGFLRTAKGG-OH

La synthèse des dérivés **PS-GRIGFLRTAKGG-OH** débute avec celle du peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH sur résine Wang comme décrite précédemment. Le couplage du photosensibilisateur (1,2 éq.) est effectué sur phase solide en présence de HBTU, de NMM et de NMP dans du DMF pendant plusieurs jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un mélange TFA/TIPS/eau (92,5/5/2,5 : v/v/v) permet de cliver le dérivé de la résine et de le récupérer entièrement déprotégé (Figure 152).

Pour les porphyrines possédant une seule fonction carboxylique, un seul produit de couplage est obtenu en majorité. La PPIX et la Ce6 possèdent plusieurs fonctions carboxyliques (Figure 159) pouvant se coupler avec la fonction *N*-terminale du peptide.

- Dans le cas de la PPIX : une étude LCMS du brut réactionnel montre la formation de deux composés (C18-phase inverse, gradient utilisé : 10/90% ACN/eau (0,1%TFA) à 100% ACN en 25 minutes). Après purification, le composé dipeptidique PPIX-(GRIGFLRTAKGG-OH)$_2$ a été identifié dans la première fraction minoritaire (R_t = 13,4 min ; MS (ESI+): *m/z* calculé pour $C_{142}H_{216}N_{42}O_{30}$ $[M+5H]^{5+}$ 599; trouvé 599, $[M+4H]^{4+}$ 748,5; trouvé 749). La seconde fraction majoritaire (R_t = 16,4 min) correspond au produit monopeptidique attendu PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH. Les deux isomères de position de ce dernier composé n'ont pu être détectés et donc séparés par HPLC.

- Dans le cas de la Ce6, il est possible également de coupler plusieurs peptides sur les trois fonctions carboxyliques. Une étude LCMS du brut réactionnel montre la formation de plusieurs composés (C18-phase inverse, gradient utilisé : 10/90% ACN/eau (0,1%TFA) à 100% ACN en 25 minutes). Après purification, le composé Ce6-(GRIGFLRTAKGG-OH)$_2$ a été identifié dans une des fractions minoritaires (HRMS (ESI+): *m/z* calculé pour $C_{142}H_{216}N_{42}O_{32}$ $[M+6H]^{6+}$ 504,9454; trouvé 505,1197, $[M+5H]^{5+}$ 605,7344; trouvé 605,9424, $[M+4H]^{4+}$ 756,9181; trouvé 757,1762, $[M+3H]^{3+}$ 1008,8907 ; trouvé 1009,2342). Un seul pic est détecté pour ce composé en HPLC, les isomères de position ne sont pas séparables. La formation du composé Ce6-(GRIGFLRTAKGG-OH)$_3$ n'a pas été observée ; l'encombrement stérique engendré par la fixation de deux peptides sur la Ce6 gêne la fixation du troisième et dernier peptide. Les trois isomères de position correspondant au produit attendu Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH ont été détectés. Le premier isomère (Fraction 1) a pu être séparé des deux autres (Fraction 2), qui n'ont pu être séparés (Figure 160). Une étude RMN 2D sur ces composés doit être effectuée afin de déterminer sur quelle fonction acide carboxylique le peptide s'est préférentiellement couplé.

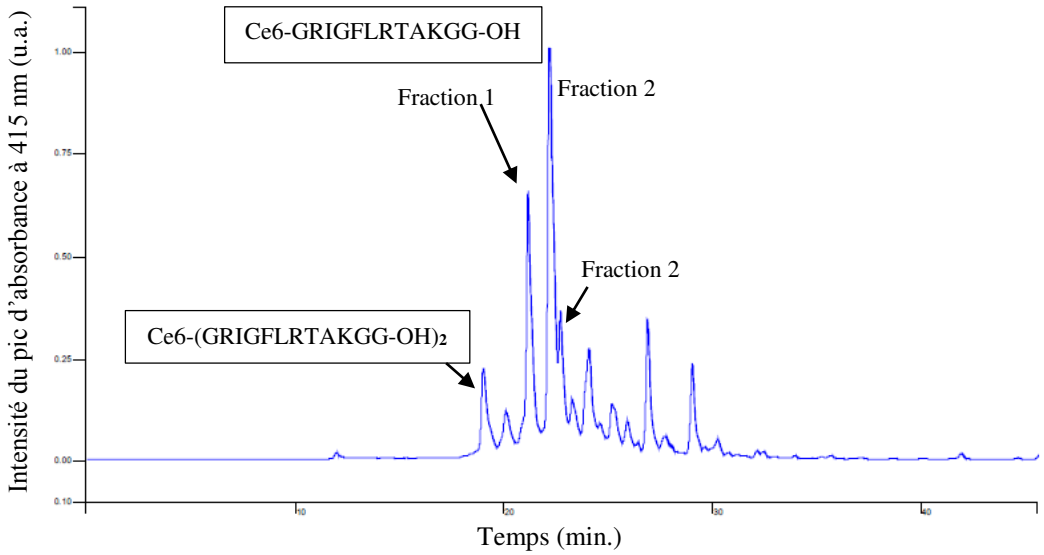


Figure 160. Chromatogramme HPLC du brut de la réaction de synthèse de Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH. Détection UV à 415 nm. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau +0,1% TFA).

Les références pour le clivage **PS-GRIGF-OH** sont synthétisés de la même manière mis à part que l'acide aminé en *C*-terminal du peptide lié à la résine n'est pas une glycine mais une phénylalanine. La synthèse du composé **PSO_3H-GRIGF-OH** a été tentée à l'aide de cette procédure mais la formation du composé n'a pas encore été déterminée. En effet, nous rencontrons des difficultés pour les analyses RMN et HRMS. Les spectres RMN (^{1}H, COSY et TOCSY, 300 MHz) obtenus sont très mal résolus et ne permettent pas de conclure. La masse en HRMS n'est pas détectée ; un grand nombre d'ions semblent être présents. En HPLC (gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau +0,1% TFA)), ce composé possède un temps de rétention différent de celui de la porphyrine PSO_3H-COOH et de son homologue PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH.
La purification de tous les dérivés s'effectue sur phase inverse (C18).

Les rendements des différents dérivés PS-peptide synthétisés sont répertoriés dans le Tableau 28. Le rendement de couplage ne paraît pas dépendre de la nature du photosensibilisateur. Seul le composé Phtalo-peptide est obtenu avec un rendement de 44 % beaucoup plus élevé que les autres composés, oscillants entre 10 et 30 % pour la plupart. La PSO_3H-COOH est un photosensibilisateur beaucoup plus hydrophile que les autres PS, ce qui pourrait expliquer que la réaction de couplage avec le peptide en milieu organique donne un rendement plus faible que pour les autres PS. Les dérivés de la PPIX et de la chlorine e6 présentent des rendements plus faibles : ceci s'explique par la présence de plusieurs fonctions acides carboxyliques sur le PS et ainsi augmentant le nombre de sous-produits formés. La plupart des dérivés **PS-GRIGFLRTAKGG-OH** sont obtenus avec un rendement inférieur à ceux des dérivés **PS-GRIGF-OH**.

Tableau 28. Rendements η de synthèse des dérivés PS-peptides.

Produit	η (%)	Produit	η (%)
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	22	**P1-GRIGF-OH**	50
Phtalo-GRIGFLRTAKGG-OH	44	**Phtalo-GRIGF-OH**	10
PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH	11	**PPIX-GRIGF-OH**	12
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH	27	**Pyro(a)-GRIGF-OH**	9
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH	2 et 6	**Ce6-GRIGF-OH**	9
PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH	6	**PSO_3H-GRIGF-OH ?**	9?

III.6.d Hydrophobie des PS et des dérivés PS-peptide

Nous avons choisi de comparer les temps de rétention de chaque molécule en HPLC phase inverse (colonne C18) utilisant un gradient acétonitrile/eau (10/90 % à 100/0 % en 25 min, 100/0% pendant 15 min, acétonitrile/eau, v/v). La comparaison des temps de rétention et par conséquent des hydrophobies des PS et des dérivés PS-peptide correspondants est représentée dans la Figure 161. Un temps de rétention élevé indique une haute hydrophobie et *vice versa*.

Les PS les plus hydrophobes sont la phtalocyanine, la pyrophéophorbide a et la porphyrine P1-COOH. Le couplage du peptide avec un PS entraîne une diminution de l'hydrophobie, plus importante avec le couplage de H-GRIGFLRTAKGG-OH que H-GRIGF-OH (Figure 161).

Les PS avec une seule fonction carboxylique, à l'exception de la PSO_3H-COOH, présentent bien une plus forte hydrophobie que la PPIX qui possède deux fonctions carboxyliques et que la chlorine e6 qui en possède trois. De nombreux sels d'acides sulfoniques sont solubles dans l'eau et dans notre cas, nous retrouvons ce résultat : la présence des groupements $-SO_3H$ sur la PSO_3H-COOH diminue considérablement l'hydrophobie de la P1-COOH. Comme attendu, l'introduction d'un bras espaceur de type PEG permet d'augmenter légèrement le caractère hydrophile de la P1-COOH.
La solubilité est un facteur clé de la PDT ainsi il conviendrait de retenir ici les composés à partir de PSO_3H-COOH ou de Ce6.

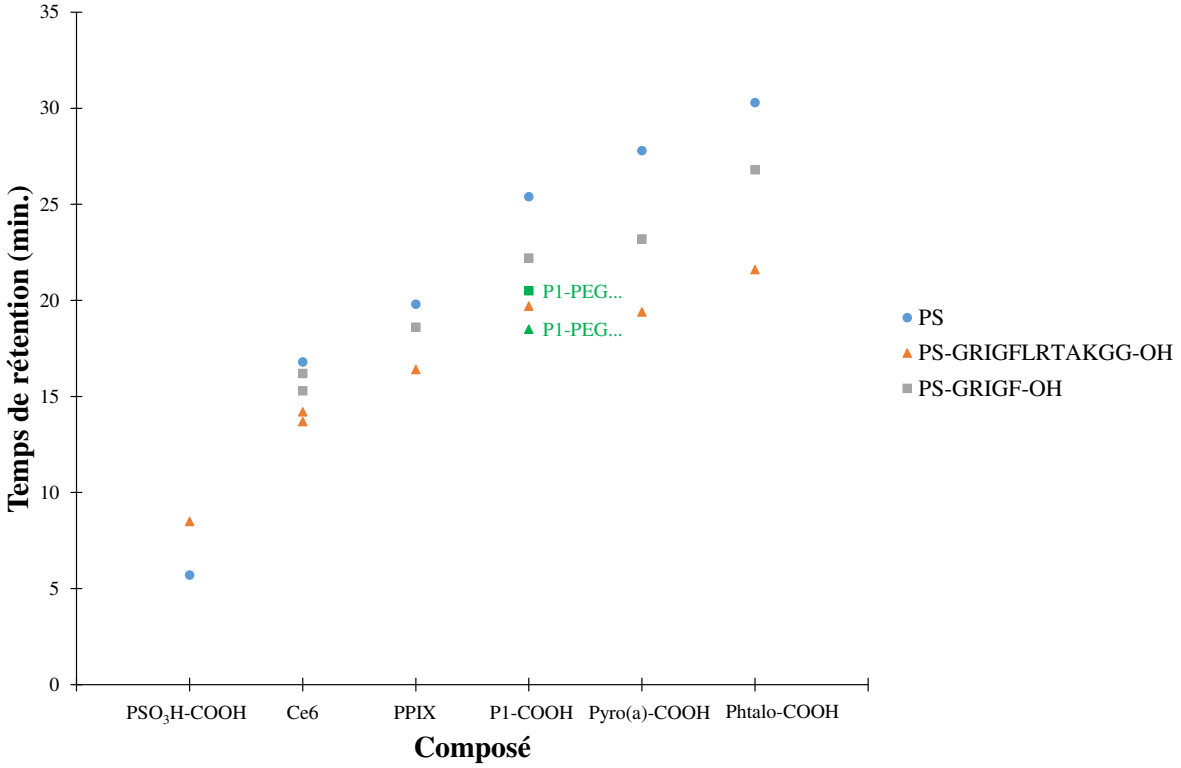


Figure 161. Comparaison des temps de rétention des PS et des dérivés PS-peptide. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

III.6.e Propriétés photophysiques des PS-GRIGFLRTAKGG-OH

Comme montré dans le Tableau 29, aucun changement significatif n'a été observé entre les propriétés photophysiques des PS et des dérivés correspondants PS-peptide. Pour faciliter la lecture de cette partie, seuls les spectres des PS seuls seront montrés, ceux des PS-GRIGFLRTAKGG-OH et PS-GRIGF-OH sont identiques.

Le nombre d'acide aminé dans la séquence peptide ne semble également pas avoir d'incidence : les dérivés PS-GRIGF-OH possèdent les mêmes propriétés photophysiques que leurs homologues PS-GRIGFLRTAKGG-OH.

Une étude photophysique sur les différents conjugués PS-GRIGF-OH était nécessaire afin d'évaluer un éventuel effet de *quenching* par le peptide des caractéristiques photophysiques du PS, primordiales pour l'application en PDT, car c'est cette partie du PMB, la partie photosensible, qui va être activée pour l'effet PDT.

Tableau 29. Propriétés photophysiques des dérivés PS-peptide dans l'éthanol.

Composé	λ_{QI} (nm)	ε_{QI} ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)	Φ_f (± 0,02)	ϕ_Δ (± 0,05)	τ_F (± 0,1 ns)	τ_Δ (± 1 µs)
Phtalo-COOH	668	146 750	0,36	0,52	4,6	-
Phtalo-GRIGFLRTAKGG-OH	668	150 916	0,36	0,53	4,1	-
Phtalo-GRIGF-OH	668	147 167	0,38	0,59	3,7	-
PPIX	630	2 244	0,11	0,77	11,5	14
PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH	630	3 142	0,11	0,73	11,6	17
PPIX-GRIGF-OH	630	2 514	0,10	0,70	10,7	16
Pyro(a)-COOH	668	24 285	0,27	0,52	6,4	14
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH	668	30 788	0,34	0,56	6,7	13
Pyro(a)-GRIGF-OH	668	31 709	0,33	0,52	6,7	12
PSO_3H-COOH	647	816	0,12	0,67	10,6	16
PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH	647	935	0,10	0,64	10,6	14
Ce6	662	37 806	0,23	0,73	4,9	14
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr1)	662	36 734	0,28	0,67	5,3	15
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr2)	662	37 882	0,24	0,78	5,8	15
Ce6-GRIGF-OH	662	34 566	0,22	0,77	5,4	16

ε : coefficient d'extinction molaire ; λ_{QI} : longueur d'onde de la bande Q_I ; λ_{exc} : longueur d'excitation ;ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet.

Le spectre d'absorption de la phtalocyanine diffère de ses homologues porphyriniques ; il est caractérisé par une forte absorption à 668 nm, ε de l'ordre de 146 000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, en raison de sa forte conjugaison (Figure 162).

Comme attendue pour les dérivés porphyriniques étudiés, la bande Q_I est beaucoup plus intense pour les composés de la chlorine e6 et ceux de la pyropheophorbide a que pour les porphyrines (Figure 162). Comme vu dans le chapitre 3, ceci est en effet dû à la structure/symétrie du macrocycle (modèle de Gouterman [66, 67], vu précédemment dans le chapitre I).

Pour une pénétration profonde de la lumière dans les tissus, les composés utilisés pour la PDT doivent absorber dans une zone de moindre absorbance du sang et des tissus endogènes, située entre 650 nm et 900 nm environ, où les composants du sang absorbent le moins et où l'énergie est suffisante pour

produire l'oxygène singulet (Figure 3, Chapitre 1). D'après les spectres d'absorption (Figure 162) et les calculs des coefficients d'extinction molaire (ε, Tableau 28), il conviendrait ainsi de retenir ici les composés à partir de Phtalo-COOH, de Ce6 ou de Pyro(a)-COOH.

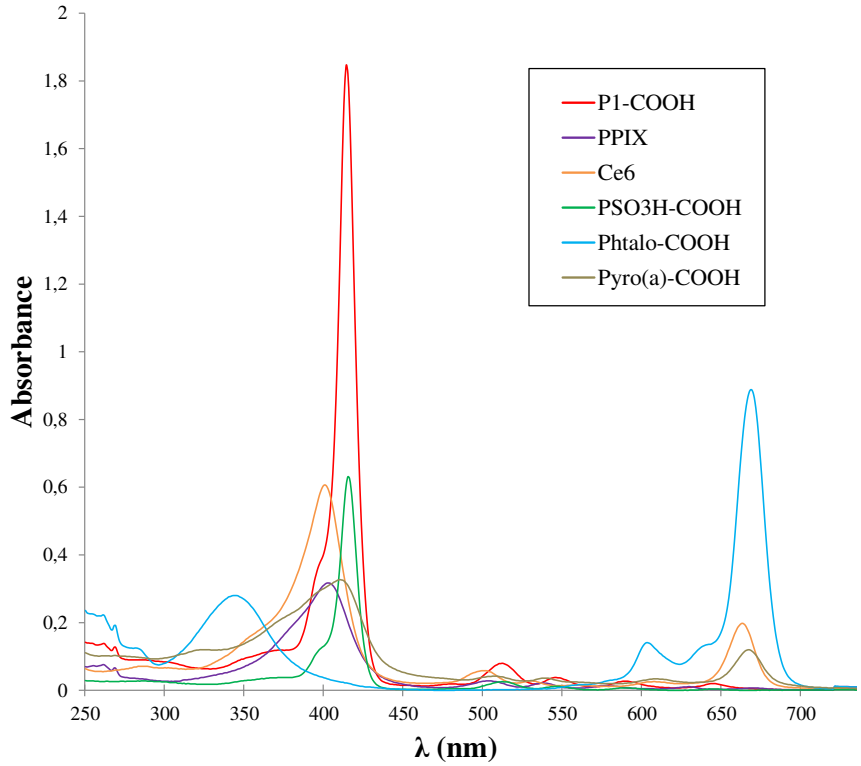


Figure 162. Spectres UV-Visible des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même concentration (C = 4,9 x 10^{-6} mol/L) dans l'éthanol.

L'excitation des bandes de Soret pour les dérivés porphyriniques ou de la bande à 340 nm pour les composés à partir de phtalocyanine se traduit par deux bandes d'émission $^1PS_1 \rightarrow {}^1PS_0$ centrées à (Figure 163) :

- 632 nm ($^1PS_1(Q_I) \rightarrow {}^1PS_0$) pour le pic le plus intense et à 690 nm ($^1PS_1(Q_{II}) \rightarrow {}^1PS_0$) pour les composés à partir de PPIX ;
- 650 nm ($^1PS_1(Q_I) \rightarrow {}^1PS_0$) pour le pic le plus intense et à 720 nm ($^1PS_1(Q_{II}) \rightarrow {}^1PS_0$) pour les composés à partir de P1-COOH et de PSO_3H-COOH ;
- 667-674 nm pour le pic le plus intense et à 720 nm pour les composés de la Ce6 et de la Pyro(a)-COOH ;
- 678 nm pour le pic le plus intense et à 744 nm pour les composés de la Phtalo-COOH.

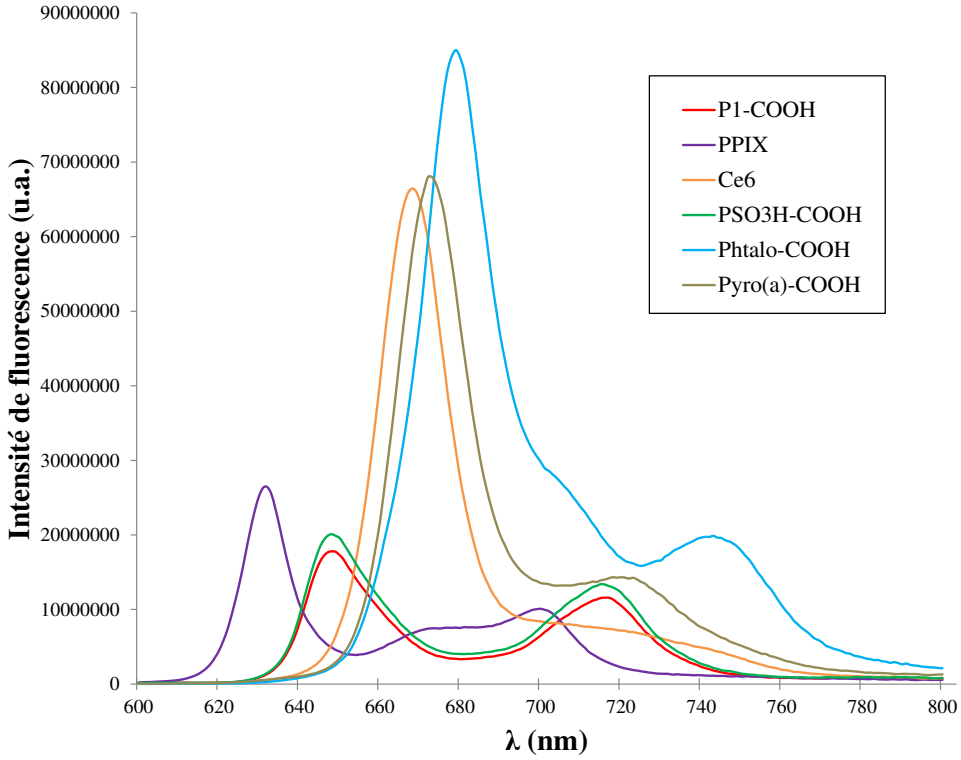


Figure 163. Spectres d'émission de fluorescence des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même absorbance ($A_{\lambda exc.}$ = 0,2) dans l'éthanol.

Les rendements quantiques de fluorescence des différents dérivés PS-peptide ici synthétisés ont été comparés à ceux des PS correspondants reportés dans la littérature :

- la valeur obtenue pour les dérivés de la P1-COOH est proche de celle de la P1-COOH seule égale à 0,14 (dans EtOH) [46]. Aucune valeur de rendement quantique de fluorescence pour la PSO_3H-COOH n'a été trouvée dans la littérature. Dans notre cas, les rendements quantiques de fluorescence pour les dérivés de la PSO_3H-COOH sont égaux à ceux de la P1-COOH (0,11). Il n'y a pas d'influence des groupements -SO_3H ;
- le rendement quantique de fluorescence pour la Pyro(a)-COOH est plus faible (0,30) dans l'EtOH que celui reporté dans le méthanol (MeOH) de 0,49 [330] mais comparable au rendement quantique de fluorescence de la phéophorbide a (composé similaire avec en plus –$COOCH_3$ sur le cyclopentadiène) dans l'EtOH égal à 0,28 [331] ;
- le rendement quantique de fluorescence pour les dérivés de la PPIX est plus faible (0,11) dans l'EtOH que celui reporté dans le DMSO (0,16) [497] ;
- les rendements quantiques de fluorescence dans l'EtOH pour les dérivés de la Phtalo-COOH sont plus élevés (0,36) que ceux reportés dans le même solvant pour la Phtalo-COOH seule égaux à 0,12 [496] et 0,19 [498]. Dans notre cas, l'excitation a été faite à 340 nm tandis que dans la littérature l'excitation a lieu à 360 ou 357 nm ;
- les rendements quantiques de fluorescence dans l'EtOH pour les dérivés de la Ce6 sont également plus élevés que celui trouvé pour la Ce6 seule dans le même solvant dans la littérature égal à 0,13 [499].

Les composés à partir de Phtalo-COOH, de Ce6 ou de Pyro(a)-COOH présentent les plus hauts rendements quantiques de fluorescence et semblent être les plus intéressants pour des applications en diagnostique.

Les spectres de production d'oxygène singulet des PS seuls, des dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH et des dérivés PS-GRIGF-OH dans l'éthanol possèdent une allure de gaussienne centrée vers le maximum d'émission à 1270 nm (Figure 164).

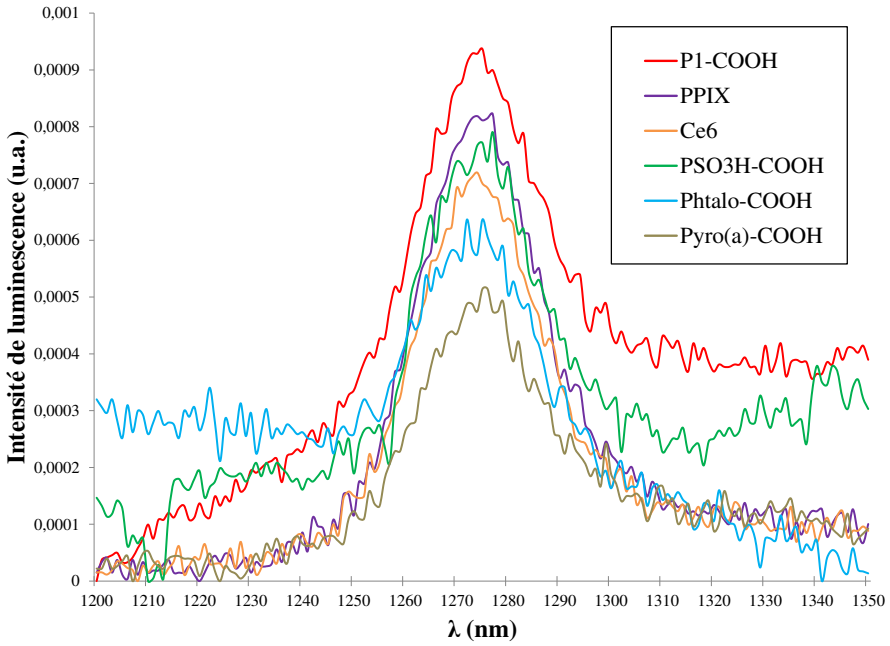


Figure 164. Spectres d'émission de production d'oxygène singulet des PS-GRIGFLRTAKGG-OH à la même absorbance ($A_{\lambda exc.}$ = 0,2) dans l'éthanol.

Les valeurs obtenues pour les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des dérivés PS-peptide ici synthétisés sont assez proches de celles reportées dans la littérature pour les PS correspondants :

- les rendements quantiques de production d'oxygène singulet pour les dérivés de la P1-COOH sont proches de 0,65 tandis que dans la littérature le rendement de la P1-COOH seule est un peu plus faible et égal à 0,50 (dans EtOH) [332]. Aucune valeur de rendement quantique de production d'oxygène singulet pour la PSO_3H-COOH n'a été trouvée dans la littérature. Dans notre cas, les rendements quantiques pour les dérivés de la PSO_3H-COOH sont égaux à ceux de la P1-COOH (0,65 environ). Il n'y a pas d'influence venant de l'introduction de groupement -SO_3H sur la production d'oxygène singulet ;
- les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des différentes composés à partir de Pyro(a)-COOH sont proches de celles reportées dans la littérature : 0,52-0,53 (Phéophorbide a et Pyro(a)-COOH dans EtOH [333, 334] ou MeOH [331]).
- le rendement quantique de production d'oxygène singulet pour les dérivés de la PPIX est beaucoup plus élevé (0,73) dans l'EtOH que celui reporté de 0,56 dans le PBS [39] ;
- les rendements quantiques de production d'oxygène singulet dans l'EtOH pour les dérivés de la Phtalo-COOH sont plus élevés (0,55) que celui reporté pour la Phtalo-COOH seule dans le même solvant égal à 0,34 [498] mais proche de celui trouvé dans le chloroforme égal à 0,51 [496]. Dans notre cas, l'excitation a été faite à 340 nm tandis que dans la littérature l'excitation a lieu à 360 ou 357 nm ;
- le rendement quantique de production d'oxygène singulet pour les dérivés de la Ce6 est un peu plus élevé (0,74) dans l'EtOH que celui reporté dans la littérature de 0,65 dans le même solvant [499].

Les dérivés PPIX-GRIGF-OH et Ce6-GRIGF-OH présentent les rendements quantiques de production d'oxygène singulet dans l'éthanol les plus élevés (0,70 et 0,77 respectivement) par rapport à ceux des autres composés PS-GRIGF-OH synthétisés, plus faibles : 0,55 (Phtalo-COOH et Pyro(a)-COOH) et 0,65 (P1-COOH et PSO_3H-COOH). Ces valeurs indiquent que ces composés sont parfaitement adaptés à des applications en PDT en raison de leur rendement de production d'oxygène singulet élevé.

Les durées de vie de fluorescence sont mesurées par TCSPC dans l'éthanol, utilisant un laser à 408 nm pour l'excitation comme vu précédemment dans le chapitre 3. Les déclins des six composés étudiés sont montrés Figure 165 ; le déclin est monoexponentiel.

- Pour les composés porphyriniques (P1-COOH, PSO_3H-COOH et PPIX), les valeurs avoisinent 10 - 11 ns, valeurs proches de celle de la littérature pour la P1-COOH [332].
- Les dérivés de la pyrophéophorbide a présentent un déclin plus faible proche des 6 - 7 ns, également proches de ceux de la littérature pour la phéophorbide a, la Pyro(a)-COOH et leurs dérivés comprises entre 5,6 et 6,5 ns dans le MeOH ou dans l'EtOH [330, 331, 333, 334].
- Pour les dérivés de la Ce6, les valeurs encore un peu plus faibles avoisinent les 5 ns, valeurs proches de celle de la littérature 4,4 ns [499] et 5,3 ns [500] dans l'EtOH.
- Les dérivés de la Phtalo-COOH présentent les plus faibles temps de vie fluorescence de l'ordre de 3 - 4 ns, identiques à ceux de la littérature trouvés dans du DMF pour Phtalo-COOH et la métallophtalocyanine de zinc non fonctionnalisée [501].

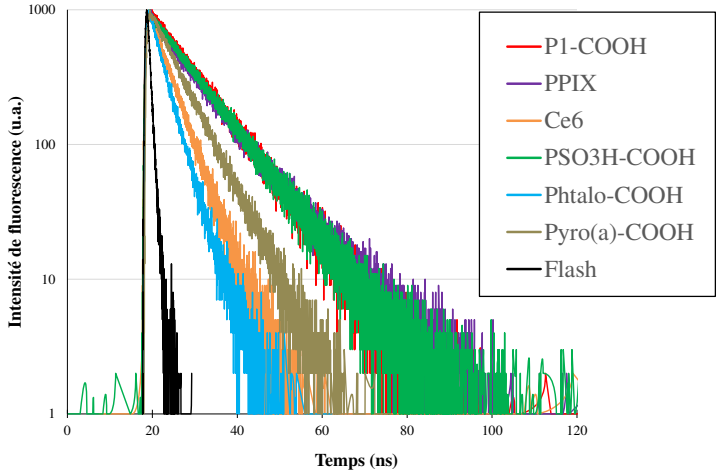


Figure 165. Durées de vie de fluorescence des conjugués PS-GRIGFLRTAKGG-OH dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 408 nm (A_{408nm} = 0,2).

Les durées de vie de production d'oxygène singulet sont mesurées dans l'éthanol utilisant une diode pulsée à 415 nm pour l'excitation. Cette longueur d'onde ne convient pas à l'étude de la durée de vie des dérivés de la Phtalo-COOH. Les déclins des cinq autres composés sont représentés Figure 166. Le déclin est monoexponentiel pour tous les composés sauf les composés à partir de pyrophéophorbide a. Le déclin est biexponentiel (même observation faite dans le chapitre 3). Des études sont toujours en cours pour mieux comprendre ce phénomène. Les valeurs avoisinent 15 - 16 µs (aucunes valeurs trouvées dans la littérature) pour tous les composés sauf pour les composés contenant de la pyrophéophorbide a qui présentent un second déclin plus faible proche de 12 µs, valeur comparable à celle trouvée dans la littérature (10 µs dans le MeOH [330]).

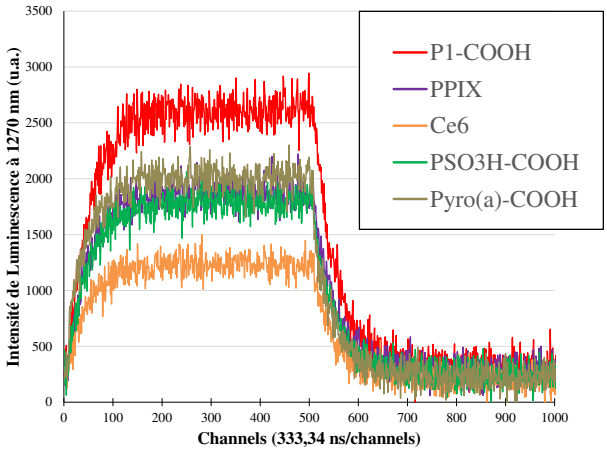


Figure 166. Durées de vie de production d'oxygène singulet des PS-GRIGFLRTAKGG-OH dans l'éthanol, $\lambda_{exc.}$ = 415 nm (A_{415nm} = 0,2).

III.6.f Clivage enzymatique

- Le dérivé Phtalo-GRIGFLRTAKGG-OH n'est pas clivé par les trois MMPs étudiées tout comme P1-GRIGFLRTAKGG-OH.

- Le composé PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé seulement par l'enzyme active MMP-9 avec un faible taux d'hydrolyse (3%). Dans ce dernier cas, une diminution de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH à 16,4 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 18,6 min. Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 1094 et $[M+2H]^{2+}$: 548 correspondant bien à la partie clivée PPIX-GRIGF-OH (Figure 167).

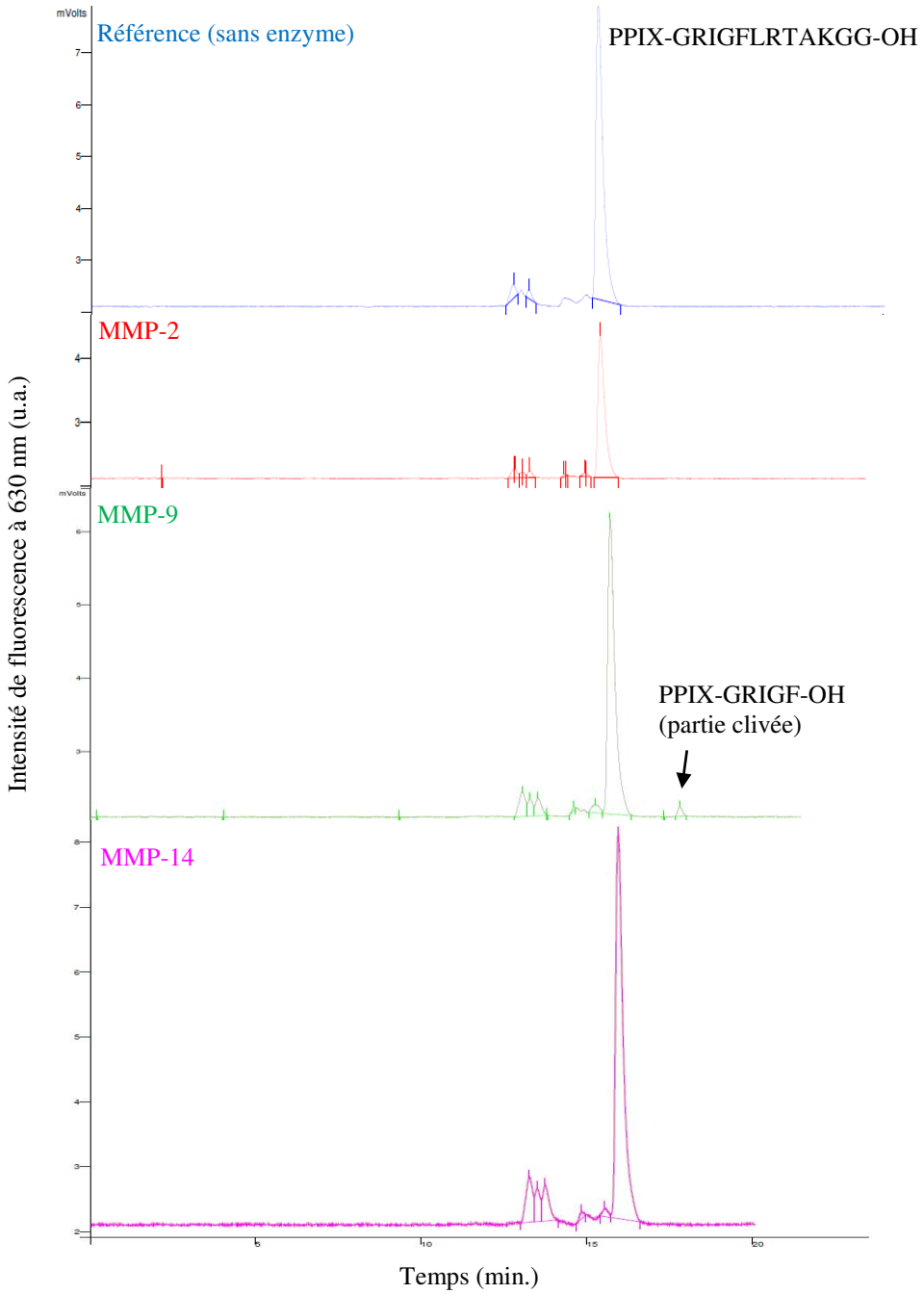


Figure 167. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

- Le composé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé par les enzymes actives MMP-9 et MMP-2 avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-9. Ces taux d'hydrolyse sont très faibles (5 et 1 %). Dans ce dernier cas, une diminution de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH à 19,4 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 23,2 min après incubation avec les MMP-2 et les MMP-9. Ce nouveau pic a pour masses $[M+2H]^{2+}$: 534 correspondant bien à la partie clivée Pyro(a)-GRIGF-OH (Figure 168).

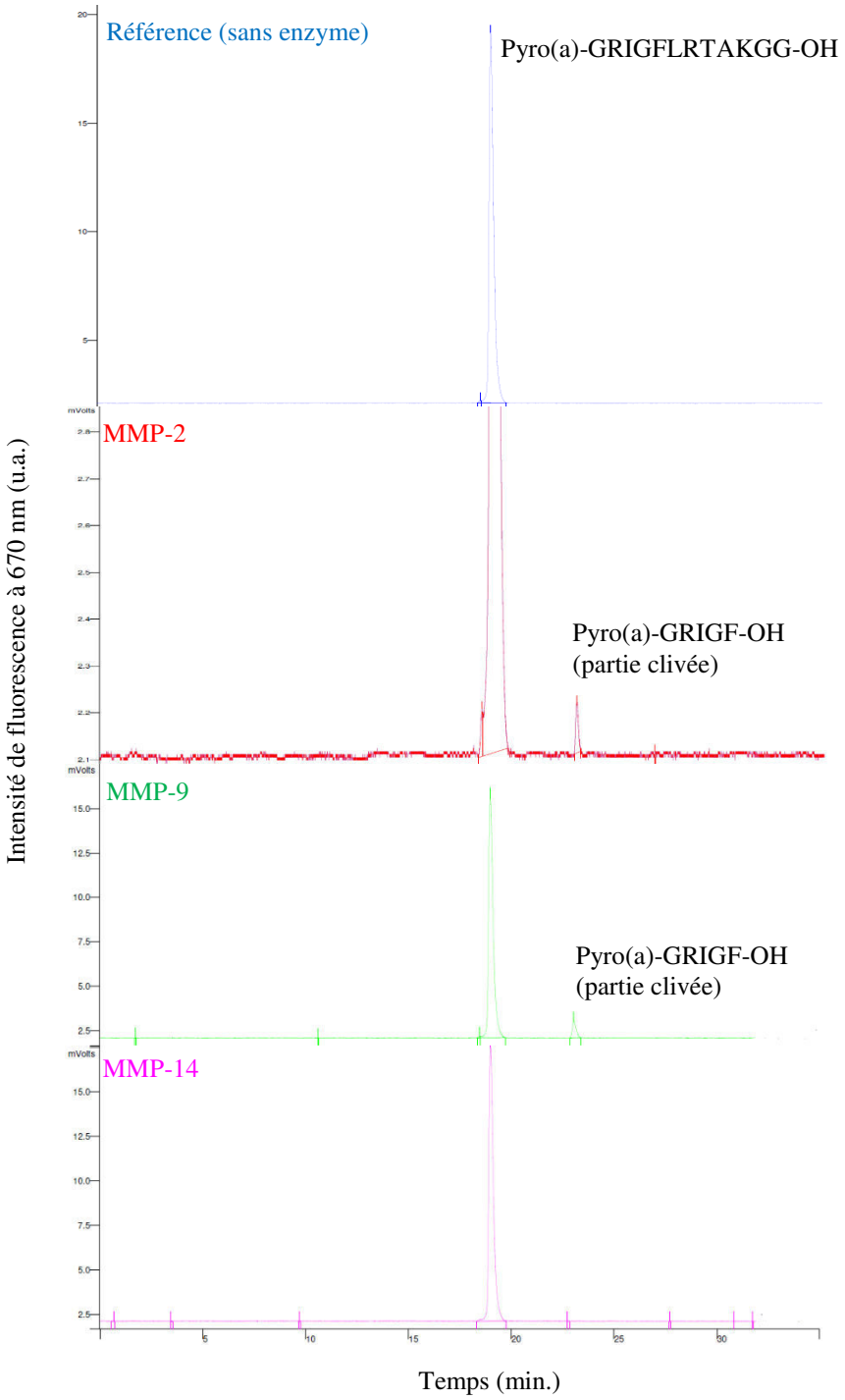


Figure 168. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

- Dans le cas du dérivé PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH, en plus du pic correspondant à PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH à 18,3 min, un même nouveau pic distinct a été détecté à 16,5 min en HPLC après incubation avec les trois MMPs (Figure 169). Cependant, aucune masse correspondant à la partie clivée PSO_3H-GRIGF-OH n'a été trouvée pour ce nouveau pic. La présence du composé PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH a été vérifiée en MS au temps de rétention 18,3 min ($[M+H]^+$ = 1058 et $[M+2H]^{2+}$ = 706). A ce jour, aucun composé n'a pu être identifié en MS car un trop grand nombre d'ions sont détectés pour ce nouveau pic. Nous envisageons de refaire ces analyses en ESI négative.

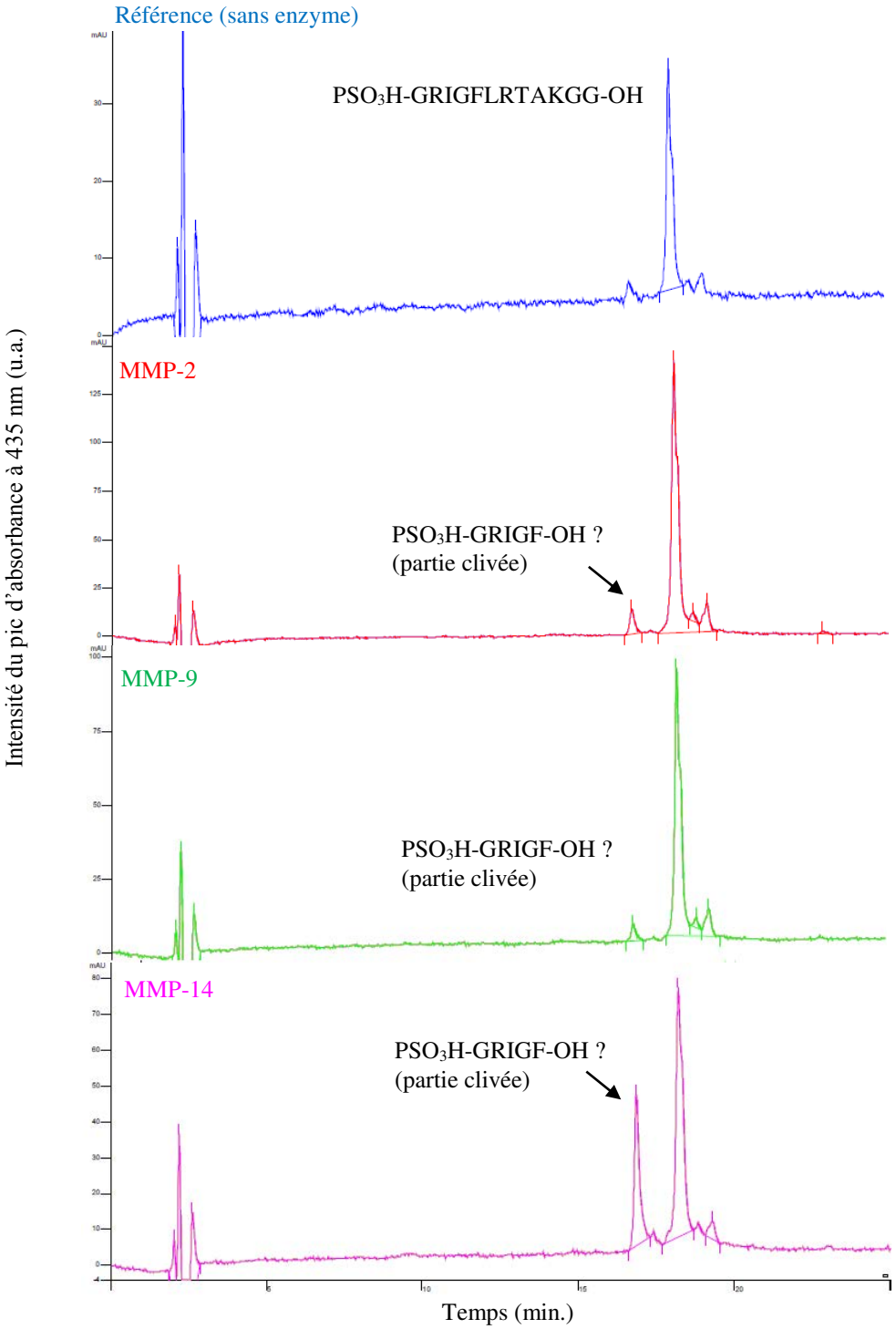


Figure 169. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 435 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

- Les trois enzymes actives étudiées clivent les isomères de position du dérivé Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr1 et Fr2) entre la phénylalanine (F) et la leucine (L) avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-14 (80 %) que pour la MMP-2 (75 %) et enfin que pour la MMP-9 (5 %). Ces taux obtenus sont beaucoup plus élevés que ceux des autres dérivés. Une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH à 13,7 (Fr1) - 14,2 (Fr2) minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 15,3 (Fr1) - 16,2 (Fr2) min après incubation avec les trois MMPs. Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 1128 et $[M+2H]^{2+}$: 564 correspondant bien à la partie clivée Ce6-GRIGF-OH (Figure 170).

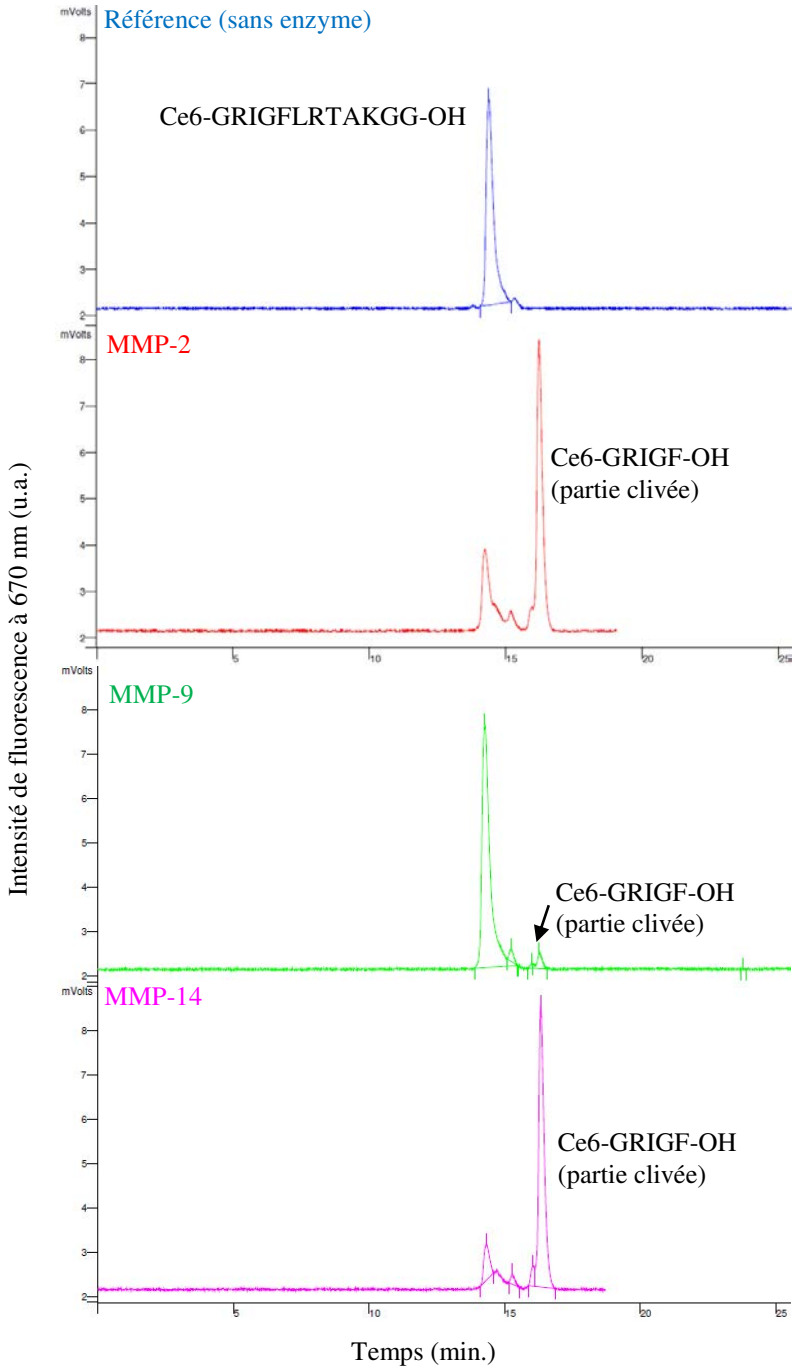


Figure 170. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr2) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 400 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Le Tableau 30 résume les résultats des tests enzymatiques des différents dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH synthétisés.

Tableau 30. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les PS-GRIGFLRTAKGG-OH avec des PS de nature différente.

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	Non	Non
Phtalo-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	Non	Non
PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH	Non	**Oui (3)**	Non
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH	**Oui (1)**	**Oui (5)**	Non
PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH	**?**	**?**	**?**
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr1)	**Oui (75)**	**Oui (6)**	**Oui (76)**
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH (Fr2)	**Oui (75)**	**Oui (4)**	**Oui (83)**

III.6.g Amélioration des conditions des tests de clivage

Rappelons que tous les précédents tests enzymatiques ont été réalisés pour une concentration en composé de 100 µM. Cette concentration a été choisie car il s'agit de la concentration la plus faible permettant la détection (UV-Visible et fluorescence) en HPLC du peptide substrat. Nous avons gardé ces conditions pour tous les composés dérivés afin de pouvoir comparer tous les résultats enzymatiques.

Les rapports molaires enzyme-peptide sont, dans ces conditions :

- pour MMP-2 (7,5 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/13 333 ;
- pour MMP-9 (6 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/16 666 ;
- pour MMP-14 (58 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/1 724.

Nous nous sommes posé la question de savoir s'il existait un effet de la concentration du dérivé PS-GRIGFLRTAKGG-OH sur la réaction de clivage.

Pour évaluer cet effet, deux composés PS-GRIGFLRTAKGG-OH différents dont le clivage avait été observé dans les conditions précédentes mais en très faible quantité ont été sélectionnés et le taux d'hydrolyse le plus élevé permet de choisir l'enzyme pour les nouveaux tests :

- le P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH en présence de MMP-2
- et le Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH en présence de MMP-9.

Dans un premier temps, la concentration en dérivé a été diminuée et la concentration en enzyme a été maintenue constante (Figure 171) :

- dans le cas du P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH avec les MMP-2 : les rapports molaires enzyme-peptide utilisés sont 1/13 333, 1/6 666 et 1/2 000. La détection de la partie clivée n'est plus possible dès le rapport 1/6 666.
- dans le cas du Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH avec les MMP-9 : les rapports molaires enzyme-peptide utilisés sont 1/16 666, 1/8 333 et 1/2 500. Le pourcentage de partie clivée est constant quelque soit la concentration de Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH utilisée au départ.

Il n'y a donc pas d'effet inhibant du dérivé PS-GRIGFLRTAKGG-OH sur la réaction de clivage du peptide dû à la présence d'un trop large excès de PS-GRIGFLRTAKGG-OH par rapport à la quantité d'enzyme utilisée.

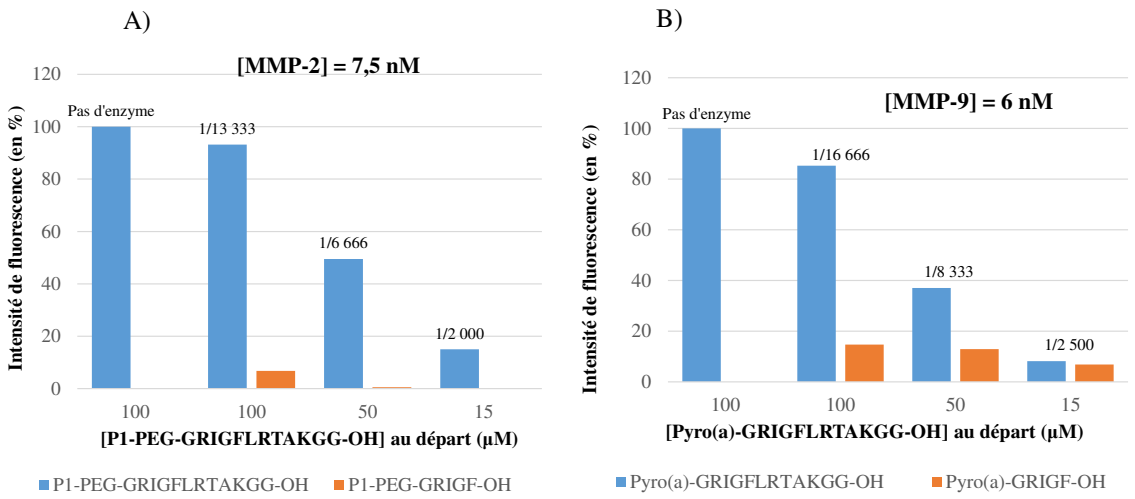


Figure 171. Clivage enzymatique pour différentes concentrations de départ en PS-GRIGFLRTAKGG-OH et une concentration en MMP constante. (Détection en fluorescence).

Une deuxième expérience a été réalisée pour trouver la quantité d'enzyme MMP-9 nécessaire pour cliver un maximum de dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH. Cette fois-ci, la concentration en Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH est fixée à 15 µM et la concentration en MMP-9 augmente (Figure 172). Le taux d'hydrolyse augmente considérablement lorsque la concentration en MMP-9 augmente. Pour le rapport molaire enzyme/peptide égal à 1/250, le taux d'hydrolyse (92 %) est 2 fois plus élevé que le taux d'hydrolyse (45 %) pour le rapport molaire 1/2 500 utilisé en premier lieu pour la même concentration de départ en dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH.

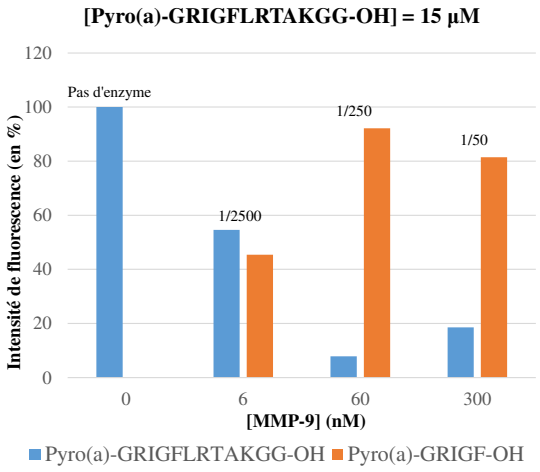


Figure 172. Clivage enzymatique pour différentes concentrations en MMP-9 et une concentration en Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH constante et égale à 15 µM.

Les tests de clivage enzymatique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH ont été réalisés pour les trois enzymes pour d'autres ratios. La concentration en Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH a été fixée à 15 µM dans les trois cas. Le rapport molaire enzyme/peptide a été réduit considérablement par rapport aux conditions précédentes afin de pouvoir mieux estimer le clivage enzymatique du composé :

- pour MMP-2 (60 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/250 ;
- pour MMP-9 (60 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/250 ;
- pour MMP-14 (58 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/260.

Dans ces conditions, le composé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé par les trois enzymes avec un taux d'hydrolyse le plus élevé pour la MMP-9 (92 %). Les taux d'hydrolyse de la MMP-2 et de la MMP-14 sont significatifs, 73 % et 83 % respectivement. Dans les trois cas, une diminution de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH à 19,4 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 23,2 min après incubation avec les MMPs. Ce nouveau pic a pour masses $[M+2H]^{2+}$: 534 correspondant bien à la partie clivée Pyro(a)-GRIGF-OH (Figure 173).

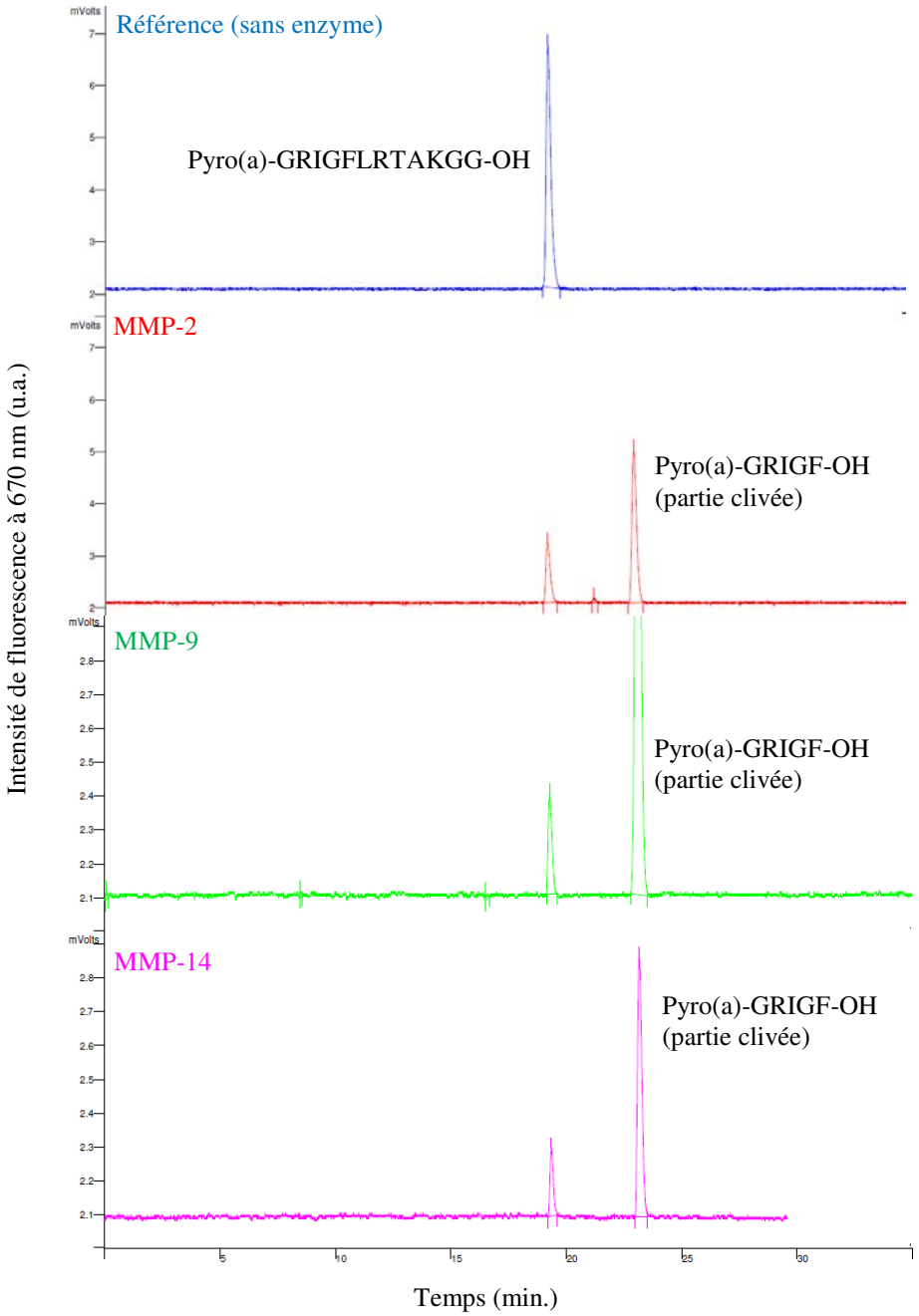


Figure 173. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (15 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection fluorescence (λ_{exc} = 415 nm, $\lambda_{ém}$ = 670 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Le Tableau 31 résume les résultats du clivage enzymatique du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH dans les deux conditions étudiées précédemment.

Tableau 31. Clivage enzymatique du Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH pour deux conditions différentes.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Composé	[MMP] en nM: rapport MMP/composé MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (100 µM)	7,5 nM : 1/13 333 **Oui (1)**	6 nM : 1/16 666 **Oui (5)**	58 nM : 1/1 724 Non
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (15 µM)	60 nM : 1/250 **Oui (73)**	60 nM : 1/250 **Oui (92)**	58 nM : 1/260 **Oui (83)**

Ces résultats amènent à penser qu'un nombre trop conséquent de composé à cliver empêche l'enzyme d'être accessible et donc pourrait expliquer l'absence de clivage : l'enzyme est plus accessible lorsqu'il y a moins de composé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH.

III.6.h Conclusion

Lorsqu'un clivage enzymatique est observé, le site de clivage n'est jamais modifié, la coupure se fait toujours entre la phénylalanine (F) et la leucine (L) tout comme le peptide substrat H-GRIGFLRTAKGG-OH. La nature du PS ne modifie donc pas le site de clivage.

Le peptide substrat choisi est spécifique des MMP-14. Toutefois, après couplage d'un PS sur ce peptide, le clivage enzymatique est modifié, la majorité des dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH clivés sont spécifiques de la MMP-9 et/ou de la MMP-2.

L'encombrement autour des noyaux pyrroliques du PS semble avoir un effet sur le clivage enzymatique du peptide. Le dérivé PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé par la MMP-9 tandis que le P1-GRIGFLRTAKGG-OH n'est clivé par aucune des trois MMPs.

Le P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé par les MMP-2 et 9 : l'introduction d'un bras espaceur entre la porphyrine et le peptide permet certainement de diminuer l'encombrement autour du peptide et donc lui permettre de se positionner correctement dans le site enzymatique.

Il est difficile de conclure sur un effet possible de la solubilité sur le clivage enzymatique, les résultats sur le clivage enzymatique pour la PSO_3H-GRIGFLRTAKGG-OH n'étant pas à ce jour confirmés par LCMS.

Les isomères du dérivé Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH donnent des résultats très encourageants. Avec de faible quantité d'enzyme par rapport au dérivé (rapports molaires enzyme/peptide = 1/13 333 ; 1/16 666 et 1/1 724), ceux-ci sont très bien hydrolysés par les trois MMPs avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-14 que pour les MMP-2 et -9. Ce composé a un clivage enzymatique similaire au peptide substrat.

Le dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH est également clivé par les trois MMPs avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-9 que pour les MMP-2 et -14. Cependant, nous avons pu constater qu'une quantité plus importante d'enzymes était nécessaire pour cliver ce dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (rapport molaire enzyme/peptide = 1/250) par rapport aux dérivés de la chlorine e6 étudiés précédemment.

La modélisation moléculaire des conjugués nous permettrait de mieux comprendre les différences importantes au niveau des clivages enzymatiques de ces différents dérivés.

III.7 Les dérivés « peptide(*quencher*) »

Après avoir étudié l'influence du couplage de la partie photosensible sur le clivage enzymatique du peptide natif, il reste maintenant à déterminer si le couplage d'une molécule inhibitrice, un *quencher*, avec le peptide substrat permet de conserver ou non le clivage du peptide par les enzymes.
La synthèse et le clivage enzymatique des deux nouveaux composés **H-GRIGFLRTAK(*quencher*)GG-OH** sont décrits dans la partie suivante.

III.7.a Choix des *quenchers*

Comme vu précédemment (Chapitre 1. II.3), d'après la théorie de Förster, le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie). Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que le spectre d'émission du donneur (PS) doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (*quencher*) [502]. 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.

Le BBQ650 et le BHQ-3 possèdent une fonction carboxylique et possèdent un spectre d'absorption recouvrant le spectre d'émission des PS (Figure 174).

La publication de Jon Lovell [503] portant sur l'utilisation de *Black Hole Quenchers* comme inhibiteurs d'états excités d'un PS, la pyrophéophorbide a, pour une utilisation dans un PMB nous a réconfortés dans nos choix. Les *quenchers* présentant les meilleurs résultats sont le BHQ-3 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 : 97% dans le cas du BBQ650 et 93% dans le cas du BHQ-3. De plus, le BHQ-3 est l'inhibiteur de PS actuellement le plus utilisé dans la littérature, principalement dans les précédents travaux sur les PMB activés par clivage enzymatique de l'équipe du professeur Zheng, précédemment cités Tableau 3 Chapitre 2.

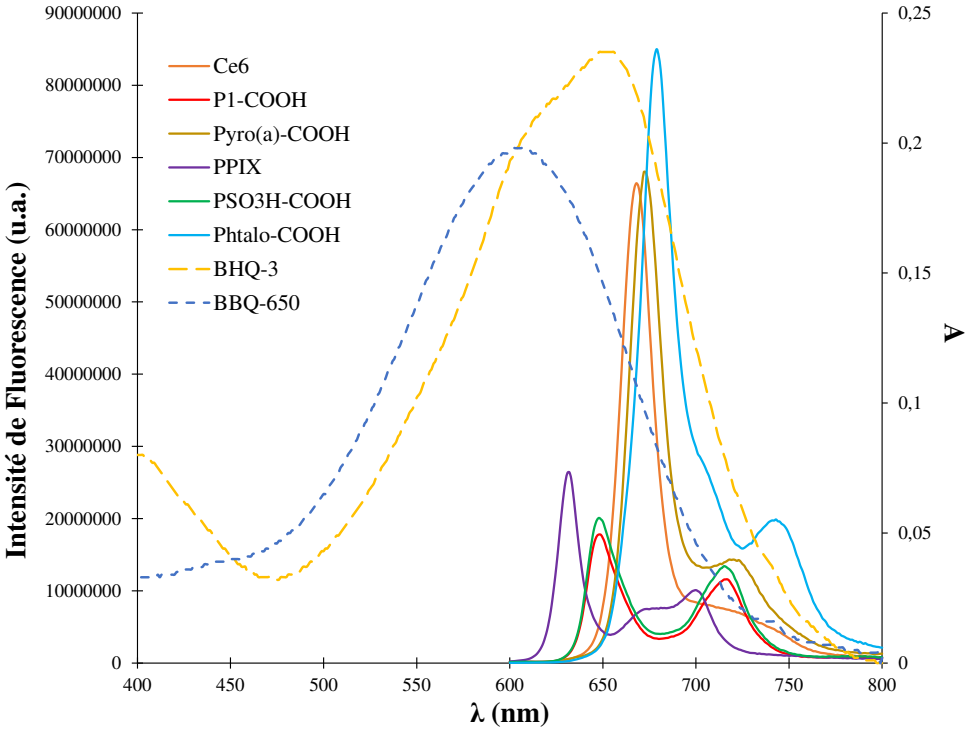


Figure 174. Recouvrement des spectres d'émission de fluorescence des PS étudiés par les spectres d'absorption des *quenchers* (BBQ650 et BHQ-3) dans l'éthanol.

III.7.b Synthèse

La Fmoc-Lys(BBQ)-OH et le BBQ-NHS sont obtenus commercialement de *Berry & Associates*, le BHQ-3-NHS est acheté chez *Biosearch technologies*.

Le composé **H-GRIFGLRTAK(BBQ)GG-OH** est synthétisé de la même manière que le composé H-GRIFGLRTAK(P1)GG-OH, entièrement sur phase solide. Le composé Fmoc-Lys(BBQ)-OH (1 éq.) est couplé comme un acide aminé protégé classique durant la procédure SPPS, à l'exception que le couplage dans ce cas précis prend 7 jours et est protégé de la lumière. Le composé est enfin clivé de la résine Wang comme précédemment et récupéré entièrement déprotégé (Figure 175). Le composé est obtenu pur après purification sur phase inverse (C18) avec un rendement faible de 3 %.

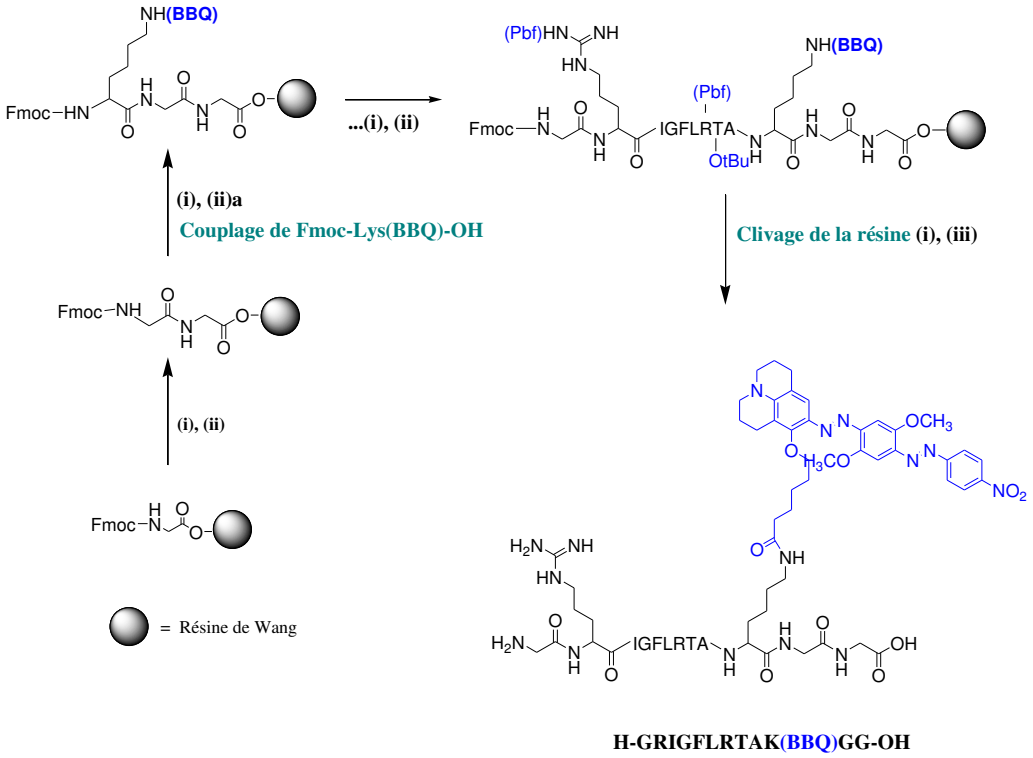


Figure 175. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH. (i) Déprotection du Fmoc : 20% pipéridine dans du DMF. (ii) Acide aminé protégé, HBTU, NMP, NMM, DMF. (ii)a Fmoc-Lys(BBQ)-COOH, HBTU, NMM, DMF, 7 jours. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau.

Le composé **H-GRIFGLRTAK(BHQ-3)GG-OH** se fait en plusieurs étapes et majoritairement en phase liquide (Figure 176).
La synthèse du peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH se fait ici sur une résine 2-chlorotrityl. La chaîne latérale de la lysine n'est plus protégée par un groupement Boc mais par un groupement Mtt. La protection Fmoc terminale de la glycine est conservée. Un mélange DCM/TFE/Acide acétique (4/2/2 : v/v/v) permet le clivage de la résine et d'obtenir le peptide intermédiaire protégé Fmoc-GR(Pbf)IFGLR(Pbf)T(tBu)AK(Mtt)GG-OH. Le groupement protecteur Mtt de la lysine est enlevé avec 3 % de TFA dans du DCM permettant ainsi le couplage ultérieur avec le *quencher*. Ce dernier couplage de la fonction amine latérale de la lysine avec le groupe carboxyle activée du BHQ-3 (activée par NHS) s'effectue dans le DMSO, en présence de 2 % de DIPEA, pendant toute une nuit à l'abri de la lumière, sous agitation et atmosphère inerte. Les groupes protecteurs des acides aminés sont éliminés par un mélange 95 % TFA / 5 % TIPS (Figure 176). Le groupement protecteur Fmoc est éliminé grâce à un mélange NMM/DMF (1/1 : v/v). En effet, la molécule de BHQ-3 se dégrade totalement en présence de pipéridine. Le produit final H-GRIFGLRTAK(BHQ-3)GG-OH est purifié par HPLC sur phase inverse (C18) et est obtenu avec un bon rendement de 49 %.

Le couplage du *quencher* sur la fonction NH_2 latérale de la lysine du peptide semble être plus facile en phase liquide qu'en phase solide.

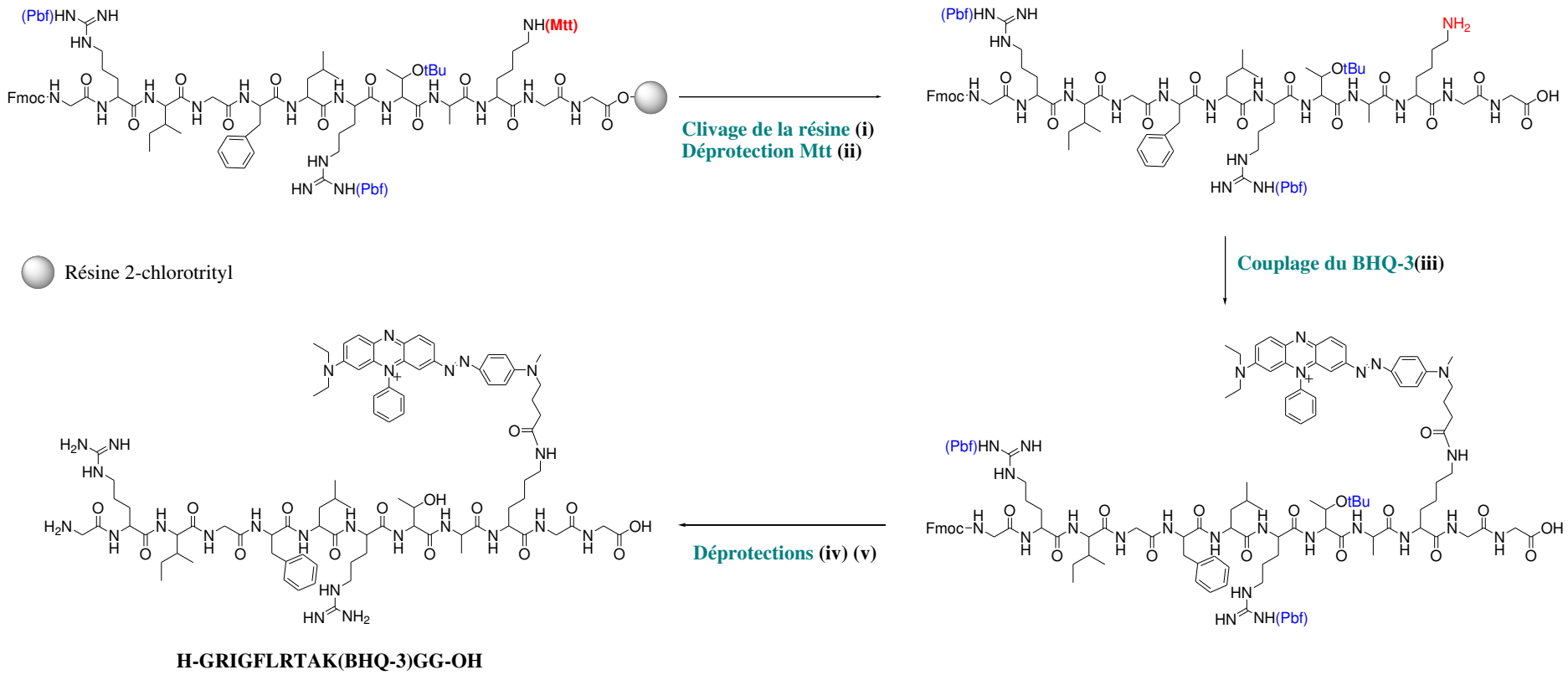


Figure 176. Synthèse du dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH. (i) Clivage: DCM/TFE/Acide acétique. (ii) Déprotection du Mtt : 3% TFA et 5% TIPS dans du CH_2Cl_2. (iii) BHQ-3-NHS, DMSO avec 2% de DIPEA, 16 h, sous N_2. (iv) Suppression des dernières protections : 95 % TFA, 5% TIPS. (v) Déprotection du Fmoc : NMM/DMF (1/1, v/v).

III.7.c Hydrophobie des peptide(*quencher*)

Les temps de rétention et par conséquent les hydrophobies des *quenchers* et peptide(*quencher*) étudiés sont représentés Figure 177. Comme pour les PS et leurs dérivés PS-peptide, les dérivés peptide(*quencher*) présentent des temps de rétention plus faibles que ceux des *quenchers* respectifs. Le couplage avec le peptide augmente le caractère hydrophile des *quenchers*.

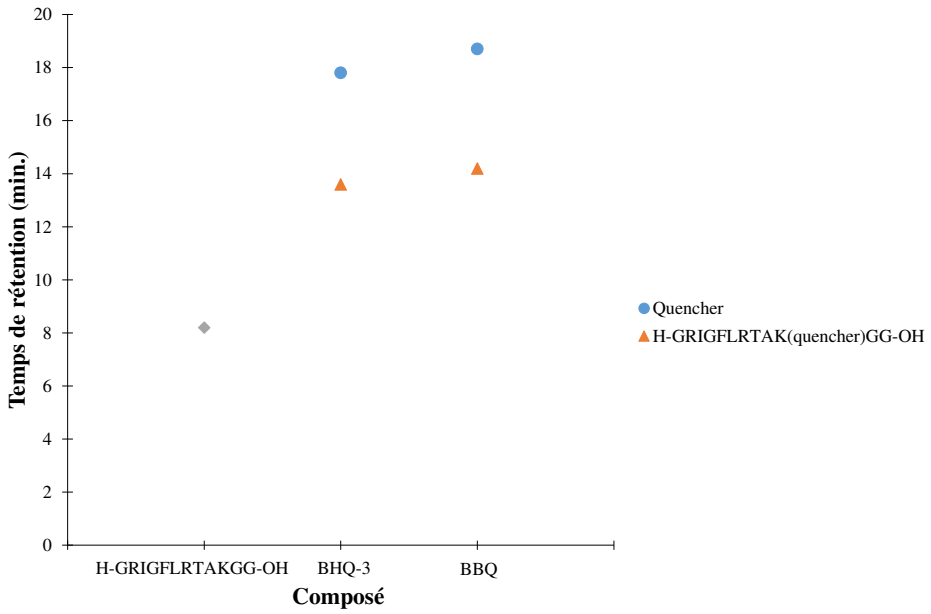


Figure 177. Comparaison des temps de rétention des *quenchers* et peptide(*quencher*). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Les deux peptide(*quencher*) possèdent des temps de rétention très proches montrant que le *quencher* présentent un caractère hydrophobe similaire.

III.7.d Clivage enzymatique

Les tests enzymatiques pour chaque composé peptide(*quencher*) ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour le peptide :

- le composé (100 µM) sans enzyme ;
- le composé (100 µM) en présence de MMP-2 (7,5 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/13 333 ;
- le composé (100 µM) en présence de MMP-9 (6 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/16 666 ;
- et le composé (100 µM) en présence de MMP-14 (58 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/1 724.

Le composé **H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH** n'est clivé que par la MMP-14 avec un taux d'hydrolyse égal à 31%. Une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au dérivé **H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH** à 20,9 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 20,2 min après incubation avec les MMP-2 et les MMP-14 (Figure 178). Ce nouveau pic a pour masses $[M+2H]^{2+}$: 651 et $[M+3H]^{3+}$: 435 correspondant bien à une partie clivée du peptide, le **H-LRTAK(BBQ)GG-OH**.

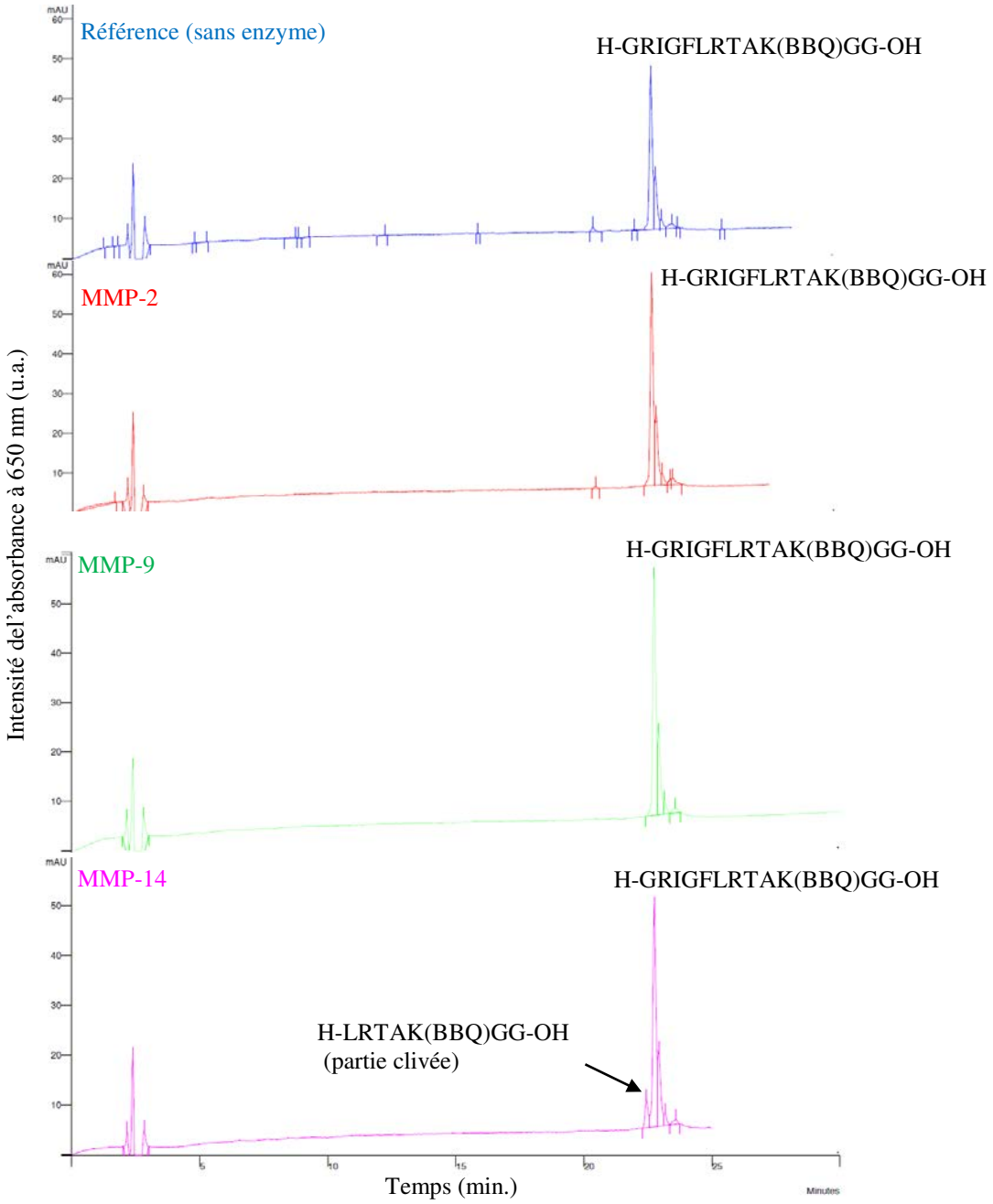


Figure 178. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé H-GRIGFLRTAK(BBQ)-OH (100 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Les enzymes actives MMP-14 et MMP-2 clivent le dérivé **H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH** entre la phénylalanine (F) et la leucine (L) avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-14. Une diminution significative de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au dérivé **H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH** à 20,9 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 20,2 min après incubation avec les MMP-2 et les MMP-14 (Figure 179). Ce nouveau pic a pour masses $[M+2H]^{2+}$: 616 et $[M+3H]^{3+}$: 411 correspondant bien à une partie clivée du peptide, le **H-LRTAK(BHQ-3)GG-OH**.

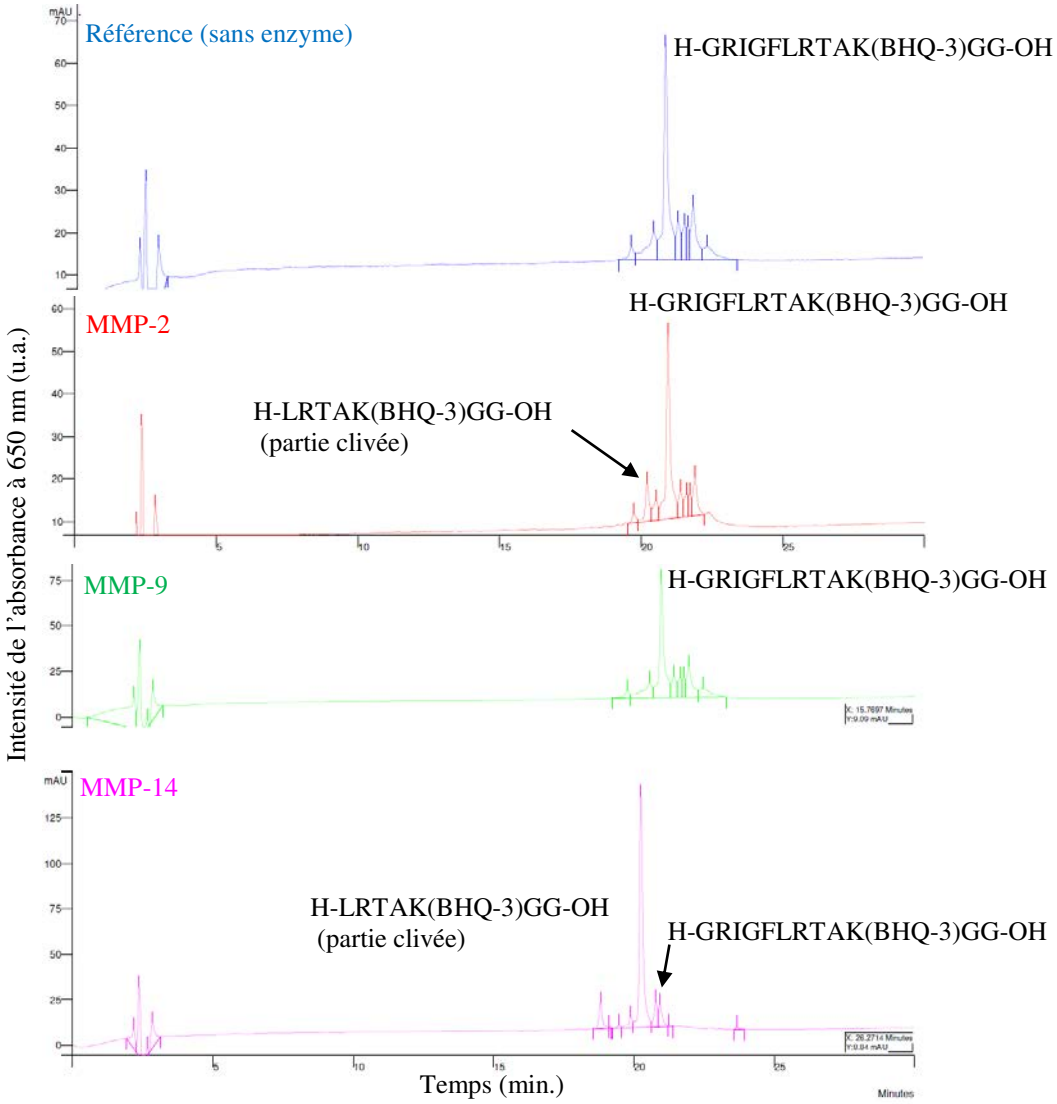


Figure 179. Chromatogrammes HPLC analytique du dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (100 µM) avant action enzymatique (bleu) et après ajout de MMP-2 (rouge), MMP-9 (vert) et MMP-14 (rose). Détection UV-Visible (λ = 650 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 45 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Le Tableau 32 résume les résultats des tests de clivage enzymatique des deux peptide(*quencher*) synthétisés.

Tableau 32. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les deux peptide(*quencher*) étudiés.

Composé	MMP (taux d'hydrolyse en %)		
	2	9	14
H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	Non	Non	**Oui (31)**
H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	**Oui (26)**	Non	**Oui (86)**

III.7.e Conclusion

Les deux dérivés peptide(*quencher*) synthétisés sont spécifiques de la MMP-14 tout comme le peptide natif et présentent le même site de clivage. Le couplage du BHQ-3 ou du BBQ sur la fonction amine -NH_2 latérale de la lysine du peptide natif permet de conserver la spécificité du clivage enzymatique pour ce peptide. Le BBQ et le BHQ-3 conviennent donc tous les deux comme inhibiteurs car (i) ce sont de bons inhibiteurs de fluorescence et (ii) couplés au peptide, ils n'ont aucun impact sur le clivage enzymatique. Toutefois, le BHQ-3 semble être un meilleur *quencher* que le BBQ pour deux raisons : 1) son spectre d'absorption est plus en adéquation avec les spectres d'émission des PS étudiés que celui du BBQ et 2) l'enzyme MMP-14 clive mieux le dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH que le dérivé H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH avec des taux d'hydrolyse respectivement de 86% contre 31%.

III.8 Les PMB

Rappelons ici que la thèse se consacre à l'étude de PMBs activables par clivage enzymatique composés de deux entités : une partie photosensible et une partie inhibitrice, différentes et reliées entre elles par un peptide (H-GRIGFLRTAKGG-OH) assurant une proximité spatiale permettant le ciblage spécifique des métalloprotéinases matricielles MMP-14 (MT1-MMP).
Les résultats obtenus auparavant sur l'influence de la partie photosensible et de la partie inhibitrice sur le clivage enzymatique du peptide natif nous ont permis de faire des choix, principalement en ce qui concerne le choix de la partie photosensible. La synthèse, la caractérisation, les propriétés photophysiques et l'activation enzymatique de six nouveaux PMBs sont décrites dans cette partie.

III.8.a Choix des PMB synthétisés

Le choix de la partie inhibitrice (du *quencher*) s'est orienté préférentiellement vers le BHQ-3, principalement car le dérivé H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH présente le meilleur taux d'hydrolyse pour l'enzyme MMP-14 ciblée. Cependant, des différences structurales importantes entre les deux *quenchers* existent : le BHQ-3 possèdent une charge positive et est constitué d'un moins grand nombre de cycle aromatique diminuant potentiellement son encombrement stérique par rapport au BBQ. La décision a été prise de comparer les clivages enzymatiques de PMBs constitués de la même partie photosensible mais possédant comme partie inhibitrice le BHQ-3 ou le BBQ.

Le choix de la partie photosensible (du PS) s'est orienté vers :

- la **P1-COOH** : le P1-GRIGFLRTAKGG-OH n'est clivé par aucune des trois MMPs. Synthétiser les PMBs suivants, P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (**PMB1**) et P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB5**), permettrait de savoir si, malgré le fait que la partie PS-peptide n'est pas clivée, une fois associée à un *quencher*, le PMB correspondant présenterait toutefois une réponse positive aux enzymes.
- la **Pyro(a)-COOH** et la « **P1-PEG-COOH** » : les composés Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH et P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH sont clivés par deux des MMPs (MMP-2 et 9) pour des rapports molaires enzyme/peptide élevés. De plus, lorsqu'une quantité plus importante d'enzyme est ajoutée (rapport molaire enzyme/peptide = 1/250-260), le dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé par les trois MMPs. Le dérivé PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH est clivé seulement par la MMP-9. Les réactifs étant chers et les synthèses en plusieurs étapes étant chronophages, nous avons décidé de nous concentrer en priorité sur les dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH clivés par au moins deux enzymes. Les PMBs Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB2**), Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (**PMB3**) et P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB4**) ont été synthétisés.
- la **Ce6** : avec une faible quantité d'enzymes nécessaire au clivage, les dérivés Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH sont presque totalement hydrolysés par les trois MMPs et principalement par les MMP-14. Le Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB6**) a été par conséquent synthétisé.

III.8.b Stratégie de synthèse

Pour la synthèse des PMBs, deux méthodes différentes ont été considérées :

(1) Le composé P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (**PMB1**) a été synthétisé avec la première méthode totalement sur support solide utilisant une résine Wang : il s'agit d'intégrer directement le *quencher* BBQ durant la procédure SPPS grâce au Fmoc-Lys(BBQ)-OH. Enfin, le couplage de la P1-COOH sur la fonction NH_2 terminale déprotégée du peptide a été réalisé de la même manière que pour les dérivés PS-peptides sur phase solide vue précédemment. Le clivage du dérivé obtenu de la résine de Wang est finalement effectué en utilisant un mélange TFA / TIPS / eau (Figure 180). Le produit final **PMB1** est purifié par HPLC sur phase inverse (C18).

Cette méthode a été testée pour la synthèse du Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (**PMB3**). Deux tentatives ont été menées mais sans succès : une analyse des bruts réactionnels en HPLC en détection par fluorescence ($\lambda_{exc.}$ = 415 nm et $\lambda_{exc.}$ = 670 nm) montre la formation de nombreux composés mais aucun profil ne correspond à un PMB. Il n'y a pas de diminution de la fluorescence émise par le photosensibilisateur. La masse attendue pour le PMB3 n'a pas été détectée par une analyse plus complète en LCMS. A ce jour, nous ne pouvons toujours pas expliquer pourquoi cette stratégie de synthèse permet d'obtenir le PMB1 mais pas le PMB3.

(2) La seconde méthode a été utilisée pour tous les autres PMB (**2 à 6**).
La synthèse du peptide H-GRIFGLRTAKGG-OH se fait ici sur une résine 2-chlorotrityl. La chaîne latérale de la lysine n'est plus protégée par un groupement Boc mais par un groupement Mtt. La déprotection du groupement Fmoc terminal se fait de façon classique avec 20% de pipéridine dans du DMF et le PS correspondant est couplé sur l'amine libre terminale du peptide de la même manière que précédemment pour les dérivés PS-peptides. Un mélange DCM/TFE/Acide acétique (4/2/2 : v/v/v) permet le clivage de la résine et d'obtenir le dérivé PS-peptide intermédiaire protégé PS-GR(Pbf)IFGLR(Pbf)T(tBu)AK(Mtt)GG-OH. Le groupement protecteur Mtt de la lysine est enlevé avec 3 % de TFA dans du DCM permettant ainsi le couplage ultérieur avec le *quencher*. Ce dernier couplage de la fonction amine latérale de la lysine avec le groupe carboxyle activée du BHQ-3 ou du BBQ (activée par NHS) s'effectue dans le DMSO en présence de 2% de DIPEA pendant toute une nuit à l'abri de la lumière, sous agitation et atmosphère inerte. Les groupes protecteurs des acides aminés sont éliminés par un mélange 95% TFA / 5 % TIPS (Figure 181). Le produit final PS-GRIFGLRTAK(*Quencher*)GG-OH est purifié par HPLC sur phase inverse (C18).
Pour le PMB4, une étape de couplage supplémentaire pour le PEG est effectuée comme précédemment montré pour le composé P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH.

Les PMB ont été obtenus avec des rendements globaux plutôt satisfaisants (entre 10 et 20 %) par rapport au nombre d'étape de synthèse et de purification (Tableau 33). Seul le PMB6 a été obtenu avec un rendement faible de 3%.

Tableau 33. Rendements η de synthèse des PMB.

Produit	PMB	η (%)
P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	PMB1	11
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB2	15
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	PMB3	17
P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB4	13
P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB5	13
Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB6	3

Une autre méthode consiste à coupler le PS sur l'amine libre terminale du peptide en phase liquide et non sur support solide. Cette méthode commence avec la synthèse du peptide protégé H-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(Mtt)GG-OH par SPPS, ensuite clivé de la résine 2-chlorotrityl grâce à une solution DCM / TFE / acide acétique. Le couplage du groupe carboxyle de la pyrophéophorbide a avec le NH_2 terminal du peptide est réalisé en phase liquide, en présence de HBTU dans de la DMF contenant 2% de DIPEA à température ambiante sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière pendant 24h. Le groupement Mtt a ensuite été supprimé par un mélange DCM / TFA / TIPS. Cette méthode de synthèse en phase liquide du composé Pyro-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH donne un rendement deux fois plus faible (16%) que la précédente méthode sur phase solide (40%). La méthode sur phase solide permet de simplifier la purification de ce composé en HPLC car de simples lavages suffisent pour éliminer les réactifs restés en solution. Le couplage du PS est plus facile sur phase solide, ceci est confirmé dans la littérature [504].

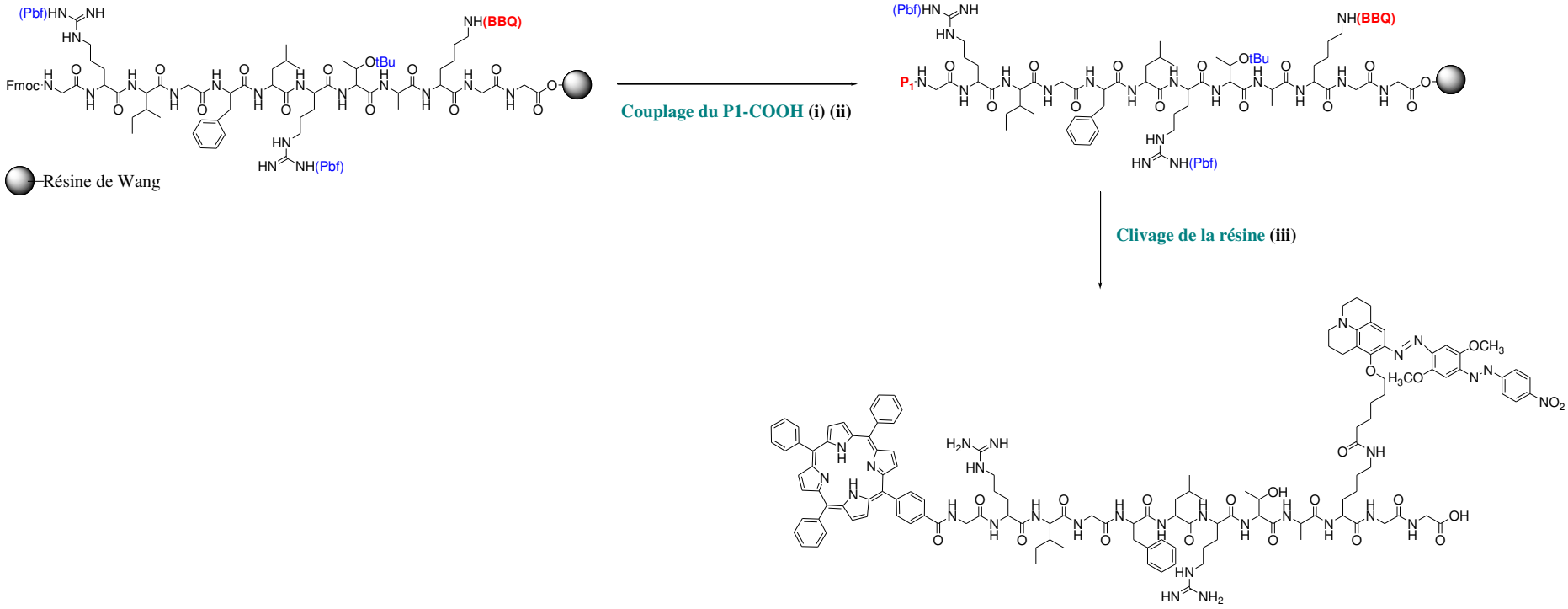


Figure 180. Synthèse du PMB1. (i) Déprotection du groupe Fmoc : 20% pipéridine dans de la DMF. (ii) P1-COOH, HBTU, NMM, DMF. (iii) Clivage: TFA/TIPS/Eau.

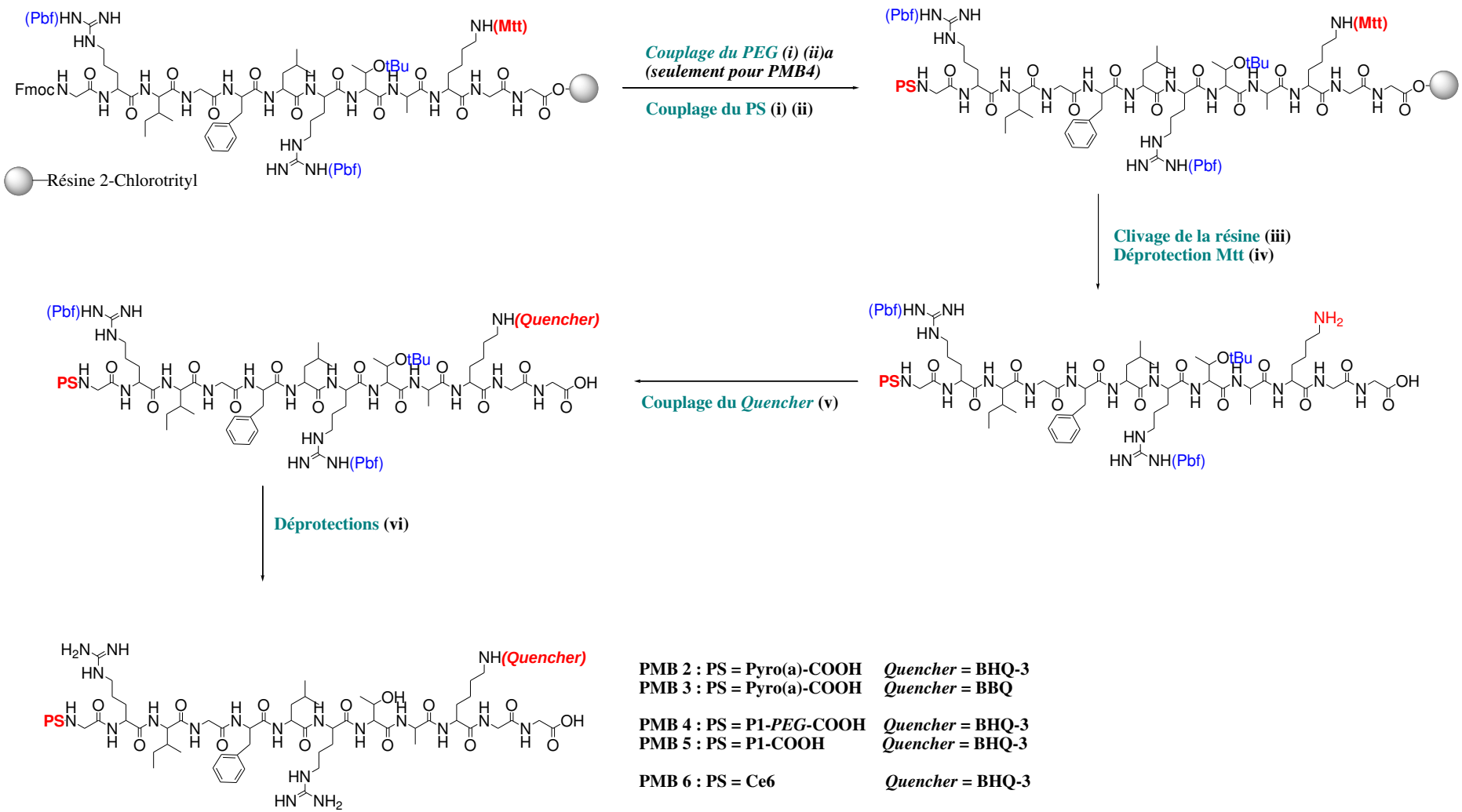


Figure 181. Synthèse des PMBs 2-4 et 6. (i) Déprotection du groupe Fmoc : 20% pipéridine dans de la DMF. (ii)a Fmoc-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-CH_2-COOH (PEG), HBTU, NMM, DMF, 16h. (ii) PS-COOH, HBTU, NMM, DMF. (iii) Clivage: DCM/TFE/acide acétique. (iv) Déprotection du groupe Mtt : 3% TFA, 5% TIPS, DCM. (v) Couplage du *Quencher*-NHS, DMSO avec 2% de DIPEA, N_2. (vi) Suppression des dernières protections : 95 % TFA, 5% TIPS.

III.8.c Hydrophobie des PMBs

La comparaison des temps de rétention et par conséquent des hydrophobies est présentée Figure 182. Les PMBs présentent des temps de rétention équivalents à ceux des parties clivées PS-GRIGF-OH respectives mais plus élevés que ceux des PS-GRIGFLRTAKGG-OH. Le couplage avec le peptide augmente le caractère hydrophile des PS mais le greffage ensuite avec le *quencher* le diminue.

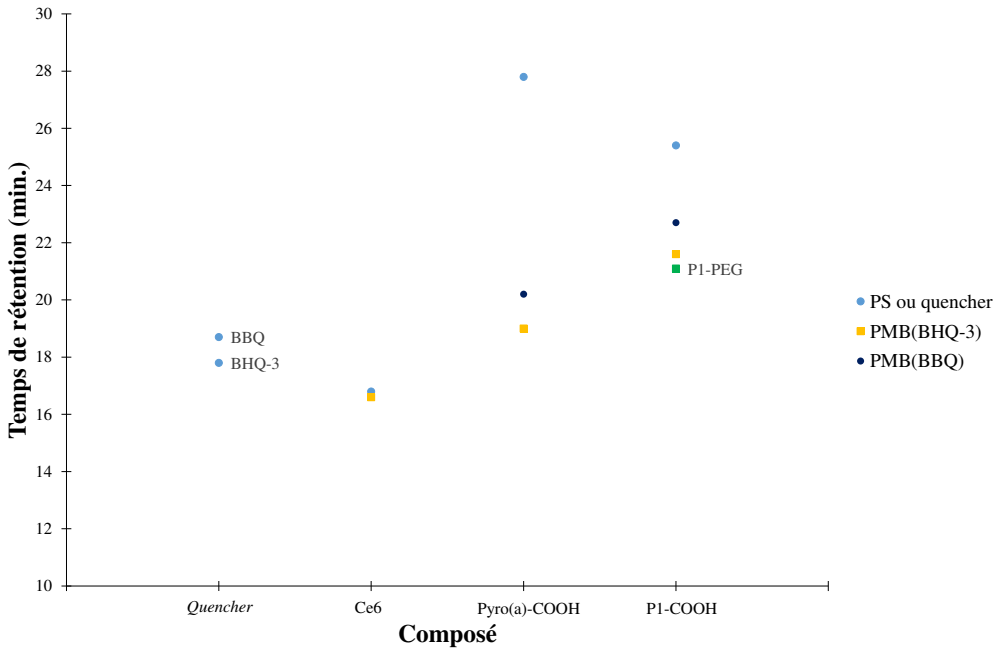


Figure 182. Comparaison des temps de rétention des PS, PS-GRIGF-OH et des PMBs. Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

La Pyro(a)-COOH possède un temps de rétention plus élevé (27,8 min) que la P1-COOH (25,4 min). Les PMBs (2 et 3) composés de Pyro(a)-COOH possèdent des temps de rétention plus faibles que les PMBs (1, 4 et 5) composés de P1-COOH (Figure 182) sans doute lié à la structure 3D des conjugués.

Les PMBs synthétisés à partir de BHQ-3 (PMBs 2 et 4-6) possèdent des temps de rétention plus faibles que les PMBs contenant le BBQ (PMBs 1 et 3), en accord avec le fait que le temps de rétention du BHQ-3 est plus faible que celui du BBQ.

La solubilité est un facteur clé de la PDT ; ainsi, il conviendrait de retenir ici le PMB6 à partir de de Ce6 et de BHQ-3 pour des études *in vitro* et *in vivo*.

III.8.d Propriétés photophysiques

Les propriétés photophysiques des PMBs sont résumées dans le Tableau 34. Comme attendu, les propriétés photophysiques des PS, P1-COOH, Pyro(a)-COOH et Ce6, montrent des grandes différences avec leurs homologues **PMB (1-6)**.

Le couplage du *quencher* est confirmé par l'apparition sur les spectres UV-visible d'une bande d'absorption plus intense entre 600 et 650 nm, longueur d'onde à laquelle les *quenchers* seuls absorbent (Figure 183).

Une diminution importante des rendements quantiques de fluorescence et de production d'oxygène singulet est observée après le couplage du *quencher* (Tableau 34).

- L'émission de fluorescence des PS après couplage avec le *quencher* diminue mais n'est pas complètement inhibée : les spectres d'émission de fluorescence des PMBs présentent les mêmes bandes d'émission que les PS correspondants (Figure 184).

- La génération d'oxygène singulet a diminué (Figure 185) : les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des PMB sont faibles, environ 0,10, voire nuls comparés à ceux des PS correspondants égaux à 0,79 (Ce6), 0,52 (Pyro(a)-COOH) et 0,64 (P1-COOH).

Les durées de vie de fluorescence des PMBs sont similaires à ceux des PS, ceci pouvant être expliqué par le fait que tout la fluorescence n'a pas été inhibée par la présence du *quencher*. Les temps de vie de fluorescence des PMBs montrent des déclins de fluorescence complexes (Figure 186). Deux déclins sont observés : un premier déclin, court, 2 ns et un second déclin mono-exponentiel correspondant à la fluorescence longue du PS. La présence d'un signal très court peut-être due à la présence d'impuretés provenant du *quencher*. Des études sont toujours en cours pour mieux comprendre ce phénomène.

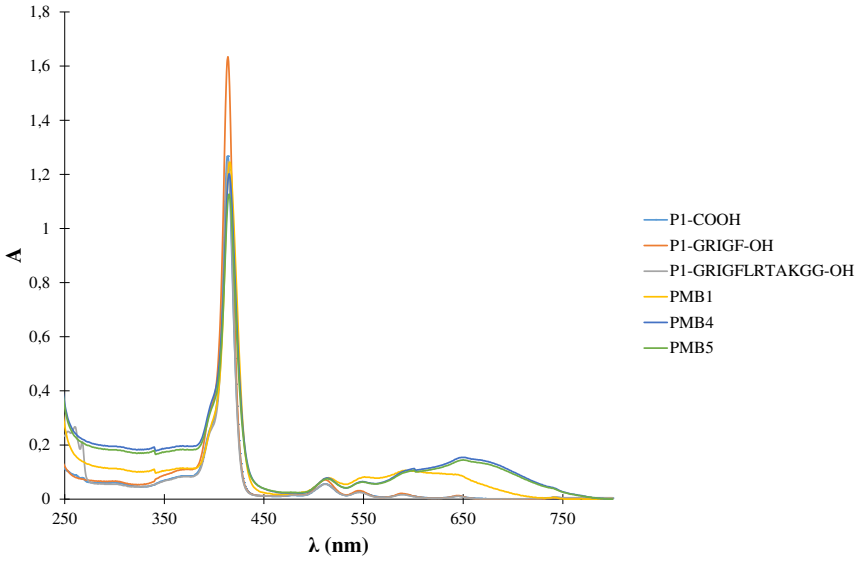
Les durées de vie d'$^1O_2$ des PMBs sont faibles voire nulles. Les déclins des PMB et des PS associés sont représentés Figure 187. Le déclin est monoexponentiel pour la P1-COOH et pour la Ce6, pour la pyrophéophorbide a il est biexponentiel (vu précédemment). Les PMB présentent un déclin trop rapide par rapport à la sensibilité de l'appareil pour être mesurés.

Tableau 34. Propriétés photophysiques des PMBs dans l'éthanol.

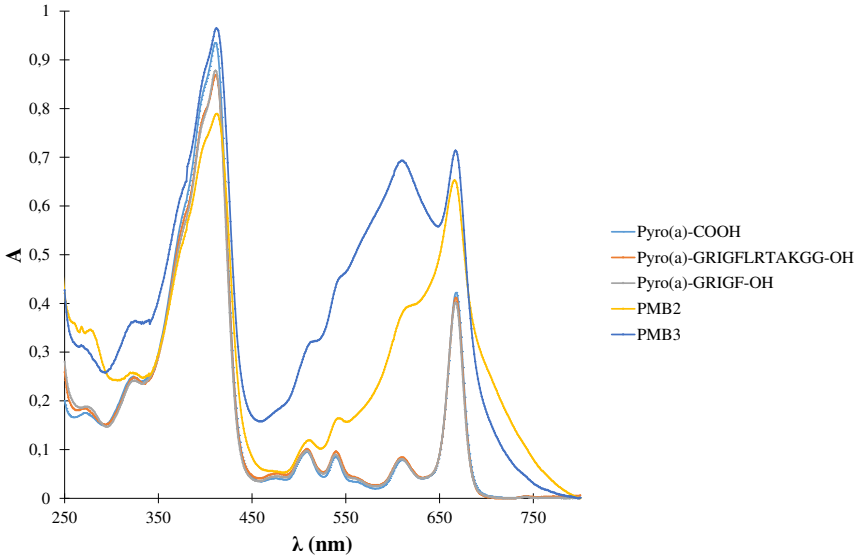
Produit	PMB	ϕ_f (±0,02)	% Fluo inhibé	ϕ_Δ (±0,05)	% $^1O_2$ inhibé	τ_F (± 0,1 ns)		Poids relatifs des τ_F (%)		τ_Δ (± 1 µs)	R_0 (Å)
P1-COOH	-	0,10	-	0,64	-	10,0		-		14	-
BBQ	-	-	-	-	-	8,4	0,7	45	55	-	-
P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	PMB1	0,01	90	0,13	80	9,7	1,7	78	22	0	34,6
P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB4	0,02	80	0	100	9,4	1,2	70	30	0	41,3
P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB5	0,02	80	0	100	9,2	0,9	83	17	0	41,3
Pyro(a)-COOH	-	0,27	-	0,52	-	6,4		-		15	-
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB2	0,02	93	0	100	6,5		-		0	49,9
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	PMB3	0,03	88	0,12	77	5,8	0,8	84	16	0	40,3
Ce6	-	0,23	-	0,73	-	4,9		-		14	-
Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	PMB6	0,04	83	0,25	66	4,6		-		0	43,2

ϕ_f : rendement quantique de fluorescence ; ϕ_Δ : rendement quantique de luminescence ; τ_f : temps de vie de fluorescence ; τ_Δ: temps de vie de production d'oxygène singulet ; R_0: rayon de Förster.

Composés à partir de P1-COOH, dans l'éthanol, C = 4,05.10^{-6} mol/L



Composés à partir de Pyro(a)-COOH, dans l'éthanol, C = 1,06.10^{-5} mol/L



Composés à partir de Ce6, dans l'éthanol, C = 7,84.10^{-6} mol/L

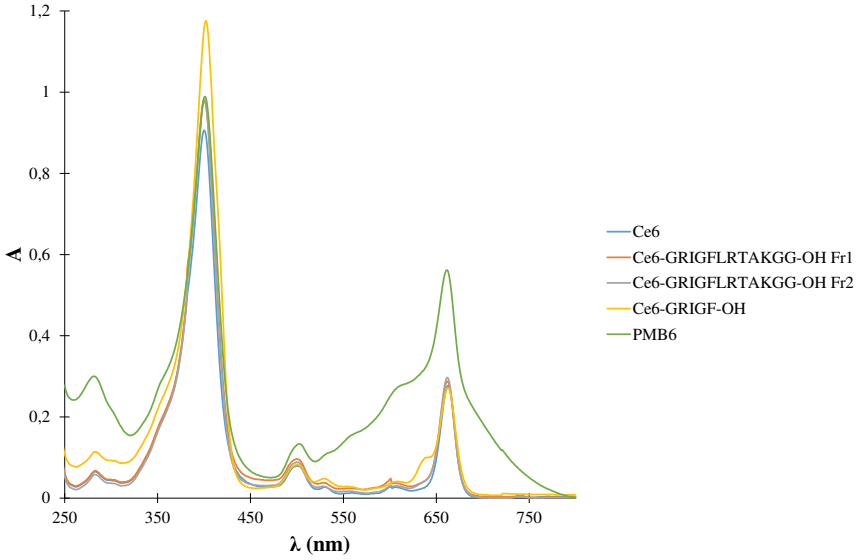


Figure 183. Spectres UV-Visible à la même concentration dans l'éthanol.

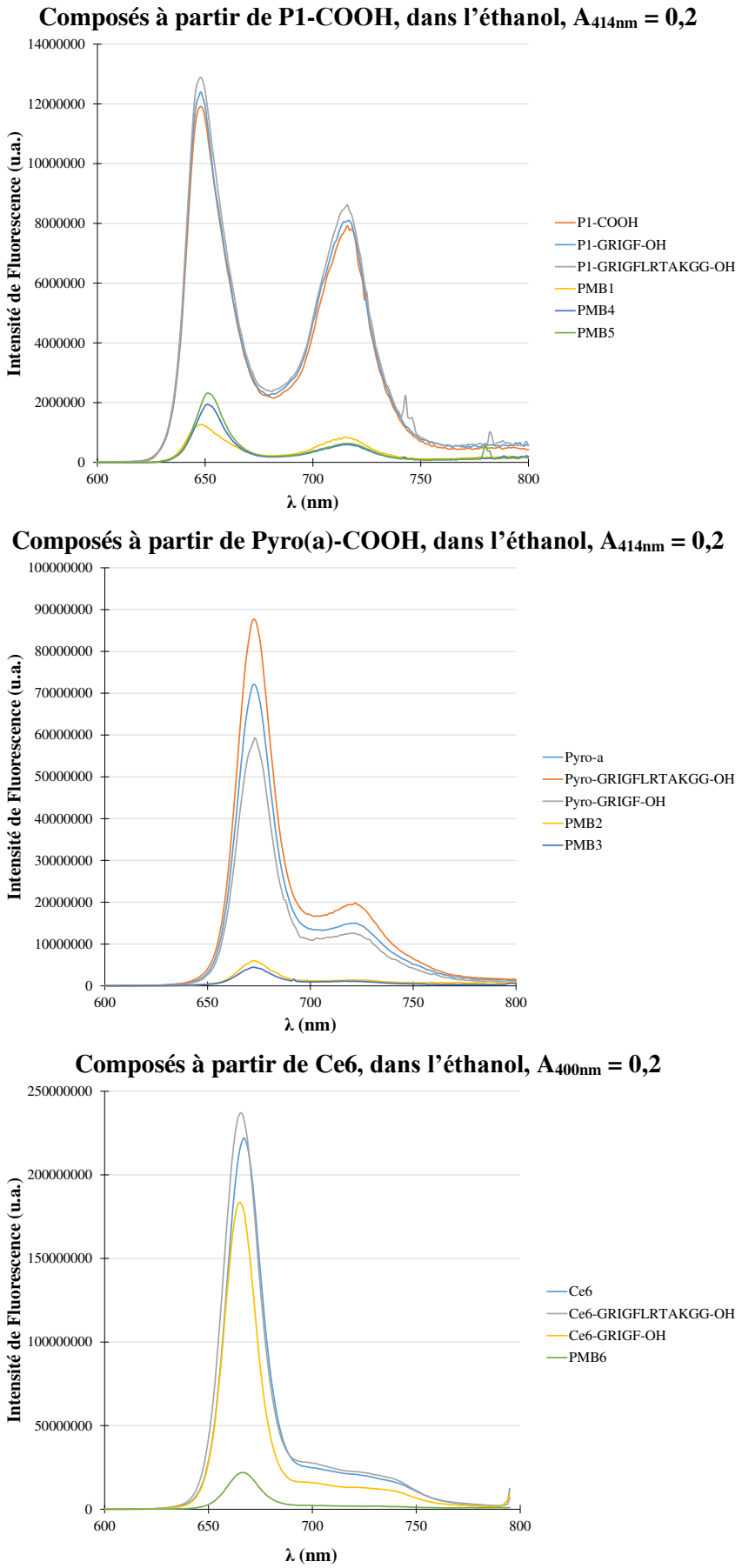


Figure 184. Spectres d'émission de fluorescence à la même absorbance dans l'éthanol.

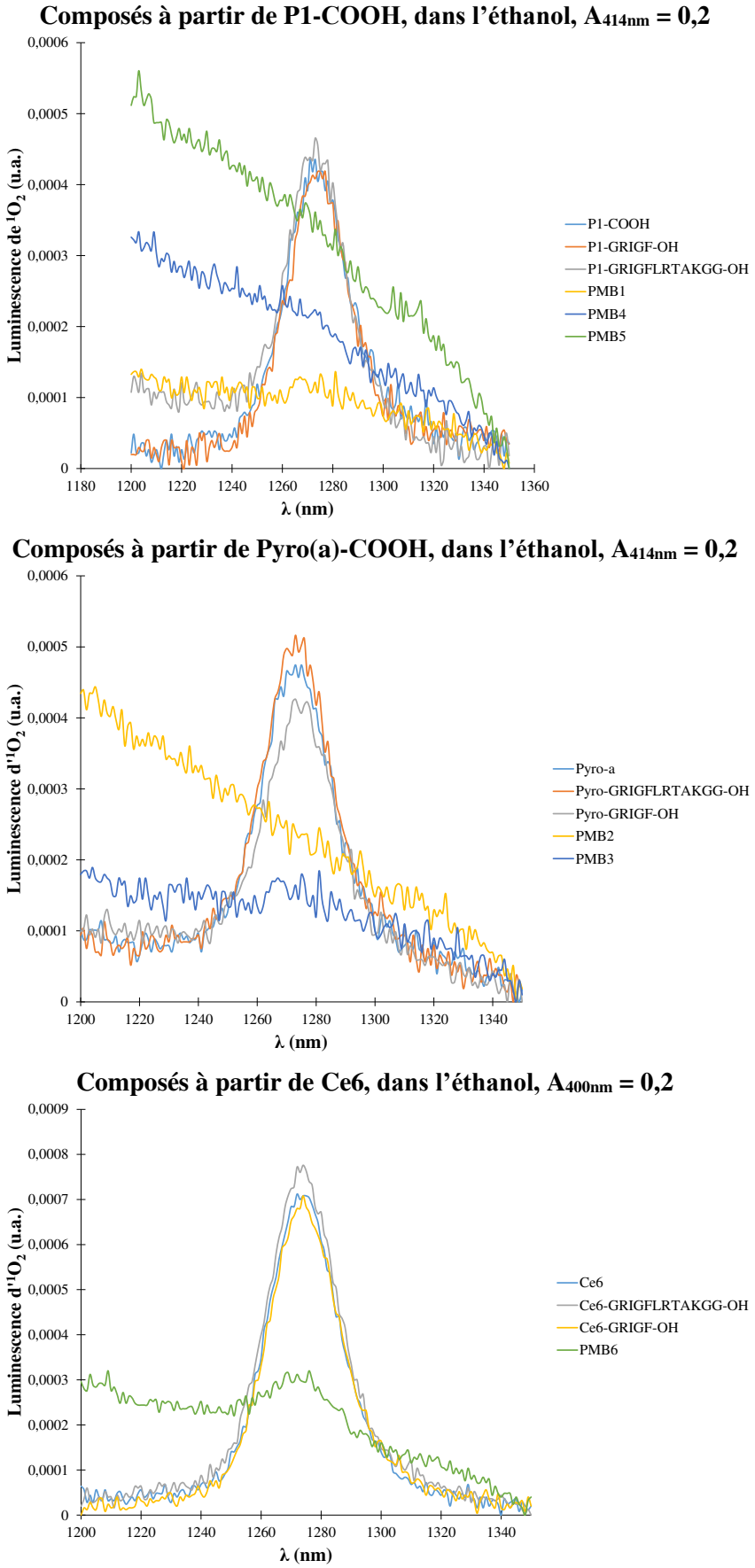


Figure 185. Spectres d'émission d'oxygène singulet.

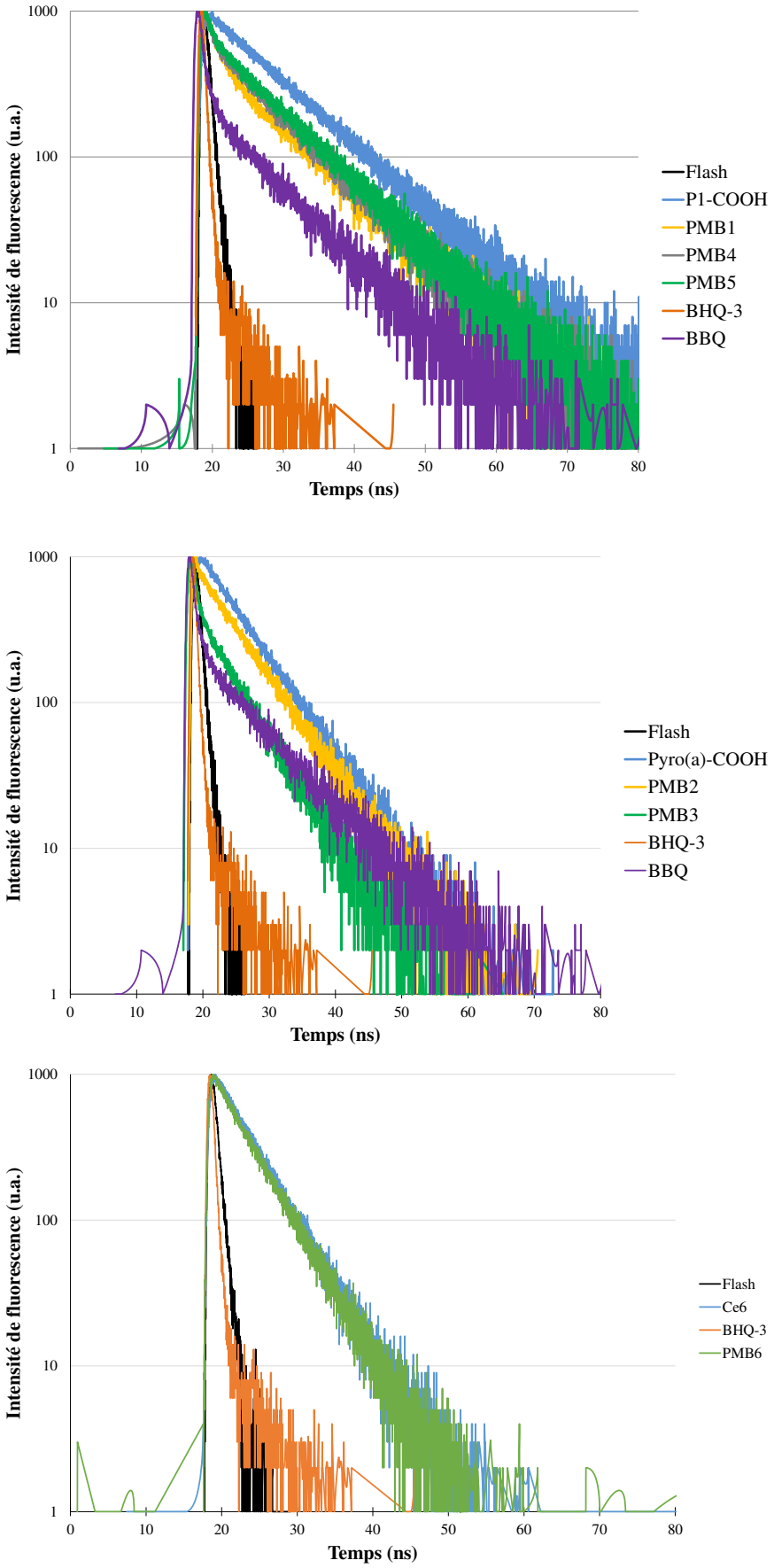


Figure 186. Durées de vie de fluorescence (λ_{exc} = 408 nm, C = 1 x 10^{-6} mol/L).

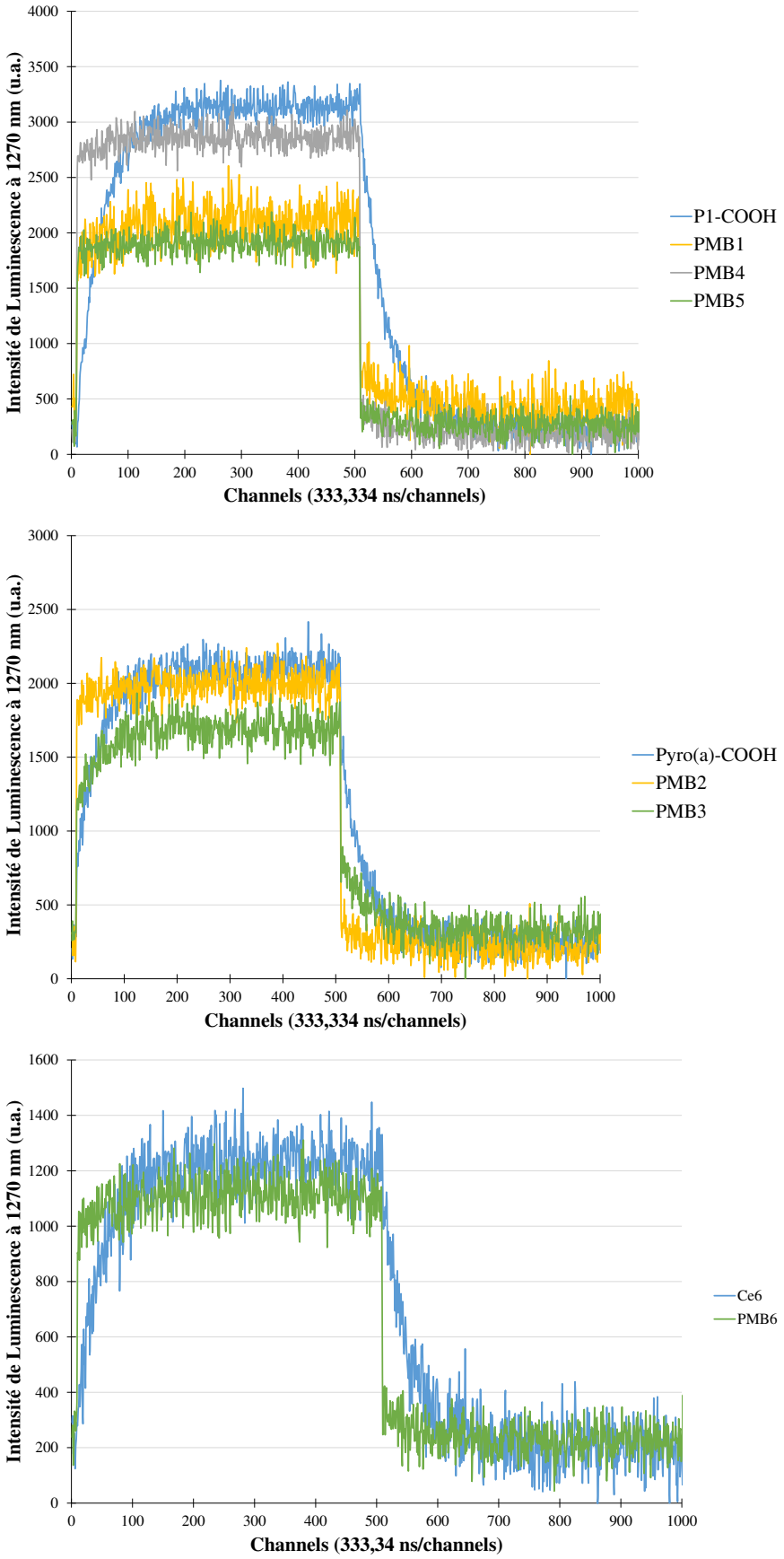


Figure 187. Durées de vie d'oxygène singulet (λ_{exc} = 408 nm, C = 1 x 10^{-6} mol/L).

III.8.e Clivage enzymatique

III.8.e.i Résultats dans les conditions 1

Dans un premier temps, les tests enzymatiques des PMBs ont été réalisés dans les mêmes conditions que ceux du peptide substrat, c'est-à-dire pour une concentration en composé de 100 µM et les concentrations d'enzyme suivantes :

- pour MMP-2 (7,5 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/13 333 ;
- pour MMP-9 (6 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/16 666 ;
- pour MMP-14 (58 nM) - rapport molaire enzyme/peptide = 1/1 724.

Dans ces conditions, les PMBs 1-6 ne sont clivés par aucune des MMPs étudiées.

III.8.e.ii Résultats dans les conditions 2

Les tests enzymatiques ont été répétés dans de nouvelles conditions pour les trois enzymes ; ces mêmes conditions qui ont permis un clivage par les MMPs étudiées du dérivé Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH (Chapitre 5. III.6.g).

La Pyro(a)-COOH et la Ce6 sont les PS parmi les PS étudiés qui possèdent les coefficients d'extinction molaires les plus élevés (30-40 000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, Chapitre 5. III.6.e).

La concentration en **PMB2**, **PMB3** et **PMB6** est fixée à 15 µM. Le rapport molaire enzyme/peptide a été réduit par rapport aux conditions 1 précédentes, à 1/250-260 soit une concentration en enzyme égale à 58-60 nM. Dans ces conditions :

- les trois enzymes actives étudiées clivent le **PMB2** avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-2 (64 %) que pour la MMP-9 (30 %) et enfin que pour la MMP-14 (27 %).
- le **PMB3** est clivé par les MMP-2 avec un taux d'hydrolyse égal à 35 %. La MMP-9 clive une trop faible quantité (ε) de PMB3 pour pouvoir déterminer le taux d'hydrolyse associé.
- le PMB6 n'est toujours clivé par aucune des MMPs étudiées.

Dans les deux cas, une diminution de l'intensité du pic (en HPLC ou en MS) correspondant au **PMB2** ou au **PMB3** à 20,0 et 21,2 minutes a été observée et un nouveau pic distinct a été détecté à 23,8 min après incubation avec les différentes MMPs sauf pour le **PMB3** avec la MMP-14. Ce nouveau pic a pour masses $[M+H]^+$: 1066 et $[M+2H]^{2+}$: 534 correspondant bien à la partie clivée Pyro(a)-GRIGF-OH (Figure 188).

Dans un seul cas, l'analyse en LCMS a permis de détecter des masses pouvant correspondre à la seconde partie clivée du PMB : les masses $[M+2H]^{2+}$: 616 et $[M+3H]^{3+}$: 411 correspondant au composé **H-LRTAK(BHQ-3)GG-OH** ont été détectées pour le **PMB2** après incubation avec la MMP-2. Dans les autres cas, aucune seconde partie n'a été détectée en masse : la sensibilité de l'appareil peut être une cause.

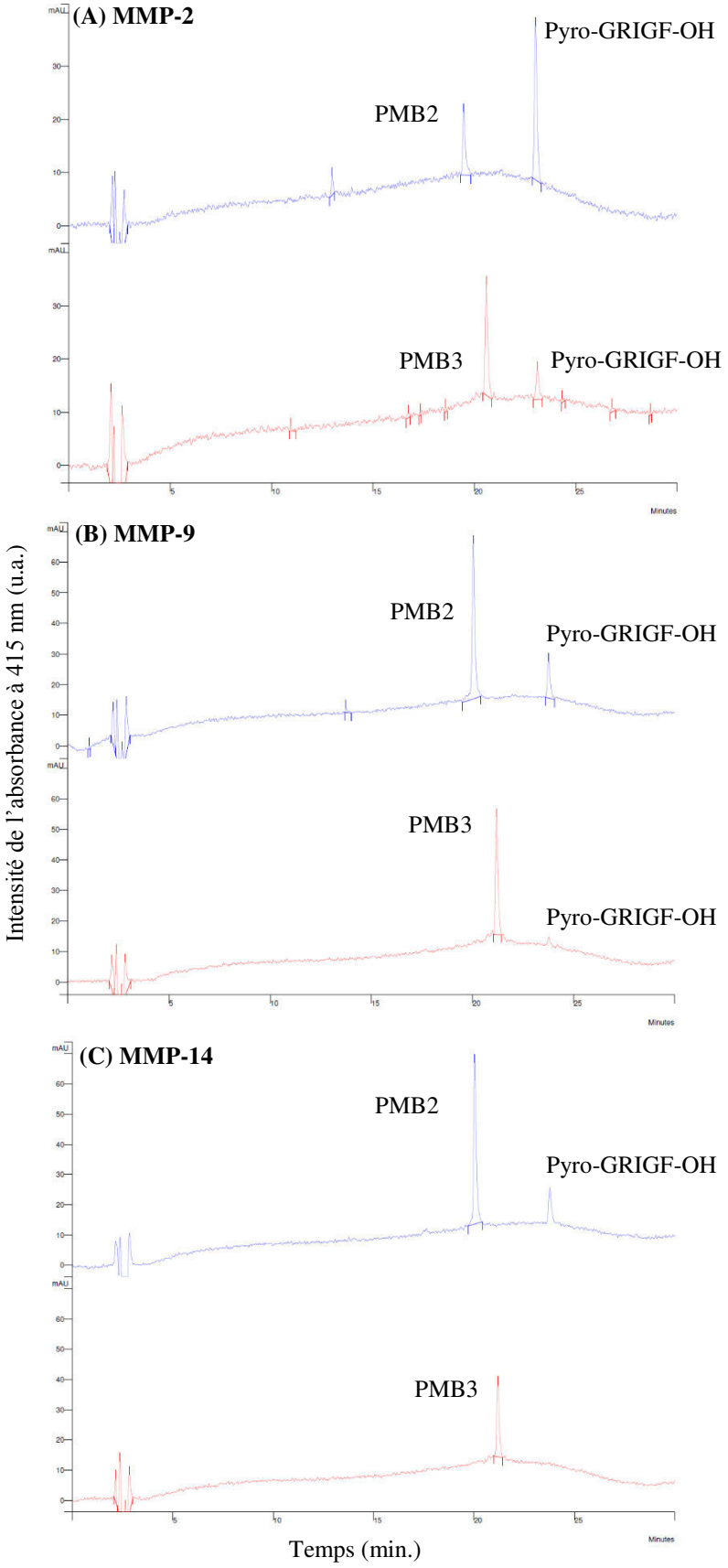


Figure 188. Chromatogrammes HPLC analytique des PMB2 (en bleu) et PMB3 (en rouge) (15 µM) après ajout de MMP-2 (A), MMP-9 (B) et MMP-14 (C). Détection UV-Visible (λ = 415 nm). Gradient : 10/90 % à 100/0 % en 25 min (acétonitrile/eau + 0,1% TFA).

Le Tableau 35 résume les résultats des tests de clivage enzymatique des différents PMBs synthétisés dans les deux conditions utilisées.

Tableau 35. Résultats des tests de clivage enzymatique pour les PMBs synthétisés.

(Oui = il y a un clivage et Non = il n'y a pas de clivage)

Conditions 1 **100 µM pour le composé** **MMP-2 (7,5 nM): 1/13 333** **MMP-9 (6 nM): 1/16 666** **MMP-14 (58 nM): 1/1 724**		**Conditions 2** **15 µM pour le composé** **Rapport 1/250-260** **MMP-2 (60 nM)** **MMP-9 (60 nM)** **MMP-14 (58 nM)**		
Composé	**PMB**	**MMP (taux d'hydrolyse en %)**		
		2	**9**	**14**
P1-GRIGFLRTAKGG-OH	-	Non	Non	Non
P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH	-	**Oui (3,2)**	**Oui (1,5)**	Non
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH	**-**	**Oui (0,5)** ***Oui (73)***	**Oui (5,4)** ***Oui (92)***	Non ***Oui (83)***
Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH	**-**	**Oui (75)**	**Oui (4-6)**	**Oui (76-83)**
P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	**PMB1**	Non	Non	Non
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	**PMB2**	Non ***Oui (64)***	Non ***Oui (30)***	Non ***Oui (27)***
Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH	**PMB3**	Non ***Oui (35)***	Non ***Oui (ε)***	Non ***Non***
P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	**PMB4**	Non	Non	Non
P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	**PMB5**	Non	Non	Non
Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH	**PMB6**	Non ***Non***	Non ***Non***	Non ***Non***

III.8.f Conclusion et perspectives

Les six PMBs ont été obtenus avec de faibles rendements globaux, d'une part à cause de l'asymétrie des porphyrines, et d'autre part à cause du nombre d'étapes et de purifications. Malgré le rendement faible de synthèse, le PMB6 est le PMB le plus hydrophile et conviendrait donc mieux que les autres PMBs pour les études *in vitro* et *in vivo*.

La conjugaison entre le PS et les différents groupements (peptides et bras espaceur) n'a aucune incidence sur les propriétés photophysiques du PS (Chapitre 5. III.6). Cependant, le couplage d'un *quencher* sur le *N*-terminal de la lysine de ces dérivés « PS-GRIGFLRTAKGG-OH » a pour conséquence une forte inhibition comprise entre 80 et 95% de la fluorescence du PS et également une forte inhibition comprise entre 70 et 100% de la production d'oxygène singulet du PS. L'inhibition est dûe à un mécanisme de FRET. Le *quencher* permet un transfert d'énergie de l'état singulet excité du PS vers son état singulet, suivi d'une désactivation non-radiative ceci aboutissant à une inhibition de la fluorescence et de la production d'oxygène singulet du PS.

Le PMB2, composé de Pyro(a)-COOH et de BHQ-3, présente les meilleurs pourcentages d'inhibition de fluorescence et de production d'oxygène singulet.

Néanmoins, à ce stade de l'étude, nous pouvons donner quelques premières conclusions :

- avec de faible quantité d'enzyme (rapports molaires enzyme/PMB = 1/13 333 ; 1/16 666 et 1/1 724), aucun PMB n'est clivé même dans le cas où les deux dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH et H-GRIGFLRTAK(*quencher*)-OH sont clivés par les enzymes étudiées.
- avec une quantité plus élevée d'enzyme (rapports molaires enzyme/PMB = 1/250-260), les PMBs 2 et 3, ayant la Pyro(a)-COOH comme PS, sont clivés par deux ou trois MMPs avec un taux d'hydrolyse plus élevé pour la MMP-2 que pour les MMP-9 et -14. En revanche, le clivage enzymatique n'est pas restauré pour le PMB6 dans ces conditions. Les études menées en LCMS confirment le clivage entre les résidus phénylalanine (F) et leucine (L) ; le site de clivage n'est donc pas modifié. Même si le peptide substrat choisi est spécifique des MMP-14, après couplage du PS et du *quencher* sur ce peptide pour former le PMB correspondant, le clivage enzymatique diverge : les deux seuls PMBs clivés sont spécifiques de la MMP-2.

Le couplage d'un *quencher* sur le *N*-terminal de la lysine des dérivés « PS-GRIGFLRTAKGG-OH » a pour conséquence de modifier la sélectivité du peptide substrat.

La modélisation moléculaire des PMBs semble primordiale pour nous permettre de mieux comprendre les différences importantes au niveau des clivages enzymatiques de ces nouvelles constructions moléculaires.

III.9 Stratégie originale de synthèse des PMB : synthèse enzymatique

Une alternative à la synthèse chimique du PMB est l'utilisation des potentialités et des spécificités des enzymes pour réaliser le greffage du *quencher* sur le peptide *via* une liaison amide.
Dans cette partie, la possibilité de coupler le *quencher* sur la fonction amine latérale de la lysine (réaction d'acylation) par voie enzymatique est étudiée (Figure 189). Les *quenchers* choisis sont le *BlackBerry quencher* BBQ-650 (Berry & Associates) et le *black hole quencher* BHQ-3 (Biosearch Technologies), représentés dans la Figure 189.

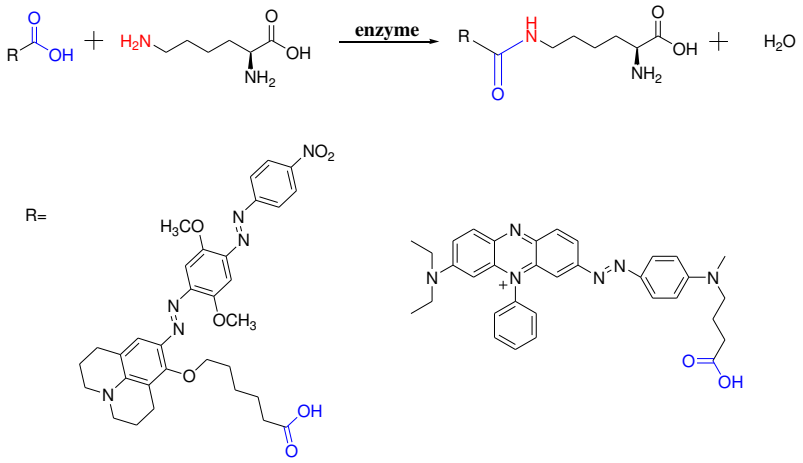


Figure 189. Réaction de couplage du *quencher* sur la fonction amine latérale de la lysine par voie enzymatique (*quenchers* : BBQ-650 et du BHQ-3).

III.9.a Introduction sur la réaction d'acylation par voie enzymatique

Les procédés d'acylation impliquant des enzymes ont largement fait leurs preuves en termes d'efficacité et de sélectivité [505-508]. Ces procédés permettent de produire des dérivés acylés de manière spécifique en fonction de l'enzyme employée tout en simplifiant les étapes de purification. Par ailleurs, ils sont généralement plus respectueux de l'environnement que les procédés chimiques traditionnels, en raison de l'innocuité des catalyseurs employés et de la nature des solvants utilisés.

Plusieurs types d'enzymes peuvent être utilisés pour catalyser les réactions d'acylation, ce sont généralement des **hydrolases** bien connues pour leurs propriétés d'énantiosélectivité, de régiosélectivité et de chimiosélectivité particulièrement intéressantes dans le cadre de l'acylation de composés multifonctionnels.

Dans le cas d'un nucléophile de type hydroxyle ou amine, la réaction sera respectivement considérée comme une *O*-acylation ou une *N*-acylation si le donneur de groupement acyle est un acide gras libre (hydrolyse inverse) et comme une transesterification ou transamidification si c'est un ester d'acide gras [509].

La liaison peptidique est une liaison amide, formée par élimination d'une molécule d'eau entre un groupement $-NH_2$ et $-COOH$ d'acides aminés. L'étude de l'acylation enzymatique d'un acide aminé consiste à étudier les cinétiques de réaction et à déterminer les conditions réactionnelles optimales pour l'acylation de cet acide aminé. Ces conditions sont notamment :
- la concentration des substrats,
- le rapport molaire,
- la nature et la concentration de l'enzyme,
- le milieu de réaction,
- le pH,
et - la température.

III.9.a.i Choix du solvant

Le solvant utilisé dans une réaction enzymatique :
- doit solubiliser au moins partiellement les réactifs,
- ne doit pas affecter la couche d'hydratation de l'enzyme sous peine d'affecter son activité due à une dénaturation,
- et doit permettre de conserver la sélectivité de l'enzyme.

Le choix d'un solvant repose sur l'hydrophobie des substrats en jeu, la polarité du solvant et des substrats. En effet, dans un solvant apolaire, les molécules d'eau se répartissent préférentiellement autour de l'enzyme assurant son activité. On utilise donc plutôt des solvants apolaires, hydrophobes, de façon à minimiser la diffusion de ces molécules d'eau constitutives et donc de maintenir structure et activité de l'enzyme. Cependant, certains substrats se solubiliseront mieux dans un solvant davantage polaire. Les solvants organiques sont largement cités dans la littérature. Néanmoins, dans un but de développer des procédés plus respectueux de l'environnement, leur utilisation tend à diminuer au profit de solvants alternatifs tels que les liquides ioniques et les fluides supercritiques. Dans le cas des réactions catalysées par des lipases, les solvants organiques utilisés sont anhydres car la présence d'eau favorise l'équilibre thermodynamique en faveur de la réaction d'hydrolyse au détriment de la réaction de synthèse. D'autres enzymes telles que les acylases, quant à elles, présentent la capacité à catalyser des réactions de synthèse d'ester et d'amides en milieux aqueux de sorte que le problème de solubilisation de substrats polaires en milieu organique est contourné. Les acylases sont aussi dotées d'un caractère régiosélectif aussi bien en hydrolyse qu'en synthèse. Cette propriété paraît très intéressante pour la mise en œuvre de procédés d'acylation d'acides aminés et de peptides. De récentes études ont montré qu'en jouant sur le ratio molaire accepteur / donneur d'acyle, il est possible d'acyler régio-sélectivement la fonction amine en position ε de la lysine en utilisant une acylase issue de *Streptomyces mobaraensis* en tampon phosphate [510]. A titre indicatif, ces études ont montré que cette enzyme présentait aussi une spécificité de substrat en faveur des acides gras à moyenne et longue chaînes. Cette enzyme s'est aussi avérée efficace d'un point de vue rendement et régio-sélectivité pour la production de dérivés monoacylés de dipeptides en milieux aqueux [511].

III.9.a.ii Choix des enzymes

Les enzymes de la classe des hydrolases sont des enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'ester, de liaisons peptidique, phosphodiester et osidique.
Les protéases, les nucléases, les glycosidases, les estérases, les acylases et les lipases sont des hydrolases. Parmi ces enzymes, les lipases, qui naturellement hydrolysent les triglycérides en acides gras et glycérol, et les acylases sont les hydrolases les plus utilisées pour l'acylation d'alcools, d'amines, d'acides aminés, de polyols, d'amino-alcools…

III.9.a.iii Paramètres influençant l'acylation enzymatique

Le **contrôle du rapport molaire** entre le donneur d'acyle et l'accepteur d'acyle détermine l'état de protonation des groupements ionisables des substrats et leur disponibilité. L'activité enzymatique est définie en termes de vitesse de réaction. L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./g d'enzyme solide).
L'**effet du pH** est tel qu'une faible variation du pH peut influencer l'activité enzymatique, en modifiant l'état de protonation d'un groupe ionisable du site catalytique, et ainsi modifier l'évolution de la réaction. Les enzymes présentent plusieurs groupements fonctionnels variés qui leur confèrent des propriétés de régio-, chimio- et stéréosélectivité. De plus, elles ont un facteur d'accroissement de la vitesse de réaction. Cependant, leur coût est assez élevé et leur solubilité est limitée dans les solvants organiques, et montrent une instabilité même dans des conditions dites « douces » [512].

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les potentiels catalytiques des enzymes hydrolytiques pour tenter de coupler le *quencher* au peptide.

III.9.b Couplage du *quencher* sur la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine par voie enzymatique et comparaison avec la synthèse chimique

L'objectif est de comparer la faisabilité du couplage du *quencher* sur la fonction amine latérale de la lysine par voie enzymatique et par synthèse chimique.

III.9.b.i Synthèse chimique

- **Fmoc-Lys(*quencher*)-OH**

Le composé Fmoc-Lys(BBQ)-OH existe commercialement (Berry & Associates). Nous avons donc décidé de nous concentrer seulement sur la synthèse chimique de la Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH qui n'existe pas commercialement.

Le couplage du *black hole quencher* à la fonction amine latérale de la lysine a été réalisé dans les mêmes conditions que la synthèse de la Fmoc-Lys(P1)-OH (décrite précédemment chapitre 4 : III.4) : le BHQ-3 activé NHS (obtenur chez Biosearch Technologies) est mis à réagir avec de la Fmoc-Lys-OH.HCl dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine (TEA) sous argon à température ambiante pendant 24 h (Figure 190). Le composé brut est ensuite purifié par HPLC-phase inverse (C18) utilisant le gradient suivant : acétonitrile/eau (0,1 % TFA) [10:90] jusqu'à 100 % acétonitrile en 45 minutes, suivi par 100 % acétonitrile (0,1 % TFA) pendant 15 minutes [R_t = 30,1 min]. Le composé Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH est isolé sous forme d'une poudre bleue avec un rendement de 56 %.

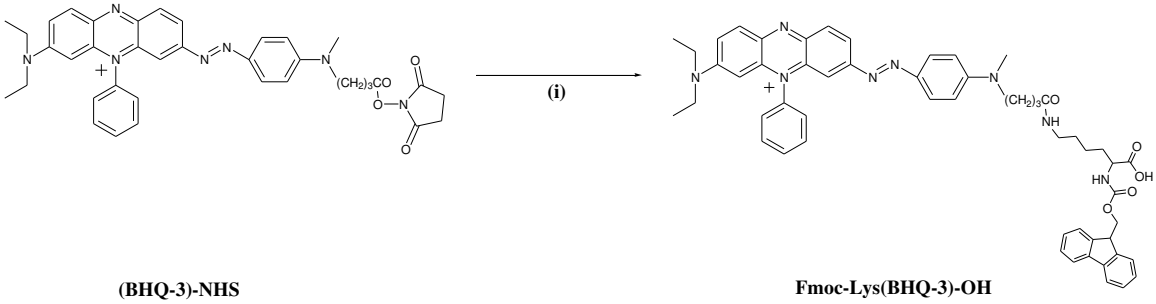


Figure 190. Synthèse chimique du composé Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH : (i) Fmoc-Lys-OH. HCl (DMF), TEA, CH_2Cl_2, 24h.

La masse du composé Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH a été confirmée par HRMS ESI+ (Figure 191).

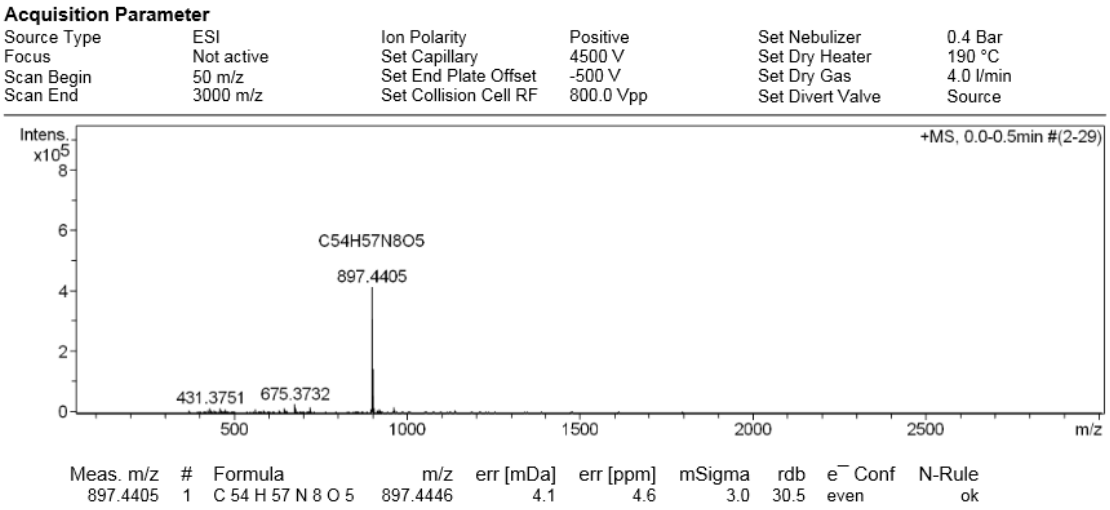


Figure 191. Spectre de masse du Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH.

Le composé Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH peut être directement utilisé lors de la synthèse peptidique pour l'élaboration du PMB (voir stratégie similaire utilisée avec le Fmoc-Lys(BBQ)-OH, chapitre 5. III.7.b Figure 180).

- **H-Lys(*quencher*)-OH**

Pour nous servir de référence dans la synthèse par voie enzymatique, nous avons envisagé d'enlever le groupement Fmoc (fluorénylméthoxycarbonyle) afin d'obtenir les composés H-Lys(BHQ-3)-OH et H-Lys(BBQ)-OH (Figure 192). Le point important du Fmoc est la présence d'un proton acide (pKa = 25), entouré en rouge (Figure 192). La présence de ce proton rend difficile l'élimination du Fmoc : le traitement par une base des amines protégées par Fmoc élimine un fulvène et fait apparaître le groupement NH_2 (cf. chapitre 4. 0.
Déprotection du Fmoc).

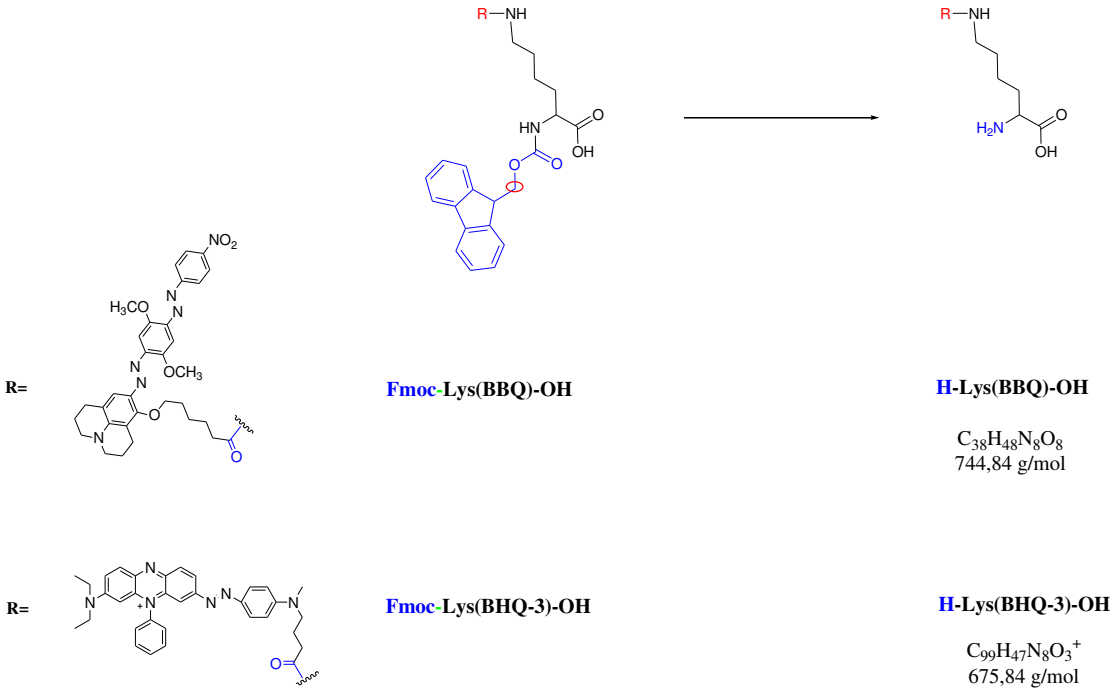


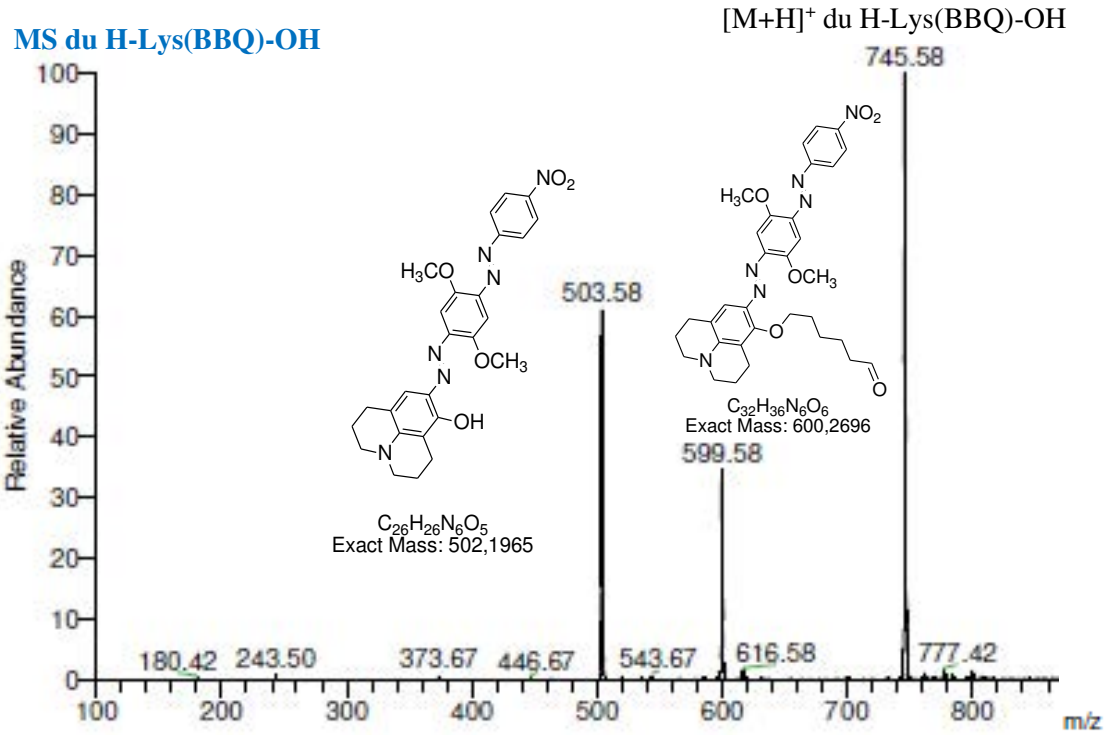
Figure 192. Déprotection du groupement Fmoc pour obtenir le composé H-Lys(*quencher*)-OH.

Le Fmoc peut être clivé typiquement par une solution de pipéridine à 20% dans la DMF, méthode classique utilisée par exemple en SPPS (Chapitre 4. III.3. La synthèse peptidique sur phase solide (SPPS). 5 mg de Fmoc-Lys(*quencher*)-OH ont été dissous dans une solution de pipéridine à 20% dans du DMF, à l'abri de la lumière, sous agitation pendant 30 min. Une analyse sur couche mince de silice (Butanol/Acide acétique/eau, 6:2:2) a révélé :

- Pour le BBQ : la disparition du réactif et la formation d'un nouveau composé majeur de couleur bleu, le H-Lys(BBQ)-OH, confirmé en LCMS (Figure 193).
- Pour le BHQ-3 : la disparition du réactif et l'apparition de quatre nouveaux composés. Deux composés majeurs de couleur violette ont été isolés et analysés par spectrométrie de masse ; il s'avère que dans ces conditions, le BHQ-3 se dégrade en deux molécules de plus faible poids moléculaire. Toutefois, le composé H-Lys(BHQ-3)-OH a été détecté en LCMS (Figure 194).

Ces mêmes conditions LCMS seront utilisées pour l'étude des synthèses enzymatiques (phase inverse (C18) utilisant le gradient suivant : acétonitrile/eau (0,1 % TFA) [10:90] jusqu'à 100 % acétonitrile en 25 minutes, suivi par 100 % acétonitrile (0,1 % TFA) pendant 15 minutes).

Temps de rétention : 15,1 min.



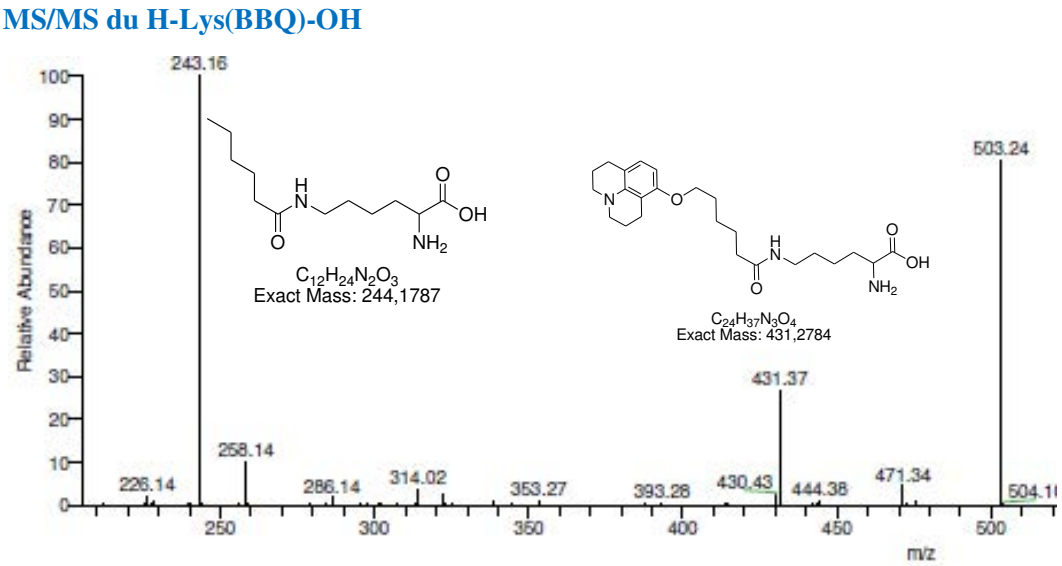
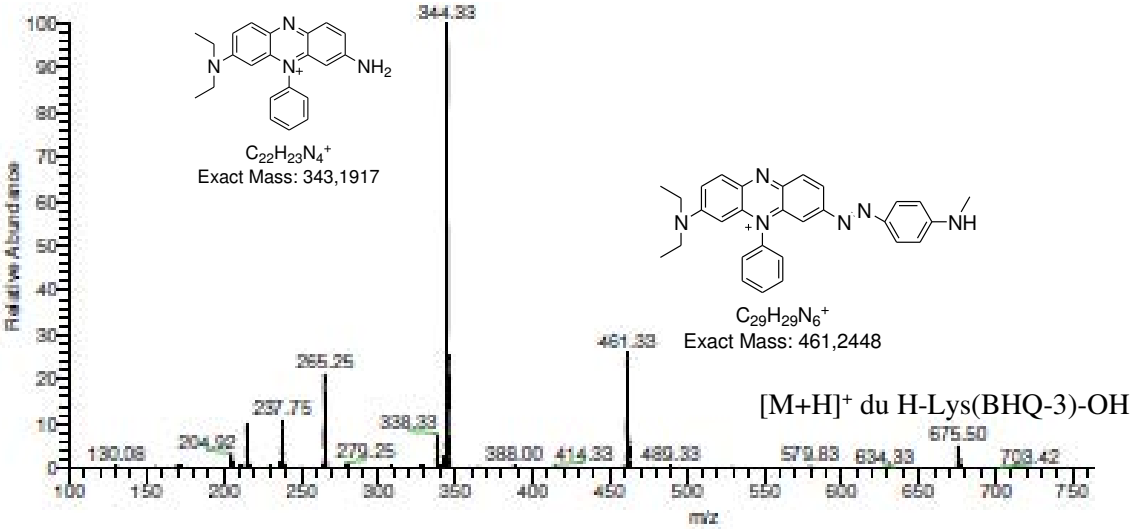


Figure 193. Résultats obtenus par spectrométrie de masse pour H-Lys(BBQ)-OH obtenus par synthèse chimique.

Temps de rétention : 13,6 min.

MS du H-Lys(BHQ-3)-OH



MS/MS du H-Lys(BHQ-3)-OH

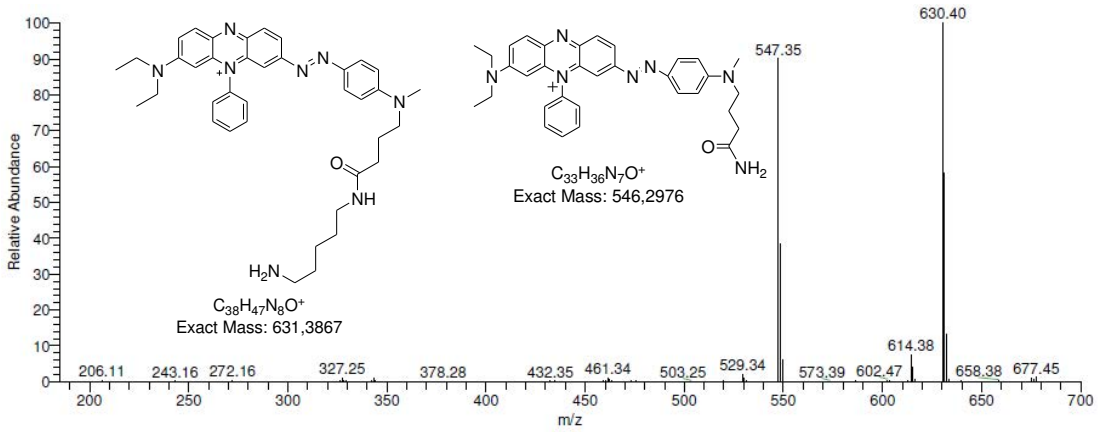


Figure 194. Résultats obtenus par spectrométrie de masse pour H-Lys(BHQ-3)-OH obtenus par synthèse chimique.

III.9.b.ii Synthèse enzymatique

Les catalyseurs enzymatiques présentent différents avantages, tels que des conditions douces réactionnelles et une sélectivité pour un groupement fonctionnel particulier, limitant la nécessité de bloquer certaines fonctions chimiques. Les enzymes hydrolytiques telles que les lipases dans un milieu non-aqueux et acylases dans un milieu aqueux ont été utilisées car déjà décrites pour leur capacité à catalyser des réactions d'acylation [513-515].

Les méthodes de détection d'un éventuel couplage enzymatique entre la lysine et le *quencher* sont :
- la migration sur plaque de silice (CCM). Le solvant utilisé classiquement est un mélange BuOH/acide acétique/H_2O (6/2/2). La détection est faite par visualisation des taches après révélation à la ninhydrine qui réagit avec les fonctions amines primaires en générant une couleur pourpre après chauffage, permettant de détecter les produits formés avec la lysine.
- la spectrométrie de masse couplée à une LC pour déterminer la masse de tous les produits formés (Tableau 25) (colonne chromatographique C18 en phase inverse 150mm x 2,1mm × 5µm). L'ionisation est réalisée par électro spray en mode positif.

Tableau 36. Formules brutes et masses exactes des *quenchers* et H-Lys(*quenchers*)-OH.

Composé	BBQ	H-Lys(BBQ)-OH	BHQ-3	H-Lys(BHQ-3)-OH
Formule brute	$C_{32}H_{36}N_6O_7$	$C_{38}H_{48}N_8O_8$	$C_{33}H_{35}N_6O_2^+$	$C_{39}H_{47}N_8O_3^+$
Masse exacte (g/mol)	616,66	744,84	547,67	675,84

- **Etude de la solubilité des *quenchers* dans différents solvants potentiels pour les synthèses enzymatiques**

Avant d'effectuer les réactions d'acylation catalysées par des enzymes en milieu organique ou tamponné un rapide test de solubilité des *quenchers* dans différents solvants a été réalisé, à température ambiante, sous agitation. Les résultats sont présentés dans le Tableau 26. Les solvants choisis sont ceux les plus décrits pour des réactions d'acylation catalysées par des enzymes hydrolytiques (M_2B_2, ACN et solution tampon) et le méthanol, solvant utilisé pour solubiliser les échantillons avant analyse LCMS.

En ce qui concerne les acylases, des études montrent leur aptitude à catalyser des réactions de *N*- ou *O*-acylation dans des milieux aqueux tampon phosphate de concentration entre 50 mM et 200 mM, à pH 8 [513, 514].

Tableau 37. Solubilité des *quenchers* dans différents solvants

	BBQ	**BHQ-3**
M_2B_2	soluble	très peu soluble
ACN	-	soluble
MeOH	soluble	soluble
Solution tampon (pH = 8)	insoluble	soluble

Dans le cadre de notre étude, le M_2B_2 a été choisi comme solvant pour la synthèse enzymatique catalysée par des lipases car des travaux ont déjà montré une bonne capacité des lipases à catalyser des réactions d'acylation de peptides ou de flavonoïdes dans ce solvant [515, 516]. De plus, ce solvant permet une solubilisation partielle des deux substrats BBQ et BHQ-3.

- **Etude comparative de réactions enzymatiques d'acylation avec différentes enzymes**

Concernant la mise en œuvre des réactions (conditions décrites dans le Tableau 27), différentes lipases et acylases ont été comparées. L'acylation enzymatique de la lysine par des lipases (20 g/L) a été réalisée dans un milieu organique (2-méthyl-2-butanol, M_2B_2), incubé à 55°C et par des acylases (20 g/L) dans un milieu aqueux tamponné (tris-HCl 25 mM, NaCl 50 mM, pH = 8) à 45°C,

sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière. Le volume de réaction est de 1 mL. Des prélèvements ont été effectués à t_0 (substrats seuls), et après différents temps. L'ajout des différentes enzymes à différents temps (environ toutes les 72h) a été réalisé dans un même réacteur contenant le *quencher* (composé cher) et a provoqué une augmentation de la viscosité du milieu réactionnel, les enzymes utilisées étant mobilisées sur support solide : un ajout de 1 mL de solvant a été nécessaire au bout de 6 jours de réaction pour compenser l'évaporation observée.

Tableau 38. Conditions réactionnelles pour les synthèses enzymatiques.

	Lipases	**Acylases**
Conditions opératoires	incubation à 55°C *2-méthyl-2-butanol*, M_2B_2 sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière	incubation à 45°C Solution tampon sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière
BBQ	Lysine (0,014 M) + BBQ (0,011M)	Lysine (0,013 M) + BBQ (0,011M dilué dans 100µL de M_2B_2)
BHQ-3	Lysine (0,014 M) + BHQ-3 (0,012 M dilué dans 200µL d'ACN)	Lysine (0,014 M) + BHQ-3 (0,013 M)
Enzymes utilisées	1) Lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique 2) Lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur Immobead 150 3) Lipozyme de *Mucor miehei* immobilisée 4) Lipase de *Candida rugosa* immobilisée sur Immobead 150	1) Mélange acylase (surnageants concentrés de *Streptomyces ambofaciens*) 2) Acylase d'*Aspergillus melleus* 3) Acylase I grade II de rein de porc 4) Acylase I d'*Aspergillus Sp* immobilisée sur Eupergit C

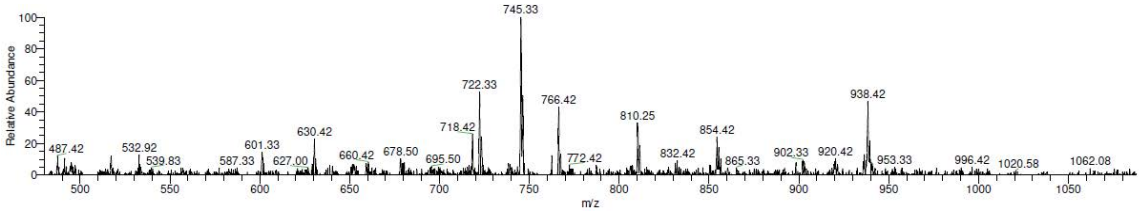
Etude de la capacité d'acylation de différentes lipases

Différentes lipases ont été utilisées afin d'étudier leur capacité à catalyser la réaction d'acylation de la lysine par les *quenchers* (-COOH). L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince a été réalisée. Cependant, aucune nouvelle tâche pouvant correspondre au *quencher* couplé à la lysine n'a été observée. L'analyse qualitative par spectrométrie de masse montre la formation du composé souhaité pour les deux *quenchers*. Le produit formé attendu apparaît dès l'ajout de la première enzyme, en très faible quantité et il ne semble pas y avoir de nouveaux produits formés après l'ajout des autres enzymes. Les lipases sont donc capables de catalyser la réaction de couplage du *quencher* sur une des fonctions amine de la lysine (réaction d'acylation). Dans les deux cas, aucune lipase utilisée n'a permis une réaction d'acylation conséquente, les composés étant uniquement présents à l'état de traces.

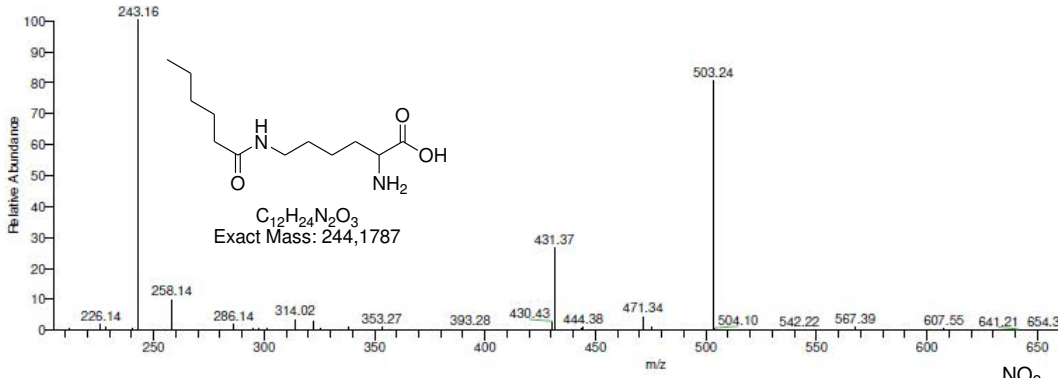
Pour le BBQ

Une masse $[M+H]^+$ de 745,3 correspondant à celle du composé attendu H-Lys(BBQ)-OH a été détectée en MS (Figure 195). Les spectres MS/MS de la référence obtenue en synthèse chimique et du composé obtenu en synthèse enzymatique ont été comparés (Figure 195). La présence commune du fragment de m/z égal à 503,2 dans les deux cas, permet de confirmer la formation du composé H-Lys(BBQ)-OH. Un second produit de masse $[M+H]^+$ 743,3 a été également détecté en MS lors de l'étude de la réaction d'acylation de la lysine par le BBQ ; il y a une différence de -2 par rapport à la masse du composé attendu de 745,3 (H-Lys(BBQ)-OH). Une déhydrogénation du produit attendu due à la température de 55°C de réaction a pu se produire.

A) **MS (H-Lys(BBQ)-OH, synthèse enzymatique)**



B) **MS/MS (H-Lys(BBQ)-OH, synthèse chimique)**



C) **MS/MS (H-Lys(BBQ)-OH, synthèse enzymatique)**

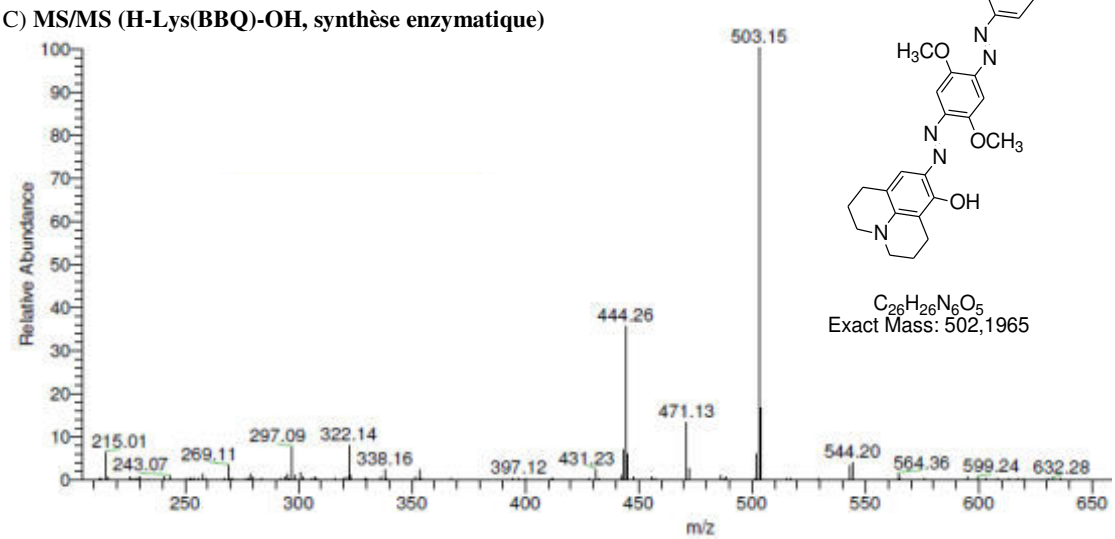


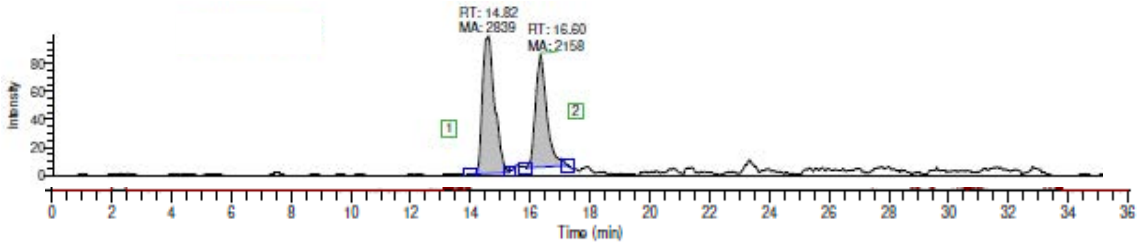
Figure 195. Spectre MS (A) et comparaison des spectres MS/MS de H-Lys(BBQ)-OH (masse isolée 745,50) obtenue (B) par synthèse chimique et (C) par voie enzymatique.

Pour le BHQ-3

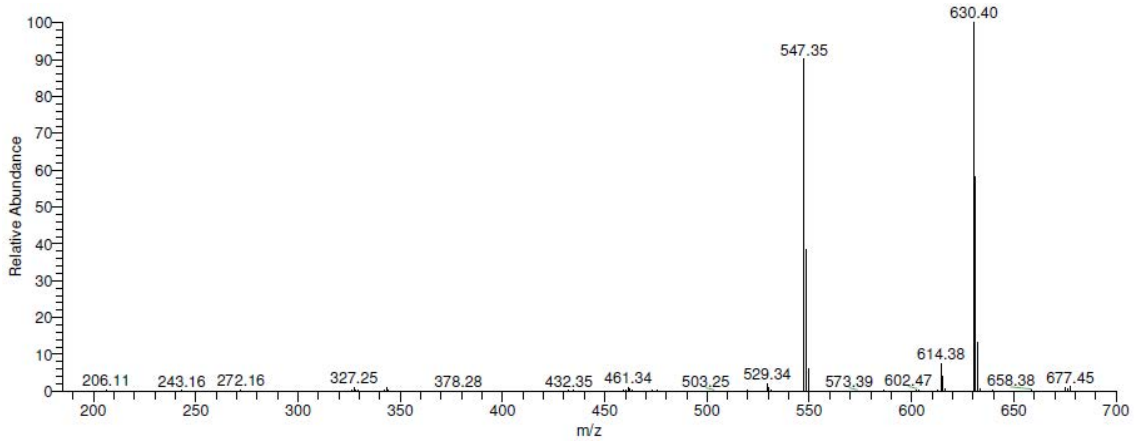
Deux produits de masse $[M]^+$ 675,50 ont été détectés mais le signal ne se distinguant pas bien du bruit de fond, la confirmation de la présence du produit attendu a dû être confirmée par MS/MS. Les spectres MS/MS de la référence obtenue en synthèse chimique et des composés obtenus en synthèse enzymatique ont été comparés. Dans ce cas précis, les résultats MS/MS ont bien confirmé la formation de deux isomères (Figure 196). La lysine possédant deux fonctions amines libres, le couplage du BHQ-3 a pu s'effectuer sur l'une comme sur l'autre. Des fragments de m/z proches dans les trois cas permettent de confirmer la formation des deux isomères de position H-Lys(BHQ-3)-OH et BHQ-3-Lys(NH_2)-OH, catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*.

Ainsi, si la lipase B de *Candida antarctica* a permis le greffage de la lysine sur BHQ-3 et BBQ, il apparaît, cependant, que les taux de conversion sont faibles dans les conditions réactionnelles utilisées lors de ces expériences.

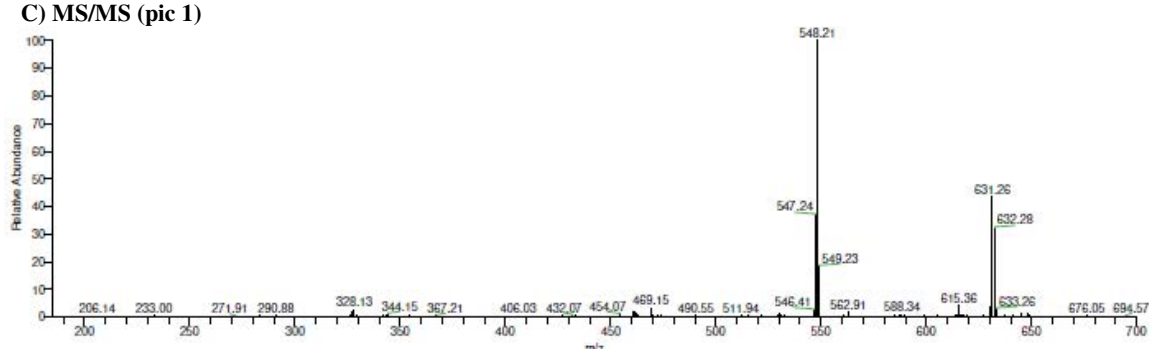
A) Suivi MS/MS du H-Lys(BHQ-3)-OH (synthèse enzymatique)



B) MS/MS (H-Lys(BHQ-3)-OH, synthèse chimique)



C) MS/MS (pic 1)



D) MS/MS (pic 2)

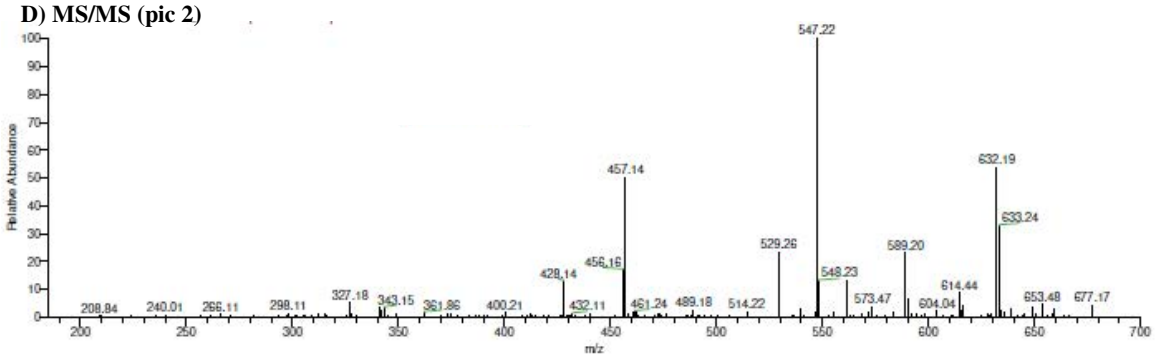


Figure 196. Suivi par spectrométrie de masse MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50).

Etude de l'acylation de la lysine par le quencher avec différentes acylases

Différentes acylases ont été utilisées dans un milieu aqueux tamponné afin d'étudier leur capacité à catalyser la réaction d'acylation de la lysine par les *quenchers* (-COOH). Des observations similaires ont été réalisées pour l'analyse qualitative par chromatographie en couche mince qu'en présence de lipases : aucune nouvelle tâche pouvant correspondre au *quencher*-K n'a été observée. L'analyse qualitative par spectrométrie de masse confirme l'absence des composés souhaités *quencher*-K. Aucune acylase ne semble donc capable de catalyser la réaction de couplage du *quencher* sur une fonction amine de la lysine (réaction d'acylation) dans les conditions réactionnelles utilisées dans cette synthèse.

Conclusions

Les réactions d'acylation de la lysine par les deux *quenchers* étudiés ne semblent possibles qu'en présence de la lipase B de *Candida antarctica*. Comme le composé Fmoc-Lys(BBQ)-OH existe commercialement (Berry & Associates), seule la synthèse chimique de la Fmoc-Lys(BHQ-3)-OH a été réalisée. Notre but principal étant de comparer synthèse chimique et synthèse par voie enzymatique, nous avons choisi de concentrer notre étude sur le couplage du BHQ-3 sur une fonction amine de la lysine en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, afin de trouver des conditions permettant d'accroître le taux de conversion.

- **Etude de l'acylation de la lysine par BHQ-3 catalysée par la lipase B de *Candida antarctica***

L'étude de la réaction d'acylation, catalysée par une lipase, de la lysine par le *quencher* BHQ-3 a été poursuivie avec des modifications de conditions réactionnelles résumées dans le Tableau 39, en vue d'accroître la production de H-Lys(BHQ-3)-OH. Le rapport molaire Lysine : BHQ-3 a été modifié à 1 : 2 (0,012 M : 0,024 M) ; en effet, des travaux antérieurs ont montré qu'il était plus favorable à la réaction [509]. Une réaction a été réalisée afin de déterminer si l'ajout d'une amine tertiaire (la triéthylamine, TEA dans notre cas) a un effet sur la réaction d'acylation : en effet, Reyes-Duarte et al. [517] ont montré que l'ajout en excès d'une amine tertiaire (*N*,*N*-diisopropyléthylamine) augmentait la conversion, catalysée par une lipase, de la vanillylamine en olvnanil de 65 à 98 % dans le M_2B_2. Ces résultats avaient été confirmés pour des réactions d'acylation de peptides [515, 518, 519].

Tableau 39. Procédure pour le couplage du BHQ-3 sur le *N*-latéral de la lysine par voie enzymatique en présence d'une lipase.

	Lipases
Conditions opératoires	incubation à 55°C *2-méthyl-2-butanol*, M_2B_2 sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière 1) sans TEA 2) avec TEA (10 éq. par rapport au BHQ-3)
Lysine	0,012 M
BHQ-3	0,024 M (dilué dans 200 µL d'ACN)
Enzyme utilisée	lipase B immobilisée de *Candida antarctica* (Novozym 435®)

Des prélèvements ont été effectués à t = 0h (substrats seuls), t = 6, 24, 48 et 72h (après ajout de l'enzyme). L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince de la réaction a été réalisée. Cependant, aucune nouvelle tâche pouvant correspondre au *quencher* couplé à la lysine n'a été observée.

L'analyse qualitative par spectrométrie de masse a été ensuite effectuée et montre la formation du composé souhaité uniquement après ajout de TEA. Dans ces conditions de réaction, la lipase B immobilisée de *Candida antarctica* est capable de catalyser la réaction de couplage du BHQ-3 sur une des fonctions amine de la lysine seulement.

L'analyse semi-quantitative par spectrométrie de masse (Figure 197) confirme que l'ajout de TEA semble avoir un effet significatif sur la réaction d'acylation, catalysée par une lipase, de la lysine par le *quencher* BHQ-3.

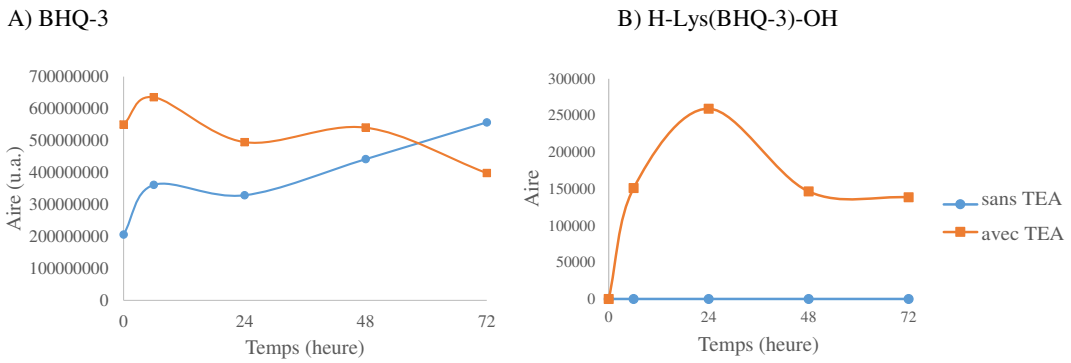


Figure 197. Suivis MS (A) de BHQ-3 et (B) de H-Lys(BHQ-3)-OH lors de la réaction de couplage du BHQ-3 avec la lysine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans M_2B_2 en présence ou non de TEA.

Sans ajout de TEA, il apparaît que le rapport molaire Lysine : BHQ-3 de 1 : 1 (Figure 195) était plus favorable à la réaction d'acylation que le rapport molaire 1 : 2 (Figure 197). Le produit attendu a été en effet détecté en MS seulement dans le premier cas. A ce stade de l'étude, il a été envisagé que l'ajout d'une quantité trop importante de *quencher* pouvait avoir un effet inhibiteur sur la réaction d'acylation.

Pour vérifier cette hypothèse, des synthèses ont été réalisées pour trois rapports molaires différents Lysine : BHQ-3 : (1 : 1/2), (1 : 1/5) et (1 : 1/10). Pour cela, par manque de réactif coûteux, la solution précédente est réutilisée ; elle est diluée de façon à obtenir une solution de 1 mL pour les différents rapports molaires. Dans chacune de ces trois nouvelles solutions, de la lysine (0,012 M) et de l'enzyme (lipase B immobilisée de *Candida antarctica*, 20g/L) sont rajoutées. Avant ajout de l'enzyme, les trois rapports molaires Lysine : BHQ-3 : (1 : 1/2), (1 : 1/5) et (1 : 1/10) ont été vérifiés (Figure 198), montrant qu'il est possible de réaliser une évaluation semi-quantitative par suivi MS.

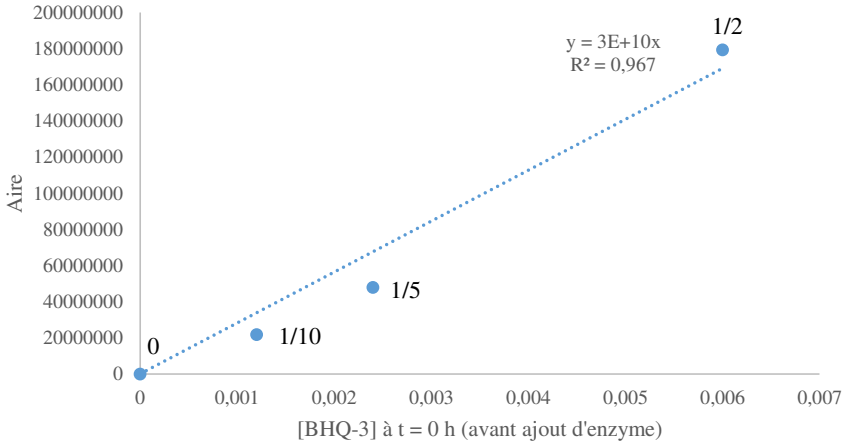


Figure 198. Suivi MS de BHQ-3 à t = 0h pour les trois concentrations utilisées.

Des prélèvements ont été effectués au cours de la réaction entre 0 et 72h. L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince des réactions aux différents temps a été réalisée. Cependant, aucune nouvelle tâche de couleur bleue pouvant correspondre au *quencher* couplé à la lysine n'a été observée quel que soit le rapport molaire. Toutefois, un changement de couleur des solutions au cours du temps a été observé, passant du bleu au violet au cours du temps. Ceci pourrait s'expliquer par une dégradation de la molécule de BHQ-3 au cours du temps à cause de la température de réaction assez élevée (55°C) et/ou à cause de la présence d'une base (TEA). En effet, cette observation avait été également faite dans la partie synthèse chimique où il avait été mis en évidence que le BHQ-3 n'était pas stable en présence de pipéridine.

L'analyse qualitative par spectrométrie de masse a été ensuite effectuée et montre la formation de composés de masse attendue 675,5 dès 24 h de réaction.

Les suivis par MS/MS de ces masses égales à 675,5 pour les trois différents rapports au cours du temps permettent de conclure à l'acylation régio-sélective de la fonction amine en position ε de la lysine (pour plus de clarté, seul le suivi MS/MS pour la synthèse avec un rapport molaire Lysine : BHQ-3 (1 : 1/2) est représenté Figure 199). Au début de la réaction, les deux pics des isomères de position sont détectés. Le deuxième pic a été comparé à la référence, et a été donc identifié comme le produit du couplage du BHQ-3 avec la fonction amine en position ε de la lysine. Il apparait clairement sur les graphes Figure 199, que ce second pic devient plus important que le premier au cours du temps. Ceci confirme l'acylation régio-sélective de la fonction amine en position ε de la lysine par le BHQ-3 en présence d'une lipase (Figure 199).

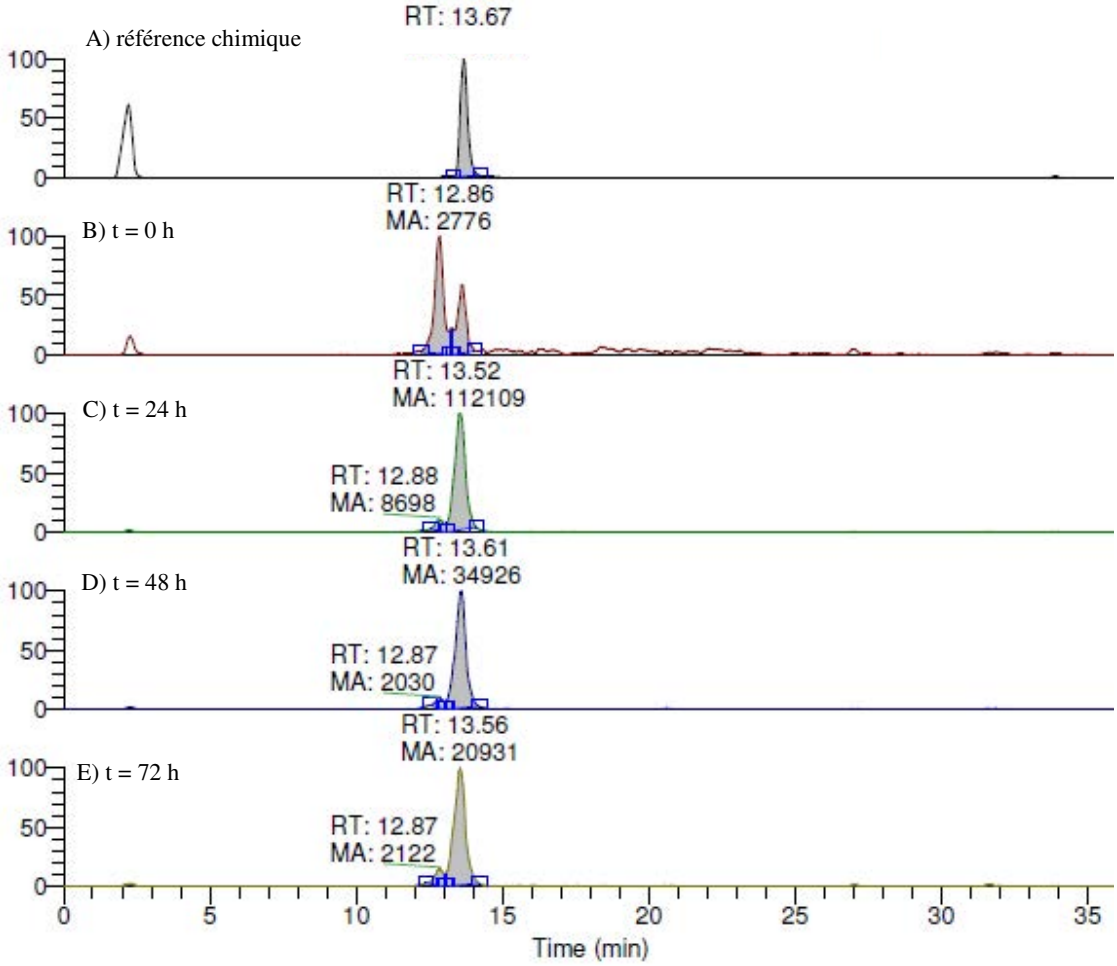


Figure 199. Suivi MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50). (A) Référence synthétisée chimiquement. (B à E) Composés synthétisés par voie enzymatique, à différents temps (t) de réaction pour un rapport molaire Lysine : BHQ-3 : 1 : 1/2.

Les suivis par MS/MS du BHQ-3 (Figure 200 A) montrent une diminution importante de la quantité de BHQ-3 au cours du temps. La vitesse de disparition de BHQ-3 est plus élevée pour le rapport molaire Lysine : BHQ-3 : (1 : 1/2), le plus élevé. Les suivis MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (Figure 200 B) montrent que la vitesse initiale de formation du H-Lys(BHQ-3)-OH est la plus élevée pour la concentration la plus élevée en BHQ-3 ce qui montrerait qu'il n'y a pas d'effet inhibiteur du *quencher* sur la réaction.

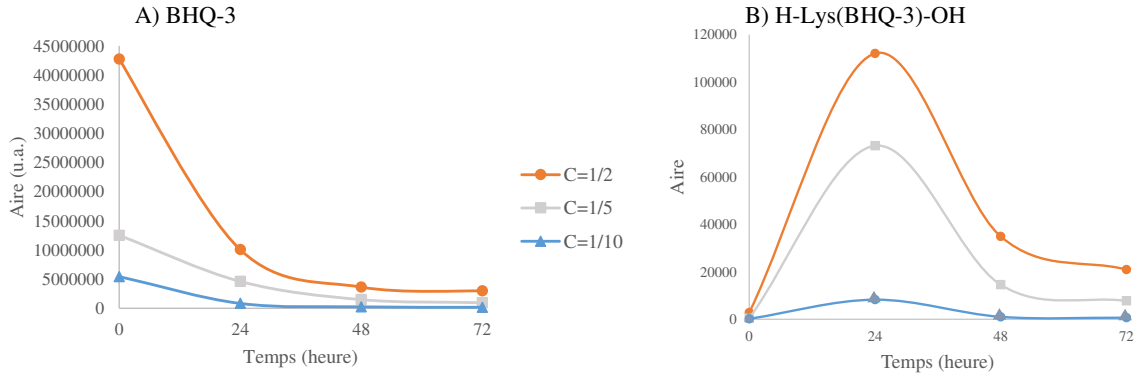


Figure 200. Suivis MS/MS de (A) BHQ-3 (masse isolée 547,50) et (B) H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50) pour trois différents rapports molaires Lysine : BHQ-3 : 1 : 1/2, 1 : 1/5 et 1 : 1/10, lors de la réaction de couplage du BHQ-3 avec la lysine catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* dans M_2B_2 en présence de TEA.

L'aire sous le pic en MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (Figure 200 B) évolue de la même manière au cours du temps quelle que soit la concentration en BHQ-3, ce qui est confirmé par le fait que les représentations graphiques de l'aire sous le pic en MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH en fonction de la concentration de BHQ-3 pour t = 24, 48 et 72 h donnent des droites (Figure 201).

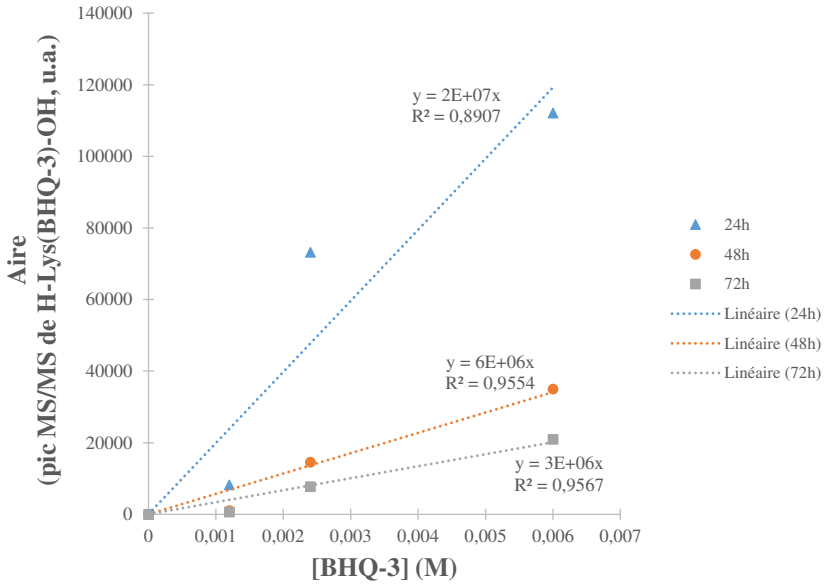


Figure 201. Suivi MS/MS de H-Lys(BHQ-3)-OH (masse isolée 675,50) pour les trois concentrations utilisées en BHQ-3.

La diminution, après 24h de réaction, au cours du temps de H-Lys(BHQ-3)-OH (Figure 200 B) démontre une dégradation de la molécule BHQ-3 due à la présence du TEA. La température (55°C) ne semble pas être la cause unique de cette dégradation car l'expérience réalisée sans TEA montre que la quantité en BHQ-3 ne diminue pas au cours de la réaction (Figure 197).

III.9.c Conclusions

Les réactions d'acylation de la lysine par le BBQ-650 et le BHQ-3 ne sont possibles qu'en présence de lipase et en particulier de lipase B de *Candida antarctica*. Dans le cas du BHQ-3, nous avons confirmé que la réaction d'acylation se fait régio-sélectivement sur la fonction amine en position ε de la lysine. L'ajout en excès d'une base tertiaire (ici le TEA) augmente le taux de conversion de la réaction d'acylation pour des temps courts mais favorise également une dégradation de la molécule de BHQ-3 pour des temps plus longs, dégradation observée également avec une autre base, la pipéridine. Ce qui est un inconvénient car la synthèse peptidique en phase solide utilise une solution de pipéridine à 20% dans du DMF, pour cliver le Fmoc des acides aminés.

L'utilisation des potentialités et des spécificités des lipases pour réaliser le greffage du BHQ-3 sur le peptide *via* une liaison amide paraît possible comme alternative à la synthèse chimique complète du PMB. Toutefois, cette étude sur la réaction d'acylation, catalysée par une lipase, de la lysine par le *quencher* BHQ-3 doit être poursuivie pour déterminer des conditions réactionnelles permettant d'accroître le taux de conversion. Un travail pourrait tout d'abord être mené afin de déterminer la quantité optimale de TEA ou une autre base organique à ajouter pour augmenter le taux de conversion sans engendrer une dégradation du BHQ-3. La biocatalyse assistée par micro-onde est en plein essor. Les vitesses de réaction et les rendements obtenus par procédés sous micro-onde comparés à ceux obtenus par chauffage traditionnel sont généralement bien meilleurs. Par exemple, la transestérification du 1,2 propanediol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*, sous irradiation micro-onde, a été obtenue avec un taux de conversion de 93 % alors qu'il n'était que de 54 % avec un chauffage conventionnel ; cette performance est attribuée notamment à un accroissement de la stabilité thermique de l'enzyme [520]. Afin d'accroître les rendements de réaction d'acylation de la lysine par le BHQ-3, la mise en œuvre de réacteur micro-onde pourrait donc être envisagée. Un autre avantage de ce procédé peut être cité : il permettrait d'éviter la dégradation du *quencher* à cause de la température élevée de réaction. Enfin, une autre approche pourrait être considérée concernant une phase d'ingénierie enzymatique permettant l'obtention d'enzyme mutée afin de permettre une meilleure accessibilité du *quencher* aux sites catalytiques.

IV PERMEABILISATION MEMBRANAIRE PAR LES DERIVES PS-GRIGF-OH

Les PMBs ne sont pas actifs lorsqu'ils ne sont pas clivés par les enzymes. Lorsque le peptide est clivé, la partie contenant le PS peut alors produire de l'oxygène singulet sous excitation lumineuse. La question que l'on peut se poser est : est-ce que cette partie peut être internalisée dans les cellules ?

Comme expliqué précédemment, le peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH est décrit dans la littérature comme étant clivé entre la phénylalanine (F) et la leucine (L). Dans un premier temps, nous avons envisagé d'étudier les interactions de type non spécifique de la partie du PMB clivé contenant le photosensibilisateur, soit PS-GRIGF-OH avec un modèle de membrane cellulaire et grâce aux techniques développées par Stéphanie Bonneau et son équipe (UMR 8237, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris).

IV.1 Introduction

IV.1.a Les membranes biologiques

Le rôle de la membrane n'est pas limité à celui de barrière entre l'intérieur de la cellule et le milieu extracellulaire mais elle intervient également dans un ensemble de processus biologiques indispensables à la vie cellulaire comme les phénomènes de transport, la transduction du signal et les processus de conversion d'énergie. En 1972, Singer et ses collaborateurs [521] ont proposé un modèle membranaire, appelé modèle de la mosaïque fluide, selon lequel les membranes biologiques sont organisées sous forme de bicouches lipidiques dynamiques renfermant des protéines et des glycoprotéines (Figure 202).

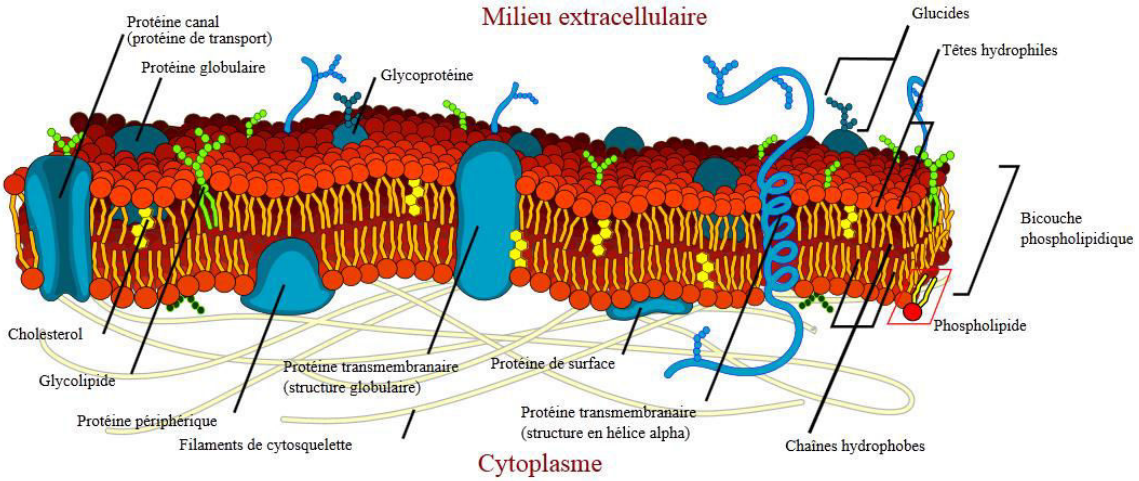


Figure 202. Représentation schématique d'une membrane biologique. La membrane est composée de deux feuillets lipidiques auxquels sont associés des protéines membranaires [522].

Les molécules de lipides peuvent diffuser librement dans la bicouche lipidique (Figure 203). Les déplacements lipidiques latéraux rapides rendent possibles maintes activités des protéines membranaires, qui peuvent ainsi se déplacer, s'associer ou se dissocier dans la membrane. La diffusion transversale des lipides dans le plan perpendiculaire à la membrane, également appelée flip-flop, est énergétiquement défavorable puisqu'elle force le passage de la partie polaire du lipide au sein du cœur hydrophobe de la membrane. C'est donc un phénomène beaucoup plus lent (avec des temps de corrélation de l'ordre de l'heure voire de la journée selon la nature du lipide considéré), ce qui permet une certaine asymétrie entre les deux faces [523].

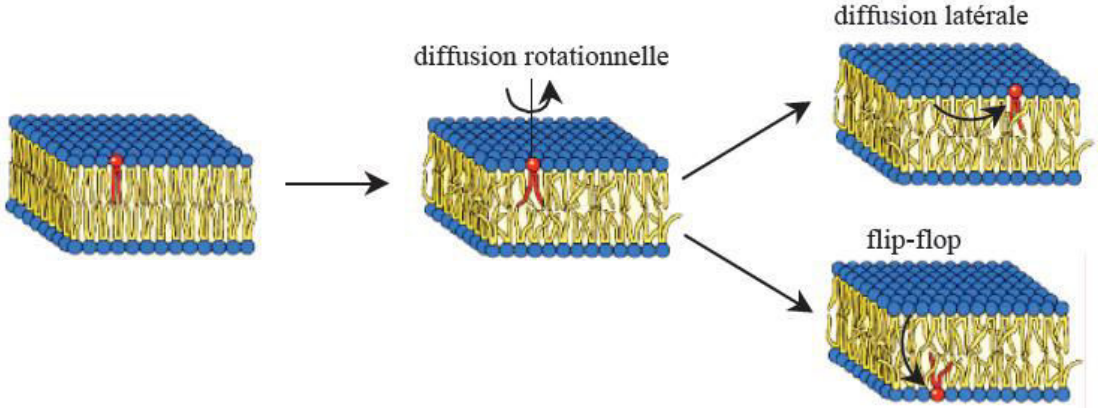


Figure 203. Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes [524].

IV.1.a.i Structure

L'épaisseur des membranes biologiques est généralement comprise entre 7 et 8 nm [525]. Elle est étroitement modulée par la composition lipidique, la présence de cholestérol et de protéines transmembranaires [526]. Les lipides représentent environ 30 à 50 % de la masse membranaire totale selon le type d'organite et le stade de croissance de la cellule [527, 528]. Il existe une variété importante de lipides possédant une structure différente, et donc des caractéristiques géométriques et physiques différentes.

Trois grandes familles de lipides constituent les membranes :

1) les phospholipides (constituant 40 à 60 % de la fraction totale en lipides) : les sphingolipides et les phosphoglycerides (dont les phosphocholine, phosphoéthanolamine et phosphoserine),

2) les glycolipides (qui constituent 20% des lipides des membranes biologiques),

3) les stérols (essentiellement le cholestérol) (Figure 204).

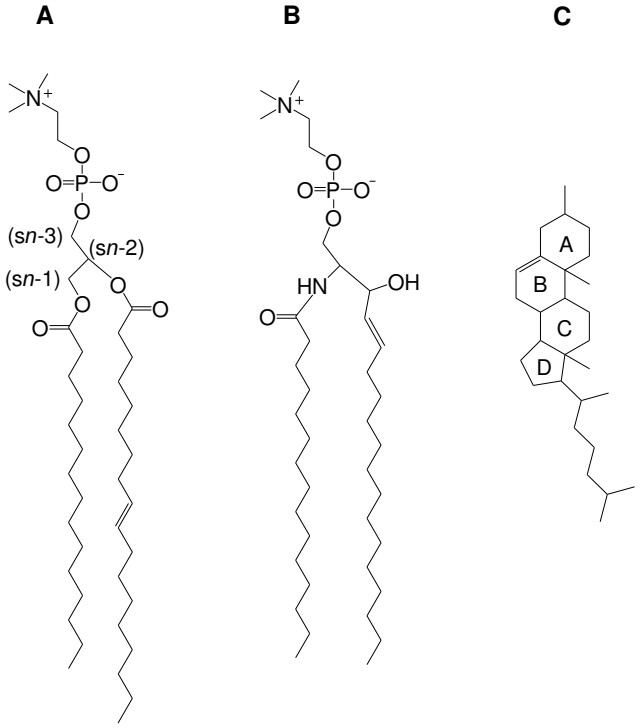


Figure 204. Structure chimique des lipides les plus représentés dans les membranes biologiques. (a) phosphatidylcholine, (b) sphingomyéline, (c) cholestérol.

Les **phospholipides** sont les lipides les mieux représentés. Ils sont composés d'une tête polaire hydrophile (surface moyenne de 50 Å²) et d'une queue apolaire hydrophobe, comportant deux chaînes d'acides gras de longueurs différentes qui peuvent porter une ou plusieurs doubles liaisons. La longueur moyenne de ces chaînes est de l'ordre de 2-3 nm. Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwittérionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre d'atomes de carbone, présence d'insaturations…).

IV.1.a.ii Des membranes biologiques aux membranes modèles

Le caractère amphiphile des lipides est à la base de l'organisation des membranes biologiques. Dans un environnement aqueux, les molécules amphiphiles doivent à la fois satisfaire la tendance de leurs parties hydrophobes à fuir tout contact avec les molécules d'eau, i.e. à s'agréger entre elles, et la tendance de leurs parties hydrophiles à chercher une hydratation. Elles peuvent donc s'organiser en diverses structures de façon à rassembler leurs parties hydrophobes tout en exposant leurs parties hydrophiles à la surface de l'assemblage. L'ensemble de ces structures sont résumées dans la Figure 205.

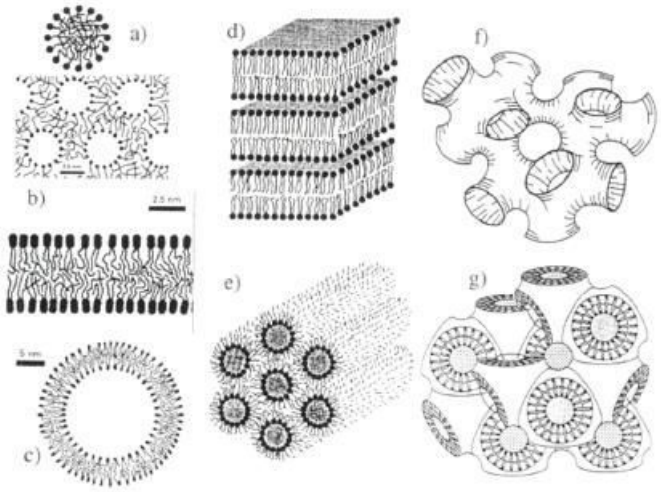


Figure 205: a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue [529].

Un type particulier d'assemblage va nous intéresser ici : les bicouches lipidiques formant des vésicules (ou liposomes). Les vésicules lipidiques sont utilisées comme modèles de la partie lipidique des membranes biologiques pour étudier les interactions molécules-membranes.

IV.1.b Les vésicules lipidiques

Les vésicules lipidiques constituent le modèle le plus simple de la structure cellulaire, considérées comme le « niveau zéro » de la modélisation (objet constitué d'une membrane lipidique sans autres constituants). Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches qui permettent de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. En fonction de la méthode de préparation, différents types de vésicules peuvent être obtenus [530, 531] :

- Les vésicules multilamellaires (MLVs) présentent plusieurs compartiments aqueux concentriques. Elles peuvent mesurer jusqu'à quelques micromètres de diamètre. Ces vésicules peuvent être obtenues par simple dispersion de lipides dans une solution tamponnée,
- Les grandes vésicules unilamellaires (LUVs) présentent une seule bicouche lipidique et un seul compartiment aqueux. Elles mesurent entre 200 à 1000 nm de diamètre,
- les vésicules unilamellaires géantes (GUVs) possèdent un diamètre supérieur à 1000 nm.

- Les petites vésicules unilamellaires (SUVs) ont un diamètre de 15 nm à 200 nm. Il est possible de les préparer par différentes méthodes (par évaporation d'une solution éthanolique, par évaporation en phase inverse, par sonication ou, comme ce fut notre cas, par extrusion).

IV.1.c Interaction photosensibilisateurs - membranes lipidiques

Les étude des mécanismes d'interaction molécules-membranes sont effectuées avec des vésicules lipidiques qui représentent un modèle de la partie lipidique des membranes biologiques [532]. *In vivo*, l'internalisation cellulaire d'une molécule peut se faire par :
- **diffusion passive** : gouvernée par la loi de Fick, la diffusion se fait en suivant le gradient de concentration, c'est-à-dire, « grossièrement », que la molécule va du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré,
- **diffusion facilitée** : se distingue de la diffusion passive par une vitesse supérieure, non proportionnelle au gradient de concentration. Les mouvements des molécules à travers la membrane par diffusion facilitée se font dans le sens du gradient et sont facilités par un transporteur,
- **transport actif** : le passage d'une substance à travers une membrane contre un gradient de concentration,
- ou **endocytose** : (ou internalisation) a lieu quand une partie de la membrane entoure complètement la particule et la fait pénétrer de l'extérieur vers l'intérieur d'une cellule. [533].

Les caractéristiques physicochimiques d'une molécule influençant son passage transmembranaire sont essentiellement :
-son poids moléculaire, et sa taille
-sa lipophilie / hydrosolubilité
et -son état d'ionisation.
Pour les petites molécules, la perméabilité membranaire peut être correctement analysée par un modèle de solubilité/diffusion. Ce dernier est basé sur le fait que de telles molécules passent facilement de la phase aqueuse à la phase lipidique, du fait de leur petite taille. Cependant, la taille des photosensibilisateurs tétrapyrroliques n'est pas négligeable devant l'épaisseur de la membrane. Pour de telles molécules, le passage des interfaces lipide/eau est sans aucun doute un phénomène plus difficile, et ce d'autant plus que les chaînes latérales peuvent être chargées et réparties autour de la molécule dont elles peuvent briser l'aspect symétrique.

Dans la littérature, il a été montré, que :
- l'entrée par endocytose est le mécanisme gouvernant l'incorporation des composés chargés ou complètement neutres qui restent bloqués dans la membrane. Ce sont donc de bons photosensibilisateurs pour l'internalisation photochimique (PCI),
et - l'entrée par diffusion passive est le mécanisme gouvernant l'entrée des composés dont la traversée membranaire est rapide (généralement amphiphiles). Par exemple, les porphyrines possédant des fonctions carboxyliques sur les chaînes latérales, dont l'entrée est facilitée par l'acidification du pH extracellulaire, se distribuent sur l'ensemble des membranes cellulaires. Ce sont donc de bons photosensibilisateurs pour la PDT [534].

Dans le cas d'une vésicule qui ne contient ni transporteurs, ni pompes à protons, ce qui est notre cas modèle, seuls les phénomènes de diffusion peuvent être observés. Trois étapes caractérisent le processus ; l'insertion dans la phase lipidique (a), la traversée de la zone hydrophobe (b) et enfin, la sortie de la bicouche (c), comme le montre la Figure 206. Selon la nature de la molécule et les conditions physicochimiques du système, chacune de ces étapes peut devenir limitante.

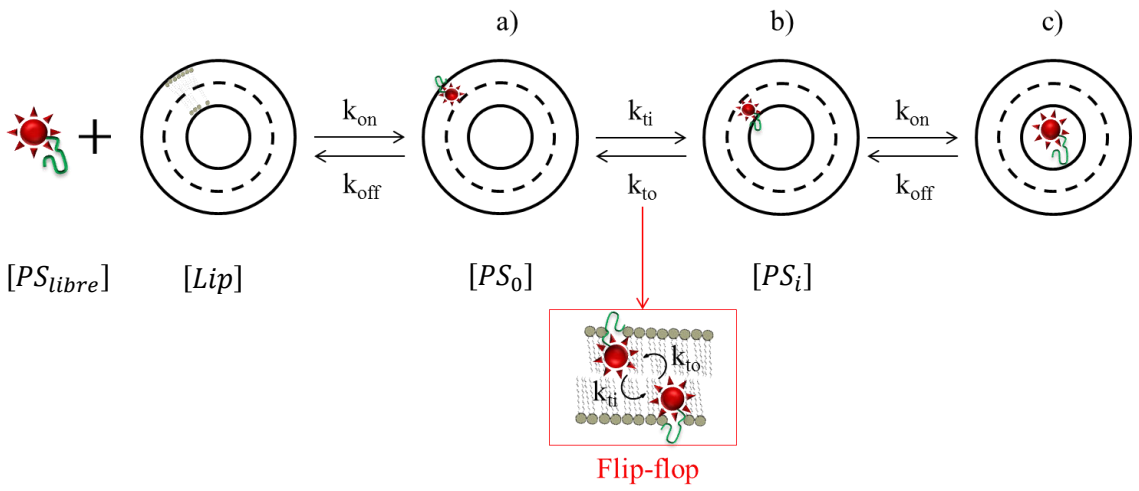


Figure 206. Représentation schématique de la cinétique par diffusion passive d'un PS amphiphile avec les vésicules lipidiques.

Les dynamiques d'entrée et de sortie sont gouvernées par les constantes de vitesse k_{on} et k_{off}, tandis que le flip-flop entre les deux feuillets est gouverné par les constantes de vitesse k_{ti} et k_{to}. ($k_{ti} = k_{t\ inset}$ et $k_{to} = k_{t\ offset}$)

L'interaction met en jeux l'insertion du macrocycle du PS dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique. L'émission de fluorescence des PS est très sensible à l'environnement et permet de suivre l'incorporation dans les vésicules lipidiques. L'association des PS à la membrane se traduit par une augmentation de la fluorescence (exemple avec la P1-COOH, Figure 207). C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier l'interaction de nos différents composés avec les membranes modèles par spectroscopie de fluorescence. Plus il y a de PS associés à la phase lipidique, plus le signal de fluorescence augmente pour atteindre une valeur constante, significative de la saturation de la couche lipidique en PS.

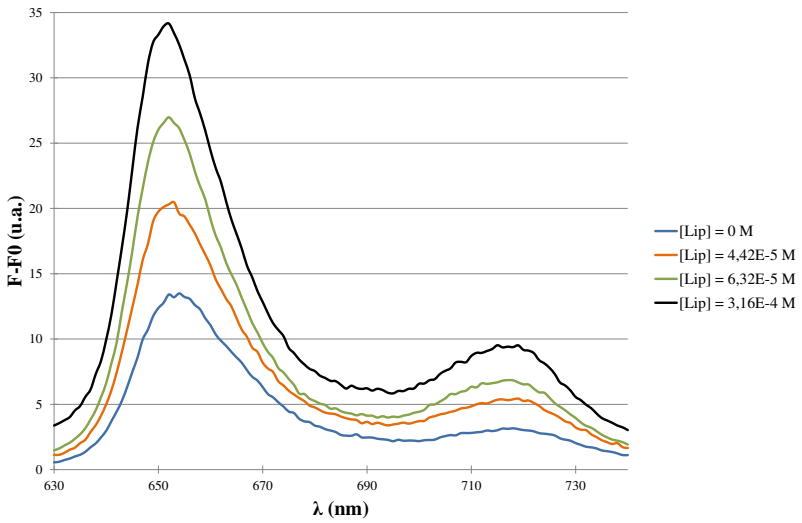


Figure 207. Spectres d'émission de fluorescence de la P1-COOH (5,61 x 10^{-7} M) dans le PBS ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm) en fonction de la concentration en lipides.

Le PS peut être redistribué entre les deux feuillets lipidiques. Ce mouvement de flip-flop, caractérisé par les constantes de vitesse k_{ti} et k_{to}, implique le retournement de la molécule, du feuillet externe vers le feuillet interne pour retrouver la même orientation que dans le feuillet externe, c'est-à-dire l'insertion du macrocycle dans le cœur hydrophobe de la membrane et la chaîne polaire en contact avec le compartiment aqueux interne de la vésicule, ce qui lui permet d'atteindre une répartition équilibrée. Cette phase est généralement lente dans le cas des PS amphiphiles et nécessite parfois

plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures (exemples, moins d'une seconde pour une porphyrine, la deutéroporphyrine, plusieurs heures pour une phtalocyanine, la phtalocyanine d'aluminium disulfonée [535]). Ce retournement du PS ne se traduit pas par une quelconque modification de fluorescence. Cependant, lorsque des molécules passent dans le feuillet interne, de la place se libère au niveau du feuillet externe permettant ainsi l'insertion de nouvelles molécules à partir de la phase aqueuse. Ceci s'accompagne d'une augmentation du nombre de molécules associées à la phase lipidique et ainsi d'une augmentation du signal de fluorescence.

IV.2 Matériels et Méthodes

- La plupart des expériences de physico-chimie ont été effectuées à pH 7,4 dans du tampon phosphate salin (PBS, Na_2HPO_4/KH_2PO_4, phosphate total $9{,}57\times10^{-3}$ M, NaCl 0,15 M et KCl à $2{,}68\times10^{-3}$ M) obtenu chez Sigma.

- Les vésicules lipidiques modèles que nous avons utilisées dans ce travail étaient essentiellement composées de phospholipides. Le dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) de masse molaire 786,113 g/mol, porte deux chaînes carbonées de 18 carbones avec une double liaison sur le carbone 9 (Figure 208). Ces lipides ont été obtenus chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

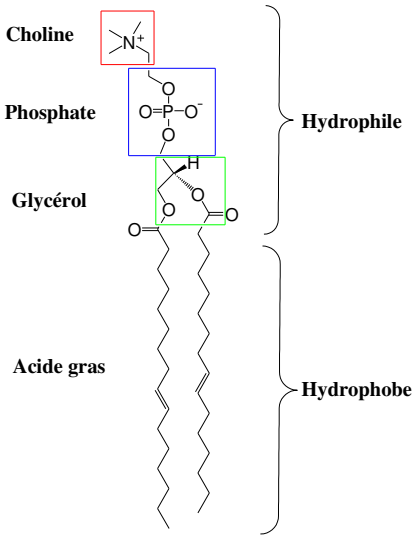


Figure 208. Structure du phospholipide 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC, C18:1).

- Pour la préparation de ces vésicules, une solution mère de lipides est préparée. Pour cela, on dissout au préalable la masse souhaitée de DOPC dans un mélange $CHCl_3$/EtOH (5:3). Toutes les solutions lipidiques stocks ont été conservées au noir sous argon à -20°C. Les mélanges lipidiques ont, le cas échéant, été préparés à partir de ces solutions. Le solvant est évaporé sous un flux d'argon dans un tube en verre pour former un film lipidique. Le film est réhydraté avec une solution tampon PBS (tampon phosphate salin, de l'anglais *phosphate buffered saline*) et ensuite vortexé pendant plusieurs minutes pour assurer la bonne dispersion des lipides et la formation de vésicules multilamellaires. Pour obtenir des LUVs unilamellaires, on passe la solution mère lipidique dans un extrudeur (Aventi Polar Lipids). Pour ce faire, la suspension de lipides est passée sous pression 10 fois minimum à travers une membrane filtrante en polycarbonate dont la taille des pores est de 200 nm.

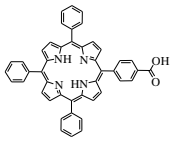
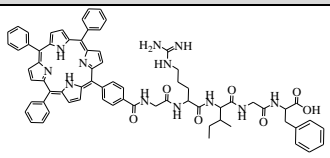
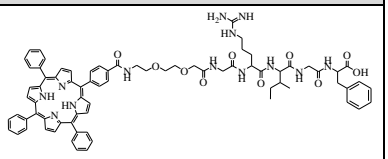
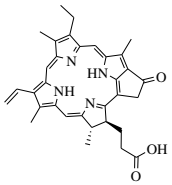
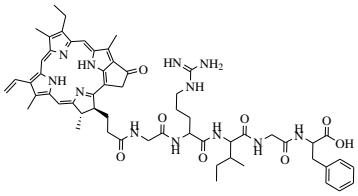
- Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés en utilisant un spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série 2 (Bioritech). L'excitation est réalisée par une lampe Xénon. Deux monochromateurs permettent de sélectionner respectivement les longueurs d'ondes à l'excitation et à l'émission. La lumière de fluorescence émise par l'échantillon est collectée à 90° par rapport à l'excitation puis transformée en un signal électrique par un photomultiplicateur. Afin de corriger

les éventuelles fluctuations de la lampe, le signal du détecteur est corrigé par rapport à un signal de référence, mesuré à la sortie du monochromateur d'excitation. Les effets parasites liés à la diffusion de lumière d'excitation de l'échantillon pour les longueurs d'ondes pouvant impliquer le second ordre du réseau, sont éliminés par des filtres placés à l'entrée du monochromateur d'émission (Schott).

- Les échantillons sont placés dans des cuves de quartz 10 mm × 10 mm, à température ambiante. Les données expérimentales ont été traitées avec le logiciel *KaleidaGraph*® (Synergic Software, PA, USA).

- Les photosensibilisateurs sont répertoriés dans le Tableau 40. Ils ont été synthétisés, excepté la pyrophéophorbide (a) acheté chez Frontier Scientific. Pour chaque photosensibilisateur, une solution stock de concentration 1 mg/mL est préparée dans le DMSO. Afin d'éviter la dégradation et le photoblanchiment, ces solutions sont stockées à -20°C dans le noir et renouvelées régulièrement. Pour chaque expérience, la solution stock est diluée dans le tampon à la concentration désirée.
Les espèces PS-GRIGF-OH ont été choisies à partir des résultats des tests de clivage enzymatique. En effet, les composés P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH et Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH sont clivés par au moins deux MMP étudiée. Le réactif P1-GRIGFLRTAKGG-OH n'est clivé par aucune des MMPs. Cependant, il nous a semblé intéressant de comparer les cinétiques d'incorporation dans les membranes du composé P1-GRIGF-OH avec celles du P1-PEG-GRIGF-OH pour savoir si l'introduction d'un bras espaceur a une influence sur la cinétique d'incorporation dans les membranes.

Tableau 40. Photosensibilisateurs étudiés.

Exc. (nm)	Em. max. (nm)	P1-COOH	P1-GRIGF-OH	P1-PEG-GRIGF-OH
414	652	 PS de référence	 P1-GRIGFLRTAKGG-OH Non clivé	 P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH Clivé par les MMP-2 et 9
Exc. (nm)	**Em. max. (nm)**	**Pyro(a)-COOH**	**Pyro(a)-GRIGF-OH**	
414	676	 PS de référence	 Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH Clivé par les trois MMPs	

- Les cinétiques obtenues sont suffisamment lentes (de l'ordre de quelques minutes à plusieurs heures), elles ont été suivies par fluorescence sur le spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série 2 décrit ci-dessus.

IV.3 Résultats

IV.3.a Etude cinétique de l'interaction des PS avec les membranes

L'interaction des PS (P1-COOH ou Pyro(a)-COOH) avec les membranes peut être schématisée, en tenant compte de l'association du PS avec les vésicules (phase 1) et du flip-flop du PS entre les feuillets membranaires (phase 2), comme indiqué dans la Figure 206.

Le modèle cinétique suivi pour l'étude cinétique de l'interaction des PS avec les membranes est celui décrit dans la publication de Kuzelova et Brault [533] et les calculs théoriques du modèle cinétique utilisé sont détaillés dans cette même référence. Le système d'équation décrivant la cinétique de l'incorporation est le suivant :

$$PS_{libre} + Lip \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} PS_0 \underset{k_{t0}}{\overset{k_{ti}}{\rightleftharpoons}} PS_i$$

où [PS_{libre}] représente la concentration en PS libre dans la solution aqueuse,
[PS_0] celle insérée dans le feuillet externe des vésicules,
[PS_i] celle insérée dans le feuillet interne,
[Lip] celle des lipides.

$$\frac{d[PS_{libre}]}{dt} = -k_{on}[Lip][PS_{libre}] + k_{off}[PS_0]$$

$$\frac{d[PS_0]}{dt} = k_{on}[Lip][PS_{libre}] - (k_{off} + k_{ti})[PS_0] + k_{t0}\,[PS_i]$$

$$\frac{d[PS_i]}{dt} = k_{ti}\,[PS_0] - k_{t0}\,[PS_i]$$

A l'état initial, on a : $[PS_{libre}]\,(t=0) = [PS_{libre}]^0$; $[PS_0]\,(t=0) = [PS_i]\,(t=0) = 0$.

D'une manière générale, dans un système de n réactions réversibles et successives, l'évolution de la concentration de chaque composant en fonction du temps peut être décrite par une somme de n exponentielles, avec la même série de facteurs exponentiels. Dans notre cas ce système peut être écrit de cette façon :

$$[PS_{libre}] = A_1 + B_1\,e^{-k_1 t} + C_1\,e^{-k_2 t}$$
$$[PS_0] = A_2 + B_2\,e^{-k_1 t} + C_2\,e^{-k_2 t}$$
$$[PS_i] = A_3 + B_3\,e^{-k_1 t} + C_3\,e^{-k_2 t}$$

La résolution de ce système d'équation est réalisée à l'aide des transformées de Laplace, dont les calculs sont détaillés dans la référence [536]. L'évolution des concentrations de différentes formes du PS en fonction du temps est décrite par la somme de deux termes exponentiels. Les constantes de vitesse de ces exponentielles sont données par :

$$k_1 = k_{on}\,[Lip] + k_{off} + k_{ti} + k_{to}$$
$$k_2 = k_{ti} + k_{to}$$
avec $k_1 > k_2$

La concentration de PS et de vésicules étant suffisamment faibles dans nos expériences (10^{-4} - 10^{-7} M), les problèmes d'effets d'écrans ne se posent pas et ainsi, l'intensité de fluorescence émise par chacune des formes de PS est proportionnelle à sa concentration [537]. La fluorescence observée (F) à un instant t est la somme de toutes les contributions des différentes formes du PS. Elle s'écrit

comme la somme d'une constante et de deux exponentielles, avec les deux constantes de vitesse k_1 et k_2 introduites précédemment. Cette équation s'écrit comme suit :

$$F(t) = \Delta f_i\big([PS_0](t) + [PS_i](t)\big) + const1$$
$$F(t) = -\Delta f_i\, k_{on}\, [\mathrm{Lip}][PS_{libre}]^0\big(A_1\, e^{-k_1 t} + A_2\, e^{-k_2 t}\big) + const2$$

où A_1 et A_2 représentent les amplitudes relatives du signal correspondant à chaque phase exponentielle (rapide et lente). Le terme const1 correspond à l'intensité de fluorescence émise quand toutes les molécules de PS sont dans la solution aqueuse. Le terme const2 est la somme de tous les termes non variables avec le temps. Δf_i est la différence de l'intensité de fluorescence observée quand le PS passe du milieu aqueux vers la membrane.

L'évolution de l'intensité de fluorescence du PS en fonction du temps pour trois concentrations en lipides est représentée dans la Figure 209. Les concentrations en lipides sont suffisamment élevées (10^{-4} – 10^{-6} M) par rapport à celle du PS (10^{-7} M) et permettent ainsi de fixer la totalité du PS disponible dans le milieu. L'incorporation des PS donne un signal bi-exponentiel qui est caractérisé par les deux constantes k_1 et k_2.

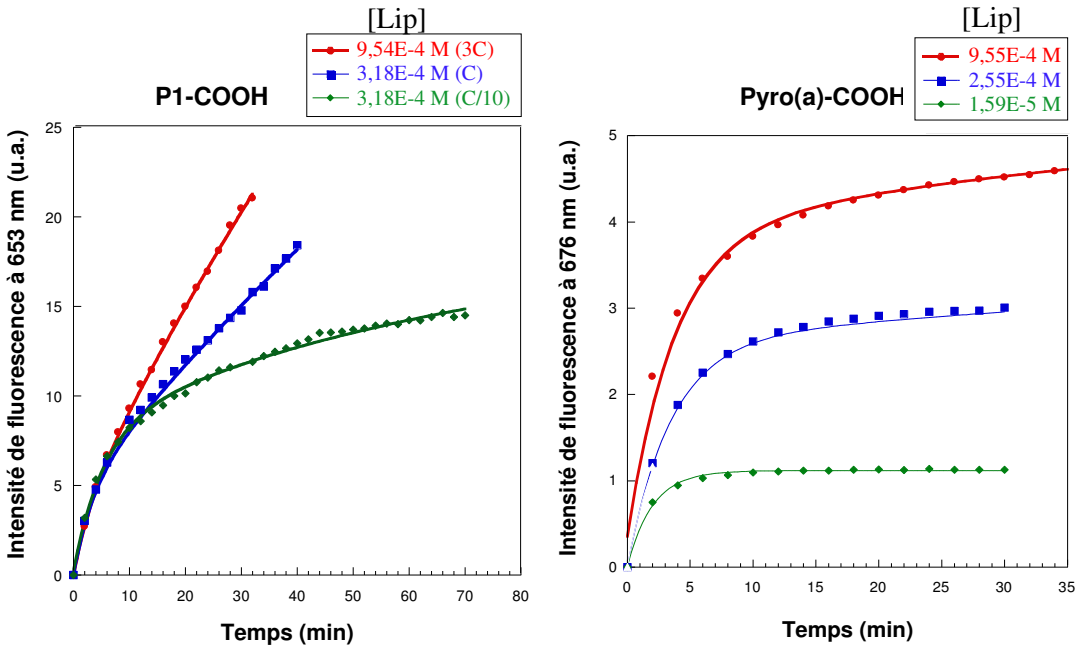


Figure 209. Intensité de fluorescence à 653 nm du P1-COOH ([P1-COOH] = 2,8 x 10^{-7} M) et à 676 nm du Pyro(a)-COOH ([Pyro(a)-COOH] = 3,1 x 10^{-7} M) en fonction du temps, pour trois concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm).

Le comportement de ces constantes en fonction de la concentration en lipides est présenté dans la Figure 210. Le mouvement de flip-flop est lent par rapport à l'entrée dans la membrane (k_{on}) et la sortie (k_{off}), et k_1 est directement proportionnel à la concentration lipidique [lip]. La mesure de k_1 en fonction de la concentration en lipides nous donne accès à k_{on} (pente) et (k_{off} + k_{ti} + k_{to}) (intersection). Comme on peut l'observer sur cette figure, la vitesse de la deuxième phase, k_2, ne change quasiment pas sur une large gamme de concentrations en lipides, comparée à celle de k_1. Nous avons ainsi évalué les constantes de vitesse k_{on}, k_{off} et k_{ti} + k_{to} (Tableau 41).

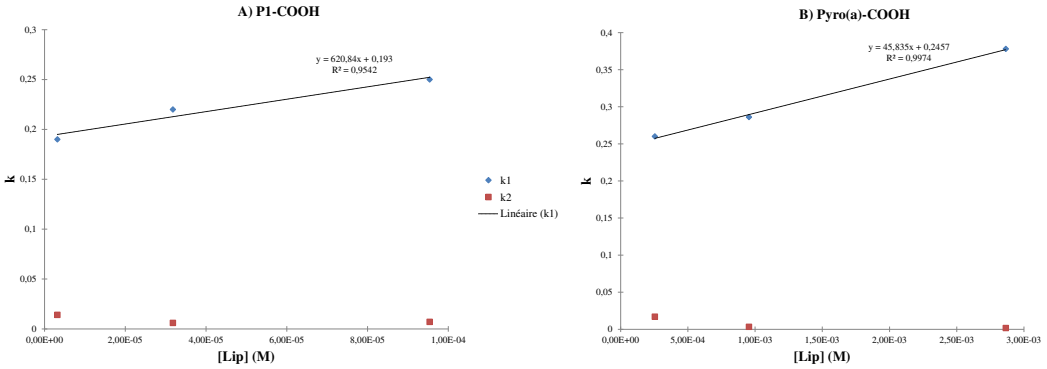


Figure 210. Constantes de vitesses k_1 et k_2 en fonction de la concentration en lipides (A) pour P1-COOH (B) pour Pyro(a)-COOH.

Tableau 41. Récapitulatif des données cinétiques de l'interaction du PS seul avec les vésicules lipidiques.

	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	$k_2 = k_{ti} + k_{to}$ (s^{-1})
P1-COOH	675,320	0,182	0,009
Pyro(a)	45,84	0,246	0,007

Les données expérimentales ont été trouvées grâce à l'équation bi-exponentielle décrite plus haut, correspondant à deux phases de l'interaction du PS dans les vésicules lipidiques de DOPC. Une première phase exponentielle rapide, correspondant à l'entrée du PS dans le feuillet externe suivie d'une seconde phase exponentielle lente, correspondant à une translocation de celui-ci à travers la bicouche du feuillet externe vers le feuillet interne. Le flip-flop reste toutefois négligeable.

IV.3.b Etude cinétique de l'interaction des PS-GRIGF-OH avec les membranes

L'évolution de l'intensité de fluorescence du PS-GRIGF-OH en fonction du temps pour différentes concentrations en lipides est représentée dans la Figure 211. Les concentrations en lipides sont suffisamment élevées (10^{-4} – 10^{-6} M) par rapport à celle du PS (10^{-7} M) et permettent ainsi de fixer la totalité du PS-GRIGF-OH disponible dans le milieu. L'incorporation des PS-GRIGF-OH ne donne pas une bi-exponentielle comme pour l'incorporation des PS mais un signal sigmoïdal typique d'une insertion facilitée. Plus il y a de PS-GRIGF-OH déjà associés à la membrane, plus l'association des molécules de PS-GRIGF-OH suivantes à la membrane est aisée. Le greffage du peptide H-GRIGF-OH a un effet sur l'interaction des PS avec les membranes. La vitesse d'incorporation du composé PS-GRIGF-OH dépend de la concentration en lipides : plus il y a de lipides moins l'insertion de la même quantité de PS-GRIGF-OH dans la membrane modifie cette dernière et donc moins l'effet est important. La vitesse diminue ainsi quand on augmente la concentration en lipides.

Quelque soit la concentration de départ en Pyro(a)-GRIGF-OH (Figure 211) et pour des concentrations en lipides identiques, l'évolution de l'intensité de fluorescence de ce composé est la même. Seul le plateau de saturation des lipides en composé est plus faible dans le cas de la concentration de départ la plus faible en Pyro(a)-GRIGF-OH, comme attendu.

En comparant l'évolution de l'intensité de fluorescence du P1-GRIGF-OH et celle du P1-PEG-GRIGF-OH pour des concentrations en lipides identiques (Figure 211), on s'aperçoit que l'incorporation du P1-PEG-GRIGF-OH est plus rapide. L'introduction d'un bras espaceur PEG entre le peptide H-GRIGF-OH et la P1-COOH modifie encore un peu plus la membrane que le peptide seul, donc l'effet est plus important, les associations suivantes sont plus favorisées.

[Lip] = C = 3,2 x 10^{-5} M

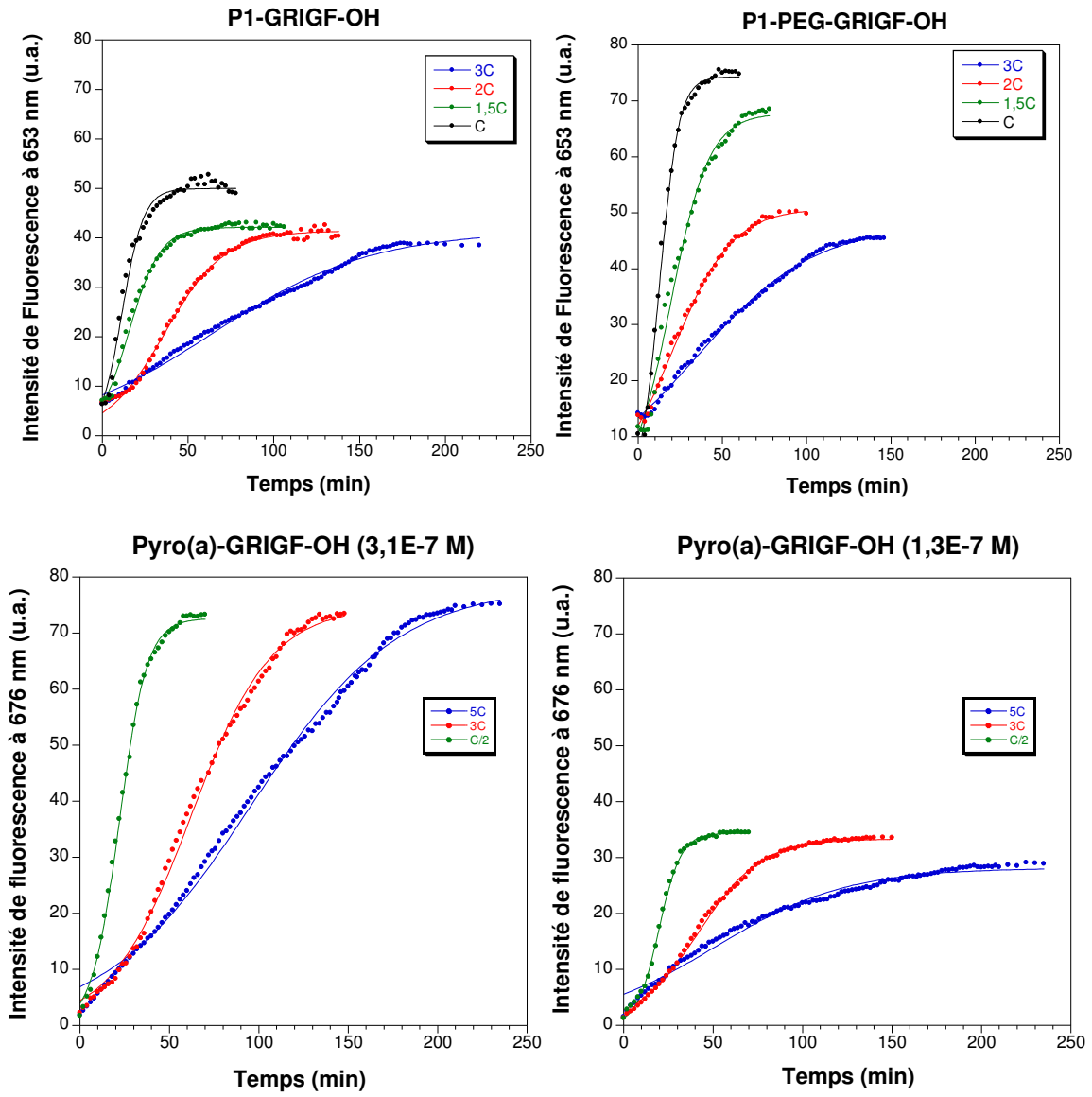


Figure 211. Intensité de fluorescence : à 653 nm du P1-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), à 653 nm du P1-PEG-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), et à 676 nm du Pyro(a)-GRIGF-OH (3,1 x 10^{-7} M et 1,3 x 10^{-7} M) - en fonction du temps, pour différentes concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm).

Nous avons souhaité valider notre hypothèse, qui consiste à considérer que la quantité de composé PS-GRIGF-OH insérée dans le feuillet des vésicules modifie bien la membrane et favorise ainsi les associations suivantes. Pour cela, nous avons décidé de comparer pour chaque composé étudié :

- l'évolution de l'intensité de fluorescence du PS-GRIGF-OH ([PS-GRIGF-OH], concentration de départ en composé) en fonction du temps pour une concentration en lipide choisie C. Une fois le plateau de saturation des lipides en composé atteint, on peut noter la concentration maximale de composé insérée dans les lipides comme suit : [PS-GRIGF-OH_{lip}] (Courbes rouges Figure 212),
- et l'évolution de l'intensité de fluorescence du PS-GRIGF-OH en fonction du temps pour la même concentration en lipide C mais avec une concentration de départ en PS-GRIGF-OH égale à 90% de la concentration de départ [PS-GRIGF-OH] précédente + 10% de PS-GRIGF-OH préalablement inséré dans la membrane ([PS-GRIGF-OH_{lip}]). (Courbes bleues Figure 212)

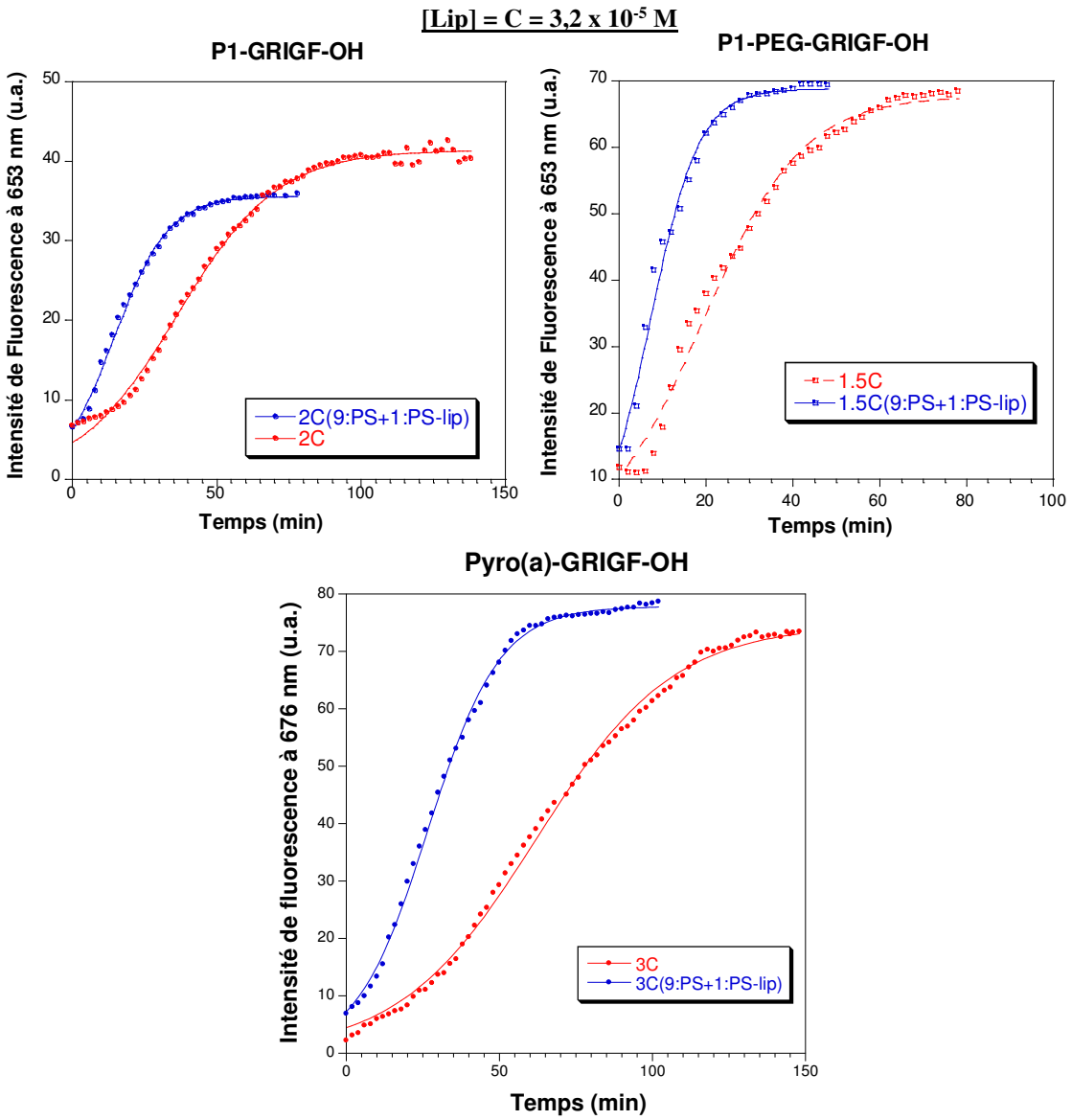


Figure 212. Evolution de la fluorescence - à 653 nm du P1-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), à 653 nm du P1-PEG-GRIGF-OH (2,8 x 10^{-7} M), et à 676 nm du Pyro(a)-GRIGF-OH (3,1 x 10^{-7} M) - en fonction du temps, pour différentes concentrations en lipides ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm).

Les graphes illustrés dans la Figure 212 montrent clairement que l'incorporation du PS-GRIGF-OH est favorisée par la présence de composés déjà insérés dans le feuillet des lipides : les courbes bleues sont toutes décalées vers la gauche par rapport aux courbes rouges, la vitesse d'incorporation dans ce cas augmente. Ce qui valide bien notre hypothèse.

Le modèle cinétique suivi pour l'étude cinétique de l'interaction des PS-GRIGF-OH avec les membranes peut être décrit de la façon suivante (Figure 213) :

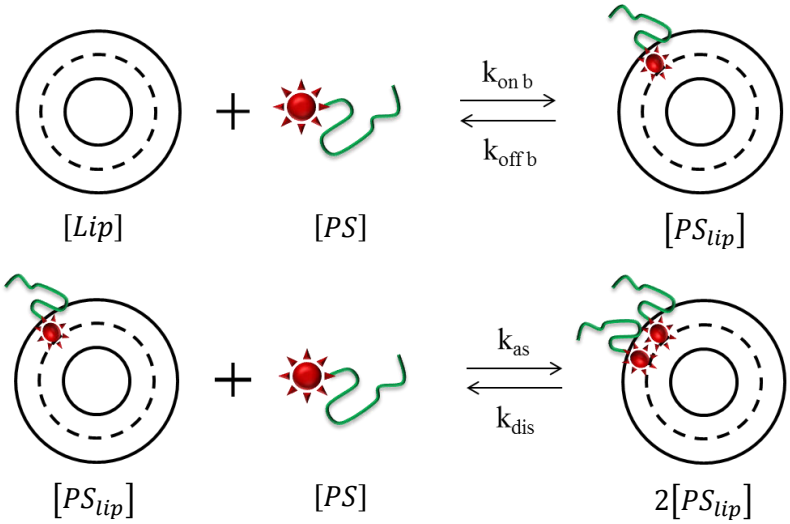


Figure 213. Représentation schématique de la cinétique d'un PS-GRIGF-OH avec les vésicules lipidiques.

Les lipides sont en excès ainsi on peut écrire :

$$PS + Lip \underset{k_{offb}}{\overset{k_{onb}}{\rightleftharpoons}} PS_{Lip}$$

$$PS + PS_{Lip} \underset{k_{dis}}{\overset{k_{as}}{\rightleftharpoons}} 2PS_{Lip}$$

Notons : [PS] représente la concentration en PS libre dans la solution aqueuse,
[PS_{lip}] celle insérée dans le feuillet des vésicules,
[Lip] celle des lipides.

Au départ, l'association est « spontanée » car il y a une affinité du composé pour les lipides puis PS_{Lip} modifie le système et favorise les associations suivantes.

$$PS_{Lip0} \ll PS_0$$

$$PS_{Lip0} + PS_0 = S = PS_0^*$$

avec PS_0^* représente la quantité mise au départ de PS

Posons $\varepsilon = PS_{Lip0}$ donc $PS_0 = PS_0^* - \varepsilon$

$$PS_{Lip} + PS = S = PS_0^*$$

$$PS_{Lip} = S - PS = PS_0^* - PS$$

Le système d'équation décrivant la cinétique de l'incorporation est le suivant :

PS est un simple réactif :

$$\frac{d[PS]}{dt} = -k_{as}[PS_{Lip}][PS] + k_{dis}[PS_{Lip}]^2$$

$$= -k_{as}([PS_0^*] - [PS])[PS] + k_{dis}([PS_0^*] - [PS])^2$$

PS_{Lip} est un réactif et un produit :

$$\frac{d[PS_{Lip}]}{dt} = -k_{as}[PS_{Lip}][PS] + k_{dis}[PS_{Lip}]^2 + 2\,k_{as}\,[PS_{Lip}][PS] - 2\,k_{dis}\,[PS_{Lip}]^2$$

$$\frac{d[PS_{Lip}]}{dt} = k_{as}([PS_0^*] - [PS])[PS] - k_{dis}\,([PS_0^*] - [PS])^2$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*] - [PS]$$

La résolution de ce système d'équation est réalisée à l'aide des transformées de Laplace :

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{k_{as} + 2k_{dis}}{2(k_{as} + k_{dis})} - \frac{k_{as}}{2(k_{as} + k_{dis})}.\frac{\frac{2\,k_{as}[PS_0^*] - 2\varepsilon(k_{as} + k_{dis})}{2\varepsilon(k_{as} + k_{dis})} - e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}{\frac{2\,k_{as}[PS_0^*] - 2\varepsilon(k_{as} + k_{dis})}{2\varepsilon(k_{as} + k_{dis})} + e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}\right]$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{k_{as} + 2k_{dis}}{2(k_{as} + k_{dis})} - \frac{k_{as}}{2(k_{as} + k_{dis})}.\frac{1 - \frac{\varepsilon(k_{as} + k_{dis})}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon(k_{as} + k_{dis})}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}{1 + \frac{\varepsilon(k_{as} + k_{dis})}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon(k_{as} + k_{dis})}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}\right]$$

On pose $E = k_{as} + k_{dis}$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{E + k_{dis}}{2E} - \frac{(E - k_{dis})}{2E}.\frac{1 - \frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}{1 + \frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}\right]$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{E + k_{dis}}{2E} - \frac{(E - k_{dis})}{2E}.\frac{1 - e^{\ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}{1 + e^{\ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}.e^{k_{as}.[PS_0^*].t}}\right]$$

on sait que $e^a e^b = e^{a+b}$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{E + k_{dis}}{2E} - \frac{(E - k_{dis})}{2E}.\frac{1 - e^{k_{as}.[PS_0^*].t + \ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}}{1 + e^{k_{as}.[PS_0^*].t + \ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}}\right]$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{E + k_{dis}}{2E} - \frac{(E - k_{dis})}{2E}.\frac{1 - e^{k_{as}.[PS_0^*].t + \ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}}{1 + e^{k_{as}.[PS_0^*].t + \ln\left(\frac{\varepsilon.E}{k_{as}[PS_0^*] - \varepsilon.E}\right)}}\right]$$

On sait que : $\frac{1 - e^{-2z}}{1 + e^{-2z}} = tanh(z)$ avec $z = -\frac{1}{2}\,(k_{as}.PS_0^*.t + \ln(\varepsilon.E) - \ln(k_{as}.PS_0^* - \varepsilon.E))$

$$tanh(-z) = -\,tanh(z)$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*]\left[1 - \frac{E + k_{dis}}{2E} + \frac{(E - k_{dis})}{2E}.\tanh\frac{k_{as}.[PS_0^*].t + \ln(\varepsilon.E) - \ln(k_{as}.[PS_0^*] - \varepsilon.E)}{2}\right]$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*] . \frac{(E - k_{dis})}{E} \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} . \tanh \frac{k_{as} . [PS_0^*] . t + \ln(\varepsilon . E) - \ln(k_{as} . [PS_0^*] - \varepsilon . E)}{2}\right]$$

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*] . \frac{k_{as}}{k_{as} + k_{dis}} \left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} . \tanh \frac{k_{as} . [PS_0^*] . t + \ln(\varepsilon . E) - \ln(k_{as} . [PS_0^*] - \varepsilon . E)}{2}\right]$$

$\left[\frac{1}{2} + \frac{1}{2} . \tanh \frac{\lambda x}{2}\right] = \frac{1}{1 + e^{-\lambda x}}$ est bien l'équation d'une sigmoïde.

$$[PS_{Lip}] = [PS_0^*] . \frac{k_{as}}{k_{as} + k_{dis}} \left[\frac{1}{1 + e^{-k_{as} . [PS_0^*] . t - \ln(\varepsilon . E) + \ln(k_{as} . [PS_0^*] - \varepsilon . E)}}\right]$$

$$\boxed{[PS_{Lip}] = [PS_0^*] . \frac{k_{as}}{k_{as} + k_{dis}} \left[\frac{1}{1 + \frac{k_{as} . [PS_0^*] - \varepsilon . E}{\varepsilon . E} e^{-k_{as} . [PS_0^*] . t}}\right]}$$

$$F(t) = f_{Lip}[PS_{Lip}](t)$$

$$\boxed{F(t) = f_{Lip}[PS_0^*] . \frac{k_{as}}{k_{as} + k_{dis}} \left[\frac{1}{1 + \frac{k_{as} . [PS_0^*] - \varepsilon . E}{\varepsilon . E} e^{-k_{as} . [PS_0^*] . t}}\right]}$$

La sigmoïde associée à l'incorporation des PS-GRIGF-OH est caractérisée par les deux constantes k_{as} et k_{dis}. Le comportement de ces constantes en fonction de la concentration en lipides est présenté dans la Figure 214 et les valeurs répertoriées dans le Tableau 42. Comme on peut l'observer sur cette figure, la vitesse de la deuxième phase, k_{dis}, ne change quasiment pas sur une large gamme de concentrations en lipides, comparée à celle de k_{as}.

$m_1 = k_{as}$ et $m_3 = k_{dis}$

$$F(t) = f_{Lip}[PS_0^*] . \frac{m_1}{m_1 + m_3} \left[\frac{1}{1 + m_2 e^{-m_1 . [PS_0^*] . t}}\right]$$

$f_{Lip}[PS_0^*]$ = 75 (P1-COOH seule, valeur maximale de F) et = 80 (Pyro(a)-COOH seule, valeur maximale de F)

$[PS_0^*]$ = 2,8 x 10^{-7} M pour P1-GRIGF-OH et P1-PEG-GRIGF-OH

$[PS_0^*]$ = 3,1 x 10^{-7} M pour Pyro(a)-GRIGF-OH

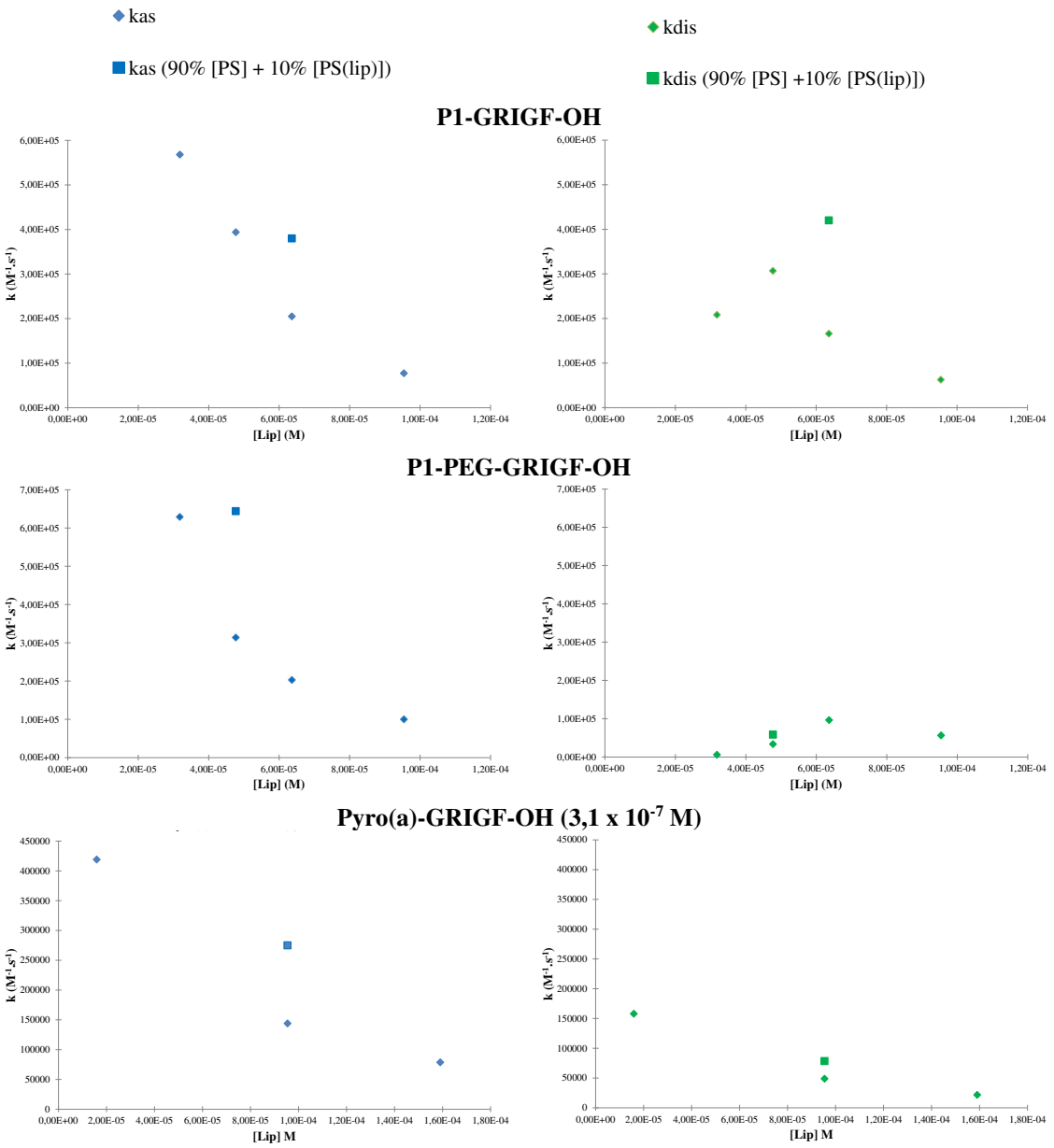


Figure 214. Evolution des constantes de vitesses k_{as} et k_{dis} en fonction de la concentration en lipides pour P1-GRIGF-OH, pour P1-PEG-GRIGF-OH et pour Pyro(a)-GRIGF-OH.

Tableau 42. Récapitulatif des données cinétiques de l'interaction des différents PS-GRIGF-OH avec les vésicules lipidiques.

	[Lip] x 10^{-5} (M)	k_{as} x 10^5 ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{dis} x 10^5 ($M^{-1}.s^{-1}$)
P1-GRIGF-OH	9,5	0,77	0,63
	6,4	2,05	1,66
	4,8	3,94	3,07
	3,2	5,68	2,08
P1-PEG-GRIGF-OH	9,5	1,00	0,56
	6,4	2,03	0,97
	4,8	3,14	0,34
	3,2	6,29	0,06
Pyro(a)-GRIGF-OH	15,9	0,79	0,22
	9,54	1,44	0,49
	1,59	4,19	1,58

La constante de vitesse k_{as} est plus élevée pour les composés constitués de P1-COOH que pour le composé Pyro(a)-GRIGF-OH sur une large gamme de concentrations en lipides. L'incorporation des composés P1-GRIGF-OH et P1-PEG-GRIGF-OH semble être meilleure que pour le Pyro-GRIGF-OH. De plus, cette même constante k_{as} diminue plus rapidement pour le P1-PEG-GRIGF-OH que pour le P1-GRIGF-OH quand la concentrations en lipides augmente. Ceci valide notre remarque précédente, que l'incorporation du P1-PEG-GRIGF-OH est plus rapide que celle du P1-GRIGF-OH du fait de l'introduction du PEG entre le peptide et la porphyrine.

IV.4 Discussion et conclusion

Les résultats cinétiques montrent que l'incorporation du PS seul se fait selon deux phases cinétiques. La première phase consiste en l'interaction du PS avec le feuillet externe des vésicules lipidiques et lors de la deuxième phase, le PS passe du feuillet externe au feuillet interne ; ce mouvement de flip-flop est, dans le cas des PS étudiés, négligeable par rapport à la première phase.

L'étude présentée ici a permis de mettre en évidence le rôle complexe du couplage d'un peptide à un photosensibilisateur dans l'insertion de ce PS au sein des membranes. L'incorporation des différents PS-GRIGF-OH donne un signal sigmoïdal et non bi-exponentiel comme dans le cas des PS. Un nouveau modèle cinétique a donc été établi afin de décrire les résultats cinétiques obtenus pour l'incorporation des PS-GRIGF-OH étudiés. La vitesse d'association de ces composés avec la membrane diminue lorsque la concentration en lipides augmente. Au début, l'association est dite « spontanée » car il y a une affinité du composé pour les lipides. Cette première quantité de composé PS-GRIGF-OH insérée dans le feuillet des vésicules modifie ensuite la membrane et favorise ainsi les associations suivantes, il y a un effet facilitant.

L'introduction d'un bras espaceur PEG entre une porphyrine, la P1-COOH et le peptide, a une incidence sur l'incorporation à travers les membranes. Le dérivé P1-PEG-GRIGF-OH est incorporé plus rapidement que le composé P1-GRIGF-OH. L'introduction d'un bras espaceur modifie davantage la membrane que le peptide seul, permettant de faciliter encore un peu plus les associations suivantes.

Les composés constitués de P1-COOH s'insère plus facilement au sein des membranes par rapport aux composés de la Pyro(a)-COOH.

Pour conclure, cette étude des interactions de type non spécifique de la partie du PMB clivé contenant le PS, soit PS-GRIGF-OH, avec un modèle de membrane cellulaire a permis de conclure sur l'internalisation à travers les membranes de ces composés.

Par manque de temps, la même étude n'a pu être réalisée sur le composé Ce6-GRIGF-OH mais est fortement envisagée. En effet, compte tenu des résultats précédents sur le clivage enzymatique des dérivés PS-GRIGFLRTAKGG-OH synthétisés, le composé Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH est celui qui possède le meilleur taux d'hydrolyse pour la MMP-14, notre cible.

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail est le premier à évaluer l'influence de la partie photosensible (PS) et de la partie inhibitrice (*quencher*) d'un *Photodynamic molecular beacon* (PMB) sur le clivage enzymatique du lien peptidique les reliant.

La définition de la cible thérapeutique a un rôle prédominant. L'emploi d'une métalloprotéinase membranaire, la MT1-MMP comme protéase activatrice du PMB semble représenter une stratégie compatible avec le traitement ciblé du glioblastome multiforme par PDT. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes essentiellement concentrés sur la séquence H-GRIGFLRTAKGG-OH, décrite par Kridel et al. [475], substrat spécifique de cette enzyme MT1-MMP.

Nous avons pu remarquer que ce même peptide couplé à la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (P1-COOH) ou la 2-(4-carboxyphénoxy) métallophtalocyanine de zinc fonctionnalisée avec un groupement carboxylique (Phtalo-COOH) ne permettait plus le clivage enzymatique du peptide. La protoporphyrine IX ou la pyrophéophorbide a (Pyro(a)-COOH) modifient l'activité enzymatique : la reconnaissance enzymatique du peptide n'est plus spécifique de la MT1-MMP mais spécifique d'une gélatinase, MMP-2 ou -9, dont l'activateur est la MT1-MMP. En revanche, la chlorine e6 couplée au peptide permet de conserver le clivage enzymatique du peptide. Des études complémentaires visant à déterminer sur quelle fonction carboxylique de la Ce6 le peptide est principalement couplé doivent être menées. Ainsi, nous avons montré que la nature du PS influe sur le clivage enzymatique du peptide.
La distance entre le peptide et le PS a également un impact sur le clivage enzymatique : l'introduction d'un bras PEG entre la P1-COOH et le peptide a permis de restaurer le clivage enzymatique du peptide par les MMP-2 et -9. Le greffage de la porphyrine en bout de la chaîne peptidique ou sur la fonction amine latérale de la lysine ne semble pas avoir une influence sur la reconnaissance enzymatique.
Le couplage d'un *quencher* sur la fonction amine latérale de la lysine garde la spécificité du peptide pour la MT1-MMP.

De nouveaux *Photodynamic Molecular Beacons* ont été développés afin de permettre le contrôle de la production d'oxygène singulet par ciblage de la MT1-MMP afin d'obtenir un plus grand degré de sélectivité PDT. Ces PMB sont basés sur l'inhibition de l'état singulet excité d'un PS par un *quencher* (BBQ650 ou BHQ-3). Ces deux entités sont reliées l'une à l'autre *via* la séquence H-GRIGFLRTAKGG-OH, spécifiques de ces enzymes.
Le transfert d'énergie au sein des PMB a été démontré. Les PMBs présentent tous une diminution du rendement quantique de production d'oxygène singulet par rapport au PS seul, diminution comprise entre 70 et 100 %. Cette étude a donc permis de prouver la faisabilité de l'association entre les PS étudiés et le *quencher* (BBQ650 ou BHQ-3) comme couple donneur/accepteur pour des applications en thérapie photodynamique. Des analyses plus poussées concernant le traitement des déclins de fluorescence et de production d'$^1O_2$ des PMB restent encore à faire. En effet, des déclins complexes ont été observés car semblent être composés d'une double exponentielle, déclin court lié au *quencher* et déclin long correspondant à l'émission du PS seul.
Nous avons également vérifié que les propriétés photophysiques de la partie du PMB clivé contenant le PS, soit PS-GRIGF-OH, ne différaient pas de celle du PS seul pour une application en PDT. La conjugaison entre le PS et les différents groupements (peptides et bras espaceurs) n'a aucune incidence sur ses propriétés photophysiques.
Les PMBs synthétisés ne sont malheureusement pas sélectifs des MT1-MMP. Le couplage d'un *quencher* sur le *N*-terminal de la lysine des dérivés « PS-GRIGFLRTAKGG-OH » a pour conséquence de modifier la sélectivité du peptide substrat. Toutefois, dans certaines conditions (rapports molaires enzyme/PMB = 1/250-260), un PMB, le Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)-OH (**PMB2**), est sélectif de la MMP-2 et présente les meilleurs pourcentages d'inhibition de fluorescence et de production d'oxygène singulet parmi les six PMBs synthétisés.

Une étude des interactions de type non spécifique de la partie du PMB clivé contenant le PS, soit PS-GRIGF-OH, avec un modèle de membrane cellulaire a permis de conclure sur l'internalisation à travers les membranes de ces composés.

Pour des études futures, les conditions de synthèse des PMBs devront être améliorées car leur faible rendement de synthèse est un frein à l'élaboration du PMB en grande quantité. Il a été montré qu'il est possible de coupler une protéine portant une fonction NH_2 et un sucre portant une fonction COOH par la synthèse de Maillard à l'aide des microondes [538]. Ce procédé, couplé au synthétiseur automatique INTAVIS utilisé durant cette thèse, pourrait possiblement améliorer le rendement de synthèse des peptides, ce qui permettrait de diminuer l'excès d'acides aminés ajoutés lors de la croissance de la chaîne peptidique. La réactivité de l'amine de la chaîne latérale de la lysine envers le *quencher*, dernière étape, est également cruciale : c'est elle qui détermine le rendement final du PMB. 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. La recherche vers de nouveaux *quenchers* est également une tâche importante ; des composés faciles d'accès, peu onéreux 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 termes de transfert d'énergie.

L'étude des interactions MMP/peptide nous permettrait de mieux comprendre, en amont, le mécanisme mis en jeu, pour, en aval, *designer* un PMB « idéal ». Pour ce faire, les techniques de modélisation moléculaire telles que la dynamique moléculaire et le docking seront utilisées. Les structures cristallines des MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP étant connues, il s'agira de générer les complexes associant peptides de ciblages et protéines de clivage et d'étudier leurs modes d'interaction. En se basant sur le mécanisme enzymatique des MMPs, la propension des complexes à conduire au clivage sera évaluée. Ces informations générées à l'échelle moléculaire permettront dans un premier temps d'expliquer des résultats expérimentaux antérieurs relatifs au clivage enzymatique de différentes macrostructures PMB par les MMPs. Dans un second temps, les modèles issus des simulations pourront guider la conception de nouvelles structures de PMB. Ainsi, en couplant les résultats obtenus par modélisation et les expériences, il sera possible d'améliorer de manière rationnelle la structure de nos systèmes PMB.

Enfin, l'activité biologique *in vivo* des nouveaux PMBs, le PMB2 (Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)-OH) et (sous réserve) PMB6 (Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)-OH), sélectifs respectivement des MMP-2 et MT1-MMP sur des lignées cellulaires cancéreuses devra être évaluée.

REFERENCES

1. « *Cancer* », Organisation mondiale de la santé. (date de dernière consultation : novembre 2014) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/.
2. Globocan 2008. Available from: http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900.
3. « *Qu'est-ce que le cancer?* », Fondation Arc pour la recherche sur le cancer. (date de dernière consultation : janvier 2015). http://www.arc-cancer.net/Face-au-cancer/qu-est-ce-que-le-cancer.html.
4. « *Les types de cancers* », Institut National du cancer. (date de dernière consultation : janvier 2015). http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/les-cancers/generalites/les-types-de-cancers.
5. « *Les différents cancers* », Fondation Arc pour la recherche sur le cancer. (date de dernière consultation : janvier 2015). http://www.arc-cancer.net/Face-au-cancer/les-differents-cancers.html.
6. Bechet, D., « *Traitement photodynamique interstitiel vasculaire stéréotaxique des tumeurs cérébrales guidé par imagerie : Intérêt des nanoparticules multifonctionnelles ciblant neuropiline-1* », Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lorraine, **2011**.
7. Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P., Pandey, R. K., *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*(1), 340-362.
8. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Golab, J, *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, *61*(4), 250-281.
9. Jeffes, E. W., McCullough, J. L., Weinstein, G. D., Kaplan, R., Glazer, S. D., Taylor, J. R., *Journal of the American Academy of Dermatology* **2001**, *45*(1), 96-104.
10. Grosjean, P., Wagnieres, G., Fontolliet, C., Van den Bergh, H., Monnier, P., *British journal of cancer* **1998**, *77*(11), 1989.
11. Grosjean, P., Savary, J. F., Wagnieres, G., Mizeret, J. A., Woodtli, A., Theumann, J. F., ... & Monnier, P., *Lasers in Medical Science* **1996**, *11*(4), 227-235.
12. Jablonski, A., *Nature* **1933**, *131*, 839-840.
13. Clo, E., Snyder, J. W., Ogilby, P. R., Gothelf, K. V., *ChemBioChem* **2007**, *8*(5), 475-481.
14. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., Kiesslich, T., *Lasers in medical science* **2009**, *24*(2), 259-268.
15. a) DeRosa, M. C., Crutchley, R. J., *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *233*, 351-371. b) Foote, C. S., Chang, Y. C., Denny, R. W., *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*(17), 5218-5219.
16. Sharman, W. M., Allen, C. M., Van Lier, J. E., *Methods in enzymology* **2000**, *319*, 376-400.
17. Wilson, B. C., Van Lier, J. E., *J. Photochem. Photobiol. B* **1989**, *3*(3) 459-463.
18. Ellis, J.W., Kneser, H.O., *Zeitschrift für Physik* **1933**, *86*, 583-591.
19. Moan, J., *J. Photochem. Photobiol. B* **1990**, *6*, 343-347.
20. Dysart, J. S., Patterson, M.S., *Phys. Med. Biol.* **2005**, *50*(11), 2597-616.
21. Suwa, K., Kimura, T., Schaap, A. P., *Biochemical and biophysical research communications* **1977**, *75*(3), 785-792.
22. Aït-Slimane, T., « *Principe physique de la Fluorescence* », **2010**, CHU Saint-Antoine. Available from : http://www.snv.jussieu.fr/~wboudier/ens/cours/cours-mec-fluorescence.pdf.
23. « *Quenching (fluorescence)* », Wikipédia. (date de dernière consultation : janvier 2015).
24. Moliton, A., « *Photophysique et processus optiques »,* In *Électronique et optoélectronique organiques.* Ed.: Springer, Collection Télécom, **2011**.
25. Lakowicz, J. R., In *Principles in fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic and Plenum Publishers, New York, 1999, 368-371.
26. Haugland, R. P., Yguerabide, J., Stryer, L., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1969**, *63*(1), 23-30.
27. Grimes, P. E., *Clinics in dermatology* **1997**, *15*(6), 921-926.
28. Epstein, J. M., *N. Engl. J. Med.* **1990**, *32*, 1149-1151.
29. Edelson, R. L., *Scientific American* **1988**, *259*(2), 68-75.
30. Spikes, J.D., In *In Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*. Eds; Bergasson, R. V., Jori, G., Land, E. J., Truscott, T. G., Plenum Press: New York, **1985**, 209–227.
31. Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M., *Photochemistry and photobiology* **2001**, *74*(5), 656-669.
32. Raab, O., *Zeitschrift Biologie* **1900**, *39*, 524–526.
33. Tappeiner, H.V., *European Journal of Inorganic Chemistry* **1903**, *36*(3), 3035-3038.
34. Tappeiner, H.V., Jodlbauer, A., *European Journal of Inorganic Chemistry* **1905**, *38*(3), 2602-2609.
35. Tappeiner, H.V., Jodlbauer, A., *Deutsches Archiv. fur klinische medizin* **1904**, *80*, 427-487.
36. Kitanov, G. M., *Biochemical Systematics and Ecology* **2001**, *29*(2), 171-178.
37. Koren, H., Schenk, G. M., Iindra, R. H., Alth, G., Ebermann, R., Kubin, A., ... & Kreitner, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *36*(2), 113-119.

38. Karioti, A., Bilia, A. R., *International journal of molecular sciences* **2010**, *11*(2), 562-594.
39. Redmond, R. W., Gamlin, J. N., *Photochemistry and photobiology* **2001**, *70*(4), 391-475.
40. Jacobson, J. M., Feinman, L., Liebes, L., Ostrow, N., Koslowski, V., Tobia, A., ... & Prince, A. M., *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2001**, *45*(2), 517-524.
41. Hadjur, C., Richard, M. J., Parat, M. O., Favier, A., Jardon, P., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1995**, *27*(2), 139-146.
42. Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., de Witte, P. A., *The international journal of biochemistry & cell biology* **2002**, *34*(3), 221-241.
43. Pathak, M. A., Daniels, F., Fitzpatrick, T. B., *Journal of investigative Dermatology* **1962**, *39*(3), 225-239.
44. Hannani, D., « *Étude des mécanismes d'action de la PhotoChimiothérapie Extra-corporelle chez l'Homme* », Thèse de doctorat en Sciences du vivant/Immunologie, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, **2010**.
45. No, R., *The Journal of Investigative Dermatology* **1959**, *32*, 645-649.
46. Seve, A., « *Optimisation de nanoparticules multifonctionnelles pour une amélioration de l'efficacité photodynamique, de la sélectivité tumorale et de la détection par IRM* », Thèse de doctorat en Chimie, Université de Lorraine, **2013**.
47. Shishodia, S., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B., *Current problems in cancer* **2007**, *31*(4), 243-305.
48. Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C., *Anticancer Res* **2003**, *23*(1A), 363-398.
49. Andrade, M. C., Ribeiro, A. P. D., Dovigo, L. N., Brunetti, I. L., Giampaolo, E. T., Bagnato, V. S., Pavarina, A. C. *Archives of oral biology* **2013**, *58*(2), 200-210.
50. Tardivo, J. P., Del Giglio, A., de Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., ... & Baptista, M. S., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*(3), 175-191.
51. Tang, W., Xu, H., Park, E. J., Philbert, M. A., Kopelman, R., *Biochemical and biophysical research communications* **2008**, *369*(2), 579-583.
52. Aghahosseini, F., Arbabi-Kalati, F., Fashtami, L. A., Djavid, G. E., Fateh, M., Beitollahi, J. M., *Lasers in surgery and medicine* **2006**, *38*(1), 33-38.
53. Xu, D., Neckers, D. C., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1987**, *40*(2), 361-370.
54. Panzarini, E., Inguscio, V., Dini, L. (2011). *International Journal of Photoenergy* **2011**, *2011*, 1-11.
55. Thompson, J. F., Hersey, P., Wachter, E., *Melanoma research* **2008**, *18*(6), 405-411.
56. Chang, C. C., Yang, Y. T., Yang, J. C., Wu, H. D., Tsai, T., *Dyes and Pigments* **2008**, *79*(2), 170-175.
57. Metcalf, D., Robinson, C., Devine, D., Wood, S., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2006**, *58*(1), 190-192.
58. Rousset, N., Bourré, L., Thibaud, S., In *Photodynamic Therapy*. Patrice, T., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2003**.
59. Shea, C. R., Chen, N., Wimberly, J., Hasan, T., *Cancer research* **1989**, *49*(14), 3961-3965.
60. O'Connor, A. E., Mc Gee, M. M., Likar, Y., Ponomarev, V., Callanan, J. J., O'shea, D. F., ... & Gallagher, W. M., *International Journal of Cancer* **2012**, *130*(3), 705-715.
61. Gorman, A., Killoran, J., O'Shea, C., Kenna, T., Gallagher, W. M., O'Shea, D. F., *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(34), 10619-10631.
62. Andrejevic-Blant, S., Hadjur, C., Ballini, J. P., WagniÃ, G., *British journal of cancer* **1997**, *76*(8), 1021.
63. Merritt, J. E., & Loening, K. L., *Pure and Applied Chemistry* **1979**, *51*, 2251-2304.
64. The Porphyrin Handbook, Vol. 1–10 (Eds.: Kadish K. M., Smith K. M., Guilard R.), Academic Press, New York, **2000**.
65. Berezin, B. D., *Coordination compounds of porphyrins and phthalocyanines*. Ed.; John Wiley & sons: Chichester, New York, Brisbane, Toronto, **1981**.
66. Gouterman, M., *Journal of Molecular Spectroscopy* **1961**, *6*, 138-163.
67. Gouterman, M., Wagnière, G. H., Snyder, L. C., *Journal of Molecular Spectroscopy* **1963**, *11*(1), 108-127.
68. Stallivieri, A., « *Synthesis of Novel Conjugated Porphyrins and Porphyrin Oligomers* in *Organic Chemistry* », Master of Sciences, Trinity College Dublin, **2012**.
69. Seybold, P. G., & Gouterman, M., *Journal of Molecular Spectroscopy* **1969**, *31*(1), 1-13.
70. Mathai, S., Smith, T. A., Ghiggino, K. P., *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6*(9), 995-1002.
71. Bakleh, M. E., « *Méthodologie de synthèse pour l'élaboration de photo-sensibilisateurs sélectifs à visée anti-cancéreuse* », Thèse de doctorat en chimie appliquée, Université de Limoges, **2008**.

72. Chaleix, V., « *Synthèse et caractérisation de nouvelles porphyrines glucosylées peptidiques à motif RGD en vue de leur application en photothérapie dynamiques* », Thèse de doctorat en chimie appliquée – chimie des substances naturelles, Université de Limoges, **2003**.
73. da GH Vicente, M., M Smith, K., *Current organic synthesis* **2014**, *11*(1), 3-28.
74. Rothemund, P., *Journal of the American Chemical Society* **1939**, *61*(10), 2912-2915.
75. Rothemund, P., Menotti, A. R., *Journal of the American Chemical Society* **1941**, *63*(1), 267-270.
76. Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J., Korsakoff, L., *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32*(2), 476-476.
77. Little, R. G., Anton, J. A., Loach, P. A., Ibers, J. A., *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12*(2), 343-349.
78. Lindsey, J. S., In *The porphyrin handbook : synthesis and organic chemistry.* Eds.: Kadish K. M., Smith K. M., Guilard R., Academic Press, New York, **2000**, p-59.
79. Lindsey, J. S., Schreiman, I. C., Hsu, H. C., Kearney, P. C., Marguerettaz, A. M., *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*(5), 827-836.
80. Lindsey, J. S., Prathapan, S., Johnson, T. E., Wagner, R. W., *Tetrahedron* **1994**, *50*(30), 8941-8968.
81. Leznoff, C. C., Svirskaya, P. I., *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*(12), 947-947.
82. Yaseen, M., Ali, M., NajeebUllah, M., Munawar, M. A., Khokhar, I., *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2009**, *46*(2), 251-255.
83. Nascimento, B. F., Pineiro, M., Rocha Gonsalves, A. M. D. A., Ramos Silva, M., Matos Beja, A., Paixão, J. A., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2007**, *11*(02), 77-84.
84. Nascimento, B.F., Rocha Gonsalves, A. M. D. A., Pineiro, M., *Inorganic Chemistry Communications* **2010**, *13*(3), 395-398.
85. Smith, K. M. (Ed.). *Porphyrins and metalloporphyrins* (pp. 3-28). Amsterdam: Elsevier, **1975**.
86. Littler, B. J., Miller, M. A., Hung, C. H., Wagner, R. W., O'Shea, D. F., Boyle, P. D., Lindsey, J. S., *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*(4), 1391-1396.
87. Sobral, A. J., Rebanda, N. G., da Silva, M., Lampreia, S. H., Ramos Silva, M., Beja, A. M., ... & Rocha Gonsalves, A. M. D. A., *Tetrahedron letters* **2003**, *44*(20), 3971-3973.
88. Gunter, M. J., Mander, L. N., *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*(23), 4792-4795.
89. Rees, R. D., « *The synthesis of novel porphyrin macrocycles for their use as potential non-linear optical materials* », Thesis in Chemistry, Brunel University, **1999**.
90. Arsenault, G.P., Bullock, E., MacDonald, S. F., *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*(16), 4384-4389.
91. Woodward, R. B., *Pure and Applied Chemistry* **1961**, *2*(3-4), 383-404.
92. Ogoshi, H., Sugimoto, H., Nishiguchi, T., Watanabe, T., Matsuda, Y., Yoshida, Z. I., *Chemistry Letters* **1978**, (1), 29-32.
93. Manka, J. S., Lawrence, D. S., *Tetrahedron letters* **1989**, *30*(50), 6989-6992.
94. Montierth, J. M., Duran, A. G., Leung, S. H., Smith, K. M., Schore, N. E., *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*(39), 7423-7426.
95. Milcent, R., In *Chimie organique hétérocyclique : Structures fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels.* Eds.: EDP Sciences, **2003**, p-124.
96. Evstigneeva, R. P., *Pure and Applied Chemistry* **1981**, *53*(6), 1129-1140.
97. Ongayi, C. O., « *Synthesis of Symmetric and Asymmetric Water-Soluble Porphyrin Derivatives* », Doctoral dissertation, Louisiana State University, **2005**.
98. Paine, J. B., Chang, C. K., Dolphin, D. *Heterocycles* **1977**, *7*, 831-838.
99. Paine III, J. B., Hiom, J., Dolphin, D., *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*(12), 2796-2802.
100. Joule, J. A., Mills, K., In *Heterocyclic Chemistry*. Eds.: John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2013**.
101. Hatscher, S., Senge, M. O., *Tetrahedron letters* **2003**, *44*(1), 157-160.
102. Dogutan, D. K., Zaidi, S. H. H., Thamyongkit, P., Lindsey, J. S., *The Journal of organic chemistry* **2007**, *72*(20), 7701-7714.
103. Eisner, U., *J. Chem. Soc.* **1957**, *690*, 3461-3469.
104. Schlesinger, W., Corwin, A. H., Sargent, L. J., *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72*(7), 2867-2871.
105. Whitlock Jr, H. W., Hanauer, R., Oester, M. Y., Bower, B. K., *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*(26), 7485-7489.
106. Varamo, M., Loock, B., Maillard, P., Grierson, D. S., *Organic letters* **2007**, *9*(23), 4689-4692.
107. Laville, I., Figueiredo, T., Loock, B., Pigaglio, S., Maillard, P., Grierson, D. S., ... & Blais, J., *Bioorganic & medicinal chemistry* **2003**, *11*(8), 1643-1652.
108. Bonnett, R., Dimsdale, M. J., Stephenson, G. F., *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1969**, (4), 564-570.

109. Callot, H. J., *Tetrahedron Letters* **1972**, *13*(11), 1011-1014.
110. Bonnett, R., Nizhnik, A.N., White, S.G., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1990**, *6*, 29-37.
111. Brückner, C., Dolphin, D., *Tetrahedron letters* **1995**, *36*(19), 3295-3298.
112. Crossley, M. J., King, L. G., *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*(16), 4370-4375.
113. Jaquinod, L., Gros, C., Khoury, R. G., Smith, K. M., *Chem. Commun.* **1996**, (22), 2581-2582.
114. Shea, K. M., Jaquinod, L., Smith, K. M., *The Journal of organic chemistry* **1998**, *63*(20), 7013-7021.
115. Burns, D. H., Caldwell, T. M., Burden, M. W., *Tetrahedron letters* **1993**, *34*(18), 2883-2886.
116. Drogat, N., Barrière, M., Granet, R., Sol, V., Krausz, P., *Dyes and pigments* **2011**, *88*(1), 125-127.
117. Drogat, N., Gady, C., Granet, R., Sol, V., *Dyes and Pigments* **2013**, *98*(3), 609-614.
118. King, L. L., « *Chlorophyll diagenesis in the water column and sediments of the Black Sea* », Thesis in Chemistry, Mary Washington College, Woods Hole Oceanographic institution MA, **1993**.
119. Jubert, C., Bailey, G., *Journal of Chromatography A* **2007**, *1140*(1), 95-100.
120. Lindsey, J. S., In *The porphyrin handbook : synthesis and organic chemistry.* Eds.: Kadish K. M., Smith K. M., Guilard R., Academic Press, New York, **2000**.
121. Gossauer, A., Engel, N., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *32*(3), 141-151.
122. Pallenberg, A. J., Dobhal, M. P., Pandey, R. K., *Organic process research & development* **2004**, *8*(2), 287-290.
123. Hargus, J.A., « *Naturally-derived porphyrin and chlorin photosensitizers for photodynamic therapy*», Master of Sciences in Chemistry, Louisiana State University, **2005**.
124. de la Torre, G., Claessens, C. G., Torres, T., *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, *2000*(16), 2821-2830.
125. Brasseur, N., Ouellet, R., La Madeleine, C., van Lier, J. E., *British Journal of Cancer* **1999**, *80*(10), 1533-1541.
126. Matlaba, P.M., « *Synthesis of Zinc Phthalocyanine derivatives for possible use in photodynamic therapy*», Master of Sciences in Chemistry, Rhodes University, **2002**.
127. Matemadombo, F., « *Substituted phthalocyanines: development and self-assembled monolayer sensorstudies*», Master of Sciences in Chemistry, Rhodes University, **2006**.
128. Braun, A. V., Tcherniac, J., *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1907**, *40*(2), 2709-2714.
129. de Diesbach, H., von der Weid, E., *Helvetica Chimica Acta* **1927**, *10*(1), 886-888.
130. Hunger, K., Industrial dyes. *Chemistry, properties, application* **2003**. Available from: http://tocs.ulb.tu-darmstadt.de/109616677.pdf.
131. Linstead, R. P., Byrne, G.T., Lowe, A.R., *J. Chem. Soc.* **1934**, *212*, 1016-1017.
132. Oliver, S. W., Smith, T. D., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1987**, (11), 1579-1582.
133. Sommerauer, M., Rager, C., Hanack, M., *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*(42), 10085-10093.
134. Drager, A. S., O'Brien, D. F., *The Journal of organic chemistry* **2000**, *65*(7), 2257-2260.
135. Cosimelli, B., Roncucci, G., Dei, D., Fantetti, L., Ferroni, F., Ricci, M., Spinelli, D., *Tetrahedron* **2003**, *59*(50), 10025-10030.
136. Chen, J., Chen, N., Huang, J., Wang, J., Huang, M., *Inorganic chemistry communications* **2006**, *9*(3), 313-315.
137. Leznoff, C. C., Marcuccio, S. M., Greenberg, S., Lever, A. B. P., Tomer, K. B., *Canadian journal of chemistry* **1985**, *63*(3), 623-631.
138. Leznoff, C. C., Hall, T. W., *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*(30), 3023-3026.
139. Wöhrle, D., Krawczyk, G., *Polymer Bulletin* **1986**, *15*(3), 193-200.
140. Hamblin, M. R., Huang, Y. Y., *Handbook of Photomedicine*. Ed.: CRC Press, **2013**.
141. Svanberg, K., Bendsoe, N., Axelsson, J., Andersson-Engels, S., Svanberg, S., *Journal of biomedical optics* **2010**, *15*(4), 041502-041502.
142. Auler, H., Banzer, G., *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1942**, *53*(2), 65-68.
143. Lipson, R. L., Baldes, E. J., *Archives of dermatology* **1960**, *82*(4), 508.
144. R. Bonnett, In *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy* **2000**. Ed.: Gordon and Breach Science, London.
145. Lamarche, F., « *Synthèse et évaluation biologique de porphyrines-polyamines en vue de leur application en photothérapie dynamique des cancers* », Thèse de doctorat en Chimie, Université de Limoges, **2004**.
146. Dougherty, T. J., Mang, T. S., *Photochemistry and photobiology* **1987**, *46*(1), 67-70.

147. Dougherty, T. J., Kaufman, J. E., Goldfarb, A., Weishaupt, K. R., Boyle, D., Mittleman, A., *Cancer research* **1978**, *38*(8), 2628-2635.
148. Senge, M. O., Brandt, J. C., *Photochemistry and photobiology* **2011**, *87*(6), 1240-1296.
149. Hammerer, F., « *Synthèse et Caractérisation de Photosensibilisateurs à Absorption Biphotonique pour Application à la Photothérapie Dynamique: Ciblage du Rétinoblastome* », Thèse de doctorat en Chimie, Paris 11, 2012.
150. Senge, M. O., *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2012**, *9*(2), 170-179.
151. « *Foscan* », Haute autorité de santé, **2009**. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1012344/en/foscan.
152. Detty, M. R., Gibson, S. L., Wagner, S. J., *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*(16), 3897-3915.
153. Berenbaum, M. C., Akande, S. L., Bonnett, R., Kaur, H., Ioannou, S., White, R. D., Winfield, U. J., *British journal of cancer* **1986**, *54*(5), 717.
154. Qian, P., Evensen, J. F., Rimington, C., Moan, J., *Cancer letters* **1987**, *36*(1), 1-10.
155. Keam, S. J., Scott, L. J., Curran, M. P., *Drugs* **2003**, *63*(22), 2521-2554.
156. « *Visudyne* », Haute autorité de santé, **2012**. Available from: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-8965_VISUDYNE_17102012_AVIS_CT8965.pdf
157. Schmidt-Erfurth, U., Hasan, T., *Survey of ophthalmology* **2000**, *45*(3), 195-214.
158. Armbrecht, A. M., Aspinall, P. A., & Dhillon, B., *British journal of ophthalmology* **2004**, *88*(10), 1270-1273.
159. Bressler, N. M., & Bressler, S. B., *Investigative ophthalmology & visual science* **2000**, *41*(3), 624-628.
160. Joule, J. A., Mills, K., In *Foundamental of Heterocyclic Chemistry*. Eds.: John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2010**.
161. Plater, M. J., Barnes, P., McDonald, L. K., Wallace, S., Archer, N., Gelbrich, T., ... & Hursthouse, M. B., *Organic & biomolecular chemistry* **2009**, *7*(8), 1633-1641.
162. Lange, N., Pharmaceutical and Biological Considerations in 5-Aminolevulinic Acid in PDT, in *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translaional and Clinical.* Eds.: Artech House, **2008**.
163. Ajioka, R. S., Phillips, J. D., Kushner, J. P., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2006**, *1763*(7), 723-736.
164. Garcia, G., « *Nouveaux macrocycles tétrapyrroliques et dérivés vectorisables en photothérapie: porphyrines et chlorines polyaminées et trimères* », Thèse de doctorat en Chimie organique, Université de Limoges, **2006**.
165. Sekkat, N., Bergh, H. V. D., Nyokong, T., Lange, N., *Molecules* **2011**, *17*(1), 98-144.
166. Vartak, D. G., Gemeinhart, R. A., *Journal of drug targeting* **2007**, *15*(1), 1-20.
167. Konan, Y. N., Gurny, R., Allémann, E., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2002**, *66*(2), 89-106.
168. Couleaud, P., « *Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour de la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1.* » Thèse de doctorat en Chimie, Université de Lorraine, **2011**.
169. Murphy, L. C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Coutts, A., Watson, P., *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **1998**, *65*(1), 175-180.
170. James, D. A., Swamy, N., Paz, N., Hanson, R. N., Ray, R., *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **1999**, *9*(16), 2379-2384.
171. Swamy, N., James, D. A., Mohr, S. C., Hanson, R. N., Ray, R., *Bioorganic & medicinal chemistry* **2002**, *10*(10), 3237-3243.
172. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J. C., Souchard, J. P., *Photochemical & Photobiological Sciences* **2006**, *5*(11), 996-999.
173. Sharon, N., *Biochemical Society Transactions* **2008**, *36*(Pt 6), 1457-1460.
174. Di Stasio, B., Frochot, C., Dumas, D., Even, P., Zwier, J., Müller, A., ... & Barberi-Heyob, M., *European journal of medicinal chemistry* **2005**, *40*(11), 1111-1122.
175. Maillard, P., Gaspard, S., Guerquin-Kern, J. L., Momenteau, M., *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*(25), 9125-9127.
176. Momenteau, M., Maillard, P., De Be, M. A., Carrez, D., Croisy, A., *Journal of biomedical optics* **1999**, *4*(3), 298-318.
177. Brevet, D., Gary-Bobo, M., Raehm, L., Richeter, S., Hocine, O., Amro, K., ... & Durand, J. O., *Chemical Communications* **2009**, (12), 1475-1477.
178. Gary-Bobo, M., Hocine, O., Brevet, D., Maynadier, M., Raehm, L., Richeter, S., ... & Durand, J. O., *International journal of pharmaceutics* **2012**, *423*(2), 509-515.
179. Gary-Bobo, M., Mir, Y., Rouxel, C., Brevet, D., Hocine, O., Maynadier, M., ... & Durand, J. O., *International journal of pharmaceutics* **2012**, *432*(1), 99-104.

180. Maillard, P., Loock, B., Grierson, D. S., Laville, I., Blais, J., Doz, F., ... & Croisy, A., *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2007**, *4*(4), 261-268.
181. Kelemen, L. E., *International journal of cancer* **2006**, *119*(2), 243-250.
182. Campbell, I. G., Jones, T. A., Foulkes, W. D., Trowsdale, J., *Cancer research* **1991**, *51*(19), 5329-5338.
183. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., Guillemin, F., ... & Barberi-Heyob, M., *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13*(8), 2799-2808.
184. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., Didelon, J., ... & Barberi-Heyob, M., *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*(13), 3867-3877.
185. Garcia, G., Sarrazy, V., Sol, V., Morvan, C. L., Granet, R., Alves, S., Krausz, P., *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, *17*(2), 767-776.
186. Sol, V., Lamarche, F., Enache, M., Garcia, G., Granet, R., Guilloton, M., ... & Krausz, P., *Bioorganic &6medicinal chemistry* **2006**, *14*(5), 1364-1377.
187. Dubuc, C., Langlois, R., Bénard, F., Cauchon, N., Klarskov, K., Tone, P., van Lier, J. E., *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*(7), 2424-2427.
188. Kaščáková, S., Hofland, L. J., De Bruijn, H. S., Ye, Y., Achilefu, S., van der Wansem, K., ... & van Hagen, M. P., *PloS one* **2014**, *9*(8), e104448.
189. Ponka, P., Lok, C. N., *The international journal of biochemistry & cell biology* **1999**, *31*(10), 1111-1137.
190. Hamblin, M. R., Newman, E. L., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1994**, *26*(1), 45-56.
191. Cavanaugh, P. G., *Breast cancer research and treatment* **2002**, *72*(2), 117-130.
192. Derycke, A. S., Kamuhabwa, A., Gijsens, A., Roskams, T., De Vos, D., Kasran, A., ... & de Witte, P. A., *Journal of the National Cancer Institute* **2004**, *96*(21), 1620-1630.
193. Tozer, G. M., Bicknell, R. In *Seminars in radiation oncology* **2004 July** (Vol. 14, No. 3, pp. 222-232). WB Saunders.
194. Chen, B., Pogue, B. W., Hoopes, P. J., Hasan, T., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2005**, *61*(4), 1216-1226.
195. Mizejewski, G. J., *Experimental Biology and Medicine* **1999**, *222*(2), 124-138.
196. Chaleix, V., Sol, V., Huang, Y. M., Guilloton, M., Granet, R., Blais, J. C., Krausz, P., *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003*(8), 1486-1493.
197. Chaleix, V., Sol, V., Guilloton, M., Granet, R., Krausz, P., *Tetrahedron letters* **2004**, *45*(27), 5295-5299.
198. Boisbrun, M., Vanderesse, R., Engrand, P., Olié, A., Hupont, S., Regnouf-de-Vains, J. B., Frochot, C., *Tetrahedron* **2008**, *64*(16), 3494-3504.
199. Sol, V., Chaleix, V., Granet, R., Krausz, P., *Tetrahedron* **2008**, *64*(2), 364-371.
200. Frochot, C., Stasio, B. D., Vanderesse, R., Belgy, M. J., Dodeller, M., Guillemin, F., ... & Barberi-Heyob, M., *Bioorganic chemistry* **2007**, *35*(3), 205-220.
201. Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., Cross, M. J., *Cellular signaling* **2007**, *19*(10), 2003-2012.
202. Raimondi, C., Ruhrberg, C, In *Seminars in cell & developmental biology* **2013 March** (Vol. 24, No. 3, pp. 172-178). Academic Press.
203. Djordjevic, S., Driscoll, P. C., *Drug discovery today* **2013**, *18*(9), 447-455.
204. Binétruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., ... & Mazie, J. C., *The EMBO journal* **2000**, *19*(7), 1525-1533.
205. Perret, G. Y., Starzec, A., Hauet, N., Vergote, J., Le Pecheur, M., Vassy, R., ... & Moretti, J. L., *Nuclear medicine and biology* **2004**, *31*(5), 575-581.
206. Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., Perret, G. Y., *Life sciences* **2006**, *79*(25), 2370-2381.
207. Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., Trinquet, E., Pinel, S., ... & Barberi-Heyob, M., *Journal of controlled release* **2006**, *111*(1), 153-164.
208. Renno, R. Z., Terada, Y., Haddadin, M. J., Michaud, N. A., Gragoudas, E. S., Miller, J. W., *Archives of ophthalmology* **2004**, *122*(7), 1002-1011.
209. Hanahan, D., Weinberg, R. A., *Cell* **2000**, *100*(1), 57-70.
210. Soukos, N. S., Hamblin, M. R., Keel, S., Fabian, R. L., Deutsch, T. F., Hasan, T. *Cancer research* **2001**, *61*(11), 4490-4496.
211. Savellano, M. D., Hasan, T., *Photochemistry and photobiology* **2003**, *77*(4), 431-439.
212. Bugaj, A. M., *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*(7), 1097-1109.
213. Prakash, S., Malhotra, M., Shao, W., Tomaro-Duchesneau, C., Abbasi, S., *Advanced drug delivery reviews* **2011**, *63*(14), 1340-1351.

214. Wagner, V., Hüsing, B., Gaisser, S., Bock, A. K., *JRC-IPTS* **2008**, *EUR*, *23494*.
215. Chatterjee, D. K., Fong, L. S., Zhang, Y., *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60*(15), 1627-1637.
216. Vemuri, S., Rhodes, C. T., *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **1995**, *70*(2), 95-111.
217. Warren, M., Smith, A., *Tetrapyrroles: birth, life and death* **2009**. Ed.: Springer.
218. Richter, A. M., Waterfield, E., Jain, A. K., Canaan, A. J., Allison, B. A., Levy, J. G. *Photochemistry and photobiology* **1993**, *57*(6), 1000-1006.
219. Jiang, F., Lilge, L., Grenier, J., Li, Y., Wilson, M. D., Chopp, M., *Lasers in surgery and medicine* **1998**, *22*(2), 74-80.
220. Lassalle, H. P., Wagner, M., Bezdetnaya, L., Guillemin, F., Schneckenburger, H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2008**, *92*(1), 47-53.
221. Chang, H.I., Cheng, M.Y, Yeh, M.K., *Clinically-Proven Liposome-Based Drug Delivery: Formulation, Characterization and Therapeutic Efficacy* **2012**, *1*(3), 1-8.
222. Puri, A., *Pharmaceutics* **2013**, *6*(1), 1-25.
223. Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Tedesco, A. C., *Photomedicine and laser surgery* **2007**, *25*(5), 428-435.
224. Gomes, A. J., Lunardi, L. O., Marchetti, J. M., Lunardi, C. N., Tedesco, A. C., *Drug delivery* **2005**, *12*(3), 159-164.
225. Konan, Y. N., Chevallier, J., Gurny, R., Allemann, E., *Photochemistry and photobiology* **2003**, *77*(6), 638-644.
226. McCarthy, J. R., Perez, J. M., Brückner, C., Weissleder, R., *Nano letters* **2005**, *5*(12), 2552-2556.
227. Zeisser-Labouebe, M., « *Photodetection and photodynamic treatment of ovarian micrometastases: benefits of hypericin-loaded polymeric nanocarriers* », Thèse de doctorat en Sciences pharmaceutiques, Université de Genève, **2008**.
228. Tang, W., Xu, H., Kopelman, R., Philbert, M. A., *Photochemistry and photobiology* **2005**, *81*(2), 242-249.
229. Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J., ... & Prasad, P. N., *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*(26), 7860-7865.
230. Yan, F., Kopelman, R., *Photochemistry and photobiology* **2003**, *78*(6), 587-591.
231. Garbo, G. M., Fingar, V. H., Wieman, T. J., Noakes III, E. B., Haydon, P. S., Cerrito, P. B., ... & Morgan, A. R., *Photochemistry and photobiology* **1998**, *68*(4), 561-568.
232. Jones, M. C., Leroux, J. C., *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **1999**, *48*(2), 101-111.
233. Wöhrle, D., Muller, S., Shopova, M., Mantareva, V., Spassova, G., Vietri, F., ... & Jori, G., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1999**, *50*(2), 124-128.
234. Le Garrec, D., Taillefer, J., Van Lier, J. E., Lenaerts, V., Leroux, J. C., *Journal of drug targeting* **2002**, *10*(5), 429-437.
235. Chouikrat, R., Seve, A., Vanderesse, R., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Richeter, S., ... & Frochot, C., *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*(6), 781-792.
236. Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M., *Trends in biotechnology* **2008**, *26*(11), 612-621.
237. Stallivieri, A., Baros, F., Arnoux, P., Vanderesse, R., Barberi-Heyob, M., Frochot, C., "*Production of singlet oxygen by nanoparticle-bound photosensitizers"*, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, edited by Santi Nonell and Cristina Flors, accepted, **2015**.
238. Constantin, C., Neagu, M., Ion, R. M., Gherghiceanu, M., Stavaru, C., *Nanomedicine* **2010**, *5*(2), 307-317.
239. Mroz, P., Tegos, G. P., Gali, H., Wharton, T., Sarna, T., Hamblin, M. R, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, *6*(11), 1139-1149.
240. Wang, Y., Wang, H., Liu, D., Song, S., Wang, X., Zhang, H., *Biomaterials* **2013**, *34*(31), 7715-7724.
241. Xiao, H., Zhu, B., Wang, D., Pang, Y., He, L., Ma, X., ... & Zhu, X., *Carbon* **2012**, *50*(4), 1681-1689.
242. Chidawanyika, W., Nyokong, T., *Carbon* **2010**, *48*(10), 2831-2838.
243. Tekdaş, D. A., Durmuş, M., Yanık, H., Ahsen, V., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *93*, 313-320.
244. Hsu, C. Y., Chen, C. W., Yu, H. P., Lin, Y. F., Lai, P. S., *Biomaterials* **2013**, *34*(4), 1204-1212.
245. Primo, F. L., Michieleto, L., Rodrigues, M. A., Macaroff, P. P., Morais, P. C., Lacava, Z. G., ... & Tedesco, A. C., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *311*(1), 354-357.
246. Huang, P., Li, Z., Lin, J., Yang, D., Gao, G., Xu, C., ... & Cui, D., *Biomaterials* **2011**, *32*(13), 3447-3458.
247. Eshghi, H., Sazgarnia, A., Rahimizadeh, M., Attaran, N., Bakavoli, M., Soudmand, S., *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2013**, *10*(3), 304-312.

248. Khaing Oo, M. K., Yang, Y., Hu, Y., Gomez, M., Du, H., Wang, H., *ACS nano* **2012**, *6*(3), 1939-1947.
249. Osseni, S. A., « *Nanoplateformes hybrides multimodales pour l'imagerie médicale* », Thèse de doctorat en Sciences et génie des matériaux, Université de Toulouse III-Paul sabatier, **2012**.
250. Wang, M., Chen, Z., Zheng, W., Zhu, H., Lu, S., Ma, E., ... & Chen, X., *Nanoscale* **2014**, *6*(14), 8274-8282.
251. Bulin, A. L., Truillet, C., Chouikrat, R., Lux, F., Frochot, C., Amans, D., ... & Dujardin, C., *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*(41), 21583-21589.
252. Verhille, M., Couleaud, P., Vanderess, R., Brault, D., Barberi-Heyob, M., Frochot, C., *Current medicinal chemistry* **2010**, *17*(32), 3925-3943.
253. Vakrat-Haglili, Y., Weiner, L., Brumfeld, V., Brandis, A., Salomon, Y., Mcllroy, B., ... & Scherz, A., *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*(17), 6487-6497.
254. Koo, H., Lee, H., Lee, S., Min, K. H., Kim, M. S., Lee, D. S., ... & Jeong, S. Y., *Chemical communications* **2010**, *46*(31), 5668-5670.
255. Ko, J., Park, K., Kim, Y. S., Kim, M. S., Han, J. K., Kim, K., ... & Kwon, I. C., *Journal of Controlled Release* **2007**, *123*(2), 109-115.
256. Wu, X. L., Kim, J. H., Koo, H., Bae, S. M., Shin, H., Kim, M. S., ... & Lee, D. S., *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*(2), 208-213.
257. Lee, S. J., Koo, H., Lee, D. E., Min, S., Lee, S., Chen, X., ... & Choi, K., *Biomaterials* **2011**, *32*(16), 4021-4029.
258. Tyagi, S., Kramer, F. R., *Nature biotechnology* **1996**, *14*(3), 303-308.
259. Tyagi, S., Bratu, D. P., Kramer, F. R., *Nature biotechnology* **1998**, *16*(1), 49-53.
260. Kostrikis, L.G., Tyagi, S., Mhlanga, M. M., Ho, D. D., Kramer, F. R., *Science* **1998**, *279*(5354), 1228-1229.
261. Marras, S. A., Russell Kramer, F., Tyagi, S., *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **1999**, *14*(5), 151-156.
262. Liu, X., Tan, W., *Analytical Chemistry* **1999**, *71*(22), 5054-5059
263. Liu, X., Farmerie, W., Schuster, S., Tan, W., *Analytical Biochemistry* **2000**, *283*(1), 56-63.
264. Brown, L. J., Cummins, J., Hamilton, A., Brown, T., *Chem. Commun.* **2000**, (7), 621-622.
265. Steemers, F. J., Ferguson, J. A., Walt, D. R., *Nature biotechnology* **2000**, *18*(1), 91-94.
266. Li, J. J., Fang, X., Schuster, S. M., Tan, W., *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*(6), 1049-1052.
267. Matsuo, T., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1998**, *1379*(2), 178-184.
268. Giesendorf, B.A., Vet, J. A., Tyagi, S., Mensink, E. J., Trijbels, F. J., et Blom, H. J., *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 482-486.
269. Bratu, D. P., Cha, B. J., Mhlanga, M. M., Kramer, F. R., Tyagi, S., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*(23), 13308-13313.
270. Tan, W., Wang, K., Drake, T. J., *Current opinion in chemical biology* **2004**, *8*(5), 547-553.
271. Cló, E., Snyder, J. W., Voigt, N. V., Ogilby, P. R., Gothelf, K. V., *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*(13), 4200-4201.
272. Chen, J., Lovell, J. F., Lo, P. C., Stefflova, K., Niedre, M., Wilson, B. C., Zheng, G., *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, *7*(7), 775-781.
273. Nesterova, I. V., Erdem, S. S., Pakhomov, S., Hammer, R. P., Soper, S. A., *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*(7), 2432-2433.
274. Lovell, J. F., Liu, T. W., Chen, J., Zheng, G., *Chemical reviews* **2010**, *110*(5), 2839-2857.
275. Bremer, C., Bredow, S., Mahmood, U., Weissleder, R., Tung, C. H., *Radiology* **2001**, *221*(2), 523-529.
276. Chen, J., Tung, C. H., Allport, J. R., Chen, S., Weissleder, R., Huang, P. L., *Circulation* **2005**, *111*(14), 1800-1805.
277. Zhu, L., Xie, J., Swierczewska, M., Zhang, F., Quan, Q., Ma, Y., ... & Chen, X., *Theranostics* **2011**, *1*, 18.
278. Zhu, L., Xie, J., Swierczewska, M., Zhang, F., Lin, X., Fang, X., ... & Chen, X., *Bioconjugate chemistry* **2011**, *22*(6), 1001-1005.
279. Ryu, J. H., Lee, A., Lee, S., Ahn, C. H., Park, J. W., Leary, J. F., ... & Choi, K., *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*(7), 1378-1384.
280. Seltzer, J. L., Akers, K. T., Weingarten, H., Grant, G. A., McCourt, D. W., Eisen, A. Z., *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*(33), 20409-20413.
281. Kridel, S. J., Chen, E., Kotra, L. P., Howard, E. W., Mobashery, S., Smith, J. W., *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(23), 20572-20578.

282. Gabriel, D., Lange, N., Chobaz-Peclat, V., Zuluaga, M. F., Gurny, R., Van Den Bergh, H., Busso, N., *Journal of Controlled Release* **2012**, *163*(2), 178-186.
283. Zuluaga, M. F., Gabriel, D., Lange, N., *Molecular pharmaceutics* **2012**, *9*(6), 1570-1579.
284. Zuluaga, M. F., Sekkat, N., Gabriel, D., van den Bergh, H., Lange, N., *Molecular cancer therapeutics* **2013**, *12*(3), 306-313.
285. Choi, Y., Weissleder, R., Tung, C. H., *Cancer research* **2006**, *66*(14), 7225-7229.
286. Ryu, B., Qian, Z. J., Kim, M. M., Nam, K. W., Kim, S. K., *Radiation Physics and Chemistry* **2009**, *78*(2), 98-105.
287. Lee, S., Ryu, J. H., Park, K., Lee, A., Lee, S. Y., Youn, I. C., ... & Kim, K., *Nano letters* **2009**, *9*(12), 4412-4416.
288. Popov, A. V., Mawn, T. M., Kim, S., Zheng, G., Delikatny, E. J., *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*(10), 1724-1727.
289. Lo, P. C., Chen, J., Stefflova, K., Warren, M. S., Navab, R., Bandarchi, B., ... & Zheng, G., *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *52*(2), 358-368.
290. Liu, T. W., Akens, M. K., Chen, J., Wise-Milestone, L., Wilson, B. C., Zheng, G., *Bioconjugate chemistry* **2011**, *22*(6), 1021-1030.
291. Jang, B., Choi, Y., *Theranostics* **2012**, *2*(2), 190.
292. Verhille, M., Benachour, H., Ibrahim, A., Achard, M., Arnoux, P., Barberi-Heyob, M., ... & Frochot, C., *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*(32), 5580-5594.
293. Chen, J., Stefflova, K., Niedre, M. J., Wilson, B. C., Chance, B., Glickson, J. D., & Zheng, G., *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(37), 11450-11451.
294. Stefflova, K., Chen, J., Marotta, D., Li, H., Zheng, G., *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*(13), 3850-3856.
295. Zheng, G., Chen, J., Stefflova, K., Jarvi, M., Li, H., Wilson, B. C., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*(21), 8989-8994.
296. Chen, J., Liu, T. W., Lo, P. C., Wilson, B. C., Zheng, G., *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20*(10), 1836-1842.
297. Zheng, G., Chen, J., Li, H., Glickson, J. D., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*(49), 17757-17762.
298. Stefflova, K., Chen, J., Zheng, G., *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **2006**, *12*, 4709-4721.
299. Zhu, Z., Tang, Z., Phillips, J. A., Yang, R., Wang, H., Tan, W., *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*(33), 10856-10857.
300. Guastalla, J. P., Ray-Coquard I., In *Les cancers ovariens*, Springer Paris, **2006**.
301. « *Les traitements des cancers de l'ovaire* », Institut National du cancer, **2010**, 1-80. Available from google.
302. Espié, M., « *Epidémiologie du cancer de l'ovaire* ». Available from : http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/201/?sequence=28.
303. Lasset, C., « *Épidémiologie du cancer de l'ovaire* », In *Les cancers* ovariens, Springer Paris, **2006**, p. 19-25.
304. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... & Bray, F., *European journal of cancer* **2013**, *49*(6), 1374-1403.
305. Al Rawahi, T., Lopes, A. D., Bristow, R. E., Bryant, A., Elattar, A., Chattopadhyay, S., Galaal, K., *The Cochrane Library* **2013**.
306. Querleu, D., Gladieff, L., Ferron, G., Rougé, P., *Bulletin du cancer* **2009**, *96*(12), 1175-1182.
307. van Dam, G. M., Themelis, G., Crane, L. M., Harlaar, N. J., Pleijhuis, R. G., Kelder, W., ... & Ntziachristos, V., *Nature medicine* **2011**, *17*(10), 1315-1319.
308. Goff, B. A., Bachor, R., Kollias, N., Hasan, T., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1992**, *15*(3), 239-251.
309. Goff, B. A., Blake, J., Bamberg, M. P., Hasan, T., *British journal of cancer* **1996**, *74*(8), 1194.
310. Goff, B. A., Bamberg, M., Hasan, T., *Cancer research* **1991**, *51*(18), 4762-4767.
311. Delaney, T. F., Sindelar, W. F., Tochner, Z., Smith, P. D., Friauf, W. S., Thomas, G., ... & Glatstein, E., *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* **1993**, *25*(3), 445-457.
312. Hahn, S. M., Fraker, D. L., Mick, R., Metz, J., Busch, T. M., Smith, D., ... & Glatstein, E., *Clinical cancer research* **2006**, *12*(8), 2517-2525.
313. Ascencio, M., Delemer, M., Farine, M. O., Jouve, E., Collinet, P., Mordon, S., *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2007**, *4*(4), 254-260.
314. Kamen, B. A., Capdevila, A., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*(16), 5983-5987.
315. Luhrs, C. A., Slomiany, B. L., *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*(36), 21446-21449.

316. Antony, A. C., *Annual review of nutrition* **1996**, *16*(1), 501-521.
317. Vlashi, E., « *Real time, non-invasive, in vivo imaging of targeted drugs to solid tumors via a high affinity ligand: Implications to improving targeted-drug delivery* », Thèse de doctorat, Purdue University, **2007**.
318. Bae, Y.H., Mrsny R. J., Park, K., In *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive* Dream. Eds.: Springer Science & Business Media, 2013.
319. Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., Leamon, C. P., *Analytical biochemistry* **2005**, *338*(2), 284-293.
320. Kalli, K. R., Oberg, A. L., Keeney, G. L., Christianson, T. J., Low, P. S., Knutson, K. L., Hartmann, L. C., *Gynecologic oncology* **2008**, *108*(3), 619-626.
321. Markert, S., Lassmann, S., Gabriel, B., Klar, M., Werner, M., Gitsch, G., ... & Hasenburg, A., *Anticancer research* **2008**, *28*(6A), 3567-3572.
322. Azaïs, H., Moussaron, A., Khodja, B. S., Bassil, A., Betrouni, N., Frochot, C., ... & Mordon, S., *Bulletin du cancer* **2014**, *101*(12), 1109-1113.
323. Hahn, S.M., Putt, M. E., Metz, J., Shin, D. B., Rickter, E., Menon, C., ... & Busch, T. M., *Clinical Cancer Research* **2006**, *12*(18), 5464-5470.
324. Azaïs, H., Schmitt, C., Tardivel, M., Kerdraon, O., Stallivieri, A., Frochot, C., Betrouni, N., Collinet, P., Mordon, S., accepted in *PDPDT* **2015**.
325. Park, K. S., Lee, E. H., Kim, H. J. (**2014**). *U.S. Patent No. 8,735,439*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
326. Michelin, C., « *Synthèse de nouveaux agents bimodaux hydrosolubles pour l'IRM, l'imagerie nucléaire, l'imagerie biphotonique et la generation de second harmonique* », Thèse de doctorat en Chimie-Physique, Université de Bourgogne, **2015**.
327. Off, M. K., Steindal, A. E., Porojnicu, A. C., Juzeniene, A., Vorobey, A., Johnsson, A., Moan, J., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, *80*(1), 47-55.
328. Vorobei, A.V., Vorobei, P.A., *Journal of Applied Spectroscopy* **2011**, *78*(4), 653-656.
329. Lowry, O.H., Bessey, O.A., Crawford, E.J., *Journal of Biological Chemistry* **1949**, *180*, 389-398.
330. Lovell, J. F., « *New Porphyrin Architectures for Biomedical Applications* », Doctoral dissertation in Chemistry, University of Toronto, **2012**.
331. Eichwurzel, I., Stiel, H., Röder, B., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2000**, *54*(2), 194-200.
332. Verhille, M., « *Conception, élaboration et caractérisations photophysique et biochimique de molécules photoactivables pour la thérapie photdynamique* », Thèse de doctorat en Chimie, Université de Lorraine, **2012**.
333. Hackbarth, S., Ermilov, E. A., Röder, B., *Optics communications* **2005**, *248*(1), 295-306.
334. Chen, K., Preuß, A., Hackbarth, S., Wacker, M., Langer, K., Röder, B., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *96*(1), 66-74.
335. Chen, C., Ke, J., Zhou, X. E., Yi, W., Brunzelle, J. S., Li, J., ... & Melcher, K., *Nature* **2013**, *500*(7463), 486-489.
336. Akhtar, M. J., Khan, M. A., Ahmad, I., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2003**, *31*(3), 579-588.
337. Akhtar, M. J., Khan, M. A., Ahmad, I., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **1999**, *19*(3), 269-275.
338. « *Le cerveau et les différents types de cancers du cerveau* », Fondation Arc pour la recherche sur le cancer, **2013**. Available from : http://www.arc-cancer.net/Les-cancers-du-cerveau/le-cerveau-et-les-differents-types-de-cancers-du-cerveau.html. (date de dernière consultation : janvier 2015).
339. del Burgo, L. S., Hernández, R. M., Orive, G., Pedraz, J. L., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10*(5), 905-919.
340. « 2014 CBTRUS Fact sheet », CBTRUS. (date de dernière consultation : juin 2015). Available from: http://www.cbtrus.org/factsheet/factsheet.html.
341. INSERM, C. *Cancers et environnement*. 2008.
342. « Tumeurs intracrâniennes », Collège des enseignants de neurologie. (date de dernière consultation : juin 2015). Available from: http://www.cen-neurologie.fr/2eme-cycle/Items%20inscrits%20dans%20les%20modules%20transversaux/Tumeurs%20intracr%C3%A2niennes/index.phtml.
343. Mazloom, A., Zangeneh, A. H., Paulino, A. C., *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2010**, *78*(1), 72-78.
344. Taillandier L., Blonski M., Carrie C., Bernier V., Bonnetain F., Bourdeaut F., Thomas I. C., Chastagner P., Dhermain F., Doz F., Frappaz D., Grill J., Guillevin R., Idbaih A., Jouvet A., Kerr C., Donadey F. L., Padovani L., Pallud J., Sunyach M. P., *Rev Neurol (Paris)* **2011**, *167*(5), 431-48.

345. Bartlett, F., Kortmann, R., Saran, F., *Clinical Oncology* **2013**, *25*(1), 36-45.
346. Desandes, E., Berger, C., Tron, I., Demeocq, F., Bellec, S., Blouin, P., ... & Clavel, J., *European Journal of Cancer* **2008**, *44*(2), 205-215.
347. Bauchet, L., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Fabbro-Peray, P., Palenzuela, G., Figarella-Branger, D., ... & Dhellemmes, P., *Journal of neuro-oncology* **2009**, *92*(1), 87-98.
348. Giordana, M. T., Schiffer, P., Lanotte, M., Girardi, P., Chio, A., *International journal of cancer* **1999**, *80*(5), 689-692.
349. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ... & Kleihues, P., *Acta neuropathologica* **2007**, *114*(2), 97-109.
350. Manoranjan, B., Venugopal, C., McFarlane, N., Doble, B. W., Dunn, S. E., Scheinemann, K., Singh, S. K., *Cancer letters* **2013**, *338*(1), 23-31.
351. Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., ... & Taylor, M. D., *Journal of Clinical Oncology* **2011**, *29*(11), 1408-1414.
352. Rudin, C. M., *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*(12), 3218-3222.
353. Von Hoff, D. D., LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Yauch, R. L., Tibes, R., ... & Low, J. A., *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*(12), 1164-1172.
354. Ajeawung, N. F., Wang, H. Y., Kamnasaran, D., *Cancer letters* **2013**, *330*(2), 130-140.
355. Hurwitz, C. A., Strauss, L. C., Kepner, J., Kretschmar, C., Harris, M. B., Friedman, H., ... & Kadota, R., *Journal of pediatric hematology/oncology* **2001**, *23*(5), 277-281.
356. Abayomi, O., Chun, M. S., Kelly, K., *Journal of the National Medical Association* **1990**, *82*(12), 833-836.
357. Chu, E. S. M., Wong, T. K. S., Yow, C. M. N., *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, *7*(1), 76-83.
358. Ritz, R., Scheidle, C., Noell, S., Roser, F., Schenk, M., Dietz, K., Strauss, W. S., *PloS one* **2012**, *7*(12), e51974.
359. Chaudhary, B., Khaled, Y. S., Ammori, B. J., Elkord, E., *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2014**, *63*(2), 81-99.
360. Snuderl, M., Batista, A., Kirkpatrick, N. D., Ruiz de Almodovar, C., Riedemann, L., Walsh, E. C., ... & Jain, R. K., *Cell* **2013**, *152*(5), 1065-1076.
361. Alouini, M.A., « *Conception et evaluation de biocapteurs de détection d'activités métalloprotéasiques pour le diagnostic du cancer* », Thèse de doctorat en chimie organique, Université de Bordeaux 1, **2011**.
362. Hillman, R. T., Feng, B. Y., Ni, J., Woo, W. M., Milenkovic, L., Gephart, M. G. H., ... & Scott, M. P., *Genes & development* **2011**, *25*(22), 2333-2346.
363. Thomas, N., Pernot, M., Vanderesse, R., Becuwe, P., Kamarulzaman, E., Da Silva, D., ... & Barberi-Heyob, M., *Biochemical pharmacology* **2010**, *80*(2), 226-235.
364. Kamarulzaman, A. E. B., « *Design, photophysical, molecular affinity and in vivo stability studies of novel peptides conjugated photosensitizer targeting neuropilin-1 for applications in vascular photodynamic therapy* », Thèse de doctorat, Universiti Sains Malaisya, **2011**.
365. Fromm, H. J., Hargrove, M., *Essentials of biochemistry*. Ed.: Springer, **2012**.
366. « *An introduction to proteins and peptides* », Elsevier Health, **2005**. Available from: http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780443100345/9780443100345.pdf.
367. Merrifield, R. B., *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*(14), 2149-2154.
368. Krinick, N. L., Sun, Y., Joyner, D., Spikes, J. D., Straight, R. C., Kopeček, J., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1994**, *5*(4), 303-324.
369. Lakowicz, J. R., In *Principles in fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, **2007**, 368-371.
370. Sureshbabu, V. V., Narendra, N., *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis* **2011**, *4*, 1-97.
371. Isidro-Llobet, A., Alvarez, M., Albericio, F., *Chemical reviews* **2009**, *109*(6), 2455-2504.
372. Fields, G. B., « *Methods for removing the Fmoc group* ». In *Peptide Synthesis Protocols*. Ed.: Humana Press, **1995**, 17-27.
373. Fields, C. G., Lloyd, D. H., Macdonald, R. L., Otteson, K. M., Noble, R. L., *Peptide research* **1990**, *4*(2), 95-101.
374. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., *Analytical biochemistry* **1970**, *34*(2), 595-598.
375. Christensen, T., *Acta Chem. Scand. B* **1979**, *33*, 763-766.
376. Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Yao, W. Q., Schafer, W., *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*(30): p. 3943-3946.

377. Valduga, J., « *Intérêt de cibler le récepteur NRP-1 pour le traitement des médulloblastomes: évaluation de nouveaux composés peptidiques et peptidomimétiques* », Thèse de Master, Université de Lorraine, **2014**.
378. Nishioka, K., Babcock, G. F., Phillips, J. H., Noyes, R. D., *Molecular and cellular biochemistry* **1981**, *41*(1), 13-18.
379. Bevec, D., Cavalli, F., Cavalli, V., Bacher, G., « Use of tuftsin as a therapeutic agent », WO 2009033678 A2, **2009**.
380. von Wronski, M. A., Raju, N., Pillai, R., Bogdan, N. J., Marinelli, E. R., Nanjappan, P., ... & Nunn, A. D., *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*(9), 5702-5710.
381. von Wronski, M., Marinelli, E., Nunn, A., Pillai, R., Ramalingam, K., Tweedle, M., Linder, K., Nanjappan, P., Raju, N., « *Tetrapeptide* », US 20020147136 A1, **2002**.
382. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
383. « *Glioblastoma and malignant astrocytoma* », American Brain Tumor Association. (date de dernière consultation : juin 2015). Available from: http://www.abta.org/secure/glioblastoma-brochure.pdf.
384. Markert, J., In *Glioblastoma Multiforme*. Ed.: Jones & Bartlett Learning, **2005**.
385. Ohgaki, H., Kleihues, P., *The American journal of pathology* **2007**, *170*(5), 1445-1453.
386. Vescovi, A. L., Galli, R., Reynolds, B. A., *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*(6), 425-436.
387. De, A., Bala, N.N., Bhattacharjee, A., JPBMS **2011**, 12(12), 1-7.
388. Watanabe, K., Tachibana, O., Sato, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H., *Brain pathology* **1996**, *6*(3), 217-223.
389. von Deimling, A., Bender, B., Jahnke, R., Waha, A., Kraus, J., Albrecht, S., ... & Wiestler, O. D., *Cancer research* **1994**, *54*(6), 1397-1401.
390. Moulton, T., Samara, G., Chung, W. Y., Yuan, L., Desai, R., Sisti, M., ... & Tycko, B., *The American journal of pathology* **1995**, *146*(3), 613.
391. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., ... & Kleihues, P., *Acta neuropathologica* **2007**, *114*(2), 97-109.
392. Ohgaki, H., « Epidemiology of brain tumors », In *Cancer Epidemiology*. Ed.: Humana Press, **2009**, 323-342.
393. Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., Kruchko, C., *Neuro-oncology* **2012**, *14*(suppl 5), v1-v49.
394. Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C., *Critical reviews in oncology/hematology* **2008**, *67*(2), 139-152.
395. Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., ... & Schackert, G., *Brain* **2007**, *130*(10), 2596-2606.
396. Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., ... & Kleihues, P., *Cancer research* **2004**, *64*(19), 6892-6899.
397. Lacroix, M., Abi-Said, D., Fourney, D. R., Gokaslan, Z. L., Shi, W., DeMonte, F., ... & Sawaya, R., *Journal of neurosurgery* **2001**, *95*(2), 190-198.
398. Cushing, H., « *Traitement des glioblastomes* », **2011**. Available from: http://www.harvey-cushing-center.be/FR_Lefranc.php.
399. Walker, M. D., Alexander Jr, E., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley Jr, M. S., Mealey Jr, J., ... & Strike, T. A., *Journal of neurosurgery* **1978**, *49*(3), 333-343.
400. Fine, H. A., *Journal of neuro-oncology* **1994**, *20*(2), 111-120.
401. Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., ... & Mirimanoff, R. O., *New England Journal of Medicine* **2005**, *352*(10), 987-996.
402. « *Avastin, Campto (Iritonecan-CPT 11)-Avastin (Bevacizumab), Temodal-Avastin, Lomustine-Avastin* », **2013**. Available from: http://gfme.free.fr/traitements/avastin.html.
403. Norden, A. D., Young, G. S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G. L., ... & Wen, P. Y., *Neurology* **2008**, *70*(10), 779-787.
404. Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., Pazdur, R., *The oncologist* **2009**, *14*(11), 1131-1138.
405. « *La thérapie à base de protéines* », **2012**. Available from: http://clinicaltrials.gov/show/NCT01071837.
406. Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., Anichini, A., *Journal of the National Cancer Institute* **2002**, *94*(11), 805-818.
407. Ni, H. T., Spellman, S. R., Jean, W. C., Hall, W. A., Low, W. C., *Journal of neuro-oncology* **2001**, *51*(1), 1-9.
408. John, S. Y., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L., Wheeler, C. J., *Cancer research* **2004**, *64*(14), 4973-4979.

409. Liau, L. M., Prins, R. M., Kiertscher, S. M., Odesa, S. K., Kremen, T. J., Giovannone, A. J., ... & Roth, M. D., *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*(15), 5515-5525.
410. De Vleeschouwer, S., Fieuws, S., Rutkowski, S., Van Calenbergh, F., Van Loon, J., Goffin, J., ... & Van Gool, S. W., *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*(10), 3098-3104.
411. Natsume, A., Yoshida, J., *Cell Adhesion & Migration* **2008**, *2*(3), 186-191.
412. Andreansky, S., He, B., Van Cott, J., McGhee, J., Markert, J. M., Gillespie, G. Y., ... & Whitley, R. J., *Gene therapy* **1998**, *5*(1), 121-130.
413. Chiocca, E. A., Abbed, K. M., Tatter, S., Louis, D. N., Hochberg, F. H., Barker, F., ... & Zwiebel, J., *Molecular Therapy* **2004**, *10*(5), 958-966.
414. Paul, M. K., Mukhopadhyay, A. K., *International journal of medical sciences* **2004**, *1*(2), 101.
415. Bai, R. Y., Staedtke, V., Riggins, G. J., *Trends in molecular medicine* **2011**, *17*(6), 301-312.
416. Bartecki, P., « *Prise en charge des récidives de glioblastomes : place de la chimiothérapie. Etude descriptive retrospective au sein de trois centres du groupe N.E.N.O. (Nord est Neuro-Oncologie)* », Thèses de doctorat en pharmacie, Université de Lorraine, 2011.
417. Bechet, D., Mordon, S. R., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M. A., *Cancer treatment reviews* **2014**, *40*(2), 229-241.
418. Kostron, H., Swartz, M. R., Miller, D. C., Martuza, R. L., *Cancer* **1986**, *57*(5), 964-970.
419. Stylli, S. S., Kaye, A. H., MacGregor, L., Howes, M., Rajendra, P., *Journal of clinical neuroscience* **2005**, *12*(4), 389-398.
420. Zimmermann, A., Ritsch-Marte, M., Kostron, H., *Photochemistry and photobiology* **2001**, *74*(4), 611-616.
421. Kostron, H., Fiegele, T., Akatuna, E., *Medical Laser Application* **2006**, *21*(4), 285-290.
422. Eljamel, M. S., *Photodiagnosis and photodynamic Therapy* **2008**, *5*(1), 29-35.
423. « *Gliolan* », Haute autorité de Santé. (date de dernière consultation : juin 2015). http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-06/gliolan_ct-7583.pdf
424. Sharman, W. M., Allen, C. M., Van Lier, J. E., *Drug discovery today* **1999**, *4*(11), 507-517.
425. Rosenthal, M. A., Kavar, B., Uren, S., Kaye, A. H., *Journal of clinical neuroscience* **2003**, *10*(4), 425-427.
426. Berthelot, T., Lasne, M. C., Deleris, G., *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*(5), 497-522.
427. Verma, R. P., Hansch, C., *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, *15*(6), 2223-2268.
428. Bosman, F. T., Stamenkovic, I., *The Journal of pathology* **2003**, *200*(4), 423-428.
429. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K., *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **1999**, *55*(4), 639-652.
430. Bode, W., Maskos, K., In *Matrix metalloproteinase Protocols.* Humana Press, **2001**, Vol. 151, 45-77.
431. Van Wart, H. E., Birkedal-Hansen, H., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*(14), 5578-5582.
432. Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., Mobashery, S., *The FASEB Journal* **1998**, *12*(12), 1075-1095.
433. Murphy, G., Docherty, A. J., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1992**, *7*(2), 120-125.
434. Stamenkovic, I., In *Seminars in cancer biology*. Academic Press, **2000**, *10*(6), 415-433.
435. Nagase, H., Woessner, J. F., *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*(31), 21491-21494.
436. Cuvelier, A., Kuntz, C., Sesboué, R., Muir, J.F., Martin, J.P., *Rev. Mol. Resp.* **1997**, *14*, 1-10.
437. Stöcker, W., Grams, F., Reinemer, P., Bode, W., Baumann, U., Gomis-Rüth, F. X., Mckay, D. B., *Protein science* **1995**, *4*(5), 823-840.
438. (a) Roy, R., Yang, J., Moses, M. A., *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*(31), 5287-5297. (b) Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., *Cell* **2010**, *141*(1), 52-67.
439. Mañes, S., Mira, E., del Mar Barbacid, M., Ciprés, A., Fernández-Resa, P., Buesa, J. M., ... & Martínez-A, C., *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*(41), 25706-25712.
440. Yu, Q., Stamenkovic, I., *Genes & development* **2000**, *14*(2), 163-176.
441. Folgueras, A. R., Pendás, A. M., Sánchez, L. M., López-Otín, C., *International Journal of Developmental Biology* **2004**, *48*, 411-424.
442. Michaud, M., « *Interaction de la MT1-MMP avec la protéine adaptatrice p130CAS au cours de la migration cellulaire* », Thèse de Master en chimie, Université du Québec à Montréal, **2008**.
443. Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., Matrisian, L. M., *Journal of Clinical Oncology* **2000**, *18*(5), 1135-1135.
444. Westermarck, J., Kahari, V. M., *The FASEB journal* **1999**, *13*(8), 781-792.
445. Nakada, M., Yamada, A., Takino, T., Miyamori, H., Takahashi, T., Yamashita, J., Sato, H., *Cancer research* **2001**, *61*(24), 8896-8902.

446. Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., Wick, W., *Cancer research* **2001**, *61*(6), 2744-2750.
447. Osenkowski, P., Toth, M., Fridman, R., *Journal of cellular physiology* **2004**, *200*(1), 2-10.
448. Seiki, M., Yana, I., *Cancer science* **2003**, *94*(7), 569-574.
449. Zucker, S., Vacirca, J., *Cancer and Metastasis Reviews* **2004**, *23*(1-2), 101-117.
450. Sato, H., Takino, T., Miyamori, H., *Cancer science* **2005**, *96*(4), 212-217.
451. Levičar, N., Nutall, R. K., Lah, T. T., *Acta neurochirurgica (Wien)* **2003**, *145*(9), 825-838.
452. Beliën, A. T., Paganetti, P. A., Schwab, M. E., *The Journal of cell biology* **1999**, *144*(2), 373-384.
453. Lakka, S. S., Gondi, C. S., Rao, J. S., *Brain pathology* **2005**, *15*(4), 327-341.
454. Munaut, C., Noël, A., Hougrand, O., Foidart, J. M., Boniver, J., Deprez, M., *International journal of cancer* **2003**, *106*(6), 848-855.
455. Groves, M. D., Puduvalli, V. K., Hess, K. R., Jaeckle, K. A., Peterson, P., Yung, W. A., Levin, V. A., *Journal of Clinical Oncology* **2002**, *20*(5), 1383-1388.
456. Levin, V. A., Phuphanich, S., Yung, W. A., Forsyth, P. A., Del Maestro, R., Perry, J. R., ... & Baillet, M., *Journal of neuro-oncology* **2006**, *78*(3), 295-302.
457. Sounni, N. E., Baramova, E. N., Munaut, C., Maquoi, E., Frankenne, F., Foidart, J. M., Noël, A., *International journal of cancer* **2002**, *98*(1), 23-28.
458. Proulx-Bonneau, S., Pratt, J., Annabi, B., *Journal of neuro-oncology* **2011**, *104*(1), 33-43.
459. Nakada, M., Nakamura, H., Ikeda, E., Fujimoto, N., Yamashita, J., Sato, H., ... & Okada, Y., *The American journal of pathology* **1999**, *154*(2), 417-428.
460. Guo, P., Imanishi, Y., Cackowski, F. C., Jarzynka, M. J., Tao, H. Q., Nishikawa, R., ... & Cheng, S. Y., *The American journal of pathology* **2005**, *166*(3), 877-890.
461. Itoh, Y., Seiki, M., *Journal of cellular physiology* **2006**, *206*(1), 1-8.
462. Butler, G. S., Butler, M. J., Atkinson, S. J., Will, H., Tamura, T., van Westrum, S. S., ... & Murphy, G., *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*(2), 871-880.
463. Baramova, E. N., Bajou, K., Remacle, A., L'hoir, C., Krell, H. W., Weidle, U. H., ... & Foidart, J. M., *FEBS letters* **1997**, *405*(2), 157-162.
464. Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A., Goldberg, G. I., *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*(10), 5331-5338.
465. Gálvez, B. G., Matías-Román, S., Albar, J. P., Sánchez-Madrid, F., Arroyo, A. G., *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(40), 37491-37500.
466. Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., ... & Seiki, M., *The EMBO Journal* **2001**, *20*(17), 4782-4793.
467. Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A. M., Kumegawa, M., Foged, N. T., Delaissé, J. M., *Journal of cell science* **1997**, *110*(5), 589-596.
468. Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., ... & Béliveau, R., *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*(50), 52132-52140.
469. Grossman, M., Born, B., Heyden, M., Tworowski, D., Fields, G. B., Sagi, I., Havenith, M., *Nature structural & molecular biology* **2011**, *18*(10), 1102-1108.
470. Brix, K., Stöcker, W., In *Proteases: structure and function*. Springer **2012**.
471. Kontogiorgis, C. A., Papaioannou, P., Hadjipavlou-Litina, D. J., *Current medicinal chemistry* **2005**, *12*(3), 339-355.
472. Lovejoy, B.H.; Luther, M.A.; Weigl, D.; Jordan, S.R., Biochemistry, **1994**. 33: p. 8207-8210.
473. Matthews, B. W., *Accounts of Chemical Research* **1988**, *21*(9), 333-340.
474. Anzellotti, A. I., Farrell, N. P., *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*(8), 1629-1651.
475. Kridel, S. J., Sawai, H., Ratnikov, B. I., Chen, E. I., Li, W., Godzik, A., ... & Smith, J. W., *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*(26), 23788-23793.
476. Zhu, L., Wang, H., Wang, L., Wang, Y., Jiang, K., Li, C., ... & Chen, X., *Journal Of Controlled Release* **2011**, *150*(3), 248-255.
477. Zhu, L., Zhang, F., Ma, Y., Liu, G., Kim, K., Fang, X., ... & Chen, X., *Molecular pharmaceutics* **2011**, *8*(6), 2331-2338.
478. Yana, I., Weiss, S. J., *Molecular biology of the cell* **2000**, *11*(7), 2387-2401.
479. Kappert, K., Meyborg, H., Baumann, B., Furundzija, V., Kaufmann, J., Graf, K., ... & Stawowy, P., *The international journal of biochemistry & cell biology* **2009**, *41*(7), 1511-1517.
480. Rozanov, D. V., Strongin, A. Y., *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*(10), 8257-8260.
481. Toth, M., Hernandez-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M. M., Gervasi, D. C., Shimura, Y., ... & Fridman, R., *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*(29), 26340-26350.
482. Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., Okada, Y., *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*(4), 2446-2451.

483. Koshikawa, N., Giannelli, G., Cirulli, V., Miyazaki, K., Quaranta, V., *The Journal of cell biology* **2000**, *148*(3), 615-624.
484. Li, Y., Aoki, T., Mori, Y., Ahmad, M., Miyamori, H., Takino, T., Sato, H., *Cancer research* **2004**, *64*(19), 7058-7064.
485. Ratnikov, B. I., Rozanov, D. V., Postnova, T. I., Baciu, P. G., Zhang, H., DiScipio, R. G., ... & Strongin, A. Y., *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*(9), 7377-7385.
486. Belkin, A. M., Akimov, S. S., Zaritskaya, L. S., Ratnikov, B. I., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(21), 18415-18422.
487. Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., Seiki, M., *The Journal of cell biology* **2001**, *153*(5), 893-904.
488. Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., Sato, H., *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*(42), 40764-40770.
489. Tam, E. M., Morrison, C. J., Wu, Y. I., Stack, M. S., Overall, C. M., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*(18), 6917-6922.
490. Higashi, S., Miyazaki, K., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*(16), 14020-8.
491. Golubkov, V. S., Boyd, S., Savinov, A. Y., Chekanov, A. V., Osterman, A. L., Remacle, A., ... & Strongin, A. Y., *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*(26), 25079-25086.
492. Lee, G., Eom, K., Park, J., Yang, J., Haam, S., Huh, Y. M., ... & Kwon, T., *Angewandte Chemie* **2012**, *124*(24), 5939-5943.
493. Packard, B. Z., Artym, V. V., Komoriya, A., Yamada, K. M., *Matrix Biology* **2009**, *28*(1), 3-10.
494. Ohkubo, S., Miyadera, K., Sugimoto, Y., Matsuo, K. I., Wierzba, K., Yamada, Y., *Biochemical and biophysical research communications* **1999**, *266*(2), 308-313.
495. Kliesch, H., Weitemeyer, A., Müller, S., Wöhrle, D., *Liebigs Annalen* **1995**, *1995*(7), 1269-1273.
496. Mannéville, V., « *Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique, Synthèse d'une métallophtalocyanine de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique* », Thèse de Doctorat, Nancy Université, **2006**.
497. Hu, Y., Geissinger, P., Woehl, J. C., *Journal of luminescence* **2011**, *131*(3), 477-481.
498. Moussaron, A., Arnoux, P., Vanderesse, R., Sibille, E., Chaimbault, P., Frochot, C., *Tetrahedron* **2013**, *69*(47), 10116-10122.
499. Zenkevich, E., Sagun, E., Knyukshto, V., Shulga, A., Mironov, A., Efremova, O., ... & Kassem, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *33*(2), 171-180.
500. Roeder, B., Wabnitz, H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1987**, *1*(1), 103-113.
501. Shen, T., Yuan, Z. L., Xu, H. J., *Dyes and pigments* **1989**, *11*(1), 77-80.
502. Marras, S. A., In *Fluorescent energy transfer nucleic acid probes* **2006** (pp. 3-16). Humana Press.
503. Lovell, J. F., Chen, J., Jarvi, M. T., Cao, W. G., Allen, A. D., Liu, Y., ... & Zheng, G., *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*(10), 3203-3211.
504. Lovell, J. F., Chen, J., Huynh, E., Jarvi, M. T., Wilson, B. C., Zheng, G., *Bioconjugate chemistry* **2010**, *21*(6), 1023-1025.
505. Danieli, B., Riva, S., *Pure and applied chemistry* **1994**, *66*(10-11), 2215-2218.
506. Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A.K., *Biotechnology* **2011**, *10*(1), 23-40.
507. Liljeblad, A., Kanerva, L. T., *Tetrahedron* **2006**, *62*(25), 5831-5854.
508. Hari Krishna, S., Karanth, N. G., *Catalysis Reviews* **2002**, *44*(4), 499-591.
509. Husson, E., « *Synthèse de dérivés fonctionnels de petits peptides par voie enzymatique »,* Thèse de Doctorat en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Université de Lorraine, **2008**.
510. Koreishi, M., Asayama, F., Imanaka, H., Imamura, K., Kadota, M., Tsuno, T., Nakanishi, K., *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2005**, *69*(10), 1914-1922.
511. Koreishi, M., Zhang, D., Imanaka, H., Imamura, K., Adachi, S., Matsuno, R., Nakanishi, K., *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54*(1), 72-78.
512. Jarrar, H., « *Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles* », Thèse de Doctorat en chimie, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, **2011**.
513. Virsu, P., Liljeblad, A., Kanerva, A., Kanerva, L. T., *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*(17), 2447-2455.
514. Youshko, M. I., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*(23), 3267-3271.
515. Husson, E., Humeau, C., Paris, C., Vanderesse, R., Framboisier, X., Marc, I., Chevalot, I., *Process Biochemistry* **2009**, *44*(4), 428-434.
516. Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J. M., Ghoul, M., *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55*(23), 9496-9502.

517. Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martínez, R., López-Munguía, A., *Biotechnology letters* **2002**, *24*(24), 2057-2061.
518. Ferrari, F., Paris, C., Maigret, B., Bidouil, C., Delaunay, S., Humeau, C., Chevalot, I., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *101*, 122-132.
519. Husson, E., Humeau, C., Blanchard, F., Framboisier, X., Marc, I., Chevalot, I., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008**, *55*(3), 110-117.
520. Yadav, G. D., Hude, M. P., Talpade, A. D., *Chemical Engineering Journal* **2015**, *281*, 199-208.
521. Singer, S. J., Nicolson, G. L., *Science* **1972**, *175*(23), 720-731.
522. « *Représentation schématique d'une membrane* », Wikipédia. (date de dernière consultation : avril 2015). Available from : http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_%28biologie%29#/media/File:Cell_membrane_detailed_diagram_fr.svg.
523. Bonneau, S., « *Biophysique et photo-perturbation de membranes biomimétiques et biologiques* », Habilitation à diriger des recherches, Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris, **2014**.
524. Scomparin, C., « *Dynamique des bicouches lipidiques supportées* », Thèse de Doctorat en Sciences des matériaux, Physique, Chimie et Nanosciences, Université de la Méditerranée-Aix-Marseille II, **2007**.
525. Aldwinckle, T. J., Ahkong, Q. F., Bangham, A. D., Fisher, D., Lucy, J. A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1982**, *689*(3), 548-560.
526. Gallová, J., Uhríková, D., Islamov, A., Kuklin, A., Balgavy, P., *General physiology and biophysics* **2004**, *23*, 113-128.
527. Arnold, K., Pratsch, L., Gawrisch, K., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1983**, *728*(1), 121-128.
528. Tilcock, C. P., Fisher, D., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1979**, *557*(1), 53-61.
529. Kerdous, R., « *Utilisation de nanoparticules copolymériques pour le ciblage cellulaire de photosensibilisateurs: étude sur des membranes modèles et corrélation avec l'internalisation cellulaire* », Thèse de Doctorat en Biophysique moléculaire, Paris 6, **2013**.
530. Gregoriadis, G., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1991**, *28*(suppl B), 39-48.
531. Mui, B., Hope, M. J., « *Formation of Large Unilamellar Vesicles by Extrusion* », In *Liposome preparation and related techniques*. G. Gregoriadi, Ed.: Informa Healthcare USA, Inc.: London, **2007**.
532. Chan, Y. H. M., Boxer, S. G., *Current opinion in chemical biology* **2007**, *11*(6), 581-587.
533. Kuzelova, K., Brault, D., *Biochemistry* **1994**, *33*(32), 9447-9459.
534. Bonneau, S., Vever-Bizet, C., *Expert Opin. Ther. Patents* **2008**, *18*(9), 1-15.
535. Bonneau, S., « *Dynamique d'interaction de tétrapyrroles avec des membranes et des lipoprotéines : conséquences sur la localisation cellulaire* », Thèse Doctorale en Biophysique moléculaire, **2003**.
536. Kuzelova, K., Brault, D., *Biochemistry* **1995**, *34*(35), 11245-11255.
537. Margalit, R., Rotenberg, M., *Biochem. J.* **1984**, *219*, 445-450.
538. Visentin, S., Medana, C., Barge, A., Giancotti, V., Cravotto, G., *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*(10), 2473-2477.
539. Moreira, L. M., Romani, A. P., Severino, D., de Oliveira, H. P., Lyon, J. P., Rodrigues, M. R., INTECH Open Access Publisher **2012**.
540. Li, D., Li, P., Lin, H., Jiang, Z., Guo, L., Li, B., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2013**, *127*, 28-37.
541. Spiller, W., Kliesch, H., Wöhrle, D., Hackbarth, S., Röder, B., Schnurpfeil, G., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2012**.

PARTIE EXPERIMENTALE

I GENERAL PROCEDURES

Pyropheophorbide carboxylic acid (Pyro(a)-COOH) and Chlorin e6 were purchased from Frontier Scientific. Protoporphyrin IX (PPIX) was purchased from Sigma Aldrich. The 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP-NH2) was purchased from Porphychem.

2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronoium hexafluorophosphate (HBTU), all amino acid derivatives and the different resins for peptide synthesis were purchased from Senn Chemicals AG or Iris Biotech. BBQ650-NHS and Fmoc-Lys(BBQ650)-OH were purchased from Berry & Associates and the black hole *quencher* 3 carboxylic acid succinimidyl ester (BHQ3-NHS) was obtained from Biosearch Technologies. 2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxyacetic acid (called here PEG) and Fmoc-Lys-OH.HCl were purchased from Fluka. *N*-Boc-2,2´-(ethylenedioxy)diethylamine (called spacer here, S) and other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

The MMP-2 Human recombinant active (PF023), MMP-9 Human recombinant active (PF140) and MMP-14 Human recombinant catalytic domain (475935) were purchased from Merck Millipore.

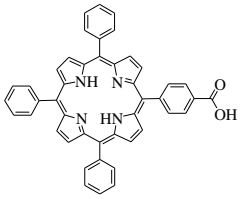
Reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) were performed on Prostar HPLC (Varian). Analytical HPLC were done with a Pursuit 5-C18 column (2.5 µm, 4.6 × 150 mm, Varian) and preparative HPLC with Pursuit 5-C18 column (5 µm, 21.2 × 150 mm, Varian), both using a photodiode array detector (UV-Visible detection, Varian) and a fluorescence detector (Varian). Liquid chromatography coupled to Mass spectrometry (LCMS) experiments for the cleavage tests were performed on a LCMS-2020 Shimadzu (electrospray ionization ESI) with a photodiode array detector (UV-Visible detection, SPD-M20A detector).

NMR spectra (^{1}H, COSY and TOCSY) were recorded on BRUKER AVANCE spectrometer at 300 MHz.

High resolution mass spectrometry (HRMS) experiments were performed on a micro-Tof Bruker (electrospray ionization ESI +, 50-1000 in low and 50-2500 in wide; Fabien Lachaud, Faculty of Sciences, Vandoeuvre-lès-Nancy).

I.1 Synthesis of photosensitizers

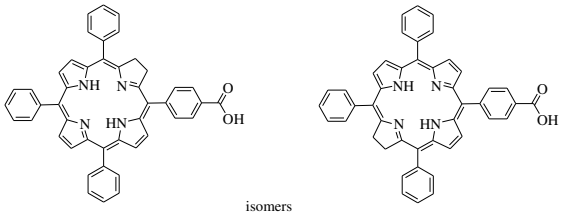
P1-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin



A stream of nitrogen in dichloromethane (700 mL) was let for 30 minutes. 3.5 mL of freshly distilled pyrrole (50 mmol), 3.8 ml of benzaldehyde (7.5 mmol) and 4-carboxybenzaldehyde (1.875 g, 2.5 mmol) were poured to the CH_2Cl_2 solution. After 15 min, 0.615 mL of boron trifluoride diethyl ether (1 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 hours. Then, *p*-chloranil (9.225 g, 37.5 mmol) was introduced. The mixture was stirred at 60°C, overnight, in the dark and under nitrogen. After cooling to room temperature, the solvent was removed. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOH, 97/3, v/v), yielding compound

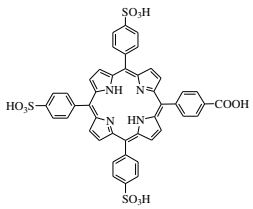
P1-COOH (738.5 mg, 11%) as purple crystals. R_f = 0.35 (CH_2Cl_2/EtOH = 97:3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.92 (s, 2H, NH), 7.83 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$),8.24 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.37 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.84 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 13.24 (br, 1H, C-OOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{45}H_{30}N_4O_2$ $[M+H]^+$ 659.2442; found 659.2476. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.49), 512 (4.13), 546 (3.81), 588 (3.65), 645 nm (3.43).

TPC-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin



P1-COOH (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 distillated pyridine (20 mL) and stirred overnight at pyridine reflux (110 °C) in a round bottom flask isolated from light and under inert atmosphere. After cooling, the crude mixture was treated with ethyl acetate (50 mL), water (50 mL) and heated, at 100 °C, for 1 h. After cooling, the organic phase was separated and washed with HCl (1 M, 200 mL), water (500 mL) and saturated water solution of $NaHCO_3$. The presence of chlorin and bacteriochlorin was controlled by UV–visible spectroscopy (bands at 650 and 735 nm, respectively). After, the organic phase was concentrated and lyophilized. The dark red solid obtained was dissolved in ethyl acetate (50 mL). Addings 100 µL of *o*-chloranil (*o*-chloranil solution 300 mg/mL in EtOAc) were poured every 30 mn to the stirred organic solution at room temperature until the absorption peak at 735 nm (bacteriochlorin) disappeared. 100 mL of water was added to quench the reaction (*o*-chloranil in excess). The solution was washed with aqueous solution of $NaHSO_3$ (5%, 200 mL), water (500 mL) and the organic phase was concentrated. The crude product was purified by HPLC using a MeOH/water (0.1% TFA) [75:25] to MeOH 100% gradient in 30 minutes, followed by 15 minutes of isocratic MeOH. R_t = 15.6 and 16.6 minutes. Yield in **2** (169.9 mg, 61%). ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.59, -1.52 (2 x s, 2H, NH), 4.13 (s, 4H, CH_2), 7.74 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 7.91, 8.06 (2 x d, 2H + 4H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.18 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.30 (s, 4H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.59 (s, 2H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{45}H_{32}N_4O_2$ $[M+H]^+$ 661.2598; found 661.2636. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (4.51), 516 (4.22), 541 (4.13), 595 (3.85), 650 (4.64).

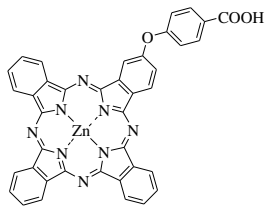
PSO_3H-COOH: 5-phenyl-10,15,20-tris(4-sulfo)phenyl porphyrin



The mixture of P1-COOH (231.5 g, 0.35 mmol) and 100% sulfuric acid (20 mL) was stirred at 120°C for 4 h. After the reaction mixture was cooled to room temperature, the mixture was poured into ice-water (100 mL). Solvents were removed by lyophilisation. Dissolved in water, the resulting compound was neutralized with 1 M NaOH until the color changed from green to red, following concentrated to around 20 mL. The mixture was purified on flash column chromatography C18 (Reveleris®, C18-WP 4g) using 100% water to water/methanol [95:5] gradient in 5 minutes, in order to remove all the salts and then, to water/methanol [50:50] gradient in 1 minute, followed by isocratic water/methanol [50:50] gradient for 3 minutes. R_t = 6.8 min. The pure compound was isolated as a claret-red solid (100 mg, 32%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.89 (s,

2H, NH), 8.07 (d, 6H, $H_{m\text{- and phenyl}}$), 8.19 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.34 (d, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.87 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{45}H_{30}N_4O_{11}S_3$ $[M+H]^+$ 899.1146; found 899.1097. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 415 (5.10), 512 (3.71), 547 (3.33), 591 (3.28), 647 nm (2.98).

Phthalo-COOH:

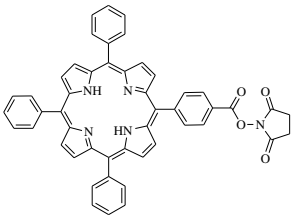


4-(3,4-dicyanophenoxy)benzoic acid (951.2 mgs, 3.59 mmol) and 1,2-dicyanobenzene (691.9 mgs, 5.40 mmol) were poured in 50 mL of fresh distilled pentanol. This solution was stirred at 140°C under a nitrogen atmosphere and in the dark. Li (486 mgs, 70 mmol) was added and the reaction let for 15 min. The solution was cooled to room temperature before adding 50 mL of glacial acetic acid. The precipitate obtained was washed with water and dried in the oven. Then, it was dissolved in 50 mL of dimethylformamide with 5 equivalent of zinc acetate dehydrate (1.69 g, 7.69 mmol) and let at 80°C overnight. The solvent was removed and the precipitate obtained was washed with water and dried in the oven. The crude reaction mixture was purified by column chromatography using diethyl ether/DMF. First, diethyl ether/DMF 9:1 (v/v) was used to eliminate the most substituted phthalocyanines (tetrasubstituted) and then, the concentration of DMF was increased. Diethyl ether/DMF 7:3 (v/v) gave the desired product as a blue powder (247.6 mg, 19%). R_f = 0.18 (diethyl ether/DMF = 85:15, v/v). ^{1}H NMR (DMSO-d6, 300MHz): δ (ppm) = 7.22 (d, 1H, CH), 7.52 (d, 2H, CH), 7.91 (m, 4H, $CH_{aromatic}$-COOH), 8.15 (m, 6H, $H_{p\text{-phthalo}}$), 8.74, 9.16 (s + d, 1H + 5 H, $H_{o\text{-phthalo}}$), 12.92 (br, 1H, -COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{39}H_{21}N_8O_3$ $[M + H]^+$, 713.1023; found 713.1013. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 340 (4.70), 604 (4.39), 668 nm (5.17).

I.2 Synthesis of succinimide ester Photosensitizers

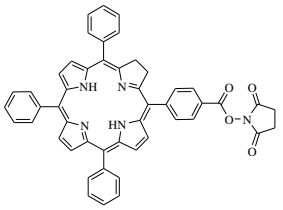
In the dark and under inert atmosphere, corresponding photosensitizer PS-COOH (1 eq.) was dissolved in CH_2Cl_2 (20-50 mL) and *N*-hydroxysuccinimide (3 eq.) and *N*,*N'*-dicyclohexylcarbodiimide (3 eq.) were added. The mixture was stirred at 40 ^{0}C, for 4 hours, under argon.

P1-NHS: 5-(4-carboxyphenylsuccinimide ester)–10,15,20–triphenylporphyrin



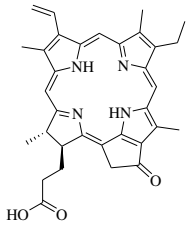
Purification of the crude material was performed using a silica gel column with DCM. P1-NHS was obtained, after recrystallization in DCM/hexane, as a purple solid with a yield of 75% (377.3 mg). R_f = 0.79 (CH_2Cl_2/EtOH = 97:3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.91 (s, 2H, NH), 3.00 (s, 4H, CH_2), 7.84 (s, 9H, $H_{m\text{- and } p\text{-phenyl}}$), 8.22 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.50 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.85 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{49}H_{33}N_5O_4$ $[M+H]^+$ 756.2605; found 756.2588. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 415 (5.70), 512 (4.35), 545 (3.99), 589 (3.82), 645 nm (3.66).

TPC-NHS: 5-(4-carboxyphenylsuccinimide ester)-10,15,20-triphenylchlorin



Purification of the crude material was performed using a silica gel column with DCM. TPC-NHS was obtained, after recrystallization in DCM/hexane, as a purple solid with a yield of 89% (102.6 mg). R_f = 0.17 (CH_2Cl_2 = 100 %). ^{1}HNMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.61, -1.48 (2 x s, 2H, NH), 2.98 (s, 4H, NHS-CH_2), 4.13 (s, 4H, CH_2), 7.74 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 7.90, 8.08(2 x d, 2H + 4H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.19 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.32 (s, 4H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.42 (s, 2H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{49}H_{35}N_5O_4$ $[M+H]^+$ 758.2762; found 758.2796. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.31), 517 (4.35), 541 (4.17), 595 (3.99), 650 (4.85).

Pyro(a)-NHS

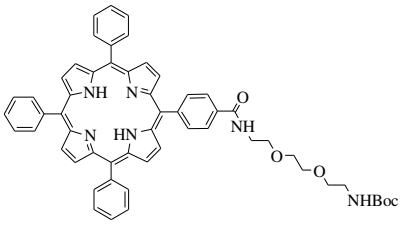


Purification of the crude material was performed using a silica gel column with 1% EtOH in DCM. Pyro(a)-NHS was obtained as a dark green solid with a yield of 46% (40.4 mg). R_f = 0.48 (CH_2Cl_2/EtOH = 97/3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.98 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.62 (t, 3H, C_8: CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.77 (d, 3H, CH_3, Pyro(a)-COOH), 3.21 (s, 4H, CH_2), 3.43, 3.52, 3.59 (3 x s, 3H x 3, CH_3, Pyro(a)-COOH), 3.68 (m, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 4.32, 4.58 (2 x d, 1H x 2, CH, Pyro(a)-COOH), 5.17 (q, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.21, 6.38 (2 x d, 1H x 2, =CH_2, Pyro(a)-COOH), 8.20 (q, 1H, -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.88, 9.43, 9.70 (3x s, 1H x 3, CH, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{37}H_{37}N_5O_5$ $[M+Na]^+$ 654.2687; found 654.2705. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.91), 506 (4.01), 537 (3.91), 608 (3.92), 667 (4.52).

Following procedures were adapted from previous protocols [183, 184].

I.3 Synthesis of Photosensitizer-SpacerNHBoc derivatives

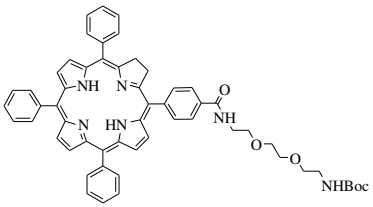
P1-S-NHBoc



84 mg of P1-NHS (0.11 mmol) and 26.3 mg of *N*-Boc-2,2´-(ethylenedioxy)diethylamine (0.11 mmol) were dissolved in 30 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature, under a nitrogen atmosphere and in the dark for 18 hours. The solvent was removed in vacuum.

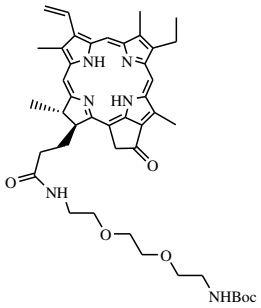
Purification of the crude material was performed using a silica gel column with 3% EtOH in CH_2Cl_2, and P1-S-NHBoc was obtained as a purple solid with a yield of 73% (68.7 mg). R_f = 0.32 (CH_2Cl_2/EtOH = 97/3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.92 (s, 2H, NH), 1.35 (s, 9H, Boc), 3.11 (q, 2H, CH_2), 3.45 (q, 2H, CH_2), 3.60 (m, 8H, CH_2), 7.81 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 8.22 (d + s, 10H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$ and $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.83 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{56}H_{52}N_6O_5$ $[M+H]^+$ 889.4072; found 889.4059. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 415 (5.52), 512 (4.17), 545 (3.90), 589 (3.72), 645 nm (3.56).

TPC-S-NHBoc



114 mg of TPC-NHS (0.15 mmol) and 37.6 mg of *N*-Boc-2,2´-(ethylenedioxy) diethylamine (0.15 mmol) were dissolved in 30 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature, under a nitrogen atmosphere and in the dark for 24 hours. The solvent was removed in vacuum. Purification of the crude material was performed using a silica gel column with 3% EtOH in CH_2Cl_2, and TPC-S-NHBoc was obtained as a purple solid with a yield of 78% (105.3 mg). R_f = 0.34 (CH_2Cl_2/EtOH = 97/3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.58, -1.53 (2 x s, 2H, NH), 1.35 (s, 9H, Boc), 3.09 (q, 2H, CH_2), 3.42 (q, 2H, CH_2), 3.61 (m, 8H, CH_2), 4.13 (s, 4H, CH_2), 7.73 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 7.92, 8.06 (2 x d, 2H + 4H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.10 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.27 (s, 4H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.57 (s, 2H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{56}H_{54}N_6O_5$ $[M+H]^+$ 891.4228; found 891.4214. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.28), 517 (4.23), 541 (4.06), 595 (3.74), 650 (4.63).

Pyro(a)-S-NHBoc



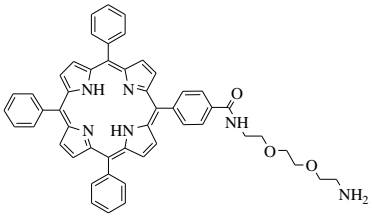
103.8 mg of Pyro(a)-COOH (0.19 mmol) and 48.2 mg of *N*-Boc-2,2´-(ethylenedioxy) diethylamine (0.19 mmol), 74.4 mg (0.38 mmol) of EDC, 30.8 mg (0.25 mmol) of DMAP were dissolved in 30 mL of THF. The reaction mixture was stirred at room temperature, under a nitrogen atmosphere and in the dark for 24 hours. The solvent was removed in vacuum. Purification of the crude material was performed using a silica gel column with 3% EtOH in CH_2Cl_2, and Pyro(a)-S-NHBoc was obtained as a dark green solid with a yield of 58 % (85.9 mg). R_f = 0.17 (CH_2Cl_2/EtOH = 97/3, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.01 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.30 (s, 9H, Boc), 1.60 (t, 3H, CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.79 (d, 3H, CH_3, Pyro(a)-COOH), 2.98 (q, 2H, CH_2), 3.15, 3.35, 3.59 (3 x s, 3H x 3, CH_3, Pyro(a)-COOH), 3.46 (q, 2H, CH_2), 3.60 (m, 8H, CH_2), 3.65 (m, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 4.31, 4.56 (2 x d, 1H x 2, CH, Pyro(a)-COOH), 5.16 (q, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.34, 6.40 (2 x d, 1H x 2, =CH_2, Pyro(a)-COOH), 6,66 (s, 1H, NH-spacer), 7,83 (t, 1H, NH-spacer), 8.19 (q, 1H, -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.88, 9.38, 9.65 (3x s, 1H x 3, CH, Pyro(a)-COOH). HRMS

(ESI+): *m/z* calcd. for $C_{44}H_{56}N_6O_6$ $[M+H]^+$ 765.4334; found 765.4304. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.91), 506 (4.02), 537 (3.98), 608 (3.91), 667 (4.58).

I.4 Synthesis of Photosensitizer-SpacerNH$_2$ derivatives

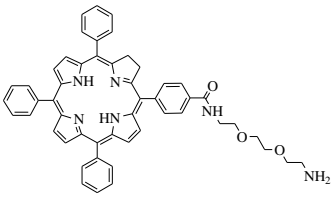
Corresponding PS-spacerNHBoc was dissolved in 2 mL of TFA. The solution was let for 2 hours, at room temperature, in the dark and under nitrogen. Next, TFA was removed by lyophilisation. The green residue was solubilized in CH_2Cl_2 (10 mL), and anhydrous potassium carbonate was added until the color changed from green to red (for P1-COOH and TPC-COOH) and from green to brown (for Pyro(a)-COOH). After filtration, the organic layer was concentrated.

P1-S-NH$_2$



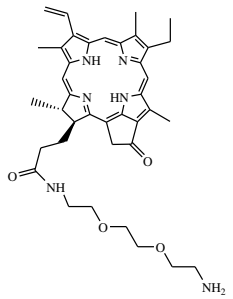
Purification of the crude material was performed using a silica gel column with CH_2Cl_2/MeOH (from 80:20 to 50:50, v/v), yielding P1-S-NH$_2$ (75.1 mg, 85%) as a purple solid. R_f = 0.72 (CH_2Cl_2/MeOH = 1/1, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm) = -2.92 (s, 2H, NH), 3.33 (m, 2H, CH_2), 3.64 (m + d, 10H, CH_2), 7.83 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 8.22 (d + s, 10H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$ and $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.84 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{51}H_{44}N_6O_3$ $[M+H]^+$ 789.3548; found 789.3560. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 415 (5.55), 512 (4.33), 545 (4.00), 589 (3.85), 645 nm (3.59).

TPC-S-NH$_2$



The residue was purified by HPLC on a C_{18} preparative column using a MeOH/water gradient (75/25 % à 100/0 % in 30 min, 100/0% for 15 min, MeOH/water (0.1% TFA), v/v). The fraction R_t = 8.05 and 9.54 minutes gave the pure product TPC-S-NH$_2$ (21.0 mg, 24%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm) = -1.56, -1.51 (2 x s, 2H, NH), 3.02 (q, 2H, CH_2), 3.58 (q, 2H, CH_2), 3.74 (s, 8H, CH_2), 4.11 (s, 4H, CH_2), 7.70 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 8.00, 8.07 (2 x d, 2H + 4H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.20 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.32 (s, 4H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.57 (s, 2H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{51}H_{46}N_6O_3$ $[M+2H]^{2+}$ 396.1880; found 396.1889. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.42), 517 (4.61), 541 (4.15), 595 (3.85), 650 (4.75).

Pyro(a)-S-NH$_2$

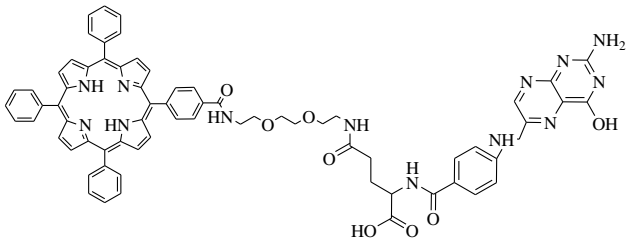


Purification of the crude material was performed using a silica gel column with CH_2Cl_2/MeOH (from 90:10 to 50:50, v/v), yielding Pyro(a)-S-NH$_2$ (35.5 mg, 52%) as a green solid. R_f = 0.13 (CH_2Cl_2/MeOH = 1:1, v/v). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm) = -1.94 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.63 (t, 3H, CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.79 (d, 3H, CH_3, Pyro(a)-COOH), 2.87 (t, 2H, CH_2), 3.17 (q, 2H, CH_2), 3.23-3.62 (3 x s, 3H x 3, CH_3, Pyro(a)-COOH), 3.50 (s, 8H, CH_2), 3.71 (m, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 4.30, 4.58 (2 x d, 1H x 2, CH, Pyro(a)-COOH), 5.17 (q, 2H, CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.22, 6.39 (2 x d, 1H x 2, =CH_2, Pyro(a)-COOH), 7,98 (t, 1H, NH), 8.18 (s, 2H, NH_2), 8.24 (q, 1H, -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.90, 9.45, 9.73 (3x s, 1H x 3, $C_{20\text{-}10\text{-}5}$, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{39}H_{48}N_6O_4$ $[M+H]^+$ 665.3810; found 665.3801. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.85), 506 (4.05), 537 (3.99), 608 (4.01), 667 (4.75).

I.5 Synthesis of Photosensitizer-Spacer-Folic Acid derivatives

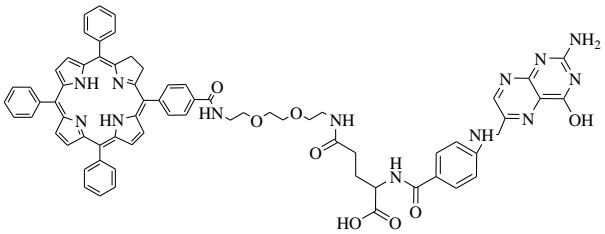
In the dark and under a N_2 atmosphere, folic acid (1 eq.) and DCC (1 eq.) were dissolved in anhydrous DMSO (5 mL) and pyridine (2 mL) and the mixture was stirred for 15 min at rt. Compound PS-S-NH$_2$ (0.9 eq.) was then added and the reaction mixture was further stirred for 24h at room temperature. The solution was slowly poured into vigorously stirred cold diethyl ether. By centrifugation, the precipitate obtained was collected and washed with diethyl ether. The powder was dried under high vacuum. The residue was purified by HPLC on a C_{18} preparative column using a acetonitrile/water gradient (10/90 % à 100/0 % in 25 min, 100/0% for 15 min, acetonitrile/water, v/v).

P1-S-FA



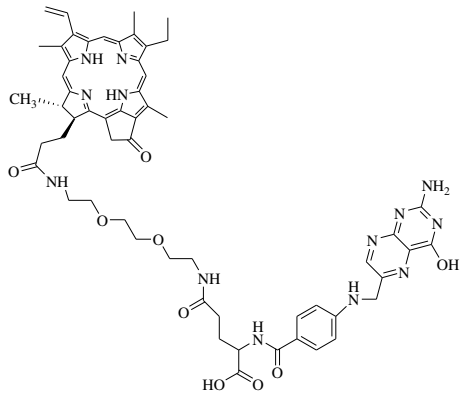
The fraction R_t = 17.9 and 18.0 minutes gave the pure product (17 mg, 16%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm) = -2.92 (s, 2H, NH), 2.07 (m, 2H, CH_2, FA), 2.30 (m, 2H, CH_2, FA), 3.60 (m, 8H, CH_2), 4.40 (m, 1H, NH, FA), 4.48 (d, 2H, CH_2, FA), 6.58 (d, 2H, H_{arom}, FA.), 6.88 (m, 3H, NH + NH_2), 7.84 (s, 9H, $H_{m\text{- and } p\text{-phenyl}}$), 8.22 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.31 (s, 4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$), 8.64 (d, 1H, $CH_{arom.}$), 8.84 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{70}H_{61}N_{13}O_8$ $[M+H]^+$ 1212.4839; found 1212.4790. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.35), 511 (4.00), 546 (3.70), 586 (3.56), 642 nm (3.39).

TPC-S-FA



No further purification by HPLC was necessary in this case. The fraction R_t = 20.8; 21.0; 21.2 and 21.4 minutes gave the pure product (21 mg, 12%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.59, -1.54 (2 x s, 2H, NH), 2.00 (m, 2H, CH_2), 2.30 (t, 2H, CH_2), 3.57 (m, 8H, CH_2), 4.12 (s, 4H, CH_2), 4.3 (m, 1H, NH), 4.47 (d, 2H, CH_2), 6.65 (d, 2H, $H_{arom.}$), 6.91 (m, 3H, NH + NH_2), 7.70 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 8.00, 8.07 (2 x d, 2H + 4H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.11 (d, 1H, $NH_.$), 8.20 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl - COOH}}$), 8.30 (s, 4H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.59 (s, 2H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.64 (d, 1H, $CH_{arom.}$), 11.40 (s, 1H, OH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{70}H_{63}N_{13}O_8$ $[M+H]^+$1214.4995; found 1214.4968. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (4.90), 514 (3.91), 544 (3.72), 595 (3.58), 650 (4.35).

Pyro-S-FA



The fraction R_t = 18.2 and 18.5 minutes gave the pure product (5.8 mg, 12%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): -1.97 (s, 2H, NH, Pyro(a)-COOH), 1.62 (t, 3H, C_8 : CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.76 (d, 3H, C_{18} : CH_3, Pyro(a)-COOH), 4.32 (2H, CH+C_{17}, FA+Pyro(a)-COOH), 4.40 (d, 2H, CH_2, FA), 4.56 (d, 1H, C_{18}, Pyro(a)-COOH), 5.17 (q, 2H, C_{13} : CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.21, 6.50 (2 x d, 1H x 2, C_3 : =CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.60 (d, 2H, $CH_{arom.}$, FA), 7.29 (br, 3H, NH + NH_2), 7.61 (d, 2H, $CH_{arom.}$, FA), 7.81 (s, 2H, NH_2), 7.92 (d, 1H, NH, FA), 8.20 (q, 1H, C_3 : -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.59 (d, 1H, $CH_{arom.}$, FA), 8.88, 9.42, 9.68 (3x s, 1H x 3, $C_{20\text{-}10\text{-}5}$, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{58}H_{65}N_{13}O_9$ $[M+Na]^+$ 1110.4920; found 1110.4872. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.40), 508 (3.40), 538 (3.40), 610 (3.40), 668 (4.00).

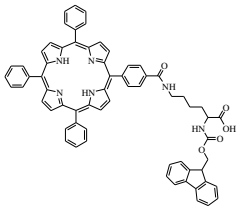
I.6 Synthesis of direct linked TPP-Folic Acid

In the dark and under a N_2 atmosphere, folic acid (73.59 mg; 0.17 mmol) and DCC (34.40 mg; 0.17 mmol) were dissolved in anhydrous DMSO (5 mL) and pyridine (2 mL) and the mixture was stirred for 15 min at room temperature. TPP-NH_2 (105 mg; 0.17 mmol) was then added and the reaction mixture was further stirred for 48h at room temperature. The solution was slowly poured into vigorously stirred cold diethyl ether. By centrifugation, the precipitate obtained was collected and washed with diethyl ether. The powder was dried under high vacuum. The residue was purified by HPLC on a C_{18} preparative column using a acetonitrile/water gradient (10/90 % à 100/0 % in 45 min, 100/0% for 15 min, acetonitrile/water, v/v). The fraction R_t = 27.4 and 28.3 minutes gave the pure product (7.3 mg, 4%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): -2.90 (s, 2H, NH), 2.00 (m, 2H, CH_2),

2.35 (t, 2H, CH_2), 4.53 (m, 3H, NH + CH_2), 6.67 (dd, 2H, $H_{arom.}$), 7.48 (br, 2H, NH_2), 7.65 (d, 2H, $CH_{arom.}$), 7.80 (d, 2H, $CH_{arom.}$), 7.83 (s, 9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$), 8.05 (d, 1H, NH), 8.15 (dd, 4H, $H_{o\text{-phenyl-COOH}}$), 8.28 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$), 8.72 (d, 1H, $CH_{arom.}$), 8.84 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{63}H_{48}N_{12}O_5$ $[M+Na]^+$ 1075.3763; found 1075.3741.

I.7 Synthesis of Fmoc-Lys(P1)-OH

2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-6-[5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin]-hexanoic acid



In the dark under a nitrogen atmosphere, to a solution of Fmoc-Lys-OH, HCl (82.8 mg, 0.20 mmol) in a minimum of DMF were added *N*-hydroxysuccinimide activated porphyrin P1-NHS (152.4 mg, 0.20 mmol) and triethylamine (0.21mmol, 28.3 µL) in 10 mL of CH_2Cl_2. After been stirred at ambient temperature for 24 h, the solvent was removed and the crude material was purified by column chromatography on silica gel using EtOH/CH_2Cl_2: 5/95 (v/v) as the eluent. Solvent was removed *in vacuo* and the residue recrystallized using $CHCl_3$/*n*-hexane. The pure compound was isolated as a purple solid (166.5 mg, 82%). R_f = 0.45 (CH_2Cl_2/EtOH = 95:5, v/v). ^{1}H NMR (DMSO-d6, 300MHz): δ (ppm) = 12.59 (br, 1H, OH), 10.52 (s, 1H, NH-COOH), 8.82 (d, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$), 8.24 (d + s, 10H, $6H_o$ + $4H_{o\text{-m phenyl-COOH}}$), 7.82 (s, 9H, $H_{p\text{-m phenyl-COOH}}$), 7.71 et 7.33 (2 x m, 8H, $H_{phényl\text{-Fmoc}}$), 5.75 (s, 1H, NH), 4.29 (m, 3H, $2H_{CH2\text{-Fmoc}}$ + $1H_{CH\alpha\text{-Fmoc}}$), 4.02 (m, 1H, $H_{CH\text{-Fmoc}}$), 3.44 (s, 2H, $H_{CH2\varepsilon\text{-Lysine}}$), 1.70 (m, 6H, $H_{CH2\ \alpha,\beta,\delta}$), -2.9 (s, 2H, NH-pyrrole). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{66}H_{52}N_6O_5$ $[M + H]^+$, 1009.3999; found 1009.4051. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.16), 512 (4.14), 546 (3.74), 588 (3.55), 645 nm (3.37).

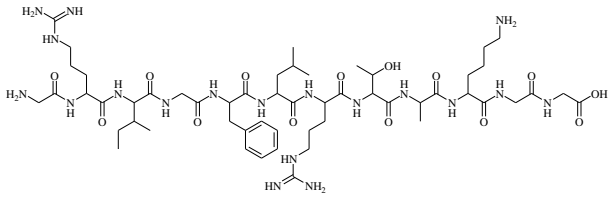
I.8 Synthesis of peptides

Coupling of amino acid to peptide

TNBSA solution is a 5% solution of trinitrobenzene sulfonic acid in methanol that reacts with primary amines (peptides or amino acids). Confirmation of an amino acid coupling was determined by performing a TNBSA test for first synthesis of each peptide.

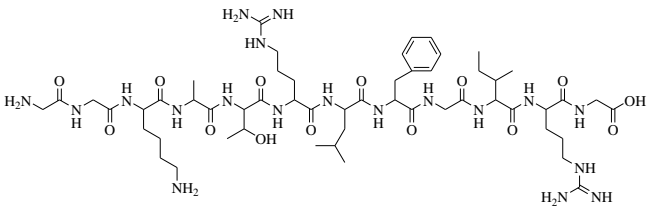
Few beads of resin are transferred with a Pasteur pipette into an eppendorf tube and two drops of DIPEA are added followed by an additon of five drops of TNBSA solution. The beads are inspected by eye or under a microscope. If the beads were colorless after 1 min, then acylation was complete and the next step was carried out. Any trace of orange color in the beads indicates the presence of free amino groups and incomplete coupling. In those cases coupling reaction is repeated and should be repeated until a negative TNBSA test is returned.

H-GRIGFLRTAKGG-OH



General procedure: The side chains of arginine, threonine and lysine were respectively protected by 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), 5-*tert*-butyl ester (OtBu) and N-*tert*-butyloxy carbonyl (Boc) groups. H-GRIGFLRTAKGG-OH was synthesized on a multichannel peptide synthetizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology, using aFmoc-Gly-Wang resin on a 100 µmole scale. Double coupling, except for the first arginine and glycine (four and six coupling were respectively necessary), were performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid, activation reagents 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate HBTU (3 eq.), *N*-methylpyrrolidone NMP (3 eq.) and *N*-methylmorpholine NMM (9 eq.) in dimethylformamide (DMF). Final Fmoc protection was removed with piperidine and the peptide on resin was dried under vacuum. Then, the peptide was cleaved from the resin using TFA/triisopropylsilane (TIPS)/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 8.2 min. Pure product was isolated as a white powder (27.8 mg, 23 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) =0.79 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.84 (6H, δCH_3, Leu), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.22 (3H, βCH_3, Ala), 1.31 (2H, γCH_2, Lys), 1.40 (2H, γCH_2, Arg1), 1.41 (1H, γH, Ile), 1.46 (2H, γCH_2, Arg2), 1.48 (1H, γH, Leu), 1.49 (1H, βH, Arg1), 1.51 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.57 (1H, βH, Arg2), 1.59 (2H, βH, Leu), 1.61 (1H, βH, Arg1), 1.68 (1H, βH, Ile), 1.69 (1H, βH, Lys), 1.72 (1H, βH, Arg2), 2.71 (1H, βH, Phe), 2.71 (2H, εCH_2, Lys), 3.01 (1H, βH, Phe), 3.07 (2H, δCH_2, Arg1), 3.10 (2H, δCH_2, Arg2), 3.50-3.80 (8H, αH, Gly), 4.05 (1H, βH, Thr), 4.18 (1H, αH, Ile), 4.19 (1H, αH, Lys), 4.22 (1H, αH, Thr), 4.28 (1H, αH, Ala), 4.29 (1H, αH, Leu),4.30 (1H, αH, Arg2), 4.43 (1H, αH, Arg1), 4.50 (1H, αCH_2, Phe), 7.19 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.68 (1H, εNH, Arg1),7.78 (1H, NH, Thr), 7.81 (2H, εNH, Lys), 7.94 (1H, NH, Phe), 7.93 (1H, εNH, Arg2), 7.96 (1H, NH, Ala), 7.98 (1H, NH, Ile), 8.14 (1H, NH, Lys), 8.17 (1H, NH, Arg2), 8.19 (1H, NH, Leu), 7.85-8.26 (5H, NH, Gly), 8.49 (1H, NH, Arg1). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{54}H_{93}N_{19}O_{14}$ $[M+H]^+$1232.7149; found 1232.7172,$[M+2H]^{2+}$ 616.8647; found 616.8669.

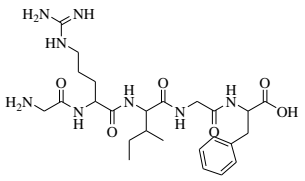
H-GGKATRLFGIRG-OH (*retro*-peptide)



Adapted from the last general procedure in a reversed sequence compared to the last peptide described. Only one difference, double coupling, except for the second arginine (six coupling were necessary), were performed. R_t = 8.3 min. Pure product was isolated as a white powder (74.7 mg, 60 %).^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.81 (12H, CH_3(δ+γ), δCH_3, Ile, Leu), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.22 (3H, βCH_3, Ala), 1.32 (2H, γCH_2, Lys), 1.42 (1H, γH, Ile), 1.48 (4H, γCH_2, Arg), 1.55 (1H, γH, Leu), 1.58 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.69 (1H, βH, Lys), 1.75 (2H, βH, Arg), 1.75 (2H, βH, Leu), 1.75 (1H, βH, Ile), 2.72 (2H, εCH_2, Lys), 2.90 (1H, βH, Phe), 3.08 (1H, βH, Phe), 3.08 (4H, δCH_2, Arg), 3.95-4.50 (8H, αH, Gly), 4.02 (1H, βH, Thr), 4.18 (2H, αH,

Arg), 4.22 (1H, αH, Leu), 4.22 (1H, αH, Ile), 4.25 (1H, αH, Lys), 4.25 (1H, αH, Thr), 4.35 (1H, αH, Ala), 4.55 (1H, αCH_2, Phe), 7.23 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.62, 7.82 (2H, εNH, Arg), 7.80 (1H, NH, Thr),7.82 (1H, NH, Ile), 7.97 (1H, NH, Leu), 7.78-8.16 (5H, NH, Gly), 8.00 (2H, εNH, Lys), 8.03 (1H, NH, Phe), 8.05 (2H, NH, Arg), 8.10 (1H, NH, Lys), 8.22 (1H, NH, Ala). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{54}H_{93}N_{19}O_{14}$ $[M+2H]^{2+}$ 616.8647; found 616.8639, $[M+3H]^{3+}$ 411.5789; found 411.5794.

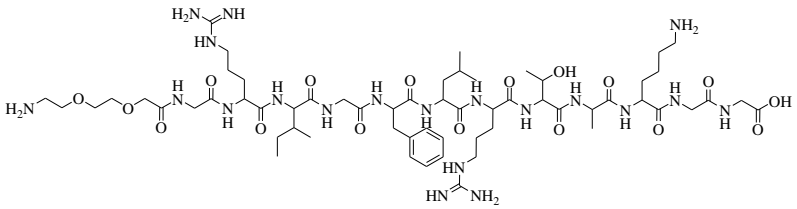
H-GRIGF-OH



Same method than for the peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH except that H-GRIGF-OH was synthesized using a Fmoc-Phe-Wang resin. R_t = 8.6min. Pure product was isolated as a white powder (10.5 mg, 38 %).^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.76 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.08 (1H, γH, Ile), 1.42 (1H, γH, Ile), 1.47 (2H, γCH_2, Arg), 1.53 (1H, βH, Arg), 1.67 (1H, βH, Arg), 1.67 (1H, βH, Ile), 2.81 (1H, βH, Phe), 2.99 (1H, βH, Phe), 3.06 (2H, δCH_2, Arg), 3.58 (2H, αH, Gly), 3.74 (2H, αH, Gly), 4.16 (1H, αH, Ile), 4.33 (2H, αCH_2, Phe), 4.41 (1H, αH, Arg), 7.23 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 8.01 (1H, NH, Phe), 8.08 (1H, NH, Ile), 8.20 (1H, εNH, Arg), 8.22 (3H, NH, Gly), 8.61 (1H, NH, Arg).HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{25}H_{40}N_8O_6$ $[M+H]^+$ 549.3144; found 549.3170.

H-ggkatrlgfirg-OH (*retro inverso*-peptide) was purchased from China Peptides.

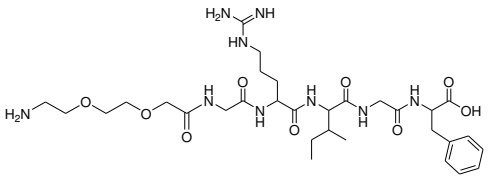
H-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH



The peptide H-GRIGFLRTAKGG-Wang resin was synthesized as previously described. 2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxyacetic acid (PEG, 2 eq., 77 mgs) was then added with HBTU (1.5 eq.), NMM (9 eq.) and NMP (3 eq.) in DMF. The reactor was shaken overnight in the dark. Fmoc protection was removed with 20% piperidine in DMF and the peptide on resin was dried under vacuum, then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 7.9 min. Pure product was isolated as a white powder (14 mg, 10 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.79 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.84 (6H, δCH_3, Leu), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.22 (3H, βCH_3, Ala), 1.31 (2H, γCH_2, Lys), 1.40 (2H, γCH_2, Arg1), 1.41 (1H, γH, Ile), 1.46 (2H, γCH_2, Arg2), 1.48 (1H, γH, Leu), 1.49 (1H, βH, Arg1), 1.51 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.57 (1H, βH, Arg2), 1.59 (2H, βH, Leu), 1.61 (1H, βH, Arg1), 1.68 (1H, βH, Ile), 1.69 (1H, βH, Lys), 1.72 (1H, βH, Arg2), 2.71 (1H, βH, Phe), 2.71 (2H, εCH_2, Lys), 3.01 (1H, βH, Phe), 3.07 (2H, δCH_2, Arg1), 3.10 (2H, δCH_2, Arg2), 3.50-3.80 (8H, αH, Gly), 3.61 (2H, CH_2, PEG), 3.71 (2H, CH_2, PEG), 3.79 (2H, CH_2, PEG), 3.94 (2H, CH_2, PEG), 4.05 (1H, βH, Thr), 4.18 (1H, αH, Ile), 4.19 (1H, αH, Lys), 4.22 (1H, αH, Thr), 4.28 (1H, αH, Ala), 4.29 (1H, αH, Leu),4.30 (1H, αH, Arg2), 4.43 (1H, αH, Arg1), 4.50 (1H, αCH_2, Phe), 7.19 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.68 (1H, εNH, Arg1),7.78 (1H, NH, Thr), 7.81 (2H, εNH, Lys), 7.94 (1H, NH, Phe), 7.93 (1H, εNH, Arg2), 7.96

(1H, NH, Ala), 7.98 (1H, NH, Ile), 8.14 (1H, NH, Lys), 8.17 (1H, NH, Arg2), 8.19 (1H, NH, Leu), 7.85-8.26 (5H, NH, Gly), 8.49 (1H, NH, Arg1). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{60}H_{104}N_{20}O_{17}$ $[M+2H]^{2+}$ 689.4017; found 689.3970, $[M+3H]^{3+}$ 459.9369; found 459.9350, $[M+4H]^{4+}$ 345.2045; found 345.2032.

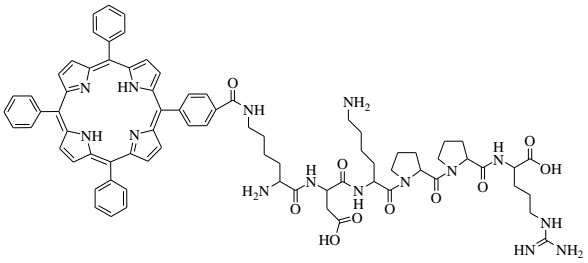
H-PEG-GRIGF-OH



Adapted from the previous procedure with H-GRIGF-OH peptide. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 8.2 min. Pure product was isolated as a white powder (18 mg, 26 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.76 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.05 (1H, γH, Ile), 1.45 (1H, γH, Ile), 1.47 (2H, γCH_2, Arg), 1.53 (1H, βH, Arg), 1.67 (1H, βH, Arg), 1.75 (1H, βH, Ile), 2.90 (1H, βH, Phe), 3.00 (1H, βH, Phe), 3.06 (2H, δCH_2, Arg), 3.61 (2H, CH_2, PEG), 3.71 (2H, CH_2, PEG), 3.79 (2H, CH_2, PEG), 3.80 (2H, αH, Gly), 3.94 (2H, CH_2, PEG), 4.15 (1H, αH, Ile), 4.20 (2H, αH, Gly), 4.35 (1H, αH, Arg), 4.40 (2H, αCH_2, Phe), 7.23 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.53 (1H, εNH, Arg), 7.80 (2H, NH, Gly), 7.85 (1H, NH, Ile), 8.15 (1H, NH, Phe), 8.17 (1H, NH, Arg), 12.80 (br, -OH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{31}H_{51}N_9O_9$ $[M+H]^+$ 694.3883; found 694.3913, $[M+2H]^{2+}$ 347.6978; found 347.6978.

I.9 Conjugates photosensitizer-peptide

H-K(P1)DKPPR-OH



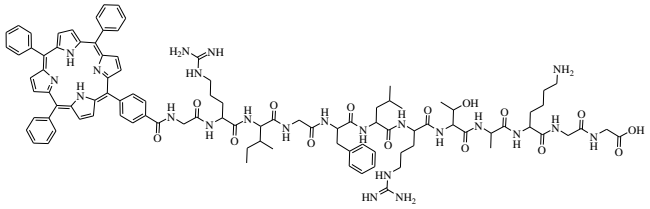
The side chains of arginine, aspartic acid and lysine were respectively protected by 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), 5-*tert*-butyl ester (OtBu) and N-*tert*-butyloxy carbonyl (Boc) groups. H-D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin was synthesized on a multichannel peptide synthetizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology, using a Fmoc-Gly-Wang resin on a 100 µmole scale. Double coupling was performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid, activation reagents HBTU (3 eq.), NMP (3 eq.) and NMM (9 eq.) in DMF. The coupling of Fmoc-Lys(P1)-OH (2 eq. used) was the only one to be stirred for 5 days. Final Fmoc protection was removed with piperidine. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 50 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 17.8 min. Pure product was isolated as a red powder (15.7 mg, 11 %). ^{1}H NMR (DMSO-d6, 300MHz): -2.91 (2H, NH-pyrrole), 1.30-1.90 (12H, γCH_2 + δCH_2 + 2 βH, Lys1 and Lys2), 1.40-1.75 (4H, γCH_2 + 2 βH, Arg), 1.83 (3H, γCH_2 + βH, Pro), 2.05 (1H, βH, Pro), 2.55, 2.70 (2H, 2 βH, Asp), 2.80 (2H, εCH_2, Lys2), 3.10 (2H, δCH_2, Arg), 3.32 (2H, εCH_2, Lys1), 3.68 (2H,

2 δH, Pro), 4.12 (1H, αH, Arg), 4.29 (1H, αH, Lys1), 4.48 (1H, αH, Lys2), 4.48 (1H, αH, Pro), 4.65 (1H, αH, Asp), 7.60 (1H, εNH, Arg), 7.70 (1H, εNH, Lys2), 7.84 (s, 9H, $H_{p\text{-}m\ phenyl\text{-}COOH}$), 7.95 (1H, NH, Arg), 8.05 (1H, NH, Lys2), 8.18 (1H, εNH, Lys1), 8.22-8.31 (d + s, 10H, $6H_o$ + $4H_{o\text{-}m\ phenyl\text{-}COOH}$), 8.75 (1H, NH, Asp), 8.76 (9H, $H_{\beta\text{-}pyrrole}$, NH, Lys2). HRMS (ESI): *m/z* calcd for $C_{77}H_{85}N_{15}O_{10}$ $[M + 2H]^{2+}$, 690.8375; found, 690.8376 and $[M + 3H]^{3+}$, 460.8941; found, 460.8945. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.55), 512 (4.3), 546 (4.03), 588 (3.87), 645 nm (3.69).

<u>Procedure A:</u> Synthesis of PS-GRIGFLRTAKGG-OH

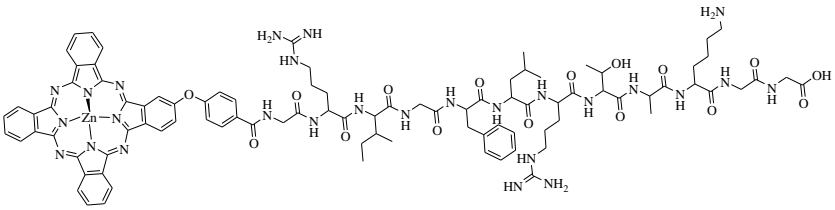
The peptide H-GRIGFLRTAKGG-Wang resin was synthesized as previously described. Corresponding PS (1.2 eq.) was then added with HBTU (1.5 eq.) and NMM (2 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 3 days in the dark. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes.

P1-GRIGFLRTAKGG-OH



R_t = 19.7 min. Pure product was isolated as a red powder (41.2 mg, 22 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.95 (2H, NH, P1-COOH), 0.85 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.85 (6H, δCH_3, Leu), 1.00 (3H, γCH_3, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.23 (3H, βCH_3, Ala), 1.32 (2H, γCH_2, Lys), 1.52 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.55 (1H, γH, Ile), 1.60 (1H, γH, Leu), 1.70 (2H, βH, Leu), 1.72 (1H, βH, Lys), 1.55, 1.80 (8H, 2 x γCH_2 + 2 x 2 βH, Arg), 1.85 (1H, βH, Ile), 2.73 (2H, εCH_2, Lys), 2.74 (1H, βH, Phe), 2.99 (1H, βH, Phe), 3.10 (4H, 2 x δCH_2, Arg), 3.95 (1H, βH, Thr), 4.00, 4.15, 4.35, 4.50 (8H, αH, Gly), 4.19 (1H, αH, Ile), 4.20 (1H, αH, Lys), 4.20 (1H, αH, Thr), 4.25 (1H, αH, Leu),4.32 (1H, αH, Ala), 4.33 (1H, αH, Arg2), 4.47 (1H, αH, Arg1), 4.52 (1H, αCH_2, Phe), 7.25 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.57 (1H, εNH, Arg1), 7.65 (1H, εNH, Arg2), 7.65 (2H, εNH, Lys), 7.69 (1H, NH, Thr), 7.85 (1H, NH, Ile), 7.89 (1H, NH, Ala), 7.93 (1H, NH, Phe), 7.95 (9H, $H_{m\text{-}\ and\ p\text{-}phenyl}$, P1-COOH), 7.95 (1H, NH, Lys),8.10 (1H, NH, Leu), 8.15 (1H, NH, Arg1), 7.67, 7.97, 8.22, 9.18 (4H, NH, Gly), 8.25 (1H, NH, Arg2), 8.25 (6H, $H_{o\text{-}phenyl}$, P1-COOH), 8.34 (4H, $H_{o\text{-}phenyl\ \text{-}COOH}$, P1-COOH), 8.84 (8H, $H_{\beta\text{-}pyrrole}$, P1-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{99}H_{121}N_{23}O_{15}$ $[M+2H]^{2+}$936.9707; found 937.4809, $[M+3H]^{3+}$ 624.9877; found 624.9914. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.49), 512 (4.13), 546 (3.79), 588 (3.60), 645 nm (3.56).

Phthalo-GRIGFLRTAKGG-OH

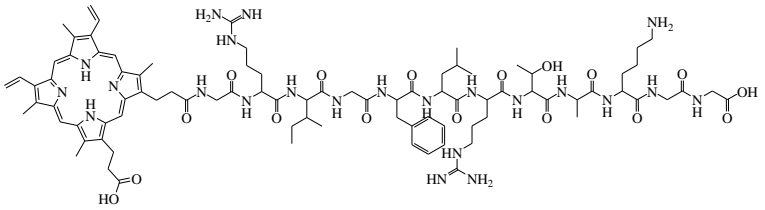


No further purification on preparative HPLC was used here.

R_t = 22 min. Pure product was isolated as a blue powder (85.1 mg, 44 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.80 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.80 (6H, δCH_3, Leu), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.12

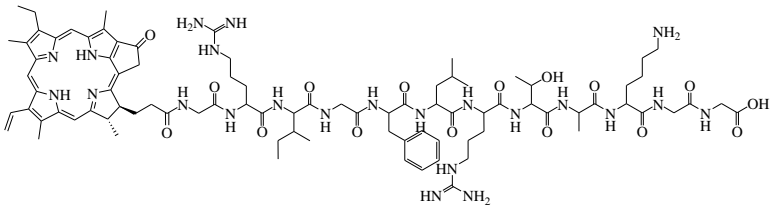
(1H, γH, Ile), 1.24 (3H, βCH_3, Ala), 1.31 (2H, γCH_2, Lys), 1.45 (1H, γH, Ile), 1.50 (1H, γH, Leu), 1.55 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.70 (2H, βH, Leu), 1.77 (1H, βH, Lys), 1.55, 1.78 (8H, 2 x γCH_2 + 2 x 2 βH, Arg), 1.79 (1H, βH, Ile), 2.72 (1H, βH, Phe), 2.74 (2H, εCH_2, Lys), 2.98 (4H, 2 x δCH_2, Arg), 3.00 (1H, βH, Phe), 4.02 (1H, βH, Thr), 4.02, 4.25, 4.40, 4.57 (8H, αH, Gly), 4.17 (1H, αH, Ile), 4.27 (1H, αH, Lys), 4.27 (1H, αH, Thr), 4.37 (1H, αH, Leu), 4.38 (1H, αH, Arg2), 4.40 (1H, αH, Ala), 4.45 (1H, αH, Arg1), 4.55 (1H, αCH_2, Phe), 6.99 (1H, CH, Phthalo-COOH), 7.22 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.51 (2H, CH, Phthalo-COOH), 7.60 (1H, εNH, Arg1), 7.62 (1H, εNH, Arg2), 7.70(2H, εNH, Lys), 7.72 (1H, NH, Thr), 7.82 (1H, NH, Ile), 7.95 (1H, NH, Ala), 8.02 (1H, NH, Phe), 8.05 (1H, NH, Lys), 8.10 (1H, NH, Arg1), 8.11 (4H, $CH_{aromatic}$-COOH, Phthalo-COOH), 8.12 (1H, NH, Leu), 8.15 (1H, NH, Arg2), 8.23 (6H, $H_{p\text{-phthalo}}$, Phthalo-COOH), 7.70, 7.97, 8.09, 8.90 (4H, NH, Gly), 9.27, 9.31 (1H + 5 H, $H_{o\text{-phthalo}}$, Phthalo-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{93}H_{111}N_{27}O_{16}Zn$ $[M+3H]^{3+}$ 642.9404; found 642.9387. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 340 (4.66), 604 (4.39), 668 nm (5.18).

PPIX-GRIGFLRTAKGG-OH



R_t = 16.4 min. Pure product was isolated as a red powder (19.6 mg, 11 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.74 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.83 (6H, δCH_3, Leu), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.02 (1H, γH, Ile), 1.23 (3H, βCH_3, Ala), 1.38 (2H, γCH_2, Lys), 1.45 (2H, γCH_2, Arg1), 1.50 (1H, γH, Ile), 1.52 (1H, γH, Leu), 1.53 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.65 (2H, γCH_2, Arg2), 1.72 (2H, 2 x βH, Arg1), 1.75 (2H, βH, Leu), 1.75 (1H, βH, Lys), 1.78 (1H, βH, Ile), 1.90 (2H, 2 x βH, Arg2), 2.75 (2H, εCH_2, Lys), 2.75 (1H, βH, Phe), 3.07 (1H, βH, Phe), 3.17 (2H, δCH_2, Arg1), 3.20 (2H, δCH_2, Arg2), 3.20, 3.66 (16H, 4 x CH_3 and 2 x CH_2, PPIX), 4.00 (1H, βH, Thr), 3.98 - 4.55 (8H, αH, Gly), 4.18 (1H, αH, Ile), 4.25 (1H, αH, Lys), 4.32 (1H, αH, Thr), 4.32 (1H, αH, Leu), 4.34 (1H, αH, Arg1), 4.35 (4H, CH_2, PPIX), 4.42 (1H, αH, Ala), 4.47 (1H, αH, Arg2), 4.60 (1H, αCH_2, Phe), 6.23, 6.46 (4H, 2 x CH_2=CH, PPIX), 7.21 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.48 (1H, εNH, Arg1), 7.60 (1H, εNH, Arg2), 7.70 (2H, εNH, Lys), 7.78 (1H, NH, Thr),7.79 - 8.09 (4H, NH, Gly), 7.80 (1H, NH, Ile), 8.02 (1H, NH, Ala), 8.05 (1H, NH, Phe), 8.10 (1H, NH, Arg2), 8.17 (1H, NH, Lys), 8.20 (1H, NH, Leu), 8.20 (1H, NH, Arg1), 8.50 (2H, 2 x CH=C, PPIX), 10.27 (4H, 4 x CH, PPIX). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{88}H_{125}N_{23}O_{17}$$[M+2H]^{2+}$ 888.9885; found 888.9862, $[M+3H]^{3+}$ 592.9947; found 592,9945. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(logε) = 403 (4.93), 504 (4.01), 538 (3.91), 576 (3.73), 630 nm (3.62).

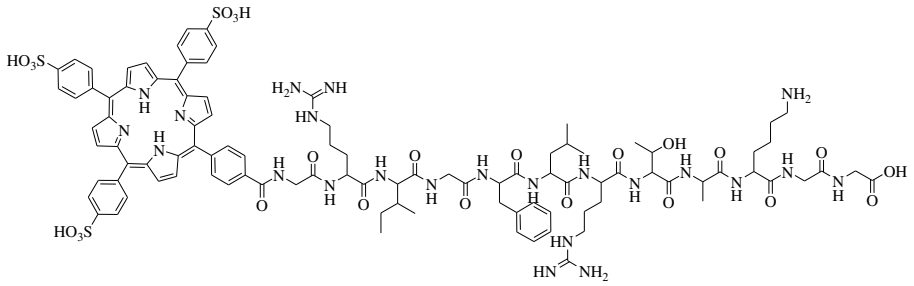
Pyro(a)-GRIGFLRTAKGG-OH



R_t = 18.7 min. Pure product was isolated as a dark green powder (47 mg, 27 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.14 (2H, NH, Pyro(a)-COOH), 0.68, 0.72 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.95 (6H, δCH_3, Leu), 0.99 (1H, γH, Ile), 1.02 (3H, γCH_3, Thr), 1.23 (3H, βCH_3, Ala), 1.32 (2H, γCH_2, Lys), 1.37 (1H, γH, Ile), 1.45 (8H, γCH_2, Arg1), 1.48 (1H, γH, Leu), 1.52 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.57 (8H, γCH_2, Arg2), 1.60 (2H, βH, Leu), 1.62 (3H, C_8 : CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.67 (1H, βH,

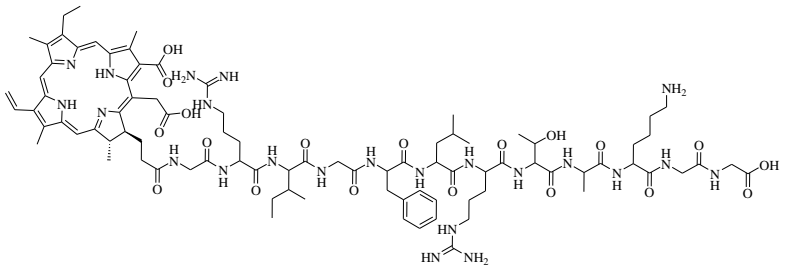
Ile), 1.70 (1H, βH, Lys), 1.72 (2H, βH, Arg1), 1.78 (2H, βH, Arg2), 1.79 (3H, C_{18} : CH_3, Pyro(a)-COOH), 2.15 (4H, C_{17}, Pyro(a)-COOH), 2.72 (1H, βH, Phe), 2.80 (2H, εCH$_2$, Lys), 3.01 (1H, βH, Phe), 3.05 (2H, δCH$_2$, Arg1), 3.12 (2H, δCH$_2$, Arg2), 3.21, 3.44, 3.62 (3H x 3, $C_{12\text{-}2\text{-}7}$, Pyro(a)-COOH), 3.75 (2H, C_8 : CH_2, Pyro(a)-COOH), 4.03 (1H, βH, Thr), 4.05, 4.23 (1H x 2, $C_{17\text{-}18}$, Pyro(a)-COOH), 4.07-4.53 (8H, αH, Gly), 4.12 (1H, αH, Ile), 4.21 (1H, αH, Lys), 4.25 (1H, αH, Thr), 4 .32 (1H, αH, Leu), 4.32 (1H, αH, Ala), 4.32 (1H, αH, Arg1), 4.40 (1H, αH, Arg2), 4.51 (1H, αCH$_2$, Phe), 5.15 (2H, C_{13} : CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.20, 6.24 (1H x 2, C_3 : =CH_2, Pyro(a)-COOH), 7.15 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.55 (1H, εNH, Arg1), 7.60 (1H, εNH, Arg2), 7.68 (2H, εNH, Lys), 7.78 (1H, NH, Thr), 7.80 (1H, NH, Ile), 7.87 (1H, NH, Phe), 7.93 (1H, NH, Ala), 8.00(1H, NH, Arg1), 8.01 (1H, NH, Lys), 7.70-8.10 (4H, NH, Gly), 8.09 (1H, NH, Arg2), 8.10 (1H, C_3 : -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.27 (1H, NH, Leu), 8.90, 9.44, 9.71 (1H x 3, $C_{20\text{-}10\text{-}5}$, Pyro(a)-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{87}H_{125}N_{23}O_{16}[M+2H]^{2+}$ 874.9910; found 874.9900, $[M+3H]^{3+}$ 583.6631; found 583.6633. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.91), 509 (3.98), 539 (3.96), 610 (3.90), 668 nm (4.59).

PSO$_3$H-GRIGFLRTAKGG-OH



The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to acetonitrile/water (0.1 % TFA) [50:50] gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile/water (0.1 % TFA) [50:50] for 15 minutes. R_t = 18.3 min. Pure product was isolated as a green powder (13 mg, 6 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm) = -2.95 (s, 2H, NH, PSO$_3$H-COOH), 0.80 (6H, CH$_3$(δ+γ), Ile), 0.90 (6H, δCH$_3$, Leu), 1.02 (3H, γCH$_3$, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.20 (3H, βCH$_3$, Ala), 1.31 (2H, γCH$_2$, Lys), 1.31 (2H, γCH$_2$, Arg1), 1.40 (2H, γCH$_2$, Arg2), 1.45 (1H, βH, Arg1), 1.49 (1H, γH, Ile), 1.50 (1H, γH, Leu), 1.50 (1H, βH, Arg2), 1.55 (3H, δCH$_2$ + βH, Lys), 1.62 (2H, βH, Leu), 1.65 (1H, βH, Arg1), 1.68 (1H, βH, Ile), 1.69 (1H, βH, Lys), 1.70 (1H, βH, Arg2), 2.70 (1H, βH, Phe), 2.80 (2H, εCH$_2$, Lys), 2.95 (1H, βH, Phe), 3.05 (2H, δCH$_2$, Arg1), 3.07 (2H, δCH$_2$, Arg2), 3.60-3.90 (8H, αH, Gly), 4.02 (1H, βH, Thr), 4.08 (1H, αH, Ile), 4.15 (1H, αH, Arg2), 4.20 (1H, αH, Lys), 4.22 (1H, αH, Thr), 4.25 (1H, αH, Ala), 4.30 (1H, αH, Arg1), 4.38 (1H, αH, Leu), 4.55 (1H, αCH$_2$, Phe), 7.22 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.60 (1H, εNH, Arg1), 7.70 (1H, NH, Thr), 7.80 (2H, εNH, Lys), 7.80 (1H, NH, Ile), 7.85 (1H, NH, Ala), 7.90 (1H, εNH, Arg2), 7.95 (1H, NH, Phe), 8.00 (1H, NH, Lys), 8.09 (d, 6H, $H_{m\text{- and phenyl}}$, PSO$_3$H-COOH), 8.15 (1H, NH, Arg2), 8.15 (1H, NH, Leu), 8.18 (d, 6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, PSO$_3$H-COOH), 8.33 (d, 4H, $H_{o\text{-phenyl –COOH}}$, PSO$_3$H-COOH), 8.40 (1H, NH, Arg1), 7.80-8.10, 9.20 (4H, NH, Gly), 8.84 (s, 8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, PSO$_3$H-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{99}H_{121}N_{23}O_{24}S$ $[M+2H]^{2+}$ 1056.9131; found 1056.9116. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 415 (5.12), 517 (4.02), 553 (3.74), 595 (3.65), 647 nm (3.39).

Ce6-GRIGFLRTAKGG-OH



The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. Two isomers of position (Fr2) have been collected together and one alone (Fr1).

Fr1

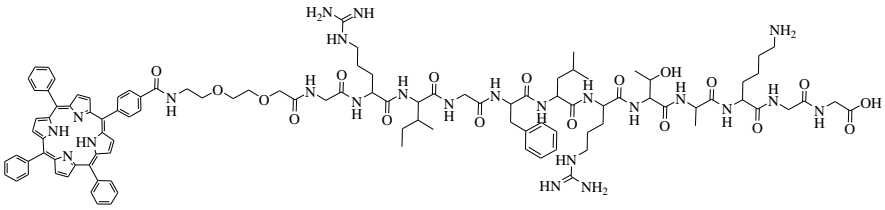
R_t = 21.2 min. Pure product was isolated as a green powder (3 mg, 2 %). Not enough for ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{88}H_{127}N_{23}O_{19}$ $[M+2H]^{2+}$ 905.9850; found 905.9849, $[M+3H]^{3+}$ 603.6580; found 603.6579, $[M+4H]^{4+}$ 452.9953; found 452.9962. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 400 (5.10), 500 (4.09), 529 (3.69), 601 (3.79), 662 nm (4.57).

Fr2

R_t = 22.2, 22.7 min. Pure product was isolated as a green powder (10 mg, 6 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.95 (s, 1H, NH, Ce6), -2.72 (s, 1H, NH, Ce6), 0.80 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.90 (6H, δCH_3, Leu), 1.00 (3H, γCH_3, Thr), 1.00 (1H, γH, Ile), 1.07 (m, 3H, $C_8^2(CH_3)$, Ce6), 1.20 (3H, βCH_3, Ala), 1.31 (2H, γCH_2, Lys), 1.30 (3H, $C_{18}^1(CH_3)$, Ce6), 1.31 (2H, γCH_2, Arg1), 1.40 (2H, γCH_2, Arg2), 1.45 (1H, βH, Arg1), 1.38 (1H, γH, Ile), 1.55 (1H, γH, Leu), 1.50 (1H, βH, Arg2), 1.55 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.65 (2H, βH, Leu), 1.65 (1H, βH, Arg1), 1.66 (4H, $C_{17}^{1\ et\ 2}(CH_2)$, Ce6), 1.60 (1H, βH, Ile), 1.70 (1H, βH, Lys), 1.70 (1H, βH, Arg2), 2.80 (1H, βH, Phe), 2.75 (2H, εCH_2, Lys), 3.05 (1H, βH, Phe), 3.05 (2H, δCH_2, Arg1), 3.20 (2H, δCH_2, Arg2), 3.52 (s, 3H, $C_2^1(CH_3)$, Ce6), 3.57 (s, 3H, $C_{12}^1(CH_3)$, Ce6), 3.60-3.90 (8H, αH, Gly), 4.10 (1H, βH, Thr), 4.20 (1H, αH, Ile), 4.15 (1H, αH, Arg2), 4.15 (1H, αH, Lys), 4.30 (1H, αH, Thr), 4.35 (1H, αH, Ala), 4.35 (1H, αH, Arg1), 4.40 (1H, αH, Leu), 4.55 (1H, αCH_2, Phe), 5.15, 5.35 (2xd, 2H, C_{15}^1, Ce6), 6.20 (d, 1H, C_3^2 cis, Ce6), 6.45 (d, 1H, C_3^2 trans, Ce6), 7.22 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.40 (1H, εNH, Arg1), 7.70 (1H, NH, Thr), 7.65 (2H, εNH, Lys), 7.80 (1H, NH, Ile), 7.90(1H, NH, Ala), 7.80 (1H, εNH, Arg2), 7.95 (1H, NH, Phe), 8.10 (1H, NH, Lys), 8.15 (1H, NH, Arg2), 8.20 (1H, NH, Leu), 8.20 (1H, NH, Arg1), 8.32 (dd, 1H, C_3^1, Ce6), 7.80-9.20 (4H, NH, Gly), 9.11 (s, 1H, C_{20}, Ce6), 9.74 (s, 1H, C_5, Ce6), 9.80 (s, 1H, C_{10}, Ce6). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{88}H_{127}N_{23}O_{19}$ $[M+2H]^{2+}$ 905.9850; found 905.9855, $[M+3H]^{3+}$ 603.6580; found 603.6589, $[M+4H]^{4+}$ 452.9953; found 452.9949. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 400 (5.10), 500 (4.06), 529 (3.57), 601 (3.61), 662 nm (4.58).

<u>Procedure B:</u> Synthesis of P1-PEG-derivatives

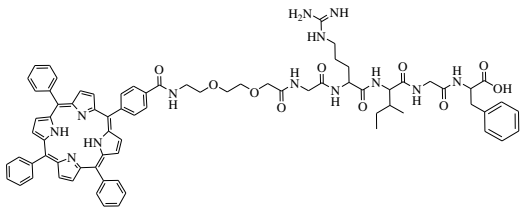
P1-PEG-GRIGFLRTAKGG-OH



The peptide H-GRIGFLRTAKGG-Wang resin was synthesized as previously described. 2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxyacetic acid (PEG, 2 eq., 77 mgs) was then added with HBTU (1.5 eq.),

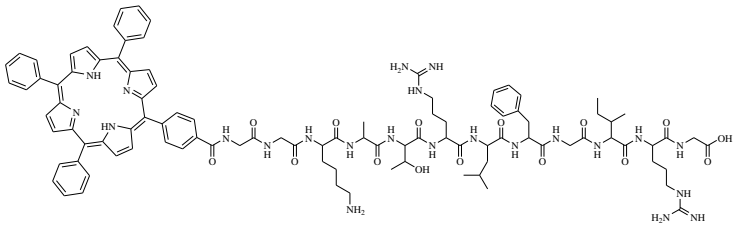
NMM (9 eq.) and NMP (3 eq.) in DMF. The reactor was shaken overnight in the dark.Fmoc protection was removed with 20% piperidine in DMF and the peptide on resin was dried under vacuum. P1-COOH (2 eq., 132 mgs) was then added with HBTU (3 eq.), NMM (9 eq.) and NMP (3 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 3 days in the dark. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 18.5 min. Pure product was isolated as a red powder (24.6 mg, 12 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.95 (2H, NH, P1-COOH), 0.80 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.88 (6H, δCH_3, Leu), 1.03 (3H, γCH_3, Thr), 1.15 (1H, γH, Ile), 1.25 (3H, βCH_3, Ala), 1.29 (2H, γCH_2, Lys), 1.45 (1H, γH, Ile), 1.45- 1.58 (8H, 2 x γCH_2 + 2 x 2 βH, Arg), 1.47 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.50 (1H, γH, Leu), 1.62 (2H, βH, Leu), 1.65 (1H, βH, Lys), 1.68 (1H, βH, Ile), 2.76 (1H, βH, Phe), 2.89 (2H, εCH_2, Lys), 2.99 (1H, βH, Phe), 3.10 (4H, 2 x δCH_2, Arg), 3.60-3.85 (8H, αH, Gly), 3.61-3.85 (10H, CH_2, PEG), 3.99 (1H, βH, Thr), 4.19 (1H, αH, Ile), 4.28 (1H, αH, Lys), 4.29 (1H, αH, Arg2),4.30 (1H, αH, Thr), 4.33 (1H, αH, Leu), 4.35 (1H, αH, Ala), 4.35 (1H, αH, Arg1), 4.60 (1H, αCH_2, Phe), 7.20 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.58 (1H, εNH, Arg1), 7.62 (1H, εNH, Arg2), 7.75 (2H, εNH, Lys), 7.75 (1H, NH, Thr), 7.82 (1H, NH, Ile), 7.84 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.97 (1H, NH, Phe), 8.02 (1H, NH, Ala), 8.09 (1H, NH, Lys), 8.10 (1H, NH, Arg1), 8.18 (1H, NH, Leu), 8.00, 8.10, 8.15,8.92 (4H, NH, Gly), 8.15 (1H, NH, Arg2), 8.22 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.31 (4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$, P1-COOH), 8.84 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{105}H_{132}N_{24}O_{18}$ $[M+2H]^{2+}$ 1009.5148; found 1009.5179, $[M+3H]^{3+}$ 673.3457; found 673.3474, $[M+4H]^{4+}$ 505.2611; found 505.2601. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.45), 512 (4.14), 546 (3.88), 588 (3.77), 645 nm (3.69).

P1-PEG-GRIGF-OH



Adapted from the previous procedure. Only difference the peptide used: H-GRIGF-Wang resin. R_t = 20.5 min. Pure product was isolated as a red powder (51.2 mg, 38 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.87 (2H, NH, P1-COOH), 0.78 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.05 (1H, γH, Ile), 1.39 (1H, γH, Ile), 1.45 (2H, γCH_2, Arg), 1.67 (1H, βH, Ile), 1.67 (2H, βH, Arg), 2.87 (1H, βH, Phe), 3.04 (1H, βH, Phe), 3.06 (2H, δCH_2, Arg), 3.60 (2H, αH, Gly1), 3.61-3.85 (10H, CH_2, PEG), 3.82 (2H, αH, Gly2), 4.20 (1H, αH, Ile), 4.42 (2H, αCH_2, Phe), 4.45 (1H, αH, Arg), 7.23 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.43 (1H, εNH, Arg), 7.84 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.93 (1H, NH, Ile), 7.98 (1H, NH, Gly2), 8.07 (1H, NH, Arg), 8.10 (1H, NH, Phe), 8.22 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.31 (4H, $H_{o\text{-phenyl –COOH}}$, P1-COOH), 8.85 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH), 8.90 (1H, NH, Gly1). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for$C_{76}H_{79}N_{13}O_{10}$ $[M+2H]^{2+}$ 667.8109; found 667.8057. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.47), 512 (4.26), 546 (4.01), 588 (3.84), 645 nm (3.56).

<u>Procedure C:</u> Synthesis of P1-GGKATRLFGIRG-OH

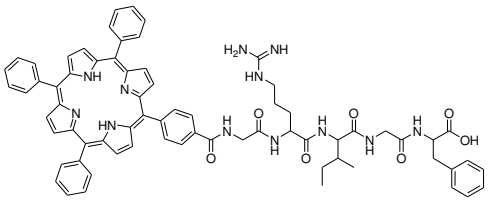


The peptide H-GGKATRLFGIRG-Wang resin was synthesized as previously described. P1-COOH (1.2 eq.) was then added with HBTU (1.5 eq.) and NMM (2 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 3 days in the dark. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 17.3 min. Pure product was isolated as a red powder (46.5 mg, 25 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.92 (2H, NH, P1-COOH), 0.82 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.82 (6H, δCH_3, Leu), 1.04 (3H, γCH_3, Thr), 1.12 (1H, γH, Ile), 1.26 (3H, βCH_3, Ala), 1.42 (2H, γCH_2, Lys), 1.42 (1H, γH, Ile), 1.42, 1.55 (4H, 2 x γCH_2, Arg), 1.60 (1H, γH, Leu), 1.62 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.67, 1.70 (4H, 2 x 2 βH, Arg), 1.78 (2H, βH, Leu), 1.78 (1H, βH, Ile), 1.80 (1H, βH, Lys), 2.82 (2H, εCH_2, Lys), 2.82 (1H, βH, Phe), 3.02 (1H, βH, Phe), 3.15 (4H, 2 x δCH_2, Arg), 3.98 (1H, βH, Thr), 3.75-4.10 (8H, αH, Gly), 4.28(1H, αH, Ile), 4.35 (1H, αH, Lys), 4.48 (1H, αH, Ala), 4.28 (1H, αH, Arg2), 4.28 (1H, αH, Thr), 4.28 (1H, αH, Leu), 4.30 (1H, αH, Arg1), 4.52 (1H, αCH_2, Phe), 7.18 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.55 (1H, εNH, Arg2), 7.61 (1H, εNH, Arg1), 7.75 (2H, εNH, Lys), 7.78 (1H, NH, Ile), 7.78 (1H, NH, Arg2), 7.84 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.85 (1H, NH, Thr), 7.90 (1H, NH, Phe),7.90 (1H, NH, Leu), 8.05 (1H, NH, Arg1), 8.08 (1H, NH, Lys), 8.18 (1H, NH, Ala), 8.20, 8.30, 8.38,9.22 (4H, NH, Gly), 8.22 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.36(4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$, P1-COOH), 8.84 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH).HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{99}H_{121}N_{23}O_{15}$ $[M+2H]^{2+}$ 936.9779; found 936.9776, $[M+3H]^{3+}$ 624.9877; found 624.9877, $[M+4H]^{4+}$ 468.9926; found 468.9936. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.53), 512 (4.10), 546 (3.70), 588 (3.51), 645 nm (3.67).

<u>Procedure D:</u> Synthesis of PS-GRIGF-OH

The peptide H-GRIGF-Wang resin was synthesized as previously described. Corresponding PS (1.2 eq.) was then added with HBTU (1.5 eq.) and NMM (2 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 3 days in the dark. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes.

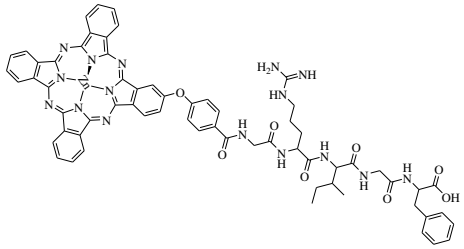
P1-GRIGF-OH



R_t = 22.2 min. Pure product was isolated as a red powder (41.2 mg, 22 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.91 (2H, NH, P1-COOH),0.85 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.14 (1H, γH, Ile), 1.57 (1H, γH, Ile), 1.57 (2H, γCH_2, Arg), 1.77 (1H, βH, Ile), 1.80 (2H, βH, Arg), 2.88 (1H, βH, Phe), 3.07 (1H, βH, Phe), 3.15 (2H, δCH_2, Arg), 3.73 (2H, αH, Gly2), 4.10 (2H, αH, Gly1), 4.22 (1H,

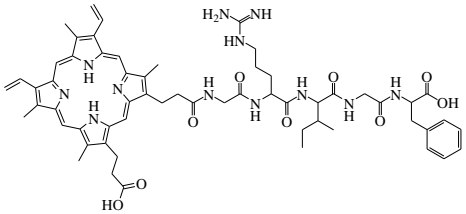
αH, Ile), 4.46 (2H, αCH_2, Phe), 4.50 (1H, αH, Arg), 7.22 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.50 (1H, εNH, Arg), 7.83 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.87 (1H, NH, Ile), 8.15 (1H, NH, Phe), 8.17 (1H, NH, Gly2), 8.22 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.25 (1H, NH, Arg), 8.35 (4H, $H_{o\text{-phenyl-COOH}}$, P1-COOH), 8.85 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH), 9.17 (1H, NH, Gly1). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{70}H_{68}N_{12}O_7$ $[M+H]^+$ 1189.5407; found 1189.5341, $[M+2H]^{2+}$ 595.2740; found 595.2713. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.61), 512 (4.24), 546 (3.88), 588 (3.71), 645 nm (3.51).

Phthalo-GRIGF-OH



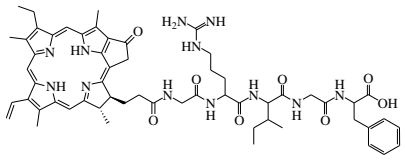
No further purification on preparative HPLC was used here. R_t = 25.2 min. Pure product was isolated as a blue powder (12 mg, 10 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.84 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.50 (1H, γH, Ile), 1.55 (2H, γCH_2, Arg), 1.75 (1H, βH, Ile), 1.75 (2H, βH, Arg), 2.89 (1H, βH, Phe), 3.05 (1H, βH, Phe), 3.12 (2H, δCH_2, Arg), 3.75 (2H, αH, Gly2), 4.03 (2H, αH, Gly1), 4.22 (1H, αH, Ile), 4.45 (2H, αCH_2, Phe), 4.47 (1H, αH, Arg), 7.20 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.20 (1H, CH, Phthalo-COOH), 7.51 (1H, εNH, Arg), 7.60 (2H, CH, Phthalo-COOH), 7.93 (1H, NH, Ile), 8.00-8.25 (10H, $CH_{aromatic}$-COOH and $H_{p\text{-phthalo}}$, Phthalo-COOH), 8.12 (1H, NH, Phe), 8.12 (1H, NH, Gly2), 8.15 (1H, NH, Arg), 8.85 (1H, NH, Gly1), 8.85-9.07 (6H, $H_{o\text{-phthalo}}$, Phthalo-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{64}H_{58}N_{16}O_8Zn$ $[M+H]^+$ 1243.3988; found 1243.3982, $[M+2H]^{2+}$ 622.2030; found 622.2026. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 340 (4.74), 604 (4.46), 668 nm (5.17).

PPIX-GRIGF-OH



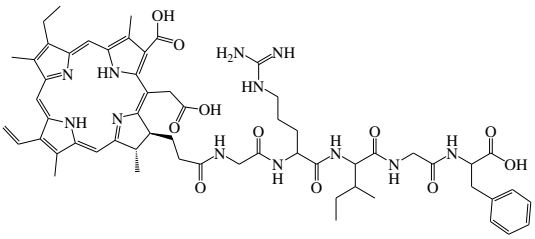
R_t = 18.6 min. Pure product was isolated as a red powder (12.8 mg, 12 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 0.79 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 1.04 (1H, γH, Ile), 1.45 (2H, γCH_2, Arg), 1.48 (1H, γH, Ile), 1.62 (2H, βH, Arg), 1.75 (1H, βH, Ile), 2.89 (1H, βH, Phe), 3.02 (1H, βH, Phe), 3.07 (2H, δCH_2, Arg), 3.20, 3.73 (16H, 4 x CH_3 and 2 x CH_2, PPIX), 3.75-3.85 (4H, 2 x αH, Gly), 4.14 (1H, αH, Ile), 4.33 (1H, αH, Arg), 4.33 (4H, CH_2, PPIX), 4.42 (2H, αCH_2, Phe), 6.22, 6.45 (4H, 2 x CH_2=CH, PPIX), 7.20 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.38 (1H, εNH, Arg), 7.80 (1H, NH, Ile), 8.01 (1H, NH, Arg), 8.11 (1H, NH, Phe), 8.12, 8.24 (3H, NH, Gly), 8.52 (2H, 2 x CH=C, PPIX), 10.23 (4H, 4 x CH, PPIX). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{59}H_{72}N_{12}O_9[M+H]^+$ 1093.5618; found 1093.5562. UV/Vis (EtOH): λ_{max} (log ε) = 403 (5.06), 504 (4.12), 538 (4.01), 576 (3.82), 630 nm (3.69).

Pyro(a)-GRIGF-OH



R_t = 21.7 min. Pure product was isolated as a dark green powder (9.2 mg, 9 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.94 (2H, NH, Pyro(a)-COOH), 0.65 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.96 (1H, γH, Ile), 1.35 (1H, γH, Ile), 1.47 (2H, γCH_2, Arg), 1.62 (3H, C_8 : CH_3, Pyro(a)-COOH), 1.65 (2H, βH, Arg), 1.67 (1H, βH, Ile), 1.79 (3H, C_{18} : CH_3, Pyro(a)-COOH), 2.10-2.30 (4H, C_{17}, Pyro(a)-COOH), 2.87 (1H, βH, Phe), 3.00 (1H, βH, Phe), 3.05 (2H, δCH_2, Arg), 3.21, 3.44, 3.61 (3H x 3, $C_{12\text{-}2\text{-}7}$, Pyro(a)-COOH), 3.60 (2H, αH, Gly2), 3.70 (2H, C_8 : CH_2, Pyro(a)-COOH), 3.75 (2H, αH, Gly1), 4.12 (1H, αH, Ile), 4.29 (1H, αH, Arg), 4.35 (2H, αCH_2, Phe), 4.42, 4.57 (1H x 2, $C_{17\text{-}18}$, Pyro(a)-COOH), 5.15 (2H, C_{13} : CH_2, Pyro(a)-COOH), 6.21, 6.39 (1H x 2, C_3 : =CH_2, Pyro(a)-COOH), 7.10 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.42 (1H, εNH, Arg), 7.75 (1H, NH, Ile),7.95 (1H, NH, Arg), 8.02 (1H, NH, Phe), 8.05 (1H, NH, Gly2), 8.05 (1H, C_3 : -CH=, Pyro(a)-COOH), 8.20 (1H, NH, Gly1), 8.90, 9.44, 9.71 (1H x 3, $C_{20\text{-}10\text{-}5}$, Pyro(a)-COOH), 12.20 (1H, -COOH, Phe). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{58}H_{72}N_{12}O_8$ $[M+H]^+$ 1065.5669; found 1065.5646, $[M+2H]^{2+}$ 533.2871; found 533.2853. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 411 (4.92), 509 (3.96), 539 (3.93), 610 (3.88), 668 nm (4.58).

Ce6-GRIGF-OH



The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. Three isomers of position have been collected together. R_t = 24.3, 24.8, 25.2 min. Pure product was isolated as a dark green powder (10.1 mg, 9 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -1.96 (s, 1H, NH, Ce6), -1.80 (s, 1H, NH, Ce6), 0.75 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.75 (m, 3H, C_8^2(CH_3), Ce6), 0.99 (1H, γH, Ile), 1.38 (1H, γH, Ile), 1.40 (2H, γCH_2, Arg), 1.60 (1H, βH, Arg), 1.66 (3H, C_{18}^1(CH_3), Ce6), 1.70 (1H, βH, Arg), 1.70 (1H, βH, Ile), 2.18 (4H, $C_{17}^{1\text{ et }2}$(CH_2), Ce6), 2.92 (1H, βH, Phe), 3.05 (1H, βH, Phe), 3.05 (2H, δCH_2, Arg), 3.51 (s, 3H, C_2^1(CH_3), Ce6), 3.58 (s, 3H, C_{12}^1(CH_3), Ce6), 3.80, 4.15 (4H, αH, Gly), 4.18 (1H, αH, Ile), 4.35 (1H, αH, Arg), 4.40 (1H, αCH_2, Phe), 5.41 (q, 2H, C_{15}^1, Ce6), 6.19 (d, 1H, C_3^2 cis, Ce6), 6.45 (d, 1H, C_3^2 trans, Ce6), 7.24 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.40 (1H, εNH, Arg), 7.80, 7.95 (2H, NH, Gly), 7.83 (1H, NH, Ile), 8.14 (1H, NH, Phe), 8.15 (1H, NH, Arg), 8.30 (dd, 1H, C_3^1, Ce6), 9.13 (s, 1H, C_{20}, Ce6), 9.75 (s, 1H, C_5, Ce6), 9.83 (s, 1H, C_{10}, Ce6). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{59}H_{74}N_{12}O_{11}$ $[M+H]^+$ 1127,5673; found 1127.5595, $[M+2H]^{2+}$ 564.2873; $[M+2H]^{2+}$ 564.2837; found 905.4855. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 402 (5.18), 500 (4.02), 529 (3.70), 603 (3.70), 662 nm (4.54).

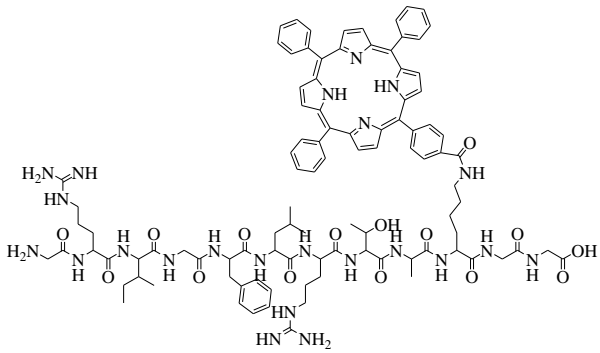
<u>Procedure E:</u> Synthesis of H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH et H-LRTAK(P1)GG-OH

The compounds H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH and H-LRTAK(P1)GG-OH were synthesized on a multichannel peptide synthetizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology, using Fmoc-Gly-Wang resin. Same method than for the peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH except that the coupling of Fmoc-Lys(P1)-OH (2 eq.) was the only one to be stirred for 5 days. On a 100 µmole scale, final Fmoc protection was removed with piperidine and the peptide on resin was dried under

vacuum. Then, the peptide is cleaved from the resin using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes.

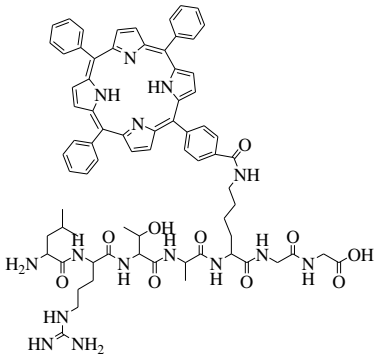
For the enzymatic cleavage, these compounds were compared with HPLC analytical using another solvent system than for the purification which cannot allow the separation of the two compounds. Acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to [70:30] % gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile/water [70:30] % for 5 minutes was used. R_t are given according to this last gradient described.

H-GRIGFLRTAK(P1)GG-OH



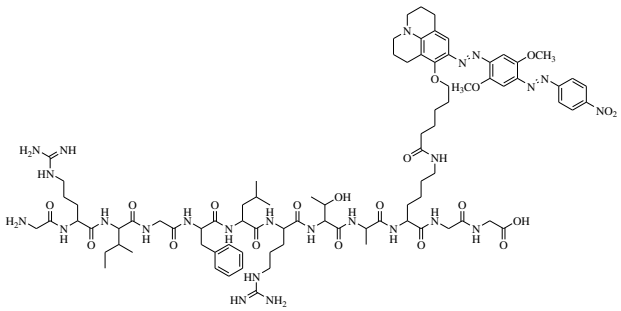
R_t = 39.9 min. Pure product was isolated as a red powder (32.4 mg, 17 %).^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.95 (2H, NH, P1-COOH), 0.80 (6H, CH_3(δ+γ), Ile), 0.82 (6H, δCH_3, Leu), 1.05 (3H, γCH_3, Thr), 1.10 (1H, γH, Ile), 1.25 (3H, βCH_3, Ala), 1.48 (2H, γCH_2, Lys), 1.49 (1H, γH, Ile), 1.52 (1H, γH, Leu), 1.68 (2H, βH, Leu), 1.69 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.79 (1H, βH, Ile), 1.82 (1H, βH, Lys), 1.45-1.85 (8H, 2 x γCH_2 + 2 x 2 βH, Arg), 2.73 (1H, βH, Phe), 3.00 (1H, βH, Phe), 3.00 (2H, δCH_2, Arg1), 3.15 (2H, δCH_2, Arg2), 3.42 (2H, εCH_2, Lys), 3.57, 3.65, 3.79, 3.90 (8H, αH, Gly), 4.05 (1H, βH, Thr), 4.19 (1H, αH, Ile), 4.30 (1H, αH, Lys), 4.35 (1H, αH, Thr), 4.32 (1H, αH, Ala), 4.38 (1H, αH, Leu), 4.39 (1H, αH, Arg2), 4.42 (1H, αH, Arg1), 4.56 (1H, αCH_2, Phe), 7.19 (5H, $H_{aromatic}$, Phe), 7.55 (1H, εNH, Arg1), 7.65 (1H, εNH, Arg2),7.79 (1H, NH, Thr), 7.82 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.97 (1H, NH, Ala), 8.00 (1H, NH, Ile), 8.00 (1H, NH, Phe), 8.09 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.15 (1H, εNH, Lys), 8.20 (1H, NH, Leu), 8.20 (1H, NH, Arg1), 8.22 (4H, $H_{o\text{-phenyl -COOH}}$, P1-COOH), 7.99, 8.13, 8.22, 8.31 (5H, NH, Gly), 8.52 (1H, NH, Arg2), 8.84 (1H, NH, Lys), 8.84 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{99}H_{121}N_{23}O_{15}$ $[M+2H]^{2+}$ 936.9779; found 936.9771, $[M+3H]^{3+}$ 624.9877; found 624.9873. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.51), 512 (4.28), 546 (3.70), 588 (3.90), 645 nm (3.64).

H-LRTAK(P1)GG-OH



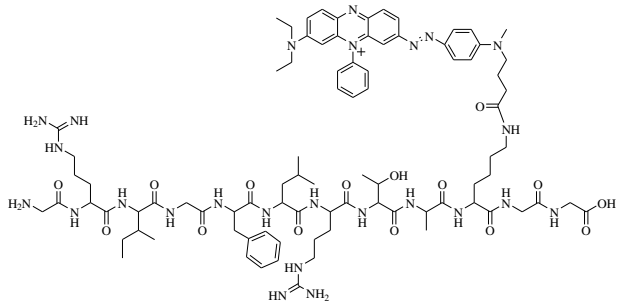
R_t = 39.3 min. Pure product was isolated as a red powder (16.9 mg, 13 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = -2.92 (2H, NH, P1-COOH), 0.87 (6H, δCH_3, Leu), 1.04 (3H, γCH_3, Thr), 1.27 (3H, βCH_3, Ala), 1.45 (2H, γCH_2, Lys), 1.55 (2H, γCH_2, Arg), 1.60 (3H, γH + 2 βH, Leu), 1.62 (1H, βH, Arg), 1.72 (3H, δCH_2 + βH, Lys), 1.76 (1H, βH, Arg), 1.79 (1H, βH, Lys), 3.14 (2H, γCH_2, Arg), 3.42 (2H, εCH_2, Lys), 3.72-3.88 (4H, αH, Gly), 3.80 (1H, αH, Leu), 4.08 (1H, βH, Thr), 4.30 (1H, αH, Thr), 4.30 (1H, αH, Lys), 4.40 (1H, αH, Ala), 4.51 (1H, αH, Arg), 7.59 (1H, εNH, Arg), 7.83 (9H, $H_{m\text{- and }p\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 7.95 (1H, NH, Ala), 7.97 (1H, NH, Thr), 8.10 (1H, εNH, Lys), 8.15 (1H, NH, Leu), 8.17 (6H, $H_{o\text{-phenyl}}$, P1-COOH), 8.20-8.30 (3H, NH, Gly), 8.37 (4H, $H_{o\text{-phenyl – COOH}}$, P1-COOH), 8.68 (1H, NH, Arg), 8.84 (1H, NH, Lys), 8.84 (8H, $H_{\beta\text{-pyrrole}}$, P1-COOH). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{74}H_{83}N_{19}O_{10}[M+H]^+$ 1342.6520; found 1342.6419, $[M+2H]^{2+}$ 671.8296; found 671.8287. UV/Vis (EtOH): λ_{max}(log ε) = 414 (5.31), 512 (4.14), 546 (4.02), 588 (3.84), 645 nm (3.63).

<u>Procedure F:</u> Synthesis of H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH



Same procedure than procedure E except that the coupling of Fmoc-Lys(BBQ)-OH (1 eq., 50 mgs) was stirred for 7 days. On 50 µmole scale, final Fmoc protection was removed with piperidine and the peptide on resin was dried under vacuum. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 14.2 min. Pure product was isolated as a dark blue powder (3 mg, 3 %). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{86}H_{127}N_{25}O_{20}$ $[M+2H]^{2+}$915.9917; found 915.9938, $[M+3H]^{3+}$ 610.9969, found 611.0002.

<u>Procedure G:</u> Synthesis of H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH



<u>Fisrt step: synthesis of H-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH</u>

Fmoc-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(Mtt)GG-2-Chlorotrityl resin was purchased from China peptides. 50 µmole of peptide was cleaved from the resin using DCM/2,2,2-trifluoroéthanol(TFE)/acetic acid (4/2/2) for 2h. The resin was filtered and washed with 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The protected peptide was treated with 3% TFA (30 µL) and 5% TIPS (50 µL) in anhydrous CH_2Cl_2 (920 µL) for 1h at room temperature to deprotect the methyltrityl (Mtt) group on the C-terminal of lysine. The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100% acetonitrile gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 33.7 min. Pure Fmoc-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH was obtained as white powder. (MS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{99}H_{143}N_{19}O_{22}S_2$ $[M+2H]^{2+}$1008; found 1009).

<u>Second step: coupling with BHQ-3-NHS ester and removing protections</u>

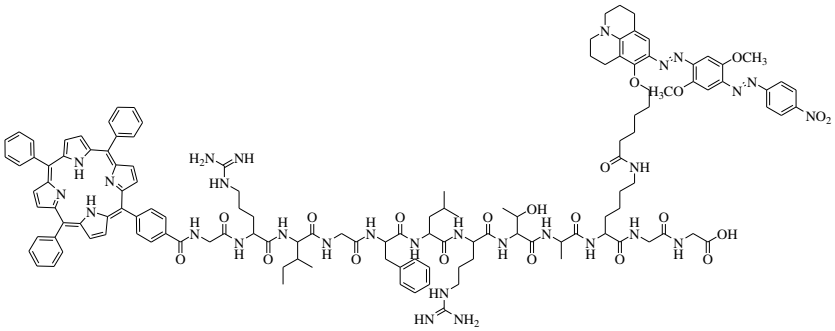
The Fmoc-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (63.8 mg, 0.032 mmol) was dissolved in 2 mL of anhydrous DMSO with 20 µl of N,N-diisopropylethylamine (DIPEA). The mixture was treated with BHQ-3 carboxylic acid succinimidyl ester (BHQ-3-NHS) (25 mg, 1eq.) at ambient temperature overnight under argon. The reaction was quenched by precipitation with diethyl ether (20 mL) to give Fmoc-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(BHQ-3)GG-OH. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{132}H_{176}N_{25}O_{23}S_2^+$ $[M]^+$ 2543,2807; found 2543,2608, $[M+H]^{2+}$ 1272.1440, found 1272.1405. This last compound was then treated with 95% TFA (950 µL) and 5% TIPS (50 µL) to remove the OtBu and Pbf-protected groups. The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100% acetonitrile gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 24.6 min. Pure product Fmoc-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH was isolated as a dark blue powder (20.7 mg, 33 %) HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{102}H_{136}N_{25}O_{17}^+$ $[M+H]^{2+}$ 992.0307; found 992.0369, $[M+2H]^{3+}$ 661.6895, found 661.6934.

<u>Third step: removing Fmoc protection</u>

Final Fmoc protection was removed with NMM/DMF (1:1), milder than piperidine for highly sensitive BHQ-3 (20.7 mg in 3 mL, 2 days, at room temperature under N_2 atmosphere). The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100% acetonitrile gradient in 45 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 19.7 min. Pure product H-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH was isolated as a dark blue powder (9.1 mg, 49 %). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{87}H_{126}N_{25}O_{15}^+$ $[M+H]^{2+}$ 880.9966; found 880.9960, $[M+2H]^{3+}$ 587.6668, found 587.6656.

I.10 Photodynamic molecular beacon synthesis

P1-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (PMB1)



H-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-Wang resin was synthesized by the procedure previously described above. P1-COOH (1.2 eq., 40 mgs) was then added with HBTU (1.5 eq.) and NMM (2 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 5 days in the dark. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved using TFA/TIPS/water (92.5/5/2.5%) for 2h. The acidic resin was filtered and washed with 2 mL of TFA and 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [50:50] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. R_t = 23.1 min. Pure product was isolated as a dark blue powder (13 mg, 11 %). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{131}H_{155}N_{29}O_{21}$ $[M+3H]^{3+}$824.4057; found 824.4064, $[M+4H]^{4+}$ 618.5561; found 618.5562.

Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (PMB2) and Pyro(a)-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (PMB3)

Fisrt step: synthesis of H-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(Mtt)GG-2-Chlorotrityl resin

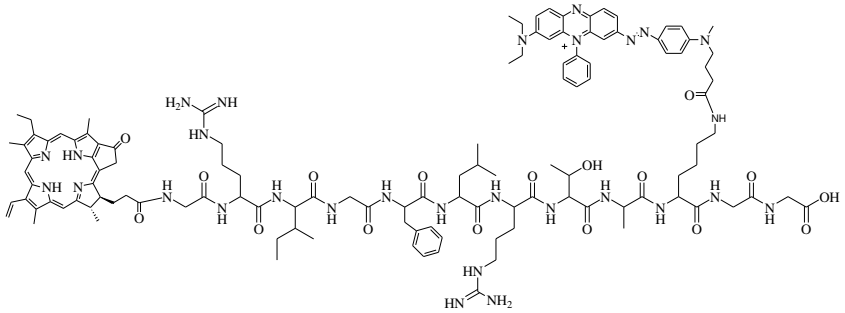
The side chains of arginine, threonine and lysine were respectively protected by 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf),5-*tert*-butyl ester (OtBu) and Methyltrityl (Mtt) groups. H-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(Mtt)GG-OH was synthesized on a multichannel peptide synthetizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology, using a H-Gly-chlorotrityl resin. Double coupling, except for the last arginine and glycine (four and six coupling were respectively necessary), were performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid, activation reagents HBTU (3 eq.), NMP (3 eq.) and NMM (9 eq.) in DMF.

Second step: coupling of Pyro(a)-COOH

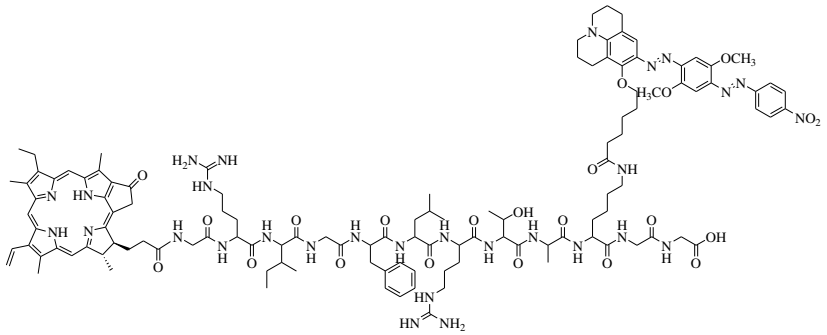
After the last Fmoc group had been removed from the peptide-resin 1 with 20% piperidine in DMF, the resin was washed with DMF. Pyro was then added to couple to the N-terminal glycine of the peptide-resin with the aid of HBTU and NMM (Pyro/HBTU/NMM/peptide = 1.2:1:2:1 mole ratio) in DMF. The mixture was shaken for a day at room temperature. The dark-green resin was washed with DMF and CH_2Cl_2 followed by drying in vacuum. Then, the pyro-protected peptide was cleaved from the resin using DCM/2,2,2-trifluoroéthanol(TFE)/acetic acid (4/2/2) for 2h. The resin was filtered and washed with 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and lyophilisated. The pyro-protected peptide was treated with 3% TFA (30 µL) and 5% TIPS (50 µL) in anhydrous CH_2Cl_2 (920 µL) for1h at room temperature to deprotect the methyltrityl (Mtt) group on the C-terminal of lysine. The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether to give Pyro-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (MS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{117}H_{165}N_{23}O_{22}S_2$ $[M+2H]^{2+}$1155; found 1156, $[M+3H]^{3+}$770; found 771).

Third step: coupling with BHQ-3-NHS ester or BBQ650-NHS ester and removing of last protections

The Pyro-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (49.4 mg, 0.022 mmol) was dissolved in 2 mL of anhydrous DMSO with 20 µl of N,N-diisopropylethylamine (DIPEA). The mixture was treated with BHQ-3 carboxylic acid succinimidyl ester (BHQ-3-NHS) (17.3 mg, 1eq.) or BBQ650 carboxylic acid succinimidyl ester (BBQ-NHS) (15.7 mg, 1eq.) at ambient temperature overnight under argon. The reaction was quenched by precipitation with diethyl ether (20 mL) to give Pyro-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(BHQ-3 or BBQ)GG-OH. This last compound was then treated with 95% TFA (950 µL) and 5% TIPS (50 µL) to remove the OtBu and Pbf-protected groups. The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to [60:40] gradient in 25 minutes, followed by isocratic [60:40] for 15 minutes.



Pure product Pyro-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB2**) was isolated as a dark blue powder (7.5 mg, 15 %). R_t = 19.4 min. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{120}H_{158}N_{29}O_{17}^{+}$ $[M+H]^{2+}$ 1139.1229; found 1139.1200, $[M+2H]^{3+}$ 759.7510; found 759.7531.



Pure product Pyro-GRIGFLRTAK(BBQ)GG-OH (**PMB3**) was isolated as a dark blue powder (8.8 mg, 17 %). R_t = 20.6 min. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{119}H_{160}N_{29}O_{22}$ $[M+2H]^{2+}$ 1174.1180; found 1174.1198, $[M+3H]^{3+}$ 783.0811; found 783.0848, $[M+4H]^{4+}$ 587.5626; found 587.5641.

P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (PMB4)

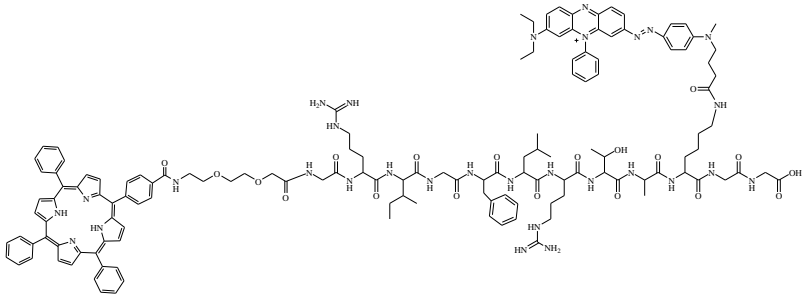
<u>First step: synthesis of H-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(Mtt)GG-2-Chlorotrityl resin</u>
Same procedure than described above for PMB2 and PMB3.

<u>Second step: coupling of PEG arm and P1-COOH</u>
2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxyacetic acid (PEG, 2 eq., 77 mgs) was then added with HBTU (1.5 eq.), NMM (9 eq.) and NMP (3 eq.) in DMF. The reactor was shaken overnight in the dark. Fmoc protection was removed with 20% piperidine in DMF and the peptide on resin was dried under vacuum. P1-COOH (2 eq., 132 mgs) was then added with HBTU (3 eq.), NMM (9 eq.) and NMP (3 eq.) in DMF. The reactor was shaken for 5 days in the dark at room temperature. The resin was washed with DMF and CH_2Cl_2 followed by drying in vacuum. Then, the P1-PEG-protected peptide was cleaved from the resin using DCM/2,2,2-trifluoroéthanol (TFE)/acetic acid (4/2/2) for 2h. The resin was filtered and washed with 20 mL of CH_2Cl_2. The filtrate was dried under vacuum and

lyophilisated. The P1-PEG-protected peptide was treated with 3% TFA (30 µL) and 5% TIPS (50 µL) in anhydrous CH_2Cl_2 (920 µL) for 1h at room temperature to deprotect the methyltrityl (Mtt) group on the C-terminal of lysine. The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether to give P1-PEG-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (MS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{135}H_{172}N_{24}O_{24}S_2$ $[M+2H]^{2+}$ 1290; found 1290, $[M+3H]^{3+}$ 860; found 861, $[M+4H]^{4+}$ 645; found 645).

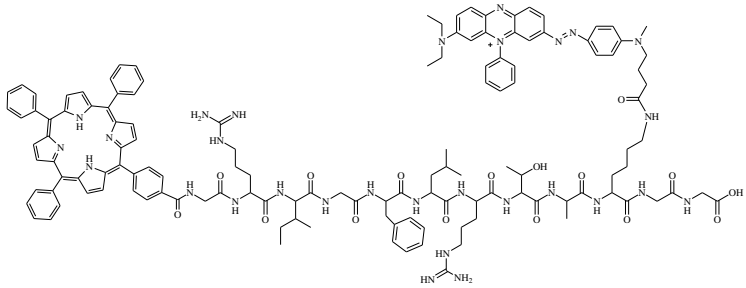
Third step: coupling with BHQ-3-NHS ester and removing of last protections

The P1-PEG-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (46.6 mg, 0.018 mmol) was dissolved in 2 mL of anhydrous DMSO with 20 µl of DIPEA.The mixture was treated with BHQ-3 carboxylic acid succinimidylester (BHQ-3-NHS) (14.2 mg, 1eq.) at ambient temperature overnight under argon. The reaction was quenched by precipitation with diethyl ether (20 mL) to give P1-PEG-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(BHQ-3)GG-OH. This last compound was then treated with 95% TFA (950 µL) and 5% TIPS (50 µL) to remove the OtBu and Pbf-protected groups.The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes.



Pure product P1-PEG-GRIGFLRTAK(BHQ3)GG-OH (**PMB4**) was isolated as a dark blue powder (6 mg, 13 %). R_t = 21.3 min. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{138}H_{165}N_{30}O_{19}^{+}$ $[M+2H]^{2+}$ 1273.6467; found 1273.6392, $[M+3H]^{3+}$ 849.4336; found 849.4306, $[M+4H]^{4+}$ 637.3270; found 637.3233.

P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (PMB5)

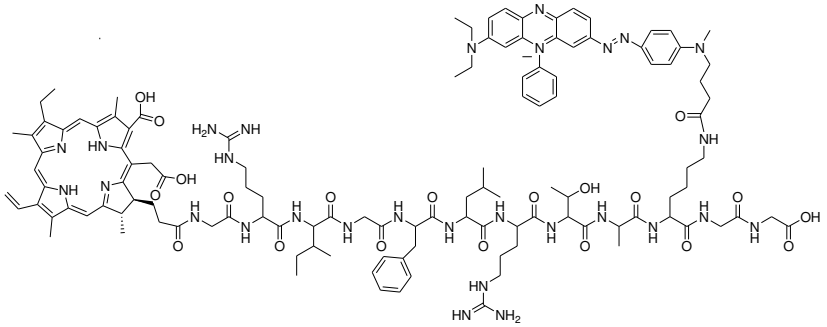


Same procedure than PMB4 except that we did not introduce PEG. The P1-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AKGG-OH (32.1 mg, 0.013 mmol) was dissolved in 2 mL of anhydrous DMSO with 20 µl of DIPEA.The mixture was treated with BHQ-3 carboxylic acid succinimidylester (BHQ-3-NHS) (10.4 mg, 1eq.) at ambient temperature overnight under argon. The reaction was quenched by precipitation with diethyl ether (20 mL) to give P1-GR(Pbf)IGFLR(Pbf)T(OtBu)AK(BHQ-3)GG-OH. This last compound was then treated with 95% TFA (950 µL) and 5% TIPS (50 µL) to remove the OtBu and Pbf-protected groups.The filtrate was concentrated and precipitated by adding anhydrous diethyl ether. The crude product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes. Pure product P1-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB5**) was isolated as a dark blue powder (4 mg, 13 %). R_t =

21.8 min. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{132}H_{154}N_{29}O_{16}^{+}$ $[M+2H]^{2+}$ 1201.1098; found 1201.1008, $[M+3H]^{3+}$ 801.0756; found 801.0710, $[M+4H]^{4+}$ 601.0585; found 601.0543.

Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (PMB6)

Same procedure than PMB2. The crude product was purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1 % TFA) [10:90] to 100 % acetonitrile gradient in 25 minutes, followed by isocratic acetonitrile for 15 minutes.



Pure product Ce6-GRIGFLRTAK(BHQ-3)GG-OH (**PMB6**) was isolated as a blue powder (2 mg, 3 %). R_t = 16.6 min. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for $C_{121}H_{160}N_{29}O_{20}^{+}$ $[M+H]^{2+}$ 1170.1231; found 1170.1178, $[M+2H]^{3+}$ 780.4178; found 780.4169, $[M+3H]^{4+}$ 585.5652; found 585.5640.

II STUDIES WITH ACTIVE MMP-2, MMP-9 AND MMP-14

The buffer used for cleavage contains 50 mMTRIS (*tris*(hydroxymethyl)aminomethane), 150 mMNaCl, 5mM $CaCl_2$, pH 7.5. For each cleavage study, the activity of MMPs was confirmed by their ability to cleave the peptide H-GRIGFLRTAKGG-OH. The peptide, PS-peptide or PMB sample (S) was prepared as 2 mM stock solution in DMSO. The composition of each sample was as follows:(*i*) 10 µl of sample stock solution without MMP; (*ii*) 10 µl of sample stock solution with 1 µl with MMP-2 (M_w = 66 000 Da); (*iii*) 10 µl of sample stock solution with 1 µl with MMP-9 (M_w = 83 000 Da); and (*iv*) 10 µl of sample stock solution with 1 µl with MMP-14 (M_w = 22 500 Da). 189 µL of buffer was added in each sample to obtain a final volume of 200 µL. The cleavage solutions were let for incubation during 8 h at 37°C.

These solutions were analyzed first by HPLC using fluorescence and UV-Visible detectors and then, LCMS experiments were completed to confirm the results and determined the enzymatic cleavage site. Digest solutions were desalting and concentrated for MS analysis using OMIX C18 Pipette Tips. Table 1 described detection parameters used in order to study the enzymatic action by HPLC.

Table 1. Detection parameters used for enzymatic action analysis by HPLC.

	UV1 (nm)	UV2 (nm)	Fluorescence	
			Excitation (nm)	Emission (nm)
Peptides	214	256	256	280
Derivatives	214	415	415	650
Phthalo-GRIGFLRTAKGG-OH	214	668	340	374
H-GRIGFLRTAK(BBQ or BHQ-3)GG-OH	214	650	256	280
PMBs	415	650	415	650

III PHOTOPHYSICAL PROPERTIES

The compounds were dissolved in DMSO in order to obtain 1 mg/mL solutions. The bulk solutions were then diluted in the solvent of interest (in EtOH) so as to obtain adequate absorption of the final solutions (A ~ 1 for the soret band for determination of absorption coefficients and A ~ 0.2 for the soret band for the other measurements described). Measurements were done in 10 mm quartz cuvettes.

III.1 Determination of absorption coefficients

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda EZ 210) double beam UV-Visible spectrophotometer. The ratio of DMSO in the final solution was always less than 1%. The absorption spectrum of the solution of known concentration was measured between 200 and 800 nm. The operation was repeated 3 times. The epsilon values were calculated and averaged from the Beer Lambert law:

$$\varepsilon = \frac{A}{l.C} \qquad (1)$$

with A: absorbance; ε: molar extinction coefficient in $L.mol^{-1}.cm^{-1}$; l = size of the cuvette, 1 cm; C = concentration of the solution.

III.2 Determination of fluorescence and singlet oxygen production quantum yields

Fluorescence spectra were recorded on a Horiba JobinYvon 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 µm). All spectra were recorded using four optical faces quartz cells. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using tetraphenylporphyrin (TPP) solution in toluene (Φ_f = 0.11 [69]) or methylene blue solution in methanol (Φ_f = 0.04 [539]) as fluorescence standards. Rose Bengal or methylene blue were chosen as reference solutions thanks to their high $^1O_2$ quantum yields in ethanol (Φ_Δ (Rose Bengal) = 0.68 and Φ_Δ (methylene blue) = 0.52 [39]); methylene blue for the phthalocyanine derivatives and rose de Bengal for the others. The absorbance value at the excitation wavelength of the reference and the sample solutions were set to around 0.2.

The quantum yield of fluorescence is determined thanks to the equation (1):

$$\Phi_f = \Phi_{f0} \cdot \frac{I_f}{I_{f0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \qquad (1)$$

where Φ_f and Φ_{f0}, I_f and I_{f0}, DO and DO_0, n and n_0 are the fluorescence quantum yields, the fluorescence intensities, the optical densities at the excitation wavelength and the refraction indices of the sample and the reference respectively [369, 540].

The quantum yield of singlet oxygen production is determined thanks to the equation (2):

$$\Phi_\Delta = \Phi_{\Delta 0} \cdot \frac{I}{I_{\Delta 0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \qquad (2)$$

where Φ_Δ and $\Phi_{\Delta 0}$, I_Δ and $I_{\Delta 0}$, DO and DO_0 are the luminescence quantum yields, the luminescence intensities and the optical densities at the excitation wavelength of the sample and the reference respectively [541].

III.3 Determination of Fluorescence and singlet oxygen lifetimes

Fluorescence lifetimes were measured on a Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) 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 four channels router PHR-800 (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Fluorescence decays were recorded using the single photon counting method (four optical faces quartz cells for pure products in ethanol). Data was collected up to 1000 counts accumulated in the maximum channel and analyzed using TCSPC software Fluofit (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) based on iterative reconvolution using a Levensberg-Marquandt algorithm, allowing to obtain the multi-exponential profiles (one or two exponentials in our cases).

Singlet oxygen lifetime measurements have been performed on a TEMPRO-01 spectrophotometer (Horiba JobinYvon – Palaiseau France) composed with a pulsed diode excitation source SpectraLED-415 emitting at 415 nm, a cuve compartment, a Seya-Namioka type emission monochromator (600 – 2000 nm) and a H10330-45 near-infrared photomultiplier tube with thermoelectric cooler (HAMAMATSU) as detection system. The system is monitored by a single photon counting controller FluoroHub-B and the software DataStation and DAS6 (Horiba JobinYvon).

ANNEXES

PUBLICATIONS

2015 **P.1** André, J.C.; **Stallivieri, A.**; Frochot, C.; Tomei, F.; "Responsible approach and social acceptance of nano-drugs": submitted in *P&R nanodrugs* **2015**.

2015 **P.2** **Stallivieri, A.**; Baros, F.; Jetpisbayeva, G.; Myrzakhmetov, B.; Frochot, C.; "The interest of folic acid in targeted photodynamic therapy": accepted by *Curr. Med. Chem.* **2015**.

2015 **P.3** Azaïs, H.; Schmitt, C.; Tardivel, M.; Kerdraon, O.; **Stallivieri, A.**; Frochot, C.; Betrouni, N.; Collinet, P.; Mordon, S.; "Treating peritoneal micrometastasis by targeted photodynamic therapy to decrease peritoneal recurrence rate after complete cytoreductive surgery in epithelial ovarian cancer. Specificity of a new generation folate-targeted photosensitizer. A preclinical study": accepted by *PDPDT* **2015**.

2015 **P.4** **Stallivieri, A.**; Le Guern, F.; Vanderesse, R.; Meledje, E.; Jori, G.; Frochot, C.; Acherar, S.; "Synthesis and photophysical properties of photoactivable cationic porphyrin 5-(4-N-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)-21H,23H-porphyrin tetraiodide for potential antimicrobial PDT": *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1290-1295..

2015 **P.5** **Stallivieri, A.**; Baros, F.; Arnoux, P.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C.; "Production of singlet oxygen by nanoparticle-bound photosensitizers": Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences edited by Santi Nonell and Cristina Flors, accepted. **2015**.

2014 **P.6** Ryan, A. A.; Pouyatos, F.; **Stallivieri, A.**; Balaban, T. S.; Senge, M. O.; "Synthesis of Diazepine-fused Porphyrinoids and Annulated Porphyrin Arrays.": *Z. Naturforsch.* **2014**, *69(8)*, 889 – 898.

2014 **P.7** Giraudeau, C.; Moussaron, A.; **Stallivieri, A.**; Mordon, S.; Frochot, C.; "Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a debate.": *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*(*16*), 1871-1897.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

2013/09/(2-6) **Co.1** **Stallivieri A.**; Verhille, M.; Benachour, H.; Arnoux, P.; Barberi-Heyob, M.; Allonas, X.; Baros, F.; Devy, J.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Improvement of the selectivity of Photodynamic Therapy (PDT): the "*Photodynamic Molecular Beacons*".
15th Congress of the ESP (Liege, Belgium).

2013/05/(30-31) **Co.2** **Stallivieri A.**; Verhille, M.; Benachour, H.; Arnoux, P.; Barberi-Heyob, M.; Allonas, X.; Baros, F.; Devy, J.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; "Vers une amélioration de la sélectivité en PDT : les *Photodynamic Molecular Beacons*".
Journées printemps GFP2P 2013 (Grenoble, France).

POSTERS

2015/09/(13-17) **Po.1** **A. Stallivieri**, J. Devy, N. Etique, M. Achard, R. Vanderesse, C. Frochot, *"New Photodynamic Molecular Beacons as cancer-targeted agents in PDT"*. 6th EuCheMS Conference on Nitrogen Ligands (Beaune, France).

2015/06/(25-26) **Po.2** **A. Stallivieri**, J. Devy, N. Etique, M. Achard, R. Vanderesse, C. Frochot, *"New Photodynamic Molecular Beacons as cancer-targeted agents in PDT"*. Colloque Interrégional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie ONCOTRANS 2015 (Dijon, France).

2014/10/(14-18) **Po.3** **A. Stallivieri**, J. Devy, N. Etique, M. Achard, R. Vanderesse, C. Frochot, *"New Photodynamic Molecular Beacons as cancer-targeted agents in PDT"*. 10th International Symposium on Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice Brixen/Bressanone (South Tyrol, Italy).

2014/06/(22-27) **Po.4** **A. Stallivieri**, J. Devy, N. Etique, M. Achard, R. Vanderesse, C. Frochot, *"New Photodynamic Molecular Beacons as cancer-targeted agents in PDT"*. ICPP-8 International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (Istanbul, Turkey).

2014/01/16 **Po.5** **A. Stallivieri**, J. Devy, N. Etique, M. Achard, R. Vanderesse and C. Frochot; "*Vers une amélioration de la sélectivité en thérapie photodynamique : les « Photodynamic Molecular Beacons »*".
Doctoral School (RP2E) Seminar (Vandœuvre-lès-Nancy, France).

2012/11/(8-9) **Po.6** **A. Stallivieri**, A. A. Ryan, M. O. Senge and C. Frochot; "*Synthesis of Novel Conjugated Porphyrins and Porphyrin Oligomers*".
PhotoMed 2012, GDR 3049 (Toulouse, France).

2012/10/(16-20) **Po.7** **A. Stallivieri**, A. A. Ryan, M. O. Senge and C. Frochot; "*Synthesis of Novel Conjugated Porphyrins and Porphyrin Oligomers*".
9th International Symposium on Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice Brixen/Bressanone (South Tyrol, Italy).

2012/01/(12-13) **Po.8** A. A. Ryan, **A. Stallivieri** and M. O. Senge; "*Synthesis of porphyrin oligomers for optical applications*".
Tetrapyrrole Discussion Group Meeting (Robinson College, Cambridge, UK).

2011/12/09 **Po.9** A. A. Ryan, **A. Stallivieri** and M. O. Senge; "*Synthesis of porphyrin oligomers for optical applications*".
10th annual symposium of the CSCB (Health Sciences Centre, UCD Dublin, Ireland).

ENCADREMENT D'ETUDIANT

LRGP/LCPM

2014 (6 mois)	Florent Le Guern, Master II, Ecole supérieure de chimie physique électronique (CPE Lyon), "*Synthèse d'un photosensibilisateur en prévention du paludisme*".
2013 – 2014 (1 an)	Gulim Jetpisbayeva, Master II, Taraz State University, Taraz city, Kazakhstan, *"Folic acid conjugates with photosensitizers for cancer targeting in photodynamic therapy: synthesis and photophysical properties"*.
2013 (6 mois)	Esme Meledje, Master II: chimie fine et thérapeutique, Université de Nantes, "*Synthèse et caractérisation photophysique d'un photosensibilisateur pour la prévention du paludisme par thérapie photodynamique*".

PUBLICATIONS PARUES

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Medicinal Chemistry, 2014, *21*, 1871-1897

Indocyanine Green: Photosensitizer or Chromophore? Still a Debate

Camille Giraudeau[1,2], Albert Moussaron[1,2], Aurélie Stallivieri[1,2], Serge Mordon[3,4] and Céline Frochot[1,2,4,*]

[1]*Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy, F-54000, France;* [2]*CNRS, LRGP, UMR 7274, Nancy, F-54000, France;* [3]*INSERM U703, Université de Lille 2, CHRU, Institut Hippocrate 152, rue du Dr. Yersin, 59120 Loos;* [4]*GDR CNRS 3049 « Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie » (PHOTOMED), France*

Abstract: Indocyanine green (ICG) is a water-soluble anionic tricarbocyanine dye developed during the Second World War that was first approved for clinical use in humans in 1956. The main features of ICG that make it suitable for bio-imaging applications are its near infrared absorption and its fluorescence. Although ICG is mainly used for its fluorescence emission properties, it has also been hypothesized that it can serve as a photosensitizer for photodynamic therapy applications, eliciting cytotoxic effects both *in vitro* and *in vivo* when used in combination with light at wavelengths in the region of 800-830 nm. Moreover, ICG can be used for hyperthermia of enhanced-photocoagulation of blood vessels treatment. In this paper we have gathered all the available data concerning the use of ICG for different treatments.

Keywords: Cytotoxic effects, fluorescence, hyperthermia, indocyanine Green (ICG), photodynamic therapy (PDT), selective photocoagulation, site-specific therapy.

1. INTRODUCTION

ICG was developed in the Second World War as a dye for use in photography. It was first approved for clinical use in humans in 1956 [1], [2] and was tested in 1957 at the Mayo Clinic for use in human medicine. That is the only Near Infra Red (NIR) dye approved by the USA Food and Drug Administration (FDA) for clinical applications such as ophthalmological ones e.g. ophthalmologic angiography[3], as a vascular imaging agent [4] including the measurement of cardiac output [5], determination of plasma volume [6] and capillary microscopy [7], as well as hepatic function studies [8], guiding biopsy [9] and object localization in tissue [10]. The main features of ICG that make it suitable for bio-imaging applications are its NIR absorption and fluorescence. It is commercially available at a low cost in a very pure form. ICG is mainly used as a very efficient fluorescent probe [11-20].

ICG has been proposed as a photosensitizer, which elicits cytotoxic effects both *in vitro* and *in vivo* when used in combination with light for photodynamic therapy (PDT) applications. Moreover, ICG-PDT can be associated with radiotherapy, chemotherapy and ultrasounds. Furthermore, ICG can be used for hyperthermia treatment of enhanced-photocoagulation of blood vessels treatments that can be associated with chemotherapy, or immunotherapy.

2. GENERAL INFORMATION ABOUT ICG

2.1. Chemistry

ICG is a water-soluble anionic tricarbocyanine dye (MW 775) containing an extended conjugated system. Its chemical name is 1H-Benz[e]indolium,2-[7[1,3-dihydro-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-2H-benz[e]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)hydroxide, inner salt, sodium. The chemical structure (see Fig. **1**) is made up of two polycyclic moieties, each known as benzoindotricarbocyanin, connected to each other by a carbon chain. While the polycyclic moieties are responsible for lipophilic properties of ICG, the sulfate groups impart hydrophilicity. As a result, ICG is amphiphilic and soluble in inorganic solvents such as methanol and DMSO as well as in aqueous media, including buffers [25]. Its chemical structure does not easily allow conjugation reactions. Therefore, an encapsulated, biocompatible and injectable form of ICG could greatly expand its clinical applications for imaging (fluorescence, photoacoustic contrast) or therapy (PDT and photothermal).

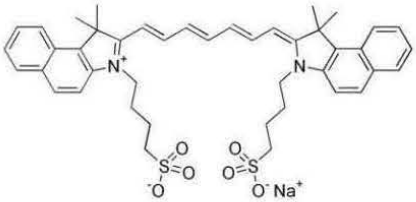


Fig. (1). Chemical structure of ICG.

2.2. Photophysical Properties

Depending on the solvent and the dye concentration, the maximum absorption is observed between 600 and 900 nm. For medical applications based on absorption, a maximum absorption at approximately 800 nm in blood plasma at low concentrations is important [6]. After light absorption, the

*Address correspondence by this author at the INSERM U703, Institut Hippocrate 152, rue du Dr. Yersin, 59120 LOOS France;
Tel: 33 320 446 708; Fax: 33 320 446 708; E-mail: serge.mordon@inserm.fr

1875-533X/14 $58.00+.00

© 2014 Bentham Science Publishers

ICG molecule can follow one of three main pathways to deactivate its excited singlet state as shown in the simplified Jablonski diagram (Fig. **2**).

Firstly, the absorbed energy may be converted to a fluorescence emission between 750 nm and 950 nm. The fluorescence spectrum is very wide and its maximum values are approximately 810 nm in water and 830 nm in blood (Fig. **3**). The large overlap of the absorption and fluorescence spectra can lead to a marked reabsorption of the fluorescence by ICG itself. This can be used for the detection of ICG *in vitro* or*in vivo*.

Secondly, a part of the energy is transferred to an ICG triplet state by intersystem crossing (ISC). Reindl *et al.* [26] found that the yield of triplet formation by ISC was respectively 14%, 16%, 17% and 11% in water, methanol, DMSO and aqueous albumin solution. These authors suggested that the measured quantum yields of triplet formation in the range of 10% to 20% are sufficiently high to generate efficient Reactive Oxygen Species (ROS), in particular singlet oxygen.

Thirdly, the energy can be transformed into heat inside the ICG molecule by internal conversion. This is the major process after photon absorption, since about 85% of absorbed light energy is converted to heat.

Depending on the energy applied, different mechanisms can occur that lead to different types of therapies (Table **1**). Different terminologies are used in the literature when ICG is used to induce a temperature increase: indocyanine green enhanced laser photocoagulation, photodynamic hyperthermal therapy, photothermal therapy (PTT), etc… (Table **1**). To describe hyperthermia (therapeutic procedure used to raise the temperature between 40°C to 43°C to achieve a specific tumor killing effect) and coagulation (therapeutic procedure used to raise the temperature above 53°C, for a duration longer than 1s, to achieve a non-specific tissue necrosis), we use the term « photothermal therapy (PTT) ».

2.3. Degradation of ICG

The degradation of ICG in aqueous solution follows (pseudo) first-order kinetics. Exposure to light and high temperatures causes accelerated degradation. The type and intensity of exposed light to which ICG is exposed also affects degradation. ICG aqueous solutions have been found to be more stable in the dark, at low temperature and at higher ICG concentrations [28]. Engel *et al.* [29] investigated the light-induced decomposition of ICG and tested the cytotoxicity of the light-induced decomposition products. ICG in solution was irradiated with laser light, solar light or surgical endolight and the light-induced decomposition products were analyzed by mass spectroscopy coupled to liquid chromatography. Independently of the light source used, the authors reported that $^1O_2$ was formed (but not detected) leading to dioxetanes by [2+2]-cycloaddition of $^1O_2$ (Fig. **4**). These dioxetanes decomposed thermally into several carbonyl compounds. It is well-known that ICG dissolved in any solvent is fairly unstable, particularly when it is exposed to light. The results clearly showed that the decomposition products reduced the viability of RPE cells *in vitro*. However, the decomposition was inhibited by adding sodium azide that favors the formation of $^1O_2$. The authors claimed that direct proof of singlet oxygen by the detection of its luminescence at 1270 nm failed (data not shown). The authors suggest that ICG first produces $^1O_2$, then further decomposition gives products that are responsible for the destruction of the cells. Thus it has been proposed that RPE cells are not predominantly killed because of oxidation of cellular constituents, but because of the toxicity of the ICG decomposition products.

2.4. Pharmacokinetics and *In Vivo* Behavior

Because of its complex molecular structure, ICG has amphiphilic properties (both lipophilic and hydrophilic characteristics) that enable it to bind to many plasmatic proteins such as human serum albumin (through its hydrophobic core), globulins (80%) and lipoprotein. It has also been found to bind to alpha1- and beta1-lipoproteins (for more information see [25]). Thus, ICG is able to remain intravascular for a long time, at least longer than Fluorescein, which is more hydrophilic than lipophilic and contrary to ICG is likely to leak out of vessels quickly.

The hepatobiliary elimination of ICG explains the rapid elimination after intravenous injection. The first publications on ICG reported a half-life of 2 to 4 minutes. These data are consistent with recent studies using spectrophotometry elimination kinetics which showed an exponential decay in two phases: an initial rapid phase leading to a half-life of 3 to

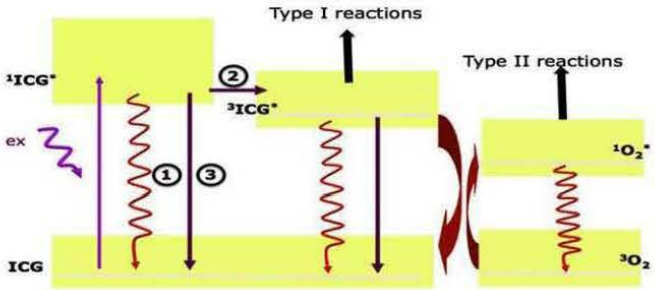


Fig. (2). Simplified Jablonski diagram 1) fluorescence emission, 2) intersystem crossing 3) heat production.

4 minutes and a second slow phase leading to a half-life of about one hour. The single exponential model is a good approximation for the early time. For the study of later times (after 30-50 minutes) mathematical modeling according to two exponential decay seems essential since the second term comes more prominent in the later time [25] (Fig. **5**).

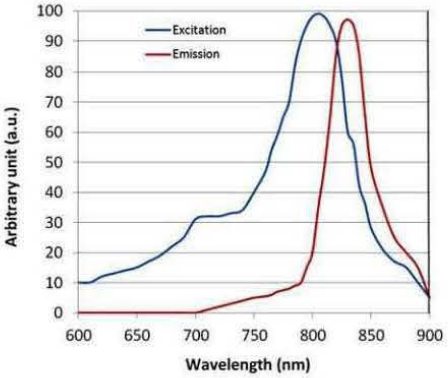


Fig. (3). Absorption and emission spectra of ICG (personal data).

Table 1. Relevant definitions or therapeutic definitions.

Therapy	Definition
Hyperthermia (HT)	Therapeutic procedure used to raise the temperature between 40°C to 43°C to achieve a specific tumor killing effect.
ICG-enhanced photocoagulation	IGC reinforces the NIR light absorption by the biological tissue (*e.g.* vessel, tissue solder [27] ...) (temperature superior to 53°C during more than 1 second).
PDT	Therapeutic procedure using oxygen, light and a photosensitizer to induce the production of Reactive Oxygen Species.
Photodynamic hyperthermia therapy (PHT)	Combination of PDT and HT.

ICG changes its molecular structure and forms aggregates whose absorbance properties vary, depending on their exposure to light, different temperature conditions and the time after ICG was dissolved in solvent [35].

2.5. Toxicity and Adverse Effects

ICG is metabolized microsomally in the liver and is only excreted *via* the liver and bile ducts; since it is not absorbed by the intestinal mucous membrane, its toxicity can be classified as low. The cytotoxicity has a median lethal dose LD-50of 50-80 mg/kg [36]. The safety of intravenously applied ICG in humans is well documented with severe adverse reactions occurring in only 0.05% of recipients [37]. Iriyama *et al.*, [38] examined the effects of ICG on retinal ganglion cells (RGCs) *in vitro* and *in vivo*. They observed an inherent toxicity of ICG in a dose-dependent manner.

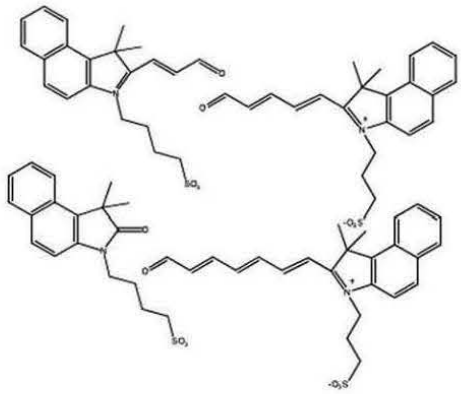


Fig. (4). Decomposition products of ICG upon light excitation.

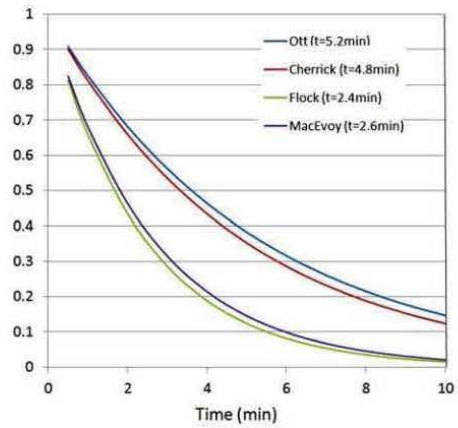


Fig. (5). ICG blood clearance; the curves were calculated using a monoexponential model and data provided by Ott *et al.*, Cherrick *et al.*, Flock *et al.*, MacEvoy *et al.* [30-34].

Despite its many advantages, ICG has several limitations for clinical applications: [32,39-42]

- A low quantum yield of reactive oxygen species,
- A threshold concentration in certain environments (80 g/mL plasmatic concentration),
- A lack of selectivity,
- A rapid degradation in moist environments that prevent it form being widely used in clinical applications,
- A rapid excretion from the circulation when administrated in molecular form,
- It binds rapidly to albumin and high density lipoproteins, causing agglomeration,
- It shows instability in physiologically conditions as a function of its concentration, the nature of the solvent, pH, temperature and light exposure.

A solution to prevent some of these side effects is to encapsulate ICG into nanoparticles.

2.6. Encapsulation of ICG

The utility of ICG remains limited by its unstable optical properties and nonspecific localization. Its usefulness for laser-mediated diagnostic and therapeutic applications could be vastly improved if it could be preferentially accumulated in significant quantities at a targeted sites [43]. Studies have been carried out to understand the interest of nanoparticules and this is illustrated by the number of reviews that have been written in the last two years on this subject [35-37]. Nanoparticles can work as carriers for anti-cancer agent delivery. They are relatively easy to prepare and have many advantages such as good colloidal stability, effective protection of the encapsulated drug against enzymes and hydrolysis, surface tailorability and multifunctionality. More importantly, due to their size, nanoparticles allow selective accumulation of the photosensitizer (PS) in cancer cells due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect of tumor tissues [44-46]. Another advantage of using nanoparticles is that they can also protect ICG. For example, Yaseen *et al.* [35] investigated the effect of encapsulation of ICG within dextran-coated electrostatically assembled mesocapsules (MCs) of 400 nm to 800 nm diameter. They proved that the MC system protected ICG from thermal degradation at all temperatures tested. In 2009, the same team encapsulated ICG within MCs to explore the potential for targeted optical imaging and therapy. *In vivo*, ICG was administered intravenously to Swiss Webster mice either as a free solution or in MCs. The circulation kinetics of ICG appeared to be unaffected by encapsulation; however, the deposition within organs other than the liver suggested a different biodistribution mechanism. Results indicated that the capsules' coating influenced their biodistribution to a greater extent than their size did. The MCs allowed the delivery of ICG to organs other than the liver, enabling the potential development of new optical imaging and therapeutic strategies.

Saxena *et al.* [47] investigated the biodistribution of ICG in healthy mice, when it was delivered through polymeric nanoparticles. Poly(dl-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles entrapping ICG were engineered and characterized using a fluorometric assay method. The biodistribution of ICG was determined in healthy C57BL/6 mice (female, 10-week old) when delivered *via* PLGA nanoparticles, in comparison to free ICG solution. The extraction method for ICG showed an efficiency of above 80% for various organs and plasma. When an i.v. dose was used to deliver ICG, 2-8 fold higher concentrations of ICG were deposited in various organs for nanoparticles, with 5-10 times higher plasma levels compared to free ICG solution until 4 h. The nanoparticle formulation significantly increased the ICG concentration and circulation time in plasma as well as the ICG uptake, accumulation and retention in various organs. Saxena *et al.* [48] also prepared ICG-loaded biodegradable PLGA nanoparticles by a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. To optimize the nanoparticle formulation, the influence of formulation parameters such as types of ICG, and amounts of ICG and the polymer were investigated. All PLGA nanoparticle formulations were found to have a mean diameter within the range of 300-410 nm. All ICG-loaded nanoparticle formulations were found to have similar ICG content of nanoparticles and showed an increase in ICG entrapment with increased amount of polymer. The release pattern consisted of two phases, with an initial exponential phase releasing about 78% of ICGwithin 8 h, followed by a slow phase releasing about 2% of ICG within the next 16 h.

Kim *et al.* [49] used polymeric micelles formed by the self-assembly of amphiphilic block copolymers to encapsulate ICG. Such filamentous carriers with high aspect ratios offer potential advantages over spherical carriers, including prolonged circulation times. Mixed micelles composed of poly(ethylene oxide)-poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene oxide) (PEO-PHB-PEO) and Pluronic F-127 (PF-127) were used to encapsulate ICG. The micelle formulations were assessed for their effects on tumor accumulation after tail vein injection into xenograft tumor-bearing mice, by noninvasive optical imaging. Advantages of the mixed micelle formulations over pure PEO-PHB-PEO or PF-127 micelles include ease of formulation at room temperature, filamentous structures, reduced plasma clearance rate, and increased passive tumor targeting. These formulations are therefore promising for tumor-targeted imaging and drug delivery.

Kim *et al.* [50] developed 100 nm diameter nanoparticles containing ICG as a contrast agent for Photoacoustic (PA) Imaging and PDT based on technology using organically modified silicate (ormosil) as a matrix for the nanoparticles. PA Imaging is an emerging biomedical method based on detecting acoustic signals generated from biological tissues by optical absorption to increase the selectivity for breast and prostate cancer. The particles were conjugated with HER-2 antibody and the photodynamic efficacy of ICG ormosil nanoparticles was evaluated by measuring the change of fluorescence intensity of a DPIBF (1,3-diphenylisobenzofuran) chemical probe that is a well-known singlet oxygen quencher [51,52]. After irradiation at 800 nm over 30 sec with a light dose of 1.36 kJ/cm^2, both free ICG and ICG ormosil nanoparticles seemed to produce $^1O_2$. As mentioned by the authors, the light dose is relatively high compared to the typical level of clinical PDT and further investigations are required.

2.7. Targeting of ICG

Site-specific therapy is a new promising therapeutic strategy, created to overcome growing problems of contemporary medicine, such as drug toxicity and resistance. An emerging aspect of this approach is targeted photodynamic-therapy (TPDT), with the main aim of improving delivery of the photosensitizer to cancer tissue and at the same time enhancing specificity and efficiency of PDT (for a review, see [53]). Depending on the mechanism of targeting, the strategies of TPDT are divided into "passive" and "active" and "activable" where in the last case the photosensitizer is only activated in the targeted tissue. In the passive strategy, an arsenal of nanoparticles (NP) has recently been developed, including polymers NP, as well as supramolecular carrier platforms such as dendrimers, micelles, liposomes. Numerous interesting reports have clearly demonstrated that enhanced specific drug targeting, cellular uptake and bioavailability can be achieved by active targeting, that is to say by

conjugating various ligands such as peptides, growth factors, transferin, antibodies or antibody fragments, oligonucleotide aptamers and small compounds such as folate [51,54]. The rational of all these strategies is taken from the biological and molecular characteristics of tumor tissues. For instance, alterations or increased levels of specific cellular type receptor expression occur in diseased tissues.

The biodistribution of the dual modified ICG-loaded PLGA nanoparticles with dual surface modifications of polyethylene glyocol PEG and folic acid (FA) in mice xenografted with MDA-MB-231 human breast cancer cells with a high expression of folate receptor (FR) has been investigated by Ma *et al.* [55], to directly confirm that the dual modification can enhance the delivery of ICG-loaded nanoparticles into the tumor tissues with high expression of FR to achieve a successful PDT treatment. They showed that the modified nanoparticles (with PEG and FA) accumulated preferentially into the tumor compared to non-modified nanoparticles, due to the long circulation and FR-mediated uptake. Likewise, Rungta *et al.* [56], have described a general strategy for the preparation of particles with surface attached ICG and PEG chains. PEGs of various molecular weights and ICG were modified with the addition of a terminal azide (azPEG and azICG, Fig. **6**) and then attached to PA colloids through Click Chemistry reactions in water.

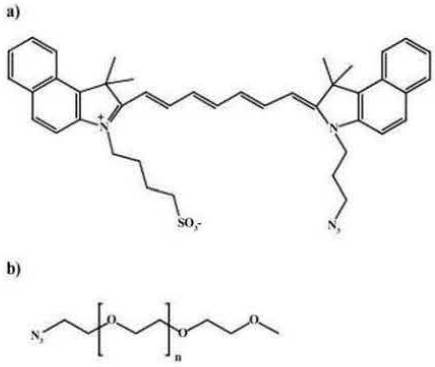


Fig. (6). Chemical structures of AzICG (a) and AzPEG (b).

The placement of azICG onto the surface of nanoparticles allowed the chromophores to complex with bovine serum albumine that resulted in the enhancement of dye emission. In addition, the inclusion of azPEG with azICG onto the particle surface resulted in a synergistic enhancement of the fluorescence intensity, with azPEGs of increasing molecular weight amplifying the response. Preliminary PDT studies with HepG2 cells combined with particles that were surface-decorated with both azICG and azPEG indicated that a minor exposure to 780 nm radiation resulted in a statistically significant reduction in cell growth. These results suggested that the surface attachment of azide-modified ICG to particles and its availability to spatially adjacent molecular oxygen, coupled with protein enhanced fluorescence, may make these particles a valuable resource in the treatment of cancer. This is the only study to date dealing with covalent grafting of ICG onto nanoparticles.

In the following parts of this article, we will describe the studies that have been performed using ICG as a treatment agent, depending on the type of disease that has been treated. All the available details concerning ICG concentration, light type and doses, irradiation time and ROS production or temperature elevation are gathered in Table **2**.

3. ICG FOR PDT APPLICATIONS

3.1. What is PDT?

PDT is an emerging non-invasive technique for the treatment of a variety of cancer tumors, involving the light activation of a photoactivable molecule called a photosensitizer in the presence of oxygen (Table **1**) [57]. After light irradiation of the photosensitizer, the energy from the excited photosensitizer can be transferred to surrounding molecules, allowing the generation of ROS including $^1O_2$ which is believed to be the major cytotoxic agent [58]. Thus, delivering the photosensitizer into cancer cells means the tumor can be specifically destroyed.

3.2. ICG for PDT Applications

3.2.1. Infections Treatment

The increase in resistance to antibiotics among disease-causing bacteria has necessitated the development of alternative antimicrobial approaches [59]. PDT can be used to destroy multidrug resistant bacteria with NIR and ICG. Topaloglu *et al.*, [60] investigated the optimum parameters with an 809 nm-laser (84, 168, 252 J/cm^2) and variable concentrations of ICG (20, 50 100, 125 150, 200, 250 □M/mL) to kill *Pseudomonas aeruginosain vitro*. They were able to optimize laser power and ICG concentration to non-toxic levels and achieved a 99% decrease in bacterial load with 252 J/cm^2 laser light and 125 □M/mL ICG concentration. Likewise, Omar *et al.*, [59] demonstrated that *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* were susceptible to be killed by ICG, excited with high or low intensity light (808 nm), the bactericidal effect being dependent on both ICG concentration and the light dose. Deuterium oxide increased the proportion of *S. aureus* killed suggesting that singlet oxygen was involved in the killing of the bacteria.

Perni *et al.*, [61] developed novel antimicrobial polymers containing ICG. When exposed to light (808 nm), polyurethane-containing ICG exhibited antimicrobial activity against Gram-positive bacteria; a 2 $\log_{10}$ reduction was achieved against methicillin-resistant S. aureus and S. epidermidis (31, 83 J/cm^2). Such materials could be useful for preparing intravenous catheters, which are often colonized by such organisms. These findings imply that ICG in combination with light from a NIR laser may be an effective means of eradicating bacteria from wounds and burns. Under the same conditions the Gram-negative bacteria Escherichia coli and P. aeruginaappeared to be less susceptible, the viable count being reduced by 0.5 log10.

Boehm and Ciancio [62] tested ICG uptake in Porphyromonas gingivalis 381 and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in addition to Escherichia Coli DH5alpha and

Table 2. Studies based on the use of ICG as a treatment agent.

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	λ_{Ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
			ICG FOR PDT APPLICATIONS					
PDT Infection	Solution	*Staphylcoccus aureus, Strep. Pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*	-	808	500 mW Gallium-aluminium-arsenide near-infrared (NIR) Laser (Thor International Ltd., UK) 1.37, 0.07 or 0.048 W/cm^2 470, 225 and 150 Mw	Yes	L-tryptophan Deuterium oxide	[59]
PDT Infection	Solutionin PBS (20 □g/mL to 250 □g/mL)	*Pseudomonas aeruginosa Wild type strain (ATCC 27853)*	-	809	Diode laser ,Bogazici University, Biodedical Engineering Institute, Biophotonics Laboratory 84, 168, 252 J/cm^2	No	No	[60]
PDT Infection	Solution in acetone /water	*Staphylococcus aureus - staphylococcus epidermidis - Escherichia coli - Pseudomonas aerugina*	-	808	Laser, 31.83 J/cm^2	No	No	[61]
PDT Infection	Dissolved in DMSO (5mM) and diluted in PBS (0-10 □M)	*Porphyromonas gingivalis* 381 - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans - Escherichia Coli* DH5alpha HepG	-	810	Diode laser (Ivoclar Odyssey) Fiber (0.4 mm diameter) at 1 mm over the pellet W or 0.5 W 80 W/cm^2 or 400 W/cm^2 0, 0.5 , 2 and 5 s	-	-	[62]
PDT Acne	Topically applied (1mg/mL)	-	22 volunteers	803 soft acne 809 soft acne 803 acne lesions	OPC – BO15 – MMM FCTS diode laser (Opto Power Corp., Tucson, AZ) 5-10 min - 10-50 mW/cm^2 15 min - 150-190 mW/cm^2 803 nm, 0.5 s - 18 W/cm^2 with cooling or 809 nm, 0.5 s, 200 W/cm^2 without cooling	No	No	[119]
PDT Acne	Topically applied	-	5 patients (2 men, 3 women)	810	Diode laser (LAS-30A ; TNL Inc., Daejeon, South Korea), 1-30 W, pulse duration 100-900 ms, 1-10 Hz	No	No	[73]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	λ_{Ex} (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Acne	Topically applied	-	34 Patients (12 men, 22 women, from 17 to 29 years)	805	Diode laser (K-laser; Eltech, Treviso, Italy) 4 W/cm^2 at 1 mm away from the skin and a spot size of 10 mm	No	No	[72]
PDT Acne	Topically applied	-	16 patients (7 men, 9 women, from 16 to 34 years)	805	NIR diode laser (LightSheer; Lumenis) 30 ms 12 J/cm^2	No	No	[71]
PDT Dermatology	i.v. application (0, 2, 4 mg/kg body weight)	-	Male syrian golden hamsters	805	Diode laser, Meditec, Aesculap®, Jena, Germany beam diameter = 6 mm 106 kW/cm^2 3.2 J/cm^2	No	T increases with [ICG] and vessel diameter	[75]
PDT Dermatology	Intravenous administration (2 mg/kg body weight)	-	15 female patients (from 28 to 62 years)	808	PDL (Sclerolaser plus™ candela Corp., Wayland, MA) Diode laser (Mediostar, Asclepion, Jena, Germany) 50-110 J/cm^2	No	No	[74]
PDT ophtalmology	Intravenous bolus	-	15 pigmented rabbits (weighing 2 to 2.5 kg)	810	Diode laser (TTT 1500, OPTO, Sao Carlos, Brazil) Time = 20,30,10 s Diameter of the laser beam = 400 microns Power density 230, 630 or 950 mW/cm^2, Light fluence 6.3 J/cm^2	No	No	[76]
PDT ophtalmology	Solution in water	QNR/K2	-	2000 lx Daylight	Daylight-colored fluorescent lamp (6500 K, Sunline ; Hitachi, Tokyo, japan)	No	No	[77]
PDT Actinic keratosis	Solution (1, 5 10, 25, 50 □M)	HaCaT	-	805		Singlet oxygen	Sodium Azide (effective physical quencher of singlet oxygen)	[80]
PDT Actinic keratosis	Solution in water	HaCaT SCL1 SCL2 N1 fibroblast	-	805	(cw)-diode laser (Opto Power Corp., CA, USA) maximum power 15W, 80 mW/cm^2, 12, 24 to 48 J/cm^2	No	No	[81]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	□Ex (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT melanoma	Solution	Sk-Mel-28	-	788	Femtosecond Ti-Sapphire laser, average power 400mW, beam diameter 3.0 cm, spectral pulse 150 fs, pulse rate 92.5 MHz, poser density 57 mW/cm^2	No	No	[82]
PDT melanoma	Solution (100 □M)	SKMEL 188 S91	-	830	MC LASER, therapy laser processor PMC-018, Katowice, Poland 100 or 200 mW/cm^2 30 to 100 J/cm^2	No	No	[83]
PDT Cervical cancer	Solution in PBS	HeLa V79	-	830	Beautyline BTL-10 laser (Beautyline, Ltd., Prague), 0, 24, 60, 99 J/cm^2 360 mW output	No	No	[84]
PDT Colorectal cancer	100 □l ICG solution (10, 50, 100 or 500 □M)	HT-29	-	805	(cw)-diode-laser (Opto Power Corp., CA, USA) maximum optical output power of 15 W 150 cm^2, Ø 14 cm a monocore fibre with 1.5 mm diameter 30 J /cm^2	Yes	Sodium azide, histidine or mannitol	[85]
PDT Bone cancer	Local or systemic injection	CRL-1666	Subcutaneous tumor of CRL-1666	810	Diode laser (UDL-15, Olympus, Tokyo, japan), maximum power output=15W, single silica probe (DM-6065, Olympus; core diameter 600 □m)	No	No	[86]
PDT Breast cancer	Solution (50 □M)	MDA-MB231	-	809	24 J/cm^2 60 mW/cm^2 biophotonics Lab., Inst. of Biomedical Eng., Bogazici Univ., Istanbul, Turkey	No	np	[87]
PDT Breast cancer	Intravenous administration 4 mg/kg	-	Mice with subcutaneous tumors (7-9 mm)	808	OLD-140-CPXF-2PA, Jenoptik Laserdiode GmbH, Jena, Germany Laser beam diameter: 5 mm Pulse time: 0.2 s Laser power output: 85 W	No	T increase of 12°C	[88]
PDT Oral cancer	Solution	KB	-	640, 785, and 895	LED (light emitting diode) 50 mW/cm^2	No	No	[89]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	□$_{Ex}$ (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Leukemia	Solution (12 □M)	U-937	-	805	Wave (cw) diode laser (Quanta System, Milan, Italy) 0.65 W Fiber 1.5 mm diameter 18 J/cm^2 Single long irradiation or intermittent exposure: total dose 180 J/cm^2	Singlet oxygen	Oxidation of the reducing agent dithiothreitol	[90]
PDT Leukemia	CD117-targeted ICG-Calcium phosphosilictae nanoparticles (ICG-CPSNPs)	32-D-p210-GFP CML Human AML	C3H/HeJ mice	-	NIR laser 0.2 J/cm^2	Singlet oxygen	dihydroethidium	[91]
PDT Pancreas cancer	Solution in water (0 to 50 □g/mL)	MIA PaCa-2 PANC-1 BxPc-3	-	808	Diode laser (B&W Tek, Newak, DE) 0.45 W – 5 min	No	No	[92]
PDT Macular surgery	Solution	RPE	-	Spectral range: 400–700	Spotlight source (LC-8; Hamamatsu Photonics, Japan) (spectral range: 400–700 nm) 750 mW / cm^2 10 min	Intracellular ROS production	Nis- hikawa *et al.* 2000)	[78]
PDT Macular surgery	Solution	Cultured retinal pigment epithelial monolayers	-	-	Fiberoptic light source (Grieshaber & Co., Schaffhausen, Switzerland) 3 to 4 mm from the cells	No	No	[79]
PDT Kaposi sarcoma	Injection (1 mg/mL) into the submucosal layer	-	13 patients with early gastric cancer (11 males and 2 females)	810	Semiconductive diode laser UDL-60 (Olympus Co., Tokyo, Japan) 30–40 W/s	No	No	[95]
ICG FOR PDT COUPLED TO OTHER THERAPIES								
PDT + Laser immunotherapy	Intra-tumor injection (2.5 mg/kg body weight)	-	Young Wistar Furth female rats (DMBA-4 transplantable cells) 6 to 8 weeks and 150 to 200 g	805	Diode laser (Diomedics, Woodlands, TX) 4-mm distance from the skin overlying the tumor a laser spot 3 mm in diameter 2 watts for 10 min, delivering a total energy of 1,200 J to the tumor to each tumor was 68,000 J/cm^2 over the entire surface area.	No	No	[98]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	□$_{Ex}$ (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	female Wistar Furth rats (metastatic mammary tumor model, DMBA-4 (33–35)) male Copenhagen rats (metastatic prostate tumor model, Met-Lu (36)) age 5–6 weeks 100–125 g	805	DIOMED 25 diode laser (DIOMEDICS, The Woodlands, TX). Lower energy : 2W for 10 min maximum power output : 25 W	No	No	[102]
PDT Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	Female Wistar Furth rats *(DMBA-4 tumors)* age 6–7 weeks 110–130 g	805	a diode laser emitting 805 nm light (Diomed 25; Diomedics, The Woodlands, TX).	No	No	[96]
PDT + Laser immunotherapy	i.v. injection	-	Rat DMBA-4 metastatic mammary tumors	805	Diomed 25 solid state laser (DIOMEDICS, The Woodlands, TX) Maximum available power 25W The laser power was set at 2W 10 min with a 3 mm diameter laser spot size, fluence of 96 J/cm^2 for a tumor of 1 cm diameter	No	No	[104]
PDT + Laser immunotherapy	Intra-tumor injection	-	DMBA-4 Metastatic Tumour in Wistar Furth female Rats	805	805 nm diode laser ISLSOF (McDonnell Douglas Aerospace; St.Louis, MO) In total 1200 J of energy (2 W and 10 min) was delivered to each tumor at 4 mm from the treatment site and a 3 mm diameter spot	No	No	[123] [100]
PDT + Radiotherapy	Solution (1 – 3.5 □g/mL)	PC-3 EPN	-	805	diode laser (Quanta System, Italy) 120 mW/cm^2 - 108 J/cm^2 6 MeV (linear accelerator GE 43 SATURNE). Irradiation at 70 cm from the source (2 Gy/min)	No	No	[107]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	□ex (nm)	Light	Ros	Detection	Refs.
PDT + Radiotherapy	Solution in water	MCF-7	-	730	Lumacare LC-122-A (Ci-Tec, USA) non-coherent light source - optical fibers with a diameter of 2 mm and 8 mm diameter light spot 45 mW/cm^2 (30, 60, and 108 J/cm^2)	No	No	[108]
PDT + chemotherapy	MCF-7 cells incubated in 20 ICG ! M for 24 h	MCF-7	-	805	Quanta System (Milan, Italy) continuous wave: 0.65 W 25j/cm^2 adjustable time shutter: 0.1 s	No	No	[109]
PDT + ultrasound	Solution in distilled water	RIF-1	RIF-1 tumour	830	Photon laser diode module (PM-605P, photonic product, USA), 2 -3 min, 315 mW/cm^2	ROS (*in vitro*)	H 2 DCFDA	[110]
PDT + TTT	Aqueous solution (15 mL with 75 mg)	-	25 patients (35 to 88 years, 13 men, 12 women)	?	Diode laser (IRIS Laser, Moutain View, CA) delivered through a slit-lamp focused on the tumor with a fundus contact lens (Mainster wide-field; ocular Instrument, Bellevue, WA) 60 s, 550 mW using a 3 mm diameter spot	No	-	[113]
PDT + TTT	i.v. injection over 20 s (100 mg in 10 mL of 5% glucose solution)	-	60 patients	810	Diode laser through a slit-lamp adaptor with beam width of 1.2, 2 and 3 mm. 60 s, 300 mW with 3mm beam width	No	-	[112]

Type of reatment	Icg	*In Vitro*	*In Vivo*	□ex (Nm)	Light	Temperature	Refs.
			ICG FOR PHT				
PHT Acne	Topical micro-emulsion	-	Few patients	810	Cynosure, Inc., Chelmsford, MA 4-mm spot size 50-ms pulse duration fluence 40 J/cm^2	-	[118]
PHT Acne	Topical application	-	Human (12 patients) acne vulgaris	803	Diode laser (OPC-BO15-MMM-FCTS, Opto Power Corp., Tucson, Arizona), up to 50 mW/cm^2, 10 min, 15 and 30 J/cm^2, spot diameter 10 cm	-	[120]
PHT Dermatology	i.v. injection (2 mg/Kg body weight)	-	piglets	810	Diode laser Radiant exposure: 31 to 80 J/cm^2	-	[121]

(Table 2) contd….

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	λ_{Ex} (nm)	Light	Temperature	Refs.
PHT Ophtalmology	75 mg/mL	-	Lewis or Brown Norway rats (200-400 g)	810	Diode laser (Oculight SLx ; Iridex, Moutain View, CA) 75 □m spot size, 100-170 mW and 400 ms pulse duration	-	[122]
PHT cancerology	i.v. injection concentration was 1% and dosage varied from 100 to 200 □L	-	Murine mammary tumors (female rats)	808	ISL50F diode laser (McDonnell-Douglas Aerospace, St Louis, MO) 5- 10 W for 3-5 min, 52 W/cm^2 (5 W) and 104 W/cm^2 (10 W) The fiber at 4 mm from the skin, spot size: 3.5 mm in diameter	Quick temperature, often above elevation 140°F	[101] [97] [99] [123]
PHT cancerology	Dissolved in DMEM at concentrations of 50, 150, 250, 350, 500 □L	Murine melanoma cell line B16F10		600 – 1600	Linear polarized infrared device (600 – 1600 nm) with energy ourput of 5W, Super Lizer™ model PX (SL, IKEN, Tookyo, Japan) 3 min, 3cm from the targeted surface, 0.33 W/m^2 energy dose 549.4 J/m^2	-	[124] [125]
PHT cancerology	Aqueous solution (2-4 mg/kg body weight)	-	Human (3 patients)- AIDS-associated Kaposi`s sarcoma	805	Beam diameter 2 cm, Opto Power, Tucson, AZ, USA, 0.5 to 5 W/cm2, total dose 100 J/cm^2	T increases of 12.1 ±4.4 °C	[94]
PHT cancerology	25 mg/mL sterile water	-	27 dutch cross rabbits implanted by green amelanotic hamster melanoma	810	Slit-lamp delivered diode laser (Microlase ; Keeler Instruments, Broomall, PA) 500 □m spot size - 0.2 s - 1100 mW through a contact lens (Funduns Laser Lens; Ocular Instruments, Inc. Bellevue, WA). Average of 513 spots per tumor during 105 s.	-	[111]
PHT cancerology	i) i.v. bolus injection (1 mg/kg) in rats ii) *in vitro* surface painting or local submucodal injection of a 0.1% solution (0.1 mL)	-	i) wistar rats ii) fresh resection samples of normal and malignant human gastric and colonic mucosa obtained with consent from 8 patients undergoing colorectal resection and 6 patients undergoing gastric resection	805	Diomed 25 semiconductor diode laser (Diomed, Cambridge, UK) 1-25 W 600 micron flexible bare quartz fibre with a constant fibre-tissue distance of 1 cm i) 20W 5 s (100 J) ii) 25 W 5 s (125 J)	-	[126]

(Table 2) contd....

Type of Treatment	ICG	*In Vitro*	*In Vivo*	λ_{Ex} (nm)	Light	Temperature	Refs.
			ICG FOR TARGETED PHT				
TARGETED PHT + PDT cancerology	Au- PSMA-ICG-anti VEGF antibodies nanorods and Au- PSMA-ICG	A549	-	808	Continuous-wave diode laser with a wavelength of 808 nm (output power : 22.5 W/cm^2, 1 mm^2 laser beam spot area) 30 s to 3 min	Singlet oxygen Φ_Δ = 0.11 (ICG) Φ_Δ=0.16 (ICG-nano) Sensor green Toluidine blue O (for Φ_Δ) T increases	[130]
TARGETED PHT +PDT cancerology	Adsorbed on Au nanoparti-cles coupled with anti EGFR anti-body Solution	A549	-	808	Laser (FSL-808-450MS-FS, Enwave Optronics Inc.), 22.5 W/cm^2, 30 s to 3 min, 1mm^2	Singlet oxygen Φ_Δ = 0.11 (ICG) Φ_Δ=0.16 (ICG-nano) Sensor green Toluidine blue O (for Φ_Δ) T increases	[115] [130]
TARGETED PHT cancerology	ICG-PL-PEG nanoparticle coupled toFA, or mAb	U87 MCF-7 EMT6 cells	-	808	Laser 1.25 W/cm^2 0.75 to 3.25 W for 5 min	T increases depending on [ICG] : up to 20°C	[127]
TARGETED PHT cancerology	Encapsulated into PLGA conjugated with RGD-4C or FA or R11 peptide	HDF (for cyto-compatibility studies) PC3 for uptake	-	808	Continuous wave laser (Cow Coherent Inc., Santa Clara, CA) 2.26 mm^2; 0.8 W; 5 min	Increase T : 8 to 10 °C	[132]
			ICG FOR PHT COUPLED CHEMOTHERAPY				
PDT +Chemotherapy	ICG +Doxorubicin (DOX)	A DOX resistant ovarian epithelial adenocarcinoma cell line (SKOV-3)	-	808	A NIR Laser Module source (RLDH808 1200-5, Roithner Lase- rthchnik Gmbh, Vienna, Austria) emitting at 808 nm with an out- put power of 1 W 1 min	-	[116]
			ICG FOR PHT COUPLED IMMUNOTHERAPY				
PHT + Immunotherapy	i.v. injection +local applica-tion of topical imiquimod	-	11 patients (7 men, 4 women from 46 to 87 years)	805	NIR laser	-	[134]

a human gingival epithelial cell line HepG in relation to ICG dose and exposure time. They measured the effects of ICG and 810 nm diode laser light (0-0.5 W output settings, 0-5 s) on bacteria. They found rapid and significant uptake of ICG into P. gingivalis 381 and A. actinomycetemcomitans 67 compared to E. Coli DH5alpha and HepG gingival cells and suggested a reduction of bacterial load in periodontal pockets. The authors affirmed that it is not clear how ICG kills bacteria. It is possible that several different mechanisms exist. Indeed, and as expected, they noticed that at high flux levels bacterial pellets heated up significantly if ICG was present, while there was no apparent temperature increase in irradiated pellets in the absence of ICG (laser 80-400 W/cm^2, 1-5 s). At low flux levels, no temperature increase was observed, but significant bacterial killing still took place. Therefore it is reasonable to think that at low flux levels phototoxicity may result in killing whereas at a high level of flux, thermal effects dominate killing. This was not proven in the paper. Further studies should test whether ICG in conjunction with low level laser treatment has significant clinical effects on the biofilm environment of human periodontal pockets.

3.2.2. Dermatology (Acne)

Acne vulgaris is one of the most prevalent skin diseases known [63]. Conventional treatments for acne tend to be

inconvenient and are associated with side-effects, which has prompted a search for more acceptable therapies. [64] Acne often improves after exposure to sunlight, and this observation led to the development of laser and other light therapies [65,66]. Studies were undertaken and clinical trials carried out [63,67-70]. Lasers are now established options in the armament to treat acne [68].

Kim *et al.*, [71] used ICG and a diode laser for acne treatment of Asian subjects. An analysis was performed of 16 randomly chosen Korean patients with acne vulgaris treated by PDT for a mean follow up of 2 months. Volunteers were divided into two groups, a single- and multiple-treatment group, in which photodynamic therapy was repeated three times with 1-week intervals. PDT using ICG dye with a diode laser was effective for acne treatment of Korean subjects. However, multiple treatments were not superior to single treatments in controlling acne lesions.

Jang *et al.*, [72] compared the safety and efficacy of PDT using ICG and PDT and tested indol-3-acetic acid (IAA) in the treatment of mild to moderate acne vulgaris. In this prospective, a single-blind clinical trialconcerned 34 patients. These were treated with IAA with green light (520 nm) on half of the face and with ICG with NIR radiation (805 nm) on the other half. The procedure was carried out five times at 1-week intervals. Both PDT with ICG and PDT with IAA are safe and effective for the treatment of mild to moderate acne vulgaris. Likewise, Nouri *et al.*, [67] demonstrated that ICG-PDT has fewer adverse effects than aminolevulinic acid-PDT.

Kim *et al.*, [73] used pin-point PDT with ICG, a pyramidal-shaped tip and a fine fiber which have been used for the targeting of veins in the treatment of thyroid nodules. The term 'skin pore' usually applies to the visible topographic features at the skin surface, corresponding to the enlarged openings of Pilosebaceous follicles. Five 22-26 year old individuals with Fitzpatrick skin types IV-V were treated. This therapeutic trial illustrated that selective PDT with ICG using an optic fiber is safe and can be useful for the improvement of enlarged pores. Nevertheless, this study did not give quantificative evaluations of pore size or sebum excretion reduction. Moreover, it was not clear whether a real PDT effect was observed, or a photothermal effect. Further investigations are warranted.

3.2.3. Dermatology (Other than Acne)

Telangiectatic and reticular leg veins are a common problem, affecting about 40-50% of adults. Age, chronic venous insufficiency, intake of hormones, pregnancy, genetic disposition, and occupation are among the most important risk factors [74]. Different authors have evaluated the efficacy of ICG-mediated diode laser treatment of blood vessels. Several *in vivo* studies have been carried out. Laser treatment (805 nm ; 106 kW/cm^2 ; 3.2 J/cm^2 ; 3 ms), of blood vessels directly after i.v. application of ICG (0, 2, or 4 mg/kg body weight) was investigated in the skinfold chamber model by Babilas, *et al.*, [75]. Male Syrian Golden hamsters of 30-40 g body weight were used. Vessel diameters were measured using intravital fluorescence microscopy up to 24 hours following irradiation. Histology was analyzed 1 or 24 hours after irradiation. The reduction of blood vessel perfusion was proportional to ICG-concentration and pulse duration. ICG-mediated laser irradiation induces irreversible photocoagulation of blood vessels of all diameters in this model.

In 2012, Klein *et al.*, [74] carried out a randomized controlled proof of concept trial. The safety and efficacy of ICG-augmented diode laser therapy (808 nm) was evaluated for the treatment of telangiectatic leg veins. ICG (2 mg/kg body weight) was intravenously administered in 15 female patients (skin type II to III) with telangiectatic leg veins (0.25 to 3.0 mm of diameter). Immediately after ICG injection, diode laser pulses of different radiant exposures (50 - 110 J/cm□) were applied as a single treatment. Safety and efficacy were assessed 1 and 3 months after treatment, by a blinded investigator and the patient. Treatments with the pulsed dye laser (PDL) and the diode laser without ICG served as reference therapies. The safety of ICG application and diode laser treatment were excellent in all patients with no persisting side effects. ICG-augmented diode laser therapy has proved to be a safe and effective treatment option for telangiectatic leg veins. In this case, it is a pure thermal action.

3.2.4. Ophtalmology

Since its peak absorption matches the emission wavelength of medical diode lasers, ICG is also used for the selective destruction of blood vessels. To evaluate the potential of PDT using ICG for occlusion of choroidal neovascularization, Costa *et al.*, [76] studied efficiency and collateral damage of photodynamic therapy-induced photothrombosis on the rabbit choriocapillary layer. Fundus photography, fluorescein angiography, and light and transmission electron microscopy were used to study efficiency of PDT-induced photothrombosis using ICG as the PS, and to assess the resultant collateral damages. The delivery system consisted of a modified infrared diode laser tuned to 810 nm, near the maximum absorption peak of ICG. Choriocapillary occlusion was achieved at ICG doses of 10 and 20 mg/kg with a radiant as low as 6.3 J/cm^2. When PDT was performed with ICG doses of 10 mg/kg, damage to the neural retina was minimal. Only inner photoreceptor segments showed degeneration, probably secondary to choroidal ischemia. The Bruch membrane remained intact and the retinal pigment epithelium was invariably damaged. Temporary occlusion of large choroidal vessels occurred at both dye doses. However, due to the High ICG concentration (20 mg/kg), the light dose 6.3 J/cm□ could be enough to induce a thermal action.

Sato *et al.*, [77]investigated the phototoxicity of persistent ICG under continuous visible light illumination on QNR/K2 cells (cultured quail Müller cells). ICG exposure followed by illumination induced severe morphologic changes in cells, significant cell death and increase of apoptosis compared to ICG or illumination alone or with no exposure. Blocking peak absorbance wavelengths of ICG prevented photodynamic cytotoxicity of persistent ICG under continuous visible light illumination *in vitro*.

3.2.5. Macular Surgery

Kernt *et al.*, [78] investigated the effects of ICG on light-induced senescence of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells. Primary human RPE cells were pre-incubated with 0.005%, 0.05% or zero ICG and then exposed to white light.

After 10 min of irradiation, the induction of ROS and senescence-associated b-galactosidase activity (SA b-Gal) were determined. Expression and secretion of matrix metalloproteinases 1 and 3 and their mRNA were determined by RT-PCR and ELISA. Light exposure decreased RPE cell viability by 46%. Treatment with 0.005% and 0.05% ICG alone decreased RPE cell viability by 7% and 21% respectively. In addition, expression of ROS, SA b-Gal, and MMP-1 and 3 were significantly increased. When 0.005% and 0.05% ICG treatments were combined with light exposure, viability decreased by 69% and 82% compared to the untreated control. Effects on the expression of ROS, SA b-Gal, and MMP-1 and 3 were significantly increased when cells were pre-incubated with ICG and then illuminated, depending on the ICG dose. In conclusion, pretreatment with ICG significantly increased light-induced oxidative stress and senescence. This might indicate a potential, supplementary mechanism that could explain RPE alterations and reduced functional results after ICG-assisted internal limiting membrane peeling.

Sippy *et al.* [79] evaluated the potential toxic effects of ICG and endoillumination,alone or in combination, on cultured human RPE cells that were exposed to balanced saline solution. RPE cells exposed to ICG showed no histologic or ultrastructural changes. Those exposed to ICG alone or ICG plus light demonstrated a significant decrease in mitochondrial enzyme activity (P = 0.0002 and 0.005, respectively). Brief exposure of cultured human RPE cells to ICG resulted in decreased mitochondrial enzyme activity but did not appear to influence cellular morphology or ultrastructure.

3.2.6. Cancer Treatment

3.2.6.1. Actinic Keratosis

PDT is increasingly recognized as an alternative treatment for superficial cancer. An actinic keratosis, also known as a solar keratosis, is a scaly or crusty growth lesion. It most often appears on the areas of the body frequently exposed to the sun. Many *in vitro* studies have been undertaken and will be developed in this section. Fickweiler *et al.*, [80] examined dose dependent phototoxic effects of ICG *in vitro*on HaCaT keratinocytes. Keratinocytes were incubated with 0-50 □M ICG for 24 h and irradiated by a diode laser (805 nm) with different energy densities (0, 12, 24, 48 J/cm^2). All ICG concentrations higher than 5 □M in combination with irradiation yielded a cell killing effect that depended significantly on ICG concentration and light dose. Cell viability for dark control and cells incubated with 50 □M ICG and irradiated with 48 J/cm^2 was 0.82 ± 0.15 and 0.07± 0.02, respectively. Sodium azide, a quencher of ROS, significantly inhibited the cell killing. Thus irradiation of ICG might induce a photodynamic reaction. Likewise, ICG-mediated phototherapy was investigated *in vitro* in four different cell lines derived from human skin (SCL1 and SCL2 squamous cell carcinoma, HaCaT keratinocytes and N1 fibroblasts). After irradiation with a cw-diode laser (805 nm, 80 mW/cm^2) at doses of 24 or 48 J/cm^2, for all cell lines ICG concentrations above 25 □M produced a significant phototoxic effect. Electron microscopy (1h after ICG-mediated phototherapy) revealed cytoplasmic vesiculation, dilatation of the rough endoplasmic reticulum, the Golgi complex and the perinuclear cisternae and the beginning of chromatin condensation in the nucleus. The authors reported that these ultra-structural findings are not consistent with a photothermal action of ICG-mediated phototherapy. Instead, Abels *et al.* [81] suggested photo-oxidation as a major cell-killing mechanism in their conditions of ICG concentration and light irradiation.

3.2.6.2. Melanoma

Mamoon *et al.*, [82] explored the efficiency of ICG as a PDT agent for human melanoma and its mechanistic role in the cell death pathway. They used human skin melanoma cells (Sk-Mel-28) incubated with ICG and exposed to a low power Ti: Sapphire laser at 788 nm (3.4 J/cm^2). IR microspectroscopy was used as a rapid and sensitive assay to determine the mode and extent of cell death as a function of laser exposure. Fragmentation of DNA, protein conformation changes and increase of lipid content could be observed. Moreover, the authors showed caspase-mediated apoptosis through activation of the initiator caspases. The excitation of ICG evoked rapid multiple consequences that triggered apoptotic cells. They cited $^1O_2$ formation but this has not been verified. To sum up, a pathway that seems to be redox-sensitive involves the release of cytochrome c from mitochondria to the cytosol, the activation of caspases, the inhibition of the NF-KB P65 subunit, the enhancement of DNA fragmentation and the induction of histone acetylation. ICG/PDT can efficiently and rapidly induce apoptosis in human melanoma cells and it can be considered as a new therapeutic approach for topical treatment of melanoma.

Urbanska *et al.*, [83] studied the cytotoxicity of ICG itself and the effect of photodynamic therapy by following the growth of human (SKMEL 188) and mouse (S91) melanoma cells. The surviving fraction of the irradiated (□= 830 nm) *vs* non-irradiated cells, treated with the same dose of ICG (100 □M), was significantly decreased. These results show that ICG is a very promising dye for PDT of melanomas.

3.2.6.3. Cervical Cancer

Skrivanova *et al.*, [84] evaluated ICG cytotoxicity in Hela cells, as well as the phototoxicity (830 nm excitation, 0, 24, 60, 99 J/cm^2, 360 mW). The maximum phototoxic effect of ICG was detected at an ICG concentration of 94 □M and an energy of 99 J/cm^2 24 h after irradiaton. More interestingly, adding an oxidative agent, 20 □M H_2O_2 statistically increased the phototoxicity of ICG. The authors attributed the results as supporting the theory of cell destruction by reactive oxidative species. However, the light dose used was very high and a thermal action could easily explain the destruction of these cells.

3.2.6.4. Colorectal Cancer

Bäumler *et al.*, [85] used HT-29 cell lines, incubated for 24 h with different concentrations of ICG, and excited at 805 nm (30 J/cm^2, 40 mW/cm^2). They observed a decrease in survival. Using 100 □M ICG and laser irradiation, they showed that sodium azide or histidine (quenchers of $^1O_2$) reduced the cell killing significantly. In contrast, when using mannitol, a quencher of superoxide anion and hydroxyl radicals, cell killing was not inhibited.

3.2.6.5. Bone Cancer

Bone metastasis is a major cause of pain and disability. The spinal column is a common site of bone metastasis, seen in about 40% of patients with cancer. PDT with ICG was

evaluated by Funayama *et al.*, [86] on rat mammary adenocarcinoma cells and its therapeutic efficacy in a rat model of spinal metastasis was assessed. Three treatment groups existed: PDT with local injection of ICG, PDT with systemic injection of ICG and no treatment (control). PDT exerted an immediate and persistent phototoxic effect. Furthermore, PDT with local or systemic injection of ICG delayed the development of paralysis. This could be an effective local adjuvant treatment for spinal metastasis.

3.2.6.6. Breast Cancer

Bozkulak *et al.*, [87] studied the inhibitory growth effects of ICG-PDT on MDA-MB231 human breast cancer cells in a time course experiment. Cells were irradiated with a continuous wave diode laser (□= 809 nm, 60 mW, 24 J/cm^2). The results showed that ICG-PDT application (50 □M ICG) exerted a photo-oxidative effect on MDA-MB231 breast cancer cells extremely rapidly (within 3 h). Relative cell viability was determined throughout a 48 h time course, and a consistent decrease was observed after ICG-PDT application.

Shafirstein *et al.*, [88] evaluated the potential benefit of using ICG/NIR laser therapy to regress superficial carcinoma with thermal injury. Two groups of A/J mice with subcutaneous mammary adenocarcinoma tumors (7-9 mm) were subjected to tail vein injection of ICG dye (4 mg/kg) or sterile saline and then irradiated with an 808 nm NIR laser. Histological evaluation of the subcutaneous tissue revealed minor thermal damage and necrosis in the saline/laser group and substantial damage (up to 100% necrosis) in the ICG/laser group. The ICG/laser-treated group showed a steady reduction in tumor volume compared to the saline/laser group. Thus, the vascular-targeted ICG-NIR laser thermal therapy appears to have potential for treating superficial tumors.

3.2.6.7. Oral Cancer (Ou Oral Squamous Cell Carcinoma)

Lim et Oh., [89] evaluated the efficiency of ICG-PDT against oral cancer. Different ICG concentrations, laser wavelengths, irradiation interval times after administering ICG, and the duration after PDT on KB cells (oral squamous cell carcinoma) were studied. The IC_{50} value was 10 □M when the irradiation value was 785 nm, which was very low compared to 630 nm and 895 nm. The values were not very different with varying irradiation interval times. The percentage of apoptotic cells increased gradually to 84% at 6 h after 20 □M ICG-PDT treatment and the percentage of necrotic cells rose dramatically to 65% at 3 h after administration of 200 □M ICG-PDT. Using ICG-PDT with 785nm LED light, the LED is regarded as a satisfying light source since cancer treatments in the oral region do not require focusing and increased depth of penetration due to longer wavelength enhances treatment effectiveness.

3.2.6.8. Leukemia

Leukemia of the blood or bone marrow is usually characterized by an abnormal proliferation of white blood cells. Varriale *et al.*, [90] evaluated the effects of an IR diode laser source emitting at 805 nm on a human leukaemic cell strain (U937) from a histiocytic lymphoma pre-loaded with ICG. The first aim of this work was to assess the earliest cellular defense events occurring upon ICG photosensitization. To this end, photosensitization was performed at low ICG concentration and low light energy density. The second aim was a comparative evaluation of the effects of continuous or fragmented irradiation. Independent of the irradiation method employed (continuous or fragmented), the authors demonstrated that cells are forced to apoptosis and not to necrosis and that the mechanism by which the process is triggered requires Caspase-3 activation. Indeed the only perceptible change in the expression of pro/antiapoptotic proteins produced by continuous photostimulation was a small, albeit reproducible, increase in Bax. In contrast, when photostimulation was achieved by means of several consecutive pulses, not only a remarkable increase in Bax was observed, but also a noticeable abatement in Bcl-XL expression. The potential involvement of $^1O_2$ in this process has been directly demonstrated by ICG photo-mediated oxidation of dithiothreitol in water. It has also been demonstrated that this oxidation is apparently more efficient when ICG is photostimulated by light pulses. Furthermore, Barth *et al.*, [91] recently developed nontoxic and non-aggregating calcium phosphosilicate nanoparticles (CPSNPs) encapsulating the near-infrared fluoroprobe ICG for diagnostic imaging and drug delivery as well as for PDT. First studies revealed that specific targeting of CPSNPs allowed for enhanced accumulation within breast tumors *via* CD71 targeting, or pancreatic cancer tumors *via* gastrin receptor targeting. ICG loaded CPSNPs were evaluated as photosensitizers for PDT of leukemia. Using a novel bioconjugation approach to specifically target CD117 or CD96, surface features enhanced on leukemia stem cells, *in vitro* ICG-CPSNP PDT of a murine leukemia cell line and human leukemia samples were dramatically improved. Furthermore, the *in vivo* efficacy of PDT was dramatically enhanced in a murine leukemia model by using CD 117-targeted ICG-CPSNPs that resulted in 29% disease-free survival. This result suggests that leukemia-targeted ICG loaded CPSNPs offer the promise of an effective treatment for relapsing and multidrug-resistant leukemia and could improve the life of leukemia patients.

3.2.6.9. Pancreas

Tseng *et al.*, [92] determined the cytotoxicity of ICG-PDT in human pancreatic cancer. MIA PaCa-2, PANC-1 and BxPc-3 pancreatic cells were incubated for one hour with 0 to 50 □g/L ICG, serially washed to remove unbound dye, and then briefly exposed to infrared light from a diode laser at 0.45 W. MTT cell viability assays were performed at 72 hours post-treatment. Toxicity to ICG or infrared laser alone was not observed in any of the cell lines. Cell viability assays showed an ICG dose dependent ablation when combined with laser exposure. In all 3 cancerous cell lines, significant growth inhibition was seen at 10 □g/mL ICG under irradiation with nearly total abrogation at 20 □g/mL ICG. ICG-PDT induces consistent and dramatic pancreatic cell death. Since neither ICG nor laser alone caused toxicity, combination therapy may offer effective control of tumor growth with minimal side effects in patients with unresectable primary or metastatic pancreatic cancer.

3.2.6.10. Kaposi's Sarcoma

The promising experimental findings with ICG led to first clinical results in treating Kaposi's sarcomas (KS) [93].KS is the most common malignancy observed in patients infected with HIV (AIDS). It is a solid tumor consist-

ing of cells of endothelial and fibroblast origin. In the study of Abels *et al.*, [94] ICG was used as a photosensitizer in combination with a diode laser to treat AIDS-associated KS in 3 patients. Three homosexual men, aged 33, 34 and 67 years with AIDS-associated, biopsy-proven KS were treated. 57 plaque-type KS lesions were treated in several sessions. The ICG dosage varied from 2 to 4 mg/kg given in two applications within 30 min and irradiation was from 0.5 to 5 W/cm^2 (805 nm). The report showed that AIDS-associated KS can be selectively sensitized and effectively treated using i.v. administered ICG excited at 805 nm. No prolonged cutaneous photosensitivity was observed. Tolerability was very good. Excellent cosmetic results were observed.

3.2.6.11. Gastric Cancer

The objective of the study of Kawaguchi *et al.*, [95] was to assess retrospectively the clinical usefulness of diode laser irradiation for early gastric cancer. The subjects were 13 patients (14 lesions) selected from 125 patients with early gastric cancer who were treated by endoscopy during the period from September 1995 to February 2003. After injection with ICG solution (1 mg/mL) into the submucosal layer, a semiconductive diode laser (30-40 W/s) was used to irradiate by the non-contacting method. There was no major complication. In the period up to December 2007, six patients survived and seven died. However, no-one died of progression of gastric cancer. The mean survival times of all patients, survivors and patients who died were 5 years 2.8 months 6 years 4.5 months and 4 years 11.7 months, respectively. Early gastric cancer can be successfully treated by laser therapy with few complications and good prognosis. This method is expected to be most suitable and effective for elderly patients with serious underlying disease. According to the authors, ICG might present a promising photosensitizer for PDT and first clinical results confirm these findings. However, the total energy applied on tissue was not reported and a thermal action could also easily explain the results.

3.3. ICG for PDT Coupled to Others Therapies

3.3.1. ICG-PDT Associated with Immunotherapy

A new method for treating metastatic tumors which uses a combination of a NIR laser, ICG and an immunoadjuvant (Chitin) has been developed by Chen *et al.*, [96]. Chitosan, a derivative of chitin, has shown the ability to stimulate immune responses in animals. A water-soluble, viscous form of a chitosan derivative, glycated chitosan (GC), has been synthesized using chitosan and galactose [96]. In the treatment of metastatic mammary tumors in rats using laser immunotherapy, GC has significantly enhanced the effects of the photothermal interaction by an 805 nm laser and ICG. With the use of GC, the noncurative laser-ICG combination was able to successfully eradicate primary tumors and control untreated metastases at remote sites [97,98]. It also helped induce a long-term tumor resistance in the successfully treated rats [96]. The treatment using GC induced a tumor-specific immune response at both cellular and molecular levels [98], which has been shown to be able to adoptively transfer to untreated naive rats [99]. The laser and the light-absorbing dye provided a selective photothermal interaction [100-103], which lead to direct tumor cell destruction. It is also believed to serve as the precursor for host immune responses by exposing tumor antigens. The function of GC in combination with laser treatment is thought to stimulate the host immune system and to enhance a direct attack mounted by it, with the help of the exposed antigens, against the remaining tumor cells as well as distant metastases. [104] In the study of Chen *et al.* [104], laser immunotherapy was extended in two directions. First, different immunoadjuvants were selected as the immune stimulants to test the principles of the laser immunotherapy. Specifically, complete Freund adjuvant, incomplete Freund adjuvant and *Corynebacteriumpawum* were used in combination with selective photothermal interaction in the treatment of metastatic mammary tumors in rats. Second, PDT was selected as the mechanism of direct tumor destruction (805 nm excitation). Combined with PDT, in the treatment of tumors in mice, GC was administered peritumorally immediately after laser irradiation. The survival of treated animals was compared with that of untreated control animals. GC resulted in a 29% long-term survival. In the treatment of EMT6 mammary sarcoma in mice, GC of 0.5% and 1.5% concentrations increased the cure rates of Photofrin-based PDT treatment from 38% to 63% and 75%, respectively. In the treatment of Line 1 lung adenocarcinoma in mice, a 1.67% GC solution enabled a noncurative *m*THPC-based PDT to cure 37% of the tumor-bearing mice. The experimental results showed that a combination of immunological stimulation and active tumor destruction could enhance the treatment of metastatic tumors. Furthermore, the chitosan derivative has been shown to be effective in inducing an antitumor immune response. The curative effects of laser immunotherapy using different immunoadjuvants and different direct tumor destruction mechanisms strongly support its hypothesized tandem effect in cancer treatment.These morphological findings suggest that both cell-mediated and humoral immune responses could be responsible for the observed tumor eradication and induced long-term tumor resistance.

3.3.2. ICG-PDT Associated with Radiotherapy

Many studies indicated that some radiation resistant tumor cells are sensitive to PDT and some PDT resistant tumor cells are more sensitive to ionizing radiation [105,106]. In the study of Colasanti *et al.*, [107], human prostate cancer cells were evaluated for growth after photodynamic therapy, radiotherapy, and combined treatment. ICG was tested as a photosensitizer and radiosensitizer. Two human cell lines were used: PC-3 derived from prostate carcinoma, and EPN derived from normal prostate tissue. The light source used for the photoactivation experiments was a diode laser that peaked at 805 nm. The light dose incident on cells was 108 J/cm^2. Ionizing radiation was produced by a linear accelerator, and the dose was 2, 4 and 6 Gy. Cytotoxicity was evaluated by measuring the colony forming ability of cells. The results show that ICG induces cell death by photoactivation, but it does not act as a radiosensitizer if used with ionizing radiation. Another study of Montazerabadi *et al.*, [108] was undertaken to evaluate the effects of ICG as a sensitizer of both photodynamic and radiation therapy on the MCF-7 human breast cancer cell line. Cells were incubated with ICG at different concentrations for 24 h and were then exposed in independent treatment groups to a non-coherent light at different fluence rates and X-ray ionizing radiation at different dose rates. Combination effects of this chemo, photo, and

radiotherapy were evaluated. The results showed that ICG had no significant cytotoxic effects up to 100 □M but as a photosensitizer had a strong cytotoxic effect on cancer cells. As already proved, ICG did not act as a radiosensitizer. It was interesting to find that 50 □M of ICG in combination with light at 60 J/cm^2 and 4 Gy of X-ray radiation killed cancer cells, reducing the percentage of viable cancer cells. According to the findings, the combined treatment of photodynamic therapy and radiotherapy produces an additive effect which does not depend on the sequence of the two treatments. Combined treatments could be more useful since they allow the reduction of the ionizing radiation dose to obtain the same effect as one obtainable by radiotherapy alone [107] and it appears that the adverse effects of PDT can be partially abated without reducing the efficacy of treatment [108].

3.3.3. ICG-PDT Associated with Chemotherapy

PDT can be safely combined with already established treatment options such as chemotherapy. Crescenzi *et al.*, [109] have evaluated whether treatment with ICG-PDT combined withlow-dose chemotherapy on breast cancer cells results in an effective outcome (additive or even synergistic) so that the dose of the two chemotherapy components or at least of the most toxic one (i.e., cisplatin) can be reduced. Photodynamic treatment was administered by irradiating ICG-preloaded MCF-7 cells with an IR diode laser source at 805 nm; cisplatin was used for chemotherapy. Viability and metabolic data demonstrated mutual reinforcement of therapeutic efficacy. Photodynamic treatment caused transient selective destruction of Bcl-2 and up-regulation of Bax. It also induced apoptosis in a limited fraction of cells (10-12%). Flow cytometry data showed that PDT killed mostly G1-phase cells, whereas cisplatin killed mostly S-phase cells. This disjointed phase-related effect may account for the favorable effects exerted by combined treatment. These findings imply that low doses of cytostatic drugs may be as effective, or even more effective, as classical chemotherapy. Obviously, this new therapeutic avenue is worth further investigation and should be tested in *in vivo* models with the aim of being applied to human therapy.

3.3.4. ICG-PDT Associated with Ultrasound

Nomikou *et al.*, [110] studied the effects of ICG with NIR radiation (830 nm), ultrasound or a combination of both stimuli. *In vitro* experiments were performed on RIF-1 mouse tumor cell lines and *in vivo* in syngeneic mice with RIF-1 tumors. They could observe a synergic effect upon the combination of the two treatments with low doses of ultrasound. Microscopic examination of cell populations treated with light or ultrasound demonstrated the production of intracellular ROS with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DHFA) which generates cell-associated fluorescence in the presence of ROS. Using a mouse tumour model treatment by PDT, ultrasound or ultrasound plus NIR led to respective decreases in tumor growth of 42, 67 and 98 % at day 27 post-treatment.

3.3.5. ICG-PDT Associated with Thermotherapy

The effectiveness of ICG-enhanced laser treatment of experimental ocular melanoma was investigated for the first time in 1993 by Liggett's team [111]. ICG administration was used to enhance the photocoagulation effects of the infrared laser in green amelanotic hamster melanoma implanted in the iris of rabbits. The 14 tumors treated with ICG-enhanced laser at 810 nm showed no growth after treatment; 4 of them showed total necrosis whereas the remaining 10 tumors demonstrated only rare viable cells around blood vessels or at the tumor periphery. In comparison, laser treatment without ICG resulted in only superficial tumor necrosis and the 4 tumors continued to grow after treatment. The authors concluded that with further evaluation, ICG-enhanced laser treatment may be useful in the treatment of ocular melanoma.

Indeed, in 2003, De Potter *et al.*, [112] realized a prospective, randomized and controlled study in order to determine the effect of ICG injection on the regression pattern of choroidal melanomas treated by transpupillary thermotherapy (TTT). 25 patients with selected choroidal melanoma were treated by TTT using an 810 nm diode laser. Adjuvant ICG administration before each TTT did not seem to be beneficial in the regression pattern.

Two years later, Liggett *et al.*, [113] evaluated whether the combination of simultaneous hyperthermia by TTT and PDT with ICG was an effective treatment for small and medium choroidal melanomas. Combined simultaneous TTT and ICG-based PDT was called CSTIP. 25 patients were treated. After a mean of 2.4 treatments (range 1 to 5 treatments) all of the tumors but one showed a significant volume reduction without clinical evidence of recurrences, for a follow-up that ranged from 6 to 59 months. Compared to De Potter *et al.*'s study [112] that had shown that ICG before TTT did not seem to be beneficial in the tumor regression pattern, this study differs in several ways: the timing of the laser treatment following the injection of ICG, the difference in laser parameters used during the treatment and the interval between treatments. Liggett *et al.*, [113] believe that CSTIP is effective in the treatment of small and medium choroidal melanomas.

4. ICG FOR HYPERTHERMIA

4.1. What is Hyperthermia?

The application of hyperthermia to cancer therapy is not new. Because of technological advances, interest has been renewed and several methods are currently under study clinically [www.cancer.gov]. Hyperthermia can be an effective cancer treatment modality because tumor cells are more sensitive to temperature elevation than normal cells [114].

A temperature of 42°C is considered sufficiently lethal to cancer cells but not to normal cells, probably because of protein denaturation, and poor DNA synthesis and repair, due to the comparatively lower oxygen level and pH of cancer cells [115]. The effectiveness of hyperthermia treatment is related to the temperature achieved during the treatment, as well as the length of treatment and cell and tissue characteristics. Most normal tissues are not damaged during hyperthermia if the temperature remains under 44°C for less than 30 minutes. However, the heat dissipation by blood flow in tumors is slower than that in normal tissues, and thus the temperature of tumor rises higher than that in normal tissue during heating. To ensure that the desired temperature is reached, but

not exceeded, the temperature of the tumor and surrounding tissue is monitored throughout the hyperthermia treatment.

Hyperthermia can be cytotoxic for cancer cells due to the inhibition of oxidative metabolism causing lower cellular pH and may also promote cell death by mechanisms such as cell membrane and cytoskeleton damage, as well as enhanced apoptosis.

The thermal effect can be strongly increased when combined with other treatment modalities the acute photothermal tissue interaction is needed for large-scale tumor cell destruction so that the body's defense system can fight against a much weakened tumor base. More importantly, the photothermal interaction is needed to expose tumor antigens in order to stimulate together with the *in situ* immunoadjuvant the host immune system against the residual tumor cells that survived the initial thermal assault and against the local tumor invasions and to remote metastases [116]. Liu *et al.*, [116] investigated the selective photothermal effect by using gel phantom to simulate targeted tumor tissue and chicken breast tissue. The target gel was buried inside the chicken breast tissue and the tissue-gel construct was irradiated. The authors showed a selective heating with an 805 nm-diode laser of target gel containing 0.27% ICG and buried 1 cm below the chicken tissue surface. The target gel experienced a temperature increase of more than 6°C whereas the surrounding chicken breast tissue experienced only a minor temperature effect. Kuo *et al.*, [117]observed that the right eyes of 9 young adult New Zealand white rabbits underwent transscleral cyclothermotherapy (TCT) following ICG treatment. In an effort to decrease the energy necessary to achieve destruction using transscleral diode laser thermotherapy, they combined the treatment with ICG in albino rabbits and evaluated the results. As a consequence ICG pretreatment reduced the energy necessary to cause a threshold lesion with TCT in non-pigmented rabbits.

4.2. ICG for Selective Photocoagulation

4.2.1. Acne

The application of ICG and high intensity diode laser irradiation for acne treatment was described as a promising approach based on selective photothermolysis of the sebaceous glands. A study of Lloyd *et al.*, [118] confirmed first the ability of ICG to penetrate into enlarged sebaceous glands. Then, they determined by laser-tissue interaction analysis the necessary parameters for the diode laser to effectively target the ICG loaded glands. In a last step, they determined whether selective destruction of the sebaceous glands could be achieved in patients that had active acne on their back and assessed the safety and efficacy of this novel treatment for acne. Histological examination of biopsy samples from the treated areas found selective necrosis of the sebaceous glands. Preliminary clinical results demonstrated a decrease in acne noted in the treatment area at 3, 6, and 10 months follow-up. Tuchin *et al.*, [119] demonstrated the efficacy of phototherapy in combination with topical application of ICG suggested for soft and thermal treatment of *acne vulgaris*. New technologies of soft and thermal acne lesions treatment were tested on 22 volunteers with facile or back-located acne. The observations during 1-2 months showed that soft acne treatments decreased the number of active elements, reduced erythema and inflammation, as well as considerably improving the skin state, without any side effects. At high power densities (up to 200 W/cm^2) ICG stained acne inflammatory elements were destroyed by light exposures of 0.5 seconds (803 nm). In conclusion, diode laser (803 or 839 nm) power densities in the range of 18 to 200 W/cm^2 provide a variety of economic and comfortable procedures of thermal destruction of ICG stained acne inflammatory elements as short light exposures (less than 0.5 seconds). Furthermore, Genina *et al.*, [120] carried out a clinical trial. For the thermotherapy of acne, the following laser parameters were used: λ_{exc}= 810 nm, 4 mm spot size, 50 ms pulse duration, 40 J/cm^2. NIR diode laser low-intensity (soft) phototherapy with the topical application of ICG has been suggested for treatment of acne vulgaris. 12 volunteers with acne lesions were enrolled in the experiment. Skin areas were 4*5cm^2 and were stained with ICG solution and irradiated at 803 nm at a power of 50 mW/cm^2 for 5 to 10 min. The authors showed that one month later, the treatment reduced inflammation and improved the state of the skin without any side effects. The results were more pronounced for patients with moderate to severe forms of acne. The improvement was about 80% for the group receiving multiple treatments. Single treatment did not have a prolonged effect.

4.2.2. Dermatology

For the treatment of vascular lesions, Babilas *et al.*, [75]used photothermolysis by laser (λ_{ex}= 805 nm; fluence rate: 106 kW/cm□ fluence: 3.2 J/cm□) of blood vessels directly after i.v. application of ICG of concentrations of 2 or 4 mg/kg body weight on male Syrian Golden Hamsters with titanium dorsal skinfold chambers. The reduction of blood vessel perfusion was proportional to the ICG-concentration and pulse duration; a 30 ms pulse duration (2 or 4 mg/kg *b.w.* ICG-concentration) was sufficient to induce a loss of perfusion even of blood vessels with a diameter less than 30 □m. Histology revealed photocoagulation of blood vessels up to 24 hours. This study shows an alternative approach to improve the treatment of port-wine stains (PWS) currently treated by the flash-pumped pulsed dye laser (FPDL) with a wavelength of 585 nm using the endogenous chromophore hemoglobin and pulse duration of 0.45 ms. Although clinical results of FPDL treatment are excellent in many cases, about 20% of PWS are resistant to this treatment.

Bäumler *et al.*, [121] proposed to improve blood vessel coagulation by iv introduction of ICG. They determined the plasma clearance rate, systemic toxicity and histological effects of ICG-assisted laser therapy in an animal model (Piglets) close to human skin. No hepatic toxicity was observed. Histological evaluation and clinical examination revealed no adverse skin reactions at 24 or 72 h after laser irradiation. The combination of ICG and diode laser irradiation showed highly selective damage of vessels. In light of these results, the authors suggest that ICG-assisted laser therapy could safely improve the clinical outcome of port wine stain or leg vein treatment with minimal adverse reactions. As blood perfusion in the human blood vessel system should be somewhat different to pigs, the ICG concentration and

plasma clearance rate will need to be re-evaluated in humans.

4.2.3. Ophtalmology

Wolfe and Csaky [122], in an attempt to reduce concomitant damage to the retina with laser photocoagulation and improve treatment outcomes, explored ICG in conjunction with a 810 nm diode laser in feeder vessel treatment as Flower did in 2000. The theoretical advantage of such a method includes localizing damage to a narrower region of the choroid thereby reducing unwanted injury to nearby structures such as the neural retina. Moreover, case reports have described successful low irradiance ICG photothrombosis [76]; The retinal arterioles of adult Lewis or Brown Norway rats were treated with diode laser alone or immediately following intravenous injection with 75 mg/mL ICG. The use of ICG adjuvant achieved complete vessel closure in albino animals with reperfusion seen in all vessels by 7 days. Nevertheless, it is limited by clot resolution due to both excessive vascular damage and an accompanying inflammatory response. To have more durable feeder vessel closure rates the authors suggested to use simultaneously an anti-inflammatory therapy or to use a less vascular damaging photoactivating dye.

4.2.4. Cancerology

Chen *et al.*, [123] carried out many *in vivo* studies. In 1995, a semiconductor laser was used in the study of photothermal effect on tumor cells. The laser produced an emission of 808 nm with a maximum output of 35 W. Laser treatment of cadaveric tumor tissue was performed and histological observations were promising. Thermal damage clearly occurred within regions with higher concentration of ICG, whereas peripheral tissues were less affected. The tissue samples injected with ICG showed clear photocoagulation at the center of ICG injection. In 1996, murine mammary tumors were treated using ICG and an 808 nm diode laser, and the *in vivo* chromophore enhanced photothermal effects on the tumor burden and on tumor rat survival were investigated. The photothermal interaction was apparent under all the treatment conditions with a well-defined spatial containment in this study and the tumor growth was slowed after treatment. The post-treatment observation showed tumor recurrence and metastasis; no long-term survival was achieved with a single application of laser in conjunction with ICG [101]. These results arouse a question as to the efficacy of the photothermal interaction, even though tumor cell destruction can be achieved on a large and controlled scale. However, this highly selective photothermal impact on the tumor tissue suggests that the method could be applied repeatedly to increase effectiveness and may serve as the precursor of other modalities, such as chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy, and surgery.

In two recent studies, Radzi *et al.*, [124,125] evaluated the optimal concentration of ICG and PHT post-irradiation time effects, by assessment of the cytotoxicity of the treatment on B16F10 murine melanoma. A concentration of 150 □M was chosen. They found that PHT can suppress the proliferation of melanoma cells in a dose-dependant manner *in vitro*. The morphological changes that characterize apoptosis are mainly cell shrinkage and rounding. A short irradiation time had an immediate effect on cell proliferation, and apoptotic and necrotic morphology were detected within 24 h. In addition, PHT requires a lower molar concentration of ICG and a lower light dose to achieve a significant reduction of cell viability and it enhanced the susceptibility of B16F10 cells to death.

The tissue effects of ICG potentiated 805 nm laser were assessed both *in vivo* using rat stomach and colon and *in vitro* using normal and neoplasic human gastric and colonic mucosa [126]. Intravenous ICG did not potentiate the 805 nm laser-tissue effects in *in vivo* studies. Local techniques of ICG applications (submucosal injection +- surface painting of 0.1% ICG solution) enhanced the total depth and diameter of laser induced thermal injury in all *in vitro* studies. Without ICG, enhancement of thermal tissue injury was minimal in normal gastric and colonic mucosa. This may permit targeting of the effects with minimal collateral damage during endoscopic laser palliation of advanced gastrointestinal malignancy.

4.3. Targeted PHT

Applications of ICG remain limited by its concentration-dependent aggregation, poor aqueous stability, nonspecific binding to proteins and lack of target specificity [127]. To overcome these limitations, further studies have been carried out with targeted PHT.

According to Yu *et al.*, [128], ICG-containing nanoparticle-assembled capsules (NACs) are capable of heat generation in response to NIR laser irradiation and are stable for multiple photothermal heating cycles. Fibroblast cells exposed to these capsules remain viable after 2 days of incubation. Yu *et al.*, [129] also studied Self-Assembly Synthesis, Tumor Cell Targeting, and Photothermal Capabilities of Antibody-Coated (anti-epidermal growth factor receptor (anti-EGFR)) ICG Nanocapsules. They analyzed the specificity of tumor cell targeting using three carcinoma cell lines with different levels of EGFR expression and investigated the photothermal effects of ICG nanocapsules on EGFR-rich tumor cells. Significant thermal toxicity was observed for encapsulated ICG as compared to free ICG at 808 nm laser irradiation with radiant exposure of 6 W/cm^2. These results illustrate the ability to design a colloidal material with cell targeting and heat generating capabilities using noncovalent chemistry.

Kuo *et al.*, [115,130,131] present the first examples of targeted Au nanorods simultaneously serving not only as photodynamic and photothermal agents to destroy A549 malignant cells but also as optical contrast agents to monitor cellular imaging. Gold nanoparticles are extensively exploited in organisms especially in the PDT fieldbecause of their good stability and biocompatibility (for reviews, see [44-46]). Au nanorods with a cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) surfactant coating were successfully synthesized. To conjugate ICG on the surface, CTAB was coated on the nanorods with PSMA (poly(styrene-alt-maleic acid)) polymer and ICG in sequence *via* an electrostatic interaction (length 35 nm, width 9.3 nm). The authors also synthesized targeted gold nanoparticles coated *via* electrostatic interaction with positively charged polyethylenimine (PEI). They obtained three sizes of Au-PEI-ICG NPs: 13, 50

and 100 nm. Anti-EGFR antibodies were electrostatically bound. The combination of PDT and hyperthermia enhanced the effectiveness of photodestruction compared to PDT or hyperthermia alone on the A549 cell line. The authors estimated the $^1O_2$ quantum yield of about 0.11 and 0.16 for respectively free ICG and coupled-ICG. The nanorods generated more $^1O_2$ than ICG alone. The authors demonstrated that Au-PEI-ICG NPs were better able not only to kill cancer cells than ICG but showed an effective destructiveness as the volume of NPs became larger.

In one study of Kuo *et al.* [130], the human lung carcinoma malignant cell line (A549), which overexpresses EGFR on the cell surface, was used to study the hyperthermia and PDT effect of Gold-poly(styrene-alt-maleic acid)-ICG nanorods (Au-PSMA-ICG). For specifically targeted NIR photochemical destruction, anti-EGFR antibodies (AbEGFR) were conjugated with ICG, Au-PSMA nanorods, and Au-PSMA-ICG nanorods. The photodestruction of A549 cells treated with Au-PSMA-ICG nanorods was performed using a continuous-wave diode laser with an 808 nm wavelength. Furthermore, the concentration of antibody conjugated on Au-PSMA-ICG nanorods was explored. The amount of antibody on gold nanorods would be related to the efficiency of photodestruction effect. Au-PSMA-ICG nanorods seemed to improve the efficacy of PDT and photothermal reactions compared with ICG and Au-PSMA nanorod treatment alone. The Au-PSMA-ICG nanorods generated more singlet oxygen than ICG alone, suggesting that Au-PSMA-ICG nanorods exhibit greater PDT efficiency. Moreover, the NIR irradiation-induced temperature produced by an 808 nm NIR laser changed for Au-PSMA nanorods and Au-PSMA-ICG nanorods as a function of exposure time. Without nanorod treatment, the A549 cells showed no damage after laser exposure; however, the viability of the ICG-treated and Au- PSMA-ICG nanorod-treated A549 cells fell after 2 minutes of laser exposure. According to these data, there was indeed an additive effect in the therapeutic efficacy of Au-PSMA-ICG nanorods. The resulting Au-PSMA-ICG nanorods simultaneously served as PDT and hyperthermia agents. Combined PDT and hyperthermia killed cancer cells more efficiently than PDT or hyperthermia treatment alone.

Zheng *et al.*, [127] used a novel ICG-containing nanostructure based on the noncovalent self-assembly chemistry between phospholipid-polyethylene glycol (PL-PEG) and ICG. Two representative targeting molecules, folic acid and integrin Rv□3 monoclonal antibody (mAb), were conjugated to the surface of the ICG-PL-PEG nanoprobe, displaying the diversity of ligand conjugation. The target specificity was confirmed using three cell lines with different levels of available folate receptors or integrin Rv□3 expression *via* laser scanning confocal microscope and flow cytometry. This specific ICG-PL-PEG nanoprobe could be internalized into targeted cells *via* a ligand-receptor mediated endocytosis pathway. *In vitro* experiments showed that internalized ICG-PL-PEG could be used for cell imaging and selective photothermal cell destruction. Likewise, Patel *et al.*, [132] showed the potential of multifunctional biodegradable and biocompatible PLGA nanoparticles (246 nm diameter) loaded with ICG. Successful cellular uptake of ligand conjugated PLGA-ICG nanoparticles by PC3 prostate cancer cells was obtained. Both phantom-based and *in vitro* cell culture demonstrated that the NPs had the great potential to induce local hyperthermia both in radius and depth, an increase of 8-10 °Cobserved in tissue within 5 mm. NPs were conjugated to RGD-4C peptides that are specific to □5□3$^+$ cells, folic acid or R11 peptides are cell-penetrating peptides specific to prostate cancer cells. R11 peptide exhibited the strongest ability of targeting prostate cancer as compared to RGD-4C and folic acid.

These results represent the first demonstration of the dual functionality of ICG-containing nanostructures for targeted optical imaging and photothermal or photodynamic therapy of cancerous cells. This novel type of nanostructure, when conjugated with other therapeutic and imaging agents, could become a multifunctional probe for cancer diagnosis and treatment [127]. Furthermore, combined PDT and hyperthermia can more efficiently extinguish cancer cells than PDT or hyperthermia treatment alone [130].

4.4. PHT and Chemotherapy

Tang et McGoron, [133] investigated the *in vitro* cytotoxic effect of combined chemotherapy and hyperthermia to a doxorubicin (DOX) resistant ovarian cancer cell line (SKOV-3). The effect of two different heating methods, ICG induced rapid rate heating and an incubator induced slow rate heating, were compared. All the experiments were conducted in 96-well plates. Cells were subjected to different concentrations of DOX and 60 min 43°C incubation or 5 □M of ICG with 1 min 808 nm NIR laser. An SRB assay was used to measure cell proliferation. ICG itself without laser irradiation was not toxic to SKOV-3 cells. The two types of hyperthermia individually produced similar cytotoxicity. DOX by itself was toxic with an IC50 value of about 5 □M. Hyperthermia in combination with DOX achieved significantly greater cell killing/growth inhibition at all DOX concentrations compared to DOX alone. A subadditive cytotoxic effect was observed by combining DOX and 60 min 43 °C incubation which lead to a lowered DOX IC50 value of about 1 □M. This value was even lower with 1 min laser-ICG photothermotherapy (0.1 □M) and, though not statistically significant, a synergistic effect may exist between DOX and laser-ICG photothermotherapy. The rate of heating may have an effect on chemotherapy-hyperthermia interaction. In conclusion, the combination of photothermal therapy and chemotherapy may provide a valuable tool for cancer treatment with minimized side effect.

4.5. PHT + Immunotherapy

Li *et al.*, [134] reported the preliminary clinical outcomes of the first series of 11 patients with advanced melanoma treated with *in situ* photoimmunotherapy (ISPI). ISPI is a promising therapeutic method that combines local, selective photothermal therapy using ICG with immunological stimulation using imiquimod as the immunoadjuvant. Imiquimod is an FDA-approved prescription medication that acts as an immune response modifier. ISPI consists of 3 main components applied directly to the cutaneous metastases: 1) local application of topical imiquimod; 2) injection of ICG; and 3) an 805 nm laser for local irradiation. In this series, a complete response was observed in six patients. Eight patients had complete disappearance of tumor from the regional lym-

Table 3. Clinical trials with ICG as a photothermal or photodynamicphotosensitizer.

Title	Start Date	Purpose	Study type	Study phase	Recruitment status	Status	Condition	Intervention	
Long Term Results of Combined Transpupillary Thermotherapy (TTT) Indocyanine Green (ICG) Based Photodynamic Therapy (PDT) in Choroidal Melanoma	January 2009	This is a report of combined Transpupillary thermotherapy (TTT) treatment with indocyanine green (ICG) in the control of small and medium sized choroidal melanomas	Obs.	-	Completed	No Results Available	Choroidal Melanoma	Procedure: TTT + ICG-based PDT	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT01253759
Laser Assisted Treatment of Chronic Sinusitis With and Without Light Activated Agents	May 2009	The study aims to treat chronic rhinosinusitis with an alternative to antibiotics, thus sparing volunteers prolonged antibiotic use and possible side effects, not to mention the cost and development of antibiotic resistant bacteria.	Int.	-	unknown	No Results Available	Rhinosinusitis	Device: Laser + ICG Device: Laser only	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00948519
Lucentis as an Adjuvant Therapy With TTT-ICG Based in Choroidal Melanoma	September 2007	To report preliminary results on safety and tolerability of intravitreal injection of Ranibizumab (Lucentis) combined with TTT + ICG based photodynamic therapy (PDT) in the treatment of choroidal melanoma	Int.	Phase 3	Active, not recruiting	No Results Available	Choroidal Melanoma	Procedure: Ranibizumab injection and TTT - ICG based	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00680225
Treatment of Patients With Neovascular AMD Using Indocyanine Green-Mediated Photothrombosis (i-MP).	April 2007	To etablish the safety and efficacy of ICG-mediated photothrombosis (i-MP) for the treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration	Int.	Phase 2	Unknown	No Results Available	Maculopathy, Age-Related	Procedure: ICG-Mediated Photothrombosis	http://ClinicalTrials.gov/show/NCT00331253

Obs.: Observational
Int.: Interventional

phatic drainage area, which is defined as a complete local response (CLR). Furthermore, CLR was observed in the non-treatment site lesions in 4 patients. The probability of a 12-month overall survival was 70%.

CONCLUSIONS

This review summed up the studies that have been carried out using ICG as a chemical compound for treatment. Depending on the energy used, it seems that three different mechanisms can occur:

- Fluorescence is the primary effect at very low laser power (inferior to 10 mW/cm^2) and ICG concentrations of 0.1 to 0.2 mg/kg body weight [88]. This was not the scope of the review.

- Phototoxicity *via* PDT was claimed for low power density of 5-10 W/cm^2 and exposure times of seconds or minutes [28,29,80]. Applying these low power densities in PDT there is hardly any detectable temperature increase in cells or tissue due to sufficient cooling *via* heat conduction. Therefore, it is rather unlikely that cells could suffer from thermal effects. Besides, other mechanisms could explain these results. For example [135],when cells are irradiated with visible and near-infrared wavelengths, in addition to the ability of photons to produce electronic excitation in chromophores, light induces a wave-like alternating electric field in a medium that is able to interact with polar structures and produce dipole transitions. These dipole transitions could explain the observed cell destruction.

The photodynamic effect of ICG has been explained by cell destruction due to the production of reactive oxygen species. Nevertheless, the mechanisms of actions are still not clear and even if some authors claimed that singlet oxygen is produced by an indirect method [71, 76, 81, 82, 101] the direct proof of singlet oxygen by the detection of its luminescence at 1270 nm failed.

- At high power density (Superior to 100W/cm^2) and short pulse duration, in the ms range, the temperature in the target can reach high values during ms irradiation which can be used for selective photothermolysis. A thermal effect (hyperthermia or selective photocoagulation) seems to be the main mechanism inducing a therapeutic effect. With a conventional ICG dose (2 mg/kg), 3 to 4 minutes after injection, the absorption of the blood is increased 10 fold at 800 nm, leading to a very efficient thermal effect.

The question of whether ICG is or is not a good PS for PDT is still controversial. As we showed in this review, although some papers claim that ICG is active in PDT, others claim it is not particularly effective. The comparison between the different studies is not obvious because the parameters used such as ICG concentrations, light fluence, irradiance are different. Moreover, they are comparatively high compared with those used with well-known PS. It is then difficult to separate photochemical effects based on generation of ROS form the triplet state from photothermal effects arising from the excited singlet state. Anyway, research is still very active in discovering all the potential of ICG and currently, six pre- or clinical studies aim to prove the effectiveness of ICG (Table **3**). Three studies use ICG as a photosensitizerin the treatment of choroidal melanoma. Clinical trials combine Transpupillary Thermo Therapy (TTT) to PDT using ICG with or without Ranibizumab. Another Phase1 trial is conducted inpatients with melanoma. This deals with the effects of imiquod combined with laser therapy with or without ICG in patients with melanoma of stage 3 or 4. Imiquodis well-known to boost the immune system and stop tumor growth. The study aims to determine the toxicity of photo immunotherapy and laser treatment with or without ICG. In this trial, they specifically propose that ICG is a photothermal sensitizer not a photodynamic sensitizer. A recent (2007), double-blind phase2 study attempts to prove the efficacy and safety of ICG coupled with photo thrombose for the treatment of age-related macular degeneration. Another recent trial started in 2009 is conducted on the treatment of bacterial infections, particularly rhinosinusitis.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

LIST OF ABBREVIATIONS

32-D-p210-GFP = Murine cell line,

CML = Chronic Myeloid Leukemia

AML = Acute Myeloid Leukemia

A549 = Human lung carcinoma malignant cell line

BxPc-3 = Pancreatic cell line

CRL1666 = Rat mammary adenocarcinoma

DHFA = 2', 7'-dichlorodihydrofluorescen diacetate

DMBA-4 = Breast cancer cell line

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

DPIBF = 1,3-diphenylisobenzofuran

EMT6 = Epithelial mammary carcinoma cells

EPN = Epithelial normal prostate tissue cells

FA = Folic acid

H 2 DCFDA = 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diactetate

HaCaT = Spontaneously immortalized human keratinocytes

HDF = Human dermal fibroblast

HepG = Human gingival epithelial cell line

HT-29 = Human colon carcinoma cell line

KB = Oral squamous cell carcinoma

mAb = Integrin □ □$_3$ monoclonal antibody

MCF-7 = Human breast cancer cells

MDA-MB231 = Breast cancer cell line

MIA PaCa-2 = Pancreatic cell line

N1 fibroblast = Skin from a healthy donor

PANC-1 = Pancreatic cell line

PC-3 = Prostate carcinoma cells

S91 = Mouse melanoma cells

Sk-Mel-28 = Human skin melanoma

SKMEL 188 = Human melanoma cells

SCL1 and SCL2 = Derived from squamous cell carcinomas of the skin

P388-D1 = American Type Culture Collection [ATCC] CCL46)

PC3 = Prostate cancer cells

QNR/K2RPE = Porcine retinal pigment endothelial cells

RIF-1 = Mouse fibrosarcoma cells

RPE = Retinal pigment epithelium cells

SKOV-3 = DOX resistant ovarian epithelial adenocarcinoma cell line

U87 = Human glioblastoma cancer cells

U-937 = Human monocytic (histiocytic lymphoma, CRL 1593) cells

V79 = Chinese hamster

REFERENCES

Reference 136 and 137 are related articles recently published.

[1] Fox, I.J.; Brooker, L.G.; Heseltine, D.W.; Essex, H.E.; Wood, E.H. A tricarbocyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc. Staff Meet Mayo Clin.*, **1957**, *32*(18), 478-484.

[2] Fox, I.J.; Wood, E.H. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc. Staff Meet Mayo Clin.*, **1960**, *35*, 732-744.

[3] Flower, R.W.; Hochheimer, B.F. Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. *Johns Hopkins Med. J.*, **1976**, *138*(2), 33-42.

[4] Porrini, G.; Giovannini, A.; Amato, G.; Ioni, A.; Pantanetti, M. Photodynamic therapy of circumscribed choroidal hemangioma. *Ophthalmology*, **2003**, *110*(4), 674-680.

[5] Lundjohassen, P. The Dye Dilution Method for Measurement of Cardiac-Output. *Eur. Heart J.*, **1990**, *11*, 6-12.

[6] Haller, M.; Akbulut, C.; Brechtelsbauer, H.; Fett, W.; Briegel, J.; Finsterer, U.; Peter, K. Determination of Plasma-Volume with Indocyanine Green in Man. *Life Sci.*, **1993**, *53*(21), 1597-1604.

[7] Moneta, G.; Brülisauer, M.; Jäger, K.; Bollinger, A. Infrared fluorescence videomicroscopy of skin capillaries with indocyanine green. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **1987**, *6*(1), 25-34.

[8] Paumgartner, G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz Med. Wochenschr.*, **1975**, *105*(17), 1-30.

[9] Motomura, K.; Inaji, H.; Komoike, Y.; Kasugai, T.; Noguchi, S.; Koyama, H. Sentinel node biopsy guided by indocyanin green dye in breast cancer patients. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **1999**, *29*(12), 604-607.

[10] Hammond, D.C.; Lane, F.R.; Welk, R.A.; Madura, M.J.; Borreson, D.K.; Passinault, W.J. Endoscopic tattooing of the colon. An experimental study. *Am. Surg.*, **1989**, *55*(7), 457-461.

[11] Desmettre, T.; Cohen, S.Y.; Devoisselle, J.M.; Gaudric, A. Intérêt et indications actuelles de l'angiographie au vert d'indocyanine (ICG). *J. Fr. Ophtalmol.*, **2011**, *34*(8), 568-582.

[12] Grosenick, D.; Wabnitz, H.; Ebert, B. Recent advances in contrast-enhanced near infrared diffuse optical imaging of diseases using indocyanine green. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **2012**, *20*(1), 203-221.

[13] Polom, K.; Murawa, D.; Rho, Y.; Nowaczyk, P.; Hünerbein, M.; Murawa, P. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer*, **2011**, *117*(21), 4812-4822.

[14] Schaafsma, B.E.; Mieog, J.S.D.; Hutteman, M.; Van der vorst, J.R.; Kuppen, P.J.K.; Löwik, C.W.G.M.; Frangioni, J.V.; Van de velde, C.J.H.; Vahrmeijer, A.L. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J. Surg. Oncol.*, **2011**, *104*(3), 323-332.

[15] Santra, S.; Kaittanis, C.; Perez, J.M. Cytochrome C encapsulating theranostic nanoparticles: a novel bifunctional system for targeted delivery of therapeutic membrane-impermeable proteins to tumors and imaging of cancer therapy. *Mol. Pharm.*, **2010**, *7*(4), 1209-1222.

[16] Kneipp, J.; Kneipp, H.; Rice, W.L.; Kneipp, K. Optical probes for biological applications based on surface-enhanced Raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*(8), 2381-2385.

[17] Withrow, K.P.; Gleysteen, J.P.; Safavy, A.; Skipper, J.; Desmond, R.A.; Zinn, K.; Rosenthal, E.L. Assessment of indocyanine green-labeled cetuximab to detect xenografted head and neck cancer cell lines. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2007**, *137*(5), 729-734.

[18] Villaraza, A.J.L.; Milenic, D.E.; Brechbiel, M.W. Improved speciation characteristics of PEGylated indocyanine green-labeled Panitumumab: revisiting the solution and spectroscopic properties of a near-infrared emitting anti-HER1 antibody for optical imaging of cancer. *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*(12), 2305-2312.

[19] Nakajima, T.; Mitsunaga, M.; Bander, N.H.; Heston, W.D.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Targeted, Activatable, *In vivo* Fluorescence Imaging of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Positive Tumors Using the Quenched Humanized J591 Antibody-Indocyanine Green (ICG) Conjugate. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*(8), 1700-1705.

[20] Jung, B.; Anvari, B. Synthesis and characterization of bovine serum albumin-coated nanocapsules loaded with indocyanine green as potential multifunctional nanoconstructs. *Biotechnol. Prog.*, **2012**, *28*(2), 533-539.

[21] Steigerwalt, R.D.J.; Pascarella, A.; Arrico, L.; Librando, A.; Plateroti, R.; Plateroti, A.M.; Plateroti, P.; Nebbioso, M. Idiopathic juxtafoveal retinal telangiectasis and retinal macroaneurysm treated with indocyanine green dye-enhanced photocoagulation. *Panminerva Med.*, **2012**, *54*(1), 93-96.

[22] Klein, A.; Buschmann, M.; Babilas, P.; Landthaler, M.; Bäumler, W. Indocyanine green-augmented diode laser therapy vs. long-pulsed Nd:YAG (1064 nm) laser treatment of telangiectatic leg veins: A randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, **2013**, *169*(2), 365-373.

[23] Bäumler, W.; Paasch, U.; Klein, A.; Landthaler, M.; Friedman, R.; Shafirstein, G. Intravenous injection of indocyanine green to enhance laser-assisted coagulation of blood vessels in skin - an animal study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2013**, *27*(2), 206-211.

[24] Klein, A.; Szeimies, R.M.; Bäumler, W.; Zeman, F.; Schreml, S.; Hohenleutner, U.; Landthaler, M.; Koller, M.; Babilas, P. Indocyanine green-augmented diode laser treatment of port-wine stains: clinical and histological evidence for a new treatment option from a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.*, **2012**, *167*(2), 333-342.

[25] Sadoqi, M.; Kumar, S.; Lau-Cam, C.; Saxena, V. In: *Biological and pharmaceutical nanomaterials*, 1st ed.Weinheim; Wiley-VCH, **2006**.

[26] Reindl, S.; Penzkofer, A.; Gong, S.H.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M.; Abels, C.; Bäumler, W. Quantum yield of triplet formation for indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, *105*(1), 65-68.

[27] Khosroshahi, M.E.; Nourbakhsh, M.S.; Saremi, S.; Tabatabaee, F. Characterization of skin tissue soldering using diode laser and indocyanine green: *in vitro* studies. *Lasers Med. Sci.*, **2010**, *25*(2), 207-212.

[28] Saxena V.; Sadoqi M.; Shao J. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, **2003**, *92*(10), 2090-2097.

[29] Engel, E.; Schraml, R.; Maisch, T.; Kobuch, K.; König, B.; Szeimies, R.M.; Hillenkamp, J.; Bäumler, W.; Vasold, R. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2008**, *49*(5), 1777-1783.

[30] Cherrick, G.R.; Stein, S.W.; Leevy, C.M.; Davidson, C.S. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.*, **1960**, *39*, 592-600.

[31] Flock, S.T.; Jacques, S.L. Thermal damage of blood vessels in a rat skin-flap window chamber using indocyanine green and a pulsed alexandrite laser: A feasibility study. *Laser Med. Sci.*, **1993**, *8*(3), 185-196.

[32] Hollins, B.; Noe, B.; Henderson, J.M. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin. Chem.*, **1987**, *33*(6), 765-768.

[33] Mc Evoy, G. In: *AHFS Drug Information 1990*. Ed.; American Society of Health System Pharmacists: Bethseda, USA, **1990**; pp.1311-1312.

[34] Ott, P.; Keiding, S.; Johnsen, A.H.; Bass, L. Hepatic removal of two fractions of indocyanine green after bolus injection in anesthetized pigs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **1994**, *266*(6), 1108-1122.

[35] Yaseen M. A.; Yu J.; Wong M. S.; Anvari B. Stability assessment of indocyanine green within dextran-coated mesocapsules by absorbance spectroscopy. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(6), 064031.

[36] Taichman, G.C.; Hendry, P.J.; Keon, W.J. The use of cardio-green for intraoperative visualization of the coronary circulation: evaluation of myocardial toxicity. *Tex. Heart Inst. J.*, **1987**, *14*(2), 133-138.

[37] Hopeross, M.; Yannuzzi, L.; Gragoudas, E.; Guyer, D.; Slakter, J.; Sorenson, J.; Krupsky, S.; Orlock, D.; Puliafito, C. Adverse Reactions Due to Indocyanine Green. *Ophthalmology*, **1994**, *101*(3), 529-533.

[38] Iriyama, A.; Uchida, S.; Yanagi, Y.; Tamaki, Y.; Inoue, Y.; Matsuura, K.; Kadonosono, K.; Araie, M. Effects of indocyanine green on retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.*, **2004**, *45*(3), 943-947.

[39] Sharma, P.; Bengtsson, N.E.; Walter, G.A.; Sohn, H.B.; Zhou, G.; Iwakuma, N.; Zeng, H.; Grobmyer, S.R.; Scott, E.W.; Moudgil, B.M. Gadolinium-Doped Silica Nanoparticles Encapsulating Indocyanine Green for Near Infrared and Magnetic Resonance Imaging. *Small*, **2012**, *8*(18), 2856-2868.

[40] Philip, R.; Penzkofer, A.; Bäumler, W.; Szeimies, R.M.; Abels, C. Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol.*, **1996**, *96*(1), 137-148.

[41] Russin, T.J.; Altino lu, E.I.; Adair, J.H.; Eklund, P.C. Measuring the fluorescent quantum efficiency of indocyanine green encapsulated in nanocomposite particulates. *J. Phys. Condens. Matter*, **2010**, *22*(33), 334217.

[42] Park,H.S.; Lee, J.E.; Cho, M.Y.; Hong, J.H.; Cho, S.H.; Lim, Y.T. Hyaluronic Acid/Poly (L-Amino Ester) Polymer Nanogels for Cancer-Cell-Specific NIR Fluorescence Switch. *Macromol. Rapid Commun.*, **2012**, *33*(18), 1549-1555.

[43] Yaseen, M.A.; Yu, J.; Jung, B.; Wong, M.S.; Anvari, B. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. *Mol. Pharm.*, **2009**, *6*(5), 1321-1332.

[44] Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*(11), 612 621.

[45] Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*, **2010**, *2*(7), 1083.

[46] Chouikrat, R.; Seve, A.; Vanderesse, R.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O.; Verelst, M.; Frochot, C. Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*(6), 781 792.

[47] Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: biodistribution in healthy mice. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *308*(1), 200-204.

[48] Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* release. *Int. J. Pharm.*, **2004**, *278*(2), 293 301.

[49] Kim, T.H.; Mount, C.W.; Dulken, B.W.; Ramos, J.; Fu, C.J.; Khant, H.A.; Chiu, W.; Gombotz, W.R.; Pun, S.H. Filamentous, Mixed Micelles of Triblock Copolymers Enhance Tumor Localization of Indocyanine Green in a Murine Xenograft Model. *Mol. Pharm.*, **2011**, *9*(1), 135-143.

[50] Kim, G.; Huang, S.W.; Day, K.C.; O'Donnell, M.; Agayan, R.R.; Day, M.A.; Kopelman, R.; Ashkenazi, S. Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging. *J. Biomed. Opt.*, **2007**, *12*(4), 044020.

[51] Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G.J.; Simons, J.W. Nanotechnology applications in cancer. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **2007**, *9*, 257 288.

[52] Usui, Y.; Tsukada, M.; Nakamura, H. Kinetics studies of photosensitized oxygenation by singlet oxygen in aqeous micellar solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1978**, *51*, 379 384.

[53] Pernot, M.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M. In: *Advances in photodynamic therapy II*;Hamblin M.; Huang Y. Y., In press.

[54] Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 24 36.

[55] Ma, Y.; Sadoqi, M.; Shao, J. Biodistribution of indocyanine green-loaded nanoparticles with surface modifications of PEG and folic acid. *Int. J. Pharm.*, **2012**, *436*(1-2), 25-31.

[56] Rungta, P.; Bandera, Y.P.; Roeder, R.D.; Li, Y.; Baldwin, W.S.; Sharma, D.; Sehorn, M.G.; Luzinov, I.; Foulger, S.H. Selective Imaging and Killing of Cancer Cells with Protein-Activated Near-Infrared Fluorescing Nanoparticles. *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*(7), 927-937.

[57] Macdonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2001**, *5*(2), 105 129.

[58] Weishaupt, 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*(7), 2326 2329.

[59] Omar, G.S.; Wilson, M.; Nair, S.P. Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light. *BMC Microbiol.*, **2008**, *8*(1), 111.

[60] Topaloglu, N.; Yuksel, S.; Gulsoy, M. In: *Optimization of parameters in photodynamic therapy to kill P. aeruginosa with 809-nm diode laser and indocyanine green,* Proceedings of the SPIE 8210 Photonics West, BIOS Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXI, January 21-26, 2012; Kessel, D. H.; Hasan, T.,San Fransisco, Califonia, USA, **2013**.

[61] Perni, S.; Pratten, J.; Wilson, M.; Piccirillo, C.; Parkin, I.P.; Prokopovich, P. Antimicrobial Properties of Light-activated Polyurethane Containing Indocyanine Green. *J. Biomater. Appl.*, **2011**, *25*(5), 387 400.

[62] Boehm, T.K.; Ciancio, S.G. Diode laser activated indocyanine green selectively kills bacteria. *J. Int. Acad. Periodontol.*, **2011**, *13*(2), 58 63.

[63] Nouri, K.; Villafradez-Diaz, L.M. Light/laser therapy in the treatment of acne vulgaris. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2005**, *4*(4), 318-320.

[64] Hamilton, F.L.; Car, J.; Lyons, C.; Car, M.; Layton, A.; Majeed, A. Laser and other light therapies for the treatment of acne vulgaris: systematic review. *Br. J. Dermatol.*, **2009**, *160*(6), 1273-1285.

[65] Sigurdsson, V.; Knulst, A.C.; Vanweelden, H. Phototherapy of acne vulgaris with visible light. *Dermatology*, **1997**, *194*(3), 256 260.

[66] Kjeldstad, B.; Johnsson, A. An action spectrum for blue and near ultraviolet in activation of Propionibacterium acnes: with emphasis on a possible porphyrin photosensitization. *Photochem. Photobiol.*, **1986**, *43*(1), 67-70.

[67] Nouri, K.; Ballard, C.J. Lasers alleviate acne. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2004**, *3*(3), 182-183.

[68] Nouri, K.; Ballard, C.J. Laser therapy for acne. *Clin. Dermatol.*, **2006**, *24*(1), 26-32.

[69] Taub, A.M.Y.F. Procedural treatments for acne vulgaris. *Dermatol. Surg.*, **2007**, *33*(9), 1005-1026.

[70] Elsaie, M.L.; Choudhary, S. Photodynamic therapy in the management of acne: an update. *J. Cosmet. Dermatol.*, **2010**, *9*(3), 211-217.

[71] Kim, B.J.; Lee, H.G.; Woo, S.M.; Youn, J.I.; Suh, D.H. Pilot study on photodynamic therapy for acne using indocyanine green and diode laser. *J. Dermatol.*, **2009**, *36*(1), 17-21.

[72] Jang, M.S.; Doh, K.S.; Kang, J.S.; Jeon, Y.S.; Suh, K.S.; Kim, S.T. A comparative split-face study of photodynamic therapy with indocyanine green and indole-3-acetic acid for the treatment of acne vulgaris. *Br. J. Dermatol.*, **2011**, *165*(5), 1095-1100.

[73] Kim, S.; Cho, K.H. Clinical trial of pin-point photodynamic therapy using an optic fiber for the improvement of enlarged facial pores: A case study. *J. Dermatol. Treat.*, **2009**, *20*(1), 36 41.

[74] Klein, A.; Bäumler, W.; Koller, M.; Shafirstein, G.; Kohl, E.A.; Landthaler, M.; Babilas, P. Indocyanine green-augmented diode laser therapy of telangiectatic leg veins: A randomized controlled proof-of-concept trial. *Lasers Surg. Med.*, **2012**, *44*(5), 369-376.

[75] Babilas, P.; Shafirstein, G.; Baier, J.; Schacht, V.; Szeimies, R.M.; Landthaler, M.; Bäumler,W.; Abels, C. Photothermolysis of blood vessels using indocyanine green and pulsed diode laser irradiation in the dorsal skinfold chamber model. *Lasers Surg. Med.*, **2007**, *39*(4), 341-352.

[76] Costa, R.A.; Farah, M.E.; Freymüller, E.; Morales, P.H.; Smith, R.; Cardillo, J.A. Choriocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green. *Am. J. Ophthalmol.*, **2001**, *132*(4), 557-565.

[77] Sato, T.; Ito, M.; Ishida, M.; Karasawa, Y. Phototoxicity of Indocyanine Green under Continuous Fluorescent Lamp Illumination and Its Prevention by Blocking Red Light on Cultured Muller Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2010**, *51*(8), 4337 4345.

[78] Kernt, M.; Hirneiss, C.; Wolf, A.; Liegl, R.; Rueping, J.; Neubauer, A.; Alge, C.; Ulbig, M.; Gandorfer, A.; Kampik, A.; Haritoglou, C. Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmol.*, **2010**, *90*(6), 571 579.

[79] Sippy, B.D.; Engelbrecht, N.E.; Hubbard, G.B.; Moriarty,S.E.; Jiang, S.; Aaberg, T.M.; Grossniklaus H. E.; Sternberg P. Indocyanine green effect on cultured human retinal pigment epithelial cells: implication for macular hole surgery. *Am. J. Ophthalmol.*, **2001**, *132*(3), 433-435.

[80] Fickweiler, S.; Szeimies, R.M.; Bäumler, W.; Steinbach, P.; Karrer,S.; Goetz, A.E.; Abels, C.; Hofstädter, F. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol.*, **1997**, *38*(2), 178-183.

[81] Abels, C.; Fickweiler, S.; Weiderer, P.; Bäumler, W.; Hofstädter, F.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch. Dermatol. Res.*, **2000**, *292*(8), 404-411.

[82] Mamoon, A.M.; Gamal-Eldeen, A.M.; Ruppel, M.E.; Smith, R.J.; Tsang, T.; Miller, L.M. *In vitro* efficiency and mechanistic role of indocyanine green as photodynamic therapy agent for human melanoma. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2009**,*6*(2), 105 116.

[83] Urbanska, K.; Romanowska-Dixon, B.; Matuszak, Z.; Oszajca, J.; Nowak-Sliwinska, P.; Stochel, G. Indocyanine green as a prospec-

tive sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. *Acta Biochim. Pol.*, **2002**, *49*(2), 387□391.

[84] Sk□ivanová, K.; □korpíková, J.; □vihálek, J.; Mornstein, V.; Janisch, R. Photochemical properties of a potential photosensitiser indocyanine green *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol.*, **2006**, *85*(2), 150□154.

[85] Bäumler, W.; Abels, C.; Karrer, S.; Weiß, T.; Messmann, H.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *Br. J. Cancer*, **1999**, *80*(3-4), 360□363.

[86] Funayama, T.; Sakane, M.; Abe, T.; Ochiai, N. Photodynamic Therapy with Indocyanine Green Injection and Near-Infrared Light Irradiation Has Phototoxic Effects and Delays Paralysis in Spinal Metastasis. *Photomed. Laser Surg.*, **2012**, *30*(1), 47□53.

[87] Bozkulak,O.; Yamaci, R.F.; Tabakoglu, O.; Gulsoy, M. Photo-toxic effects of 809-nm diode laser and indocyanine green on MDA-MB231 breast cancer cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2009**, *6*(2), 117-121.

[88] Shafirstein, G.; Bäumler, W.; Hennings, L.J.; Siegel, E.R.; Friedman, R.; Moreno, M.A.; Webber, J.; Jackson, C.; Griffin, R.J. Indocyanine green enhanced near-infrared laser treatment of murine mammary carcinoma. *Int. J. Cancer*, **2011**, *130*(5), 1208-1215.

[89] Lim,H.J.; Oh, C.H. Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785 nm light emitting diode for oral squamous cancer cells. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, **2011**, *8*(4), 337□342.

[90] Varriale, L.; Crescenzi, E.; Paba, V.; Mazziotti Di Celso, B.; Palumbo, G. Selective light-induced modulation of bcl-XL and bax expressions in indocyanine green-loaded U937 cells: effects of continuous or intermittent photo-sensitization with low IR-light using a 805-nm diode laser. *J. Photochem. Photobiol.*, **2000**, *57*(1), 66-75.

[91] Barth, B.M.I.; Altino□ lu, E.; Shanmugavelandy, S.S.; Kaiser, J.M.; Crespo-Gonzalez, D.; Divittore, N.A.; Mcgovern, C.; Goff, T.M.; Keasey, N.R.; Adair, J.H.; Loughran, T.P.; Claxton, D.F.; Kester, M. Targeted Indocyanine-Green-Loaded Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for *In vivo* Photodynamic Therapy of Leukemia. *ACS Nano*, **2011**, *5*(7), 5325□5337.

[92] Tseng, W.W.; Saxton, R.E.; Deganutti, A.; Liu, C.D. Infrared Laser Activation of Indocyanine Green Inhibits Growth in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas*, **2003**, *27*(3), 42□45.

[93] Abels, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*(8), 765-771.

[94] Abels, C.; Karrer, S.; Bäumler, W.; Goetz, A.; Landthaler, M.; Szeimies, R.M. Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma. *Br. J. Cancer*, **1998**, *77*(6), 1021□1024.

[95] Kawaguchi, A.; Nagao, S.; Takebayashi, K.; Higashiyama, M.; Komoto, S.; Hokari, R.; Miura, S. Long-term outcome of endoscopic semiconductive diode laser irradiation therapy with injection of indocyanine green for early gastric cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2008**, *23*(8), 1193-1199.

[96] Chen, W.R.; Jeong, S.W.; Lucroy, M.D.; Wolf, R.F.; Howard, E.W.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Induced antitumor immunity against DMBA-4 metastatic mammary tumors in rats using laser immunotherapy. *Int. J. Cancer*, **2003**, *107*(6), 1053□1057.

[97] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Carubelli, R.; Nordquist, R.E. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. *Cancer Lett.*, **1997**, *115*(1), 25-30.

[98] Chen, W.R.; Zhu, W.G.; Dynlacht, J.R.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Long-term tumor resistance induced by laser photo-immunotherapy. *Int. J. Cancer*, **1999**, *81*(5), 808-812.

[99] Chen, W.R.; Singhal, A.K.; Liu, H.; Nordquist, R.E. Antitumor immunity induced by laser immunotherapy and its adoptive transfer. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(2), 459-461.

[100] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808-nm diode laser.*Cancer Lett.*, **1995**, *94*(2), 125-131.

[101] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Higgins, A.K.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an *in vivo* efficacy study. *Cancer Lett.*, **1996**, *98*(2), 169-173.

[102] Chen, W.R.; Liu, H.; Ritchey, J.W.; Bartels, K.E.; Lucroy, M.D.; Nordquist, R.E. Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Res.*, **2002**, *62*(15), 4295-4299.

[103] Lucroy, M.D.; Chen, W.R.; Ridgway, T.D.; Higbee, R.G.; Bartels, K.E. Selective laser-induced hyperthermia for the treatment of spontaneous tumors in dogs. *J. X-Ray Sci. Technol.*, **2002**, *10*(3-4), 237□243.

[104] Chen, W.R. Enhancement of Laser Cancer Treatment by a Chitosan-derived Immunoadjuvant. *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*(1), 190-195.

[105] Luksiene, Z.; Berg, K.; Moan, J.In: *Combination of Photodynamic Therapy and X-Irradiation - a Study on 5-Ala Radiomodifying Properties*. Proceedings Volume 2325 of Photodynamic Therapy of Cancer II,September 6, 1994; Brault D.; Jori G.; Moan J.; Ehrenberg B.; Lille, France, **1995**, ofBellingham : Spie - Int Soc Optical Engineering, 1995. ISBN : 0-8194-1658-4.

[106] Berg, K.; Luksiene, Z.; Moan, J.; Ma, L. Combined Treatment of Ionizing-Radiation and Photosensitization by 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-Ix. *Radiat. Res.*,**1995**, *142*(3), 340□346.

[107] Colasanti, A.; Kisslinger, A.; Quarto, M.; Riccio, P. Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an *in vitro* human prostate model. *Acta Biochim. Pol.*, **2004**, *51*(4), 1039-1046.

[108] Montazerabadi, A.R.; Sazgarnia, A.; Bahreyni-Toosi, M.H.; Ahmadi, A.; Aledavood, A.The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *J. Photochem. Photobiol.*, **2012**, *109*, 42-49.

[109] Crescenzi, E.; Varriale, L.; Iovino, M.; Chiaviello, A.; Veneziani, B.M.; Palumbo, G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, *3*(5), 537-544.

[110] Nomikou, N.; Sterrett, C.; Arthur, C.; Mccaughan, B.; Callan,J.F.; Mchale, A.P.The Effects of Ultrasound and Light on Indocyanine-Green-Treated Tumour Cells and Tissues. *Chem. Med. Chem.*, **2012**, *7*(8), 1465□1471.

[111] Chong, L.P.; Ozler, S.A.; De Queiroz, J.M.J.; Liggett, P.E. Indocyanine green-enhanced diode laser treatment of melanoma in a rabbit model. *Retina*, **1993**, *13*(3), 251□259.

[112] De Potter, P.; Jamart, J. Adjuvant indocyanine green in transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma. *Ophthalmology*, **2003**, *110*(2), 406□413.

[113] Liggett, P.E.; Lavaque, A.J.; Chaudhry, N.A.; Jablon, E.P.; Quiroz-Mercado, H. Preliminary results of combined simultaneous transpupillary thermotherapy and ICG-based photodynamic therapy for choroidal melanoma. *Ophthalmic Surg. Laser Imag.*, **2005**, *36*(6), 463□470.

[114] Anghileri, L.; Robert, J. *Hyperthermia in cancer treatment*, CRC Press,**1986**.

[115] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yang, M.H.; Chien, Y.H.; Chen, S.J.; Yeh, C.S. In: *Near-infrared Au nanorods in photodynamic therapy, hyperthermia agents, and near-infrared optical imaging*, Proceedings of Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications III,February 11, 2011; Samuel Achilefu; Ramesh Raghavachari, San Francisco, California, USA, **2011**.

[116] Liu, V.G.; Cowan, T.M.; Jeong, S.W.; Jacques, S.L.; Lemley, E.C.; Chen, W.R. Selective photothermal interaction using an 805-nm diode laser and indocyanine green in gel phantom and chicken breast tissue. *Lasers Med. Sci.*, **2002**, *17*(4), 272-279.

[117] Kuo, P.C.; Peyman, G.A.; Men, G.; Bezerra, Y.; Torres, F.The effect of indocyanine green pretreatment on the parameters of transscleral diode laser thermotherapy-induced threshold coagulation of the ciliary body. *Lasers Surg. Med.*, **2004**, *35*(2), 157-162.

[118] Lloyd, J.R.; Mirkov, M. Selective photothermolysis of the sebaceous glands for acne treatment. *Lasers Surg. Med.*, **2002**, *31*(2), 115□120.

[119] Tuchin, V.V.; Genina,E.A.; Bashkatov, A.N.; Simonenko, G.V.; Odoevskaya, O.D.; Altshuler, G.B. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment. *Lasers Surg. Med.*, **2003**, *33*(5), 296-310.

[120] Genina, E.A.; Bashkatov, A.N.; Simonenko, G.V.; Odoevskaya, O.D.; Tuchin, V.V.; Altshuler, G.B. Low-intensity indocyanine-green laser phototherapy of acne vulgaris: Pilot study. *J. Biomed. Opt.*, **2004**, *9*(4), 828.

[121] Bäumler, W.; Paasch, U.; Klein, A.; Landthaler, M.; Friedman, R.; Shafirstein, G. Intravenous injection of indocyanine green to en-

hance laser-assisted coagulation of blood vessels in skin-an animal study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2013**, *27*(2), 206-211.

[122] Wolfe, J.D.; Csaky, K.G. Indocyanine green enhanced retinal vessel laser closure in rats: histologic and immunohistochemical observations. *Exp. Eye Res.*, **2004**, *79*(5), 631□638.

[123] Chen, W.R.; Adams, R.L.; Bartels, K.E.; Nordquist, R.E. Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer lett.*, **1995**, *94*(2), 125-131.

[124] Radzi, R.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Nakayama, Y.; Okamoto, Y. Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG) induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in B16F10 Murine Melanoma Cells. *J. Vet. Med. Sci.*, **2012**, *74*(5), 545□551.

[125] Radzi, R.; Osaki, T.; Tsuka, T.; Imagawa, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Morphological Study in B16F10 Murine Melanoma Cells after Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG). *J. Vet. Med. Sci.*, **2012**, *74*(4), 465□472.

[126] Greenwell, T.; Wyman, A.; Rogers, K. Chromophore-enhanced 805 nm laser therapy for gastrointestinal neoplasia. *Eur J. Surg. Oncol.*, **2001**, *27*(4), 368□372.

[127] Zheng, X.; Xing, D.; Zhou, F.; Wu, B.; Chen, W.R. Indocyanine Green-Containing Nanostructure as Near Infrared Dual-Functional Targeting Probes for Optical Imaging and Photothermal Therapy. *Mol. Pharm.*, **2011**, *8*(2), 447□456.

[128] Yu, J.; Yaseen, M.A.; Anvari, B.; Wong, M.S. Synthesis of Near-Infrared-Absorbing Nanoparticle-Assembled Capsules. *Chem. Mater.*, **2007**, *19*(6), 1277□1284.

[129] Yu, J.; Javier, D.; Yaseen, M.A.; Nitin, N.; Richards-Kortum, R.; Anvari, B.; Wong, M.S. Self-assembly synthesis, tumor cell targeting, and photothermal capabilities of antibody-coated indocyanine green nanocapsules. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*(6), 1929-1938.

Received: July 18, 2013 Revised: October 08, 2013 Accepted: December 10, 2013

[130] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yang, M.H.; Chien, Y.H.; Chen,S.J.; Yeh, C.S. Gold Nanorods in Photodynamic Therapy, as Hyperthermia Agents, and in Near-Infrared Optical Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*(15), 2711□2715.

[131] Kuo, W.S.; Chang, Y.T.; Cho, K.C.; Chiu, K.C.; Lien, C.H.; Yeh, C.S.; Chen, S.J. Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*, **2012**, *33*(11), 3270□3278.

[132] Patel, R.H.; Wadajkar, A.S.; Patel, N.L.; Kavuri, V.C.; Nguyen, K.T.; Liu, H. Multifunctionality of indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles for enhanced optical imaging and hyperthermia intervention of cancer. *J. Biomed. Opt.*, **2012**, *17*(4), 046003.

[133] Tang, Y.; Mcgoron, A.J. Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells. *J. Photochem. Photobiol.*, **2009**, *97*(3), 138-144.

[134] Li, X.; Naylor, M.F.; Le, H.; Nordquist, R.E.; Teague, T.K.; Howard, C.A.; Murray, C.; Chen, W.R. Clinical effects of in situ photoimmunotherapy on late-stage melanoma patients: A preliminary study. *Canc. Biol. Ther.*, **2010**, *10*(11), 1081□1087.

[135] Amat, A.; Rigau, J.; Waynant, R.W.; Ilev, I.K.; Anders, J.J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, **2006**, *82*(2), 152□160.

[136] Huang, L.; Chen, T.C.; Lin, F.H. Luminol as in situ light source in meso-tetraphenylporphyrin-mediated photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2013**, *20*(9), 1195-1202.

[137] Ferreira, D.M.; Saga, Y.Y.; Aluicio-Sarduy, E.; Tedesco, A.C. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by Photodynamic Therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives. *Curr. Med. Chem.*, **2013**, *20*(14), 1904-1911.

Example Chapter

Title Page

Chapter XX

Production of singlet oxygen by nanoparticle-bound photosensitizers

Stallivieri A.[a], Baros F.[a], Arnoux P.[a], Vanderesse R.[b], Barberi-Heyob M.[c], Frochot C.[a]

[a] LRGP, CNRS UMR 7274, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, BP 20451 -54001 Nancy cedex, France
[b] LCPM, FRE CNRS 3564, Université de Lorraine, ENSIC, 1 rue Grandville, BP 20451 -54001 Nancy cedex, France
[c] CRAN, CNRS UMR 7039, Université de Lorraine, Campus SciencesBP 70239 - 54506 Vandœuvre Cedex, France

Corresponding Author Email: Celine.frochot@univ-lorraine.fr

Table of Contents

Chapter X – Production of singlet oxygen by photosensitizers encapsulated or covalently linked into inorganic nanoparticles

X.1 Introduction

X.2 Gold Nanoparticles

X.3 Carbon Nanotubes

X.4 Graphene

X.5 Mg-Al Hydroxides

X.6 Iron Oxide with Polyacrylamide or Silica

X.7 Iron oxide

X.8 Silica

X.9 Conclusion and perspectives

X.1 Introduction

For PDT to be both effective and safe, it is very important to deliver the photosensitizer mainly to the target cells and not to non-target cells. To improve this selectivity, a strategy is to use nanoparticles. Indeed, thanks to their size, nanoparticles allow selective accumulation of the PS in cancer cells, due to the enhanced permeability and retention effects of tumour tissues. Liposomes, micelles, polymer-based nanoparticles and dendrimers are nanostructures into which the PS is encapsulated and from which it is released into the target cells. After light excitation, the triplet PS can react with surrounding molecular oxygen by the type 1 or type 2 pathway in which singlet oxygen ($^1O_2$*) is produced. These types of nanoparticles will not be described here. Instead, in this chapter we will focus specifically on nanoparticles possessing a three-dimensional rigid matrix, concentrating on the production of singlet oxygen ($^1O_2$*) after excitation of PS that are coupled or encapsulated into these nanoparticles [1,2]. With this type of nanoparticle, the mechanisms of PS action are slightly different from those described to date. The PS are not released into the target cells, but molecular oxygen has to diffuse into the nanoparticles and $^1O_2$* has to diffuse out of the nanoparticles. Different factors can influence the formation and the consumption of $^1O_2$* namely i) oxygen access: nanoparticles' matrix should be porous enough to be permeable to molecular oxygen as well as to $^1O_2$*; ii) $^1O_2$* can be quenched by the nanoparticle itself or by the surface agents before being able to reach the target cells. The chemical composition of the nanoparticle should be well-defined. In other cases, for example in gold nanoparticles (AuNPs), the surface plasmonic effect enhances the photocurrent after light irradiation, which can lead to an AuNPs-PS energy transfer and an increase in $^1O_2$* formation ; iii) $^1O_2$* can react with the photosensitizer itself, leading to photobleaching; iv) $^1O_2$* can be quenched by a non-target substrate. This means that the localisation of the nanoparticle is of great importance; v) the effects of PS loading: most of the PS are hydrophobic and tend to aggregate. The amount of PS linked or encapsulated should be carefully controlled to avoid stacking of the PS that would lead to a decrease of $^1O_2$*formation.

Among the hundreds of papers describing the synthesis and characterization of nanoparticles and detection of $^1O_2$*, we shall concentrate on just those papers whose authors compared the production of $^1O_2$* from the photosensitizer encapsulated or grafted into the nanoparticle with the production of $^1O_2$* of the same photosensitizers in solution. The aim of this is to better understand the influence of the encapsulation of the PS onto the $^1O_2$* production. Table 1 shows the papers we collected which describe the production of $^1O_2$* formed by photosensitizers encapsulated or covalently linked into inorganic nanoparticles. This does not however include quantum dots and all the nanoparticles which produce $^1O_2$* by themselves such as TiO_2, ZnO and fullerene in which no PS have been encapsulated. Even if many authors discuss the formation of singlet oxygen by different techniques, there are in fact relatively few publications whose authors compare the $^1O_2$* formation of the PS

alone to the PS coupled to the nanoparticles. In the papers we analyzed the results by defining three types of nano-objects: nanoparticles in which the Φ_Δ of photosensitizers increases compared to free photosensitizers, nanoparticles in which the Φ_Δ of the encapsulated PS decreases compared to Φ_Δ of the free photosensitizer and systems in which Φ_Δ of the encapsulated or free PS are similar. We shall list the types of nanoparticles according to whether the photosensitizer is encapsulated (E) or covalently linked; whether *in vitro* or *in vivo* experiments were performed; whether singlet oxygen was detected by direct luminescence or by using chemical probes or if it was done *in vitro* or in cuvets and finally according to the influence of encapsulation on Φ_Δ.

X.2 Gold Nanoparticles

Among all the metal nanoparticles, gold NPs (AuNPs) are receiving the most attention mainly due to their combination of unique properties which suit multiple applications such as labelling, delivery, heating and sensing. In most of the publications comparing the production of $^1O_2$* by photosensitizers coupled to AuNP or produced in solution, the authors detect an increase in the formation of $^1O_2$*.[3] For the first time in 2002, Russell's team compared free Pca and free Pc with TOAB (tetraoctylammonium bromide) phase transfer reagent to the free Pc and Pc-coated gold nanoparticles with TOAB and found an increase of around 50% with the three-component Pc-coated gold nanoparticles. It is possible that TOAB affects both the excited singlet state of the free and bound Pc and the triplet energy transfer to molecular oxygen to form the excited singlet oxygen species. It is clear that three-component metal nanoparticles can generate $^1O_2$* with enhanced quantum yields when compared with free photosensitizers. Oo *et al.*[4] also found a better production of Reactive Oxygen Species (ROS) from 5-ALA-Gold nanoparticles than 5-ALA alone on two different cell lines but an explanation of this was not given.

Benito *et al.*[5] also developed gold nanoparticles coupled to 5-ALA. They observed an increase in ROS formation when compared with ALA alone and concluded that this may be due to a plasmon effect (no $^1O_2$* specific probe was used). The authors suggest that the surface plasmonic effect of AuNPs enhances the photocurrent between AuNPs and PpIX after light irradiation, which leads to an energy transfer to PpIX. The same conclusion was reached by Chu *et al.*[6] They confined methylene blue in the close vicinity of an Au nanorod by incorporating it into SiO_2 during Au-core/SiO_2-shell nanoparticle (NP) growth to develop and produce a core-shell Au@SiO_2 nanoparticle carrier. Using H_2DCFDA, after light irradiation the Au@(SiO_2-MB) NPs were found to generate more hydroxyl radical and superoxide than both free MB and SiO_2-MB NPs but free MB was found to produce the most $^1O_2$* among the three. The researchers also attributed this effect to the plasmonic enhancement effect of the Au core. After excitation, the intensified electromagnetic field in the proximity of Au was found to contribute to the increased absorption of photosensitizers. Two conditions are required here: 1) the excitation energy of the PS should match

the Surface Plasmon Resonance energy of Au, and 2) the PS should be close to the Au. In the study by Wang,[7] the increase observed could also have been due to enhanced absorption arising from the transverse Surface Plasmon Resonance of NP.

Kuo *et al.*[8] compared the luminescence at 1270 nm of ICG alone and Au PSMA (poly(styrene-altmaleic acid)-ICG nanorods. The Φ_Δ of ICG and Au-PSMA-ICG nanorods were about 0.112 and 0.160, respectively. The authors found that the Au-PSMA-ICG nanorods generated more $^1O_2$* than ICG alone and this could be due to enhanced intersystem crossing, increased triplet yield of the photosensitizers, or the metal substrates, resulting in photostability for the photosensitizers. Nevertheless, it is not clear whether the detection at 1270 nm was due to $^1O_2$* or to ICG fluorescence.

Most of the studies describe an enhancement of $^1O_2$* formation but Shang *et al.*[9] do not observe any difference between $^1O_2$* formation of loaded or free ZnPc, and Cheng *et al.*[10] even detected a decrease in $^1O_2$* formation. In the paper by Shang *et al.* ZnPc is encapsulated into a nanogel composed of a PEGMA monolayer on the surface of gold nanorods and cross-linked N-*iso*-propylacrylamide (NIPAAm) and poly-(ethyleneglycol)-methacrylate (PEGMA). No difference was found between the $^1O_2$* formation with ZnPc alone or ZnPc loaded into the nanoparticles. Cheng *et al.*[10] elaborated PEGylated AuNP–Pc and found Φ_Δ = 50% for free Pc in ethanol using DPBF whereas Φ_Δ = 35% was estimated for ZnPc-PEGylated AuNPs.

X.3 Carbon Nanotubes

Single (SWNTs) or multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) can be used as delivery agents for PDT photosensitizers. The influence of grafting or encapsulating photosensitizers on carbon nanotubes is difficult to evaluate, a point illustrated by the fact that only those publications which describe $^1O_2$ formation use aptamer[11] to control $^1O_2$* formation or the release of the photosensitizers[12] which means it is impossible to run a comparison with free photosensitizer.

X.4 Graphene

Graphene is a two-dimensional material with sp^2-bonded carbon atoms packed into a honeycomb lattice whose electronic, optical and structural properties make it suitable for applications in many fields like electronics, catalysis, gas storage and medicine. Wojtoniszak *et al.*[13] developed graphene oxide functionalized with methylene blue. They used a chemical probe ABDA (9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid) and observed a better $^1O_2$* formation for grafted methylene blue than free methylene blue in solution. In this case, the researchers suggest that adsorption of methylene blue on graphene oxide increased the yield of intersystem crossing which gives enhanced $^1O_2$ quantum yield by the nanoparticles.

Conversely, two other studies reveal a decrease in $^1O_2$* formation; Wang *et al.*[14] developed a core-

shell multifunctional nanocomposite surrounded by polyethylene glycol and loading Zn-phthalocyanine (ZnPc). Using DPBF, they found that $^1O_2$* formation was weaker for the nanoparticles than for free ZnPc because of nanographene oxide's *quenching* effect. Li *et al.*[15] synthesized hyaluronic-graphene oxide conjugates with chlorin e6. They used DMA to demonstrate that free Ce6 presents better $^1O_2$* formation than grafted Ce6 in water illustrating the firm adsorption of the photosensitizer onto the graphene which results in *quenching*.

X.5 Mg-Al Hydroxides

Layered double hydroxides (LDHs) are synthetic clay materials which form successive layers of metal hydroxides separated by layers of anions and water. Kantonis *et al.* immobilized PpIX on layered double hydroxides and also synthesized a nanohybrid of LDH coupled to perfluoroheptanoic acid (LDH-PFHA) to increase the solubility of molecular O_2. The reaction rate for the oxidation of three substrates was determined using imidazole, 2,3-dimethyl-2-butene and linoleic acid. Using imidazole, the immobilized PpIX was able to produce $^1O_2$*[16] five to nine times faster with free PpIX compared to LDH–PpIX and LDH–PpIX–PFHA, respectively. In contrast, with hydrophobic substrates LDH–PpIX–PFHA was found to give the fastest reactions. This was particularly noteworthy in the case of linoleic acid where the reaction with LDH–PpIX–PFHA as catalyst was four to seven times faster than with LDH–PpIX and free PpIX, respectively.

X.6 Iron Oxide with Polyacrylamide or Silica

For this type of nanoparticle, one paper describes an increase of $^1O_2$* from the PS into the nanoparticles and one paper a decrease of $^1O_2$* formation when the PS is linked to the nano-object. Wang *et al.*[17] developed fluorescent and mesoporous core-shell-structured nanoparticles and observed that the AlC_4Pc-incorporated Fe_3O_4@SiO_2@*meso*-SiO_2 particles exhibited much higher activity in photo-oxidation DPBF than the same amount of free AlC_4Pc in solution. They suggest that the mesoporous silica nanovehicle acts both as a carrier for AlC4Pc and also as a nanoreactor to facilitate the photo-oxidation reaction.

Tada *et al.*[18] elaborated Silica-coated magnetic particles containing methylene blue (MagMB). The lifetime of $^1O_2$* was determined in CH_3CN (52 µs), and in water (3 µs); Φ_Δ of MagMB particles was estimated to be 0.03 ±0.02, while Φ_Δ of MBinCH_3CN is 0.50. According to the authors and reference[19], this decrease in $^1O_2$* production when MB is encapsulated in nanoparticles may be due to the scattering of the nanoparticles, the local sequestration of generated $^1O_2$* by the nanoparticle matrix, or an intrinsic lower encapsulated MB Φ_Δ.

X.7 Iron Oxide

Li *et al.*[20] developed PEG-functionalized iron oxide nanoclusters loaded with chlorin e6.The authors compared $^1O_2$* generation for free Ce6 with encapsulated Ce6, but in their experiment the excitation was carried out at 704 nm where Ce6 does not absorb, which makes it difficult to draw any conclusions regarding the influence of encapsulation on $^1O_2$* generation. Nevertheless, IONCePEGeCe6 offered a good level of $^1O_2$* generation under 704 nm excitation.

X. 8 Silica

Silica-based nanomaterials have emerged as promising vectors for PDT mainly because they are chemically inert and the silica matrix porosity is not susceptible to swelling or changes because of a varying pH. The particles' size, shape, porosity and mono-dispersibility can be easily controlled during their preparation. Moreover, $^1O_2$ generated by the photosensitizer immobilized in the silica matrix can diffuse efficiently through the solution.

Of the publications studied, 7 papers described an increase of $^1O_2$* from the PS into the nanoparticles, 5 did not detect any significant difference and 7 related a decrease of $^1O_2$* formation when it is encapsulated into silica nanoparticles.

Rossi *et al.*[21] developed protoporphyrin IX nanoparticle carrier. The quantum yield of free protoporphyrin solution (Φ_Δ = 0.77 in CCl_4; Φ_Δ = 0.60 in aqueous/TX100 solution) was found to be less than 0.9 for the porphyrin immobilized in silica spheres. The authors suggest that this increase could be due to the decrease in the monomer-dimer equilibrium because the photosensitizer is covalently attached to the matrix. Aggregation is indeed also known to reduce the quantum yield and lifetime of the excited triplet state of porphyrins and logically should consequently therefore also reduce the $^1O_2$* generation yield. Yan and Kopelman[22] compared the photophysical properties of and the pH influence on free *m*-THPC with those of *m*-THPC embedded in silica nanoparticles. They used ADPA (anthracene-9,10-dipropionic acid) to determine that the exact reaction rate constant for free *m*-THPC and *m*-THPC embedded in silica NP is 2.7 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ and 4.8 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, suggesting that $^1O_2$* production from *m*-THPC embedded in silica NP exceeds that of free *m*-THPC. Zhou *et al.* embedded hypocrellin A (HA) into porous hollow silica nanospheres.[23, 24] The same ESR signal was observed in an aqueous solution for HA free molecules or HA-NP, but the signal intensity was found to be smaller, implying that HA-NP could have a better $^1O_2$* generation ability than free HA. Φ_Δ=1.16 was determined with ADPA taking free HA as a reference. They claimed that the increased $^1O_2$* generation ability of AM-HA as compared with free HA was possibly because the nanoparticle formation protected the interior HA molecules from exposure to the aqueous environment thus slowing down the $^1O_2$* *quenching* speed.

Other silica nanovehicles with embedded hypocrellin A were synthesized two years later by Zhou *et al.*[24, 25]. In this case, Φ_Δ = 2.13 taking free HA as a reference and defining its Φ_Δ=1 at this

experiment condition. The authors suggest that the presence of the silica nanovehicle significantly increases the ability of HA to generate $^1O_2$* because the nanovehicle protected and retained the long-lived singlet state of HA. Zhao *et al.*[26] encapsulated Pc4 using silica nanoparticles (Pc_4SNP). Using ABDA as a $^1O_2$* chemical probe, they showed that for the Pc4 sample, the photobleaching rate caused by $^1O_2$* was much lower than that of Pc4SNP. Encapsulation of Pc4 into silicon nanoparticles improved $^1O_2$* production while decreasing photobleaching and aggregation.

Simon *et al.*[27] described the synthesis and photophysical studies of protoporphyrin IX (Pp IX) silica nanoparticles. ROS detection *in vivo* was performed using an APF (2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid) kit which is not specific to $^1O_2$*. They evaluated the ROS generation of Pp IX silica nanoparticles and free Pp IX and quantification of cell internalization using HCT 116 and HT-29 colon cancer cells and demonstrated that ROS generation was significantly improved in the presence of PpIX silica nanoparticles in both cell lines.

Wang *et al.*[28] loaded chlorin e6 onto $NaFY_4$-based UCNPs functionalized with polyethylene glycol to elaborate a UCNP-Ce6 complex. They observed significant production of $^1O_2$* after irradiation at 980 nm of UCNP-Ce6. In marked contrast, they noted that plain UCNPs and free Ce6 at the same respective concentrations generated $^1O_2$* under the 980 nm light, due to the fact that Ce6 does not absorb at this wavelength.

Zhang *et al.*[29] compared the photo-oxidation effect of SiO_2@hematoporphyrin (HP) nanocomposites and the same amounts of HP molecules in a homogeneous solution. SiO_2@HP nanocomposites produce 10-15 times more $^1O_2$* than free HP does in a homogeneous solution. The authors suggest that HP molecules are located in the nanocomposites which results in a higher local concentration in the mesopore than in the homogeneous solution. Moreover, the mesoporous structure's high surface volume allows the absorption of ABMD into the pores thus increasing the local concentration of ABMD and the efficiency of the reaction between the probe and $^1O_2$*. During irradiation, the endoperoxide formed leads to a concentration gradient between the mesoporous and solution phases which acts as a driving force for voluntary exchange of ABMD and the photo-oxidized product between two phases until the photo-oxidation reaction is complete. In SiO_2@HP, a smaller diffusion time of $^1O_2$* is required before photo-oxidation processes because $^1O_2$* generation and photo-oxidation occur in the mesoporous channel. HP molecules are bound to the mesopores which are made up of inert silica matrix and are therefore less reactive than water which means that the singlet and triplet excited state of HP molecules are possibly therefore less quenched or deactivated. The degree of freedom of the HP molecules reduced by this microenvironment of the silica mesopore causes a longer excited state lifetime and an enhancement of $^1O_2$* generation efficiency. The consequence of all these factors is that the photo-oxidation efficiency of the mesoporous materials is higher than the homogeneous one.

In 2003, the team of Prasad[30] synthesized ultrafine organically modified silica (ORMOSIL) based nanoparticles entrapping HPPH. They used ADPA to compare the $^1O_2$* generation from free HPPH

and HPPH solubilized in micelles or doped in nanoparticles. Similar efficiencies of $^1O_2$* generation were found in both cases. It should be noted that the absorption spectra of HPPH were also similar for both. In 2010, Thienot *et al.*[31] described one pot synthesis of a very stable hybrid versatile nanocarrier made of PpIX silica-based nanocarriers with a bilayer coating of triethoxyvinylsilane. The authors compared the PpIX silica-based nanoparticles in PBS with PpIX in DMF. Similar levels of effectiveness were observed in both cases although it is difficult to draw conclusions because the solvents are different. Our team also conjugated a 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin to a hybrid gadolinium oxide nanoparticle coupled to peptides to target neuropilin-1[32]. TPC-grafted within the nanoparticle matrix was found to present the same quantum yield of $^1O_2$ as free TPC in a solution, that is to say that the photosensitizer was mainly in a monomeric form without aggregation inside the NPs. In a similar way,[33] Rose Bengal was conjugated to organically modified silica nanoparticles by electrostatic and covalent interaction. The relative $^1O_2$* generation yield of RB and its complexes with SiNP did not reveal any significant differences.

Prasad's team[34] reported new ORMOSIL with HPPH linked to the nanoparticles instead of being physically entrapped. They first synthesized iodobenzyl-pyro-silane (IPS) which is a precursor for ORMOSIL with the grafted iodobenzylpyropheophorbide (IP). Different formulations were synthesized by changing the IPS/VTES (vinyltriethoxysilane) ratio to study the influence of loading on the photophysical properties of the pyropheophorbide. IP incorporated within nanoparticles is capable of generating $^1O_2$* with a yield comparable to that of $^1O_2$* generated by IP/Tween-80 micelles using both direct detection of $^1O_2$* luminescence and ADPA. The $^1O_2$* generated by PS (IP) in surfactant (Tween-80) micelles depends on the relative amount of surfactant which protects hydrophobic PS molecules from aggregation. The $^1O_2$* generated within nanoparticles is mostly deactivated outside nanoparticles which leads to bleaching of ADPA. IP/Tween-80 micellar suspension demonstrated higher $^1O_2$* generation than the nanoparticles whatever the loads on the photosensitizers.

Li *et al.*[35] developed pH-responsive silica nanoparticles for controllable $^1O_2$* generation. By a spin-trapping technique using 2,2,6,6-tetramethyl- 4-piperidone (TEMP) as the spin-trapping agent, the authors showed that TPP-NP produced a similar Electron Paramagnetic Resonance signal, indicating the generation of $^1O_2$*. In the case of TPP or TPP-NP, the photobleaching of AMDA was found to be superior with free TPP than with TPP-NP. Tu *et al.*[36] also reported the elaboration of mesoporous silica nanoparticles conjugated with PpIX *via* the amine group of 3-aminopropyltrimethoxysilane. The absorption decay curves of DPBF were found to be faster for free PpIX than for covalently linked PpIX. Direct luminescence at 1270 nm in acetone was also performed. Tang *et al.*[19] also observed a decrease of Φ_Δ after encapsulation of methylene blue in polyacrylamide-based nanoparticles. They showed that the delivery of $^1O_2$* was reduced to varying degrees by encapsulation. This difference in activity was attributed to the various microenvironments in the nanoparticles, in particular, the local sequestration of produced $^1O_2$* by

the matrixes or even the dimerization of MB, which occurred to different extents in the matrixes. Nevertheless, they also showed that using nanoparticles can prevent the embedded MB from being reduced by diaphorase enzymes, thereby retaining the photoactive form of MB for efficient PDT treatment.

Selvestrel *et al.*[37] synthesized ORMOSIL nanoparticles with alkoxysilane-porphyrin, alkoxysilane *m*-THPC like chlorin and an alkoxysilane *m*-THPC like chlorin attached to the nanoparticles with 4 silane groups. They measured the Φ_Δ in MeOD or D_2O. Whereas Φ_Δ of *m*-THPC in MeOD is 0.71, they found measurements of between 0.55 and 0.67 for the two nanoparticles. In deuterated water, $^1O_2$* production of nanoparticles was found to be very similar to that of *m*-THPC but the $^1O_2$* production of the nanoparticle doped with the alkoxysilane *m*-THPC like chlorin attached to the nanoparticles with 4 silane groups was much lower. The authors suggest that water penetrating the nanoparticle may lead to distortion of the tetra-coordinated chlorin and that this would increase the rate of internal conversion and a decrease of $^1O_2$* production. This is due to the fact that the chlorin is rigidly attached to the silica matrix and cannot compensate by conformational realignment.

To evaluate the influence of loading onto the Φ_Δ and the Φ_f, our team[38] synthesized silica nanoparticles with a Gd_2O_3–Tb_2O_3 core surrounded by a polysiloxane shell in which is covalently bound different amounts of tetraphenyl monocarboxylic chlorin. We were able to show that the amount of covalently grafted PS has a slightly negative influence on Φ_Δ and Φ_f. Indeed, when the grafting was too high, we observed a decrease of Φ_Δ compared to the one obtained using the same amount of chlorin in solution due to both FRET and partial *quenching* linked to the formation of dimers.

A final interesting example is the work of Li *et al.*[39] who synthesized base silica nanoparticle-attached *meso*-tetra(*N*-methyl-4pyridyl)porphyrin (SiO_2-TMPyP) for pH controllable photosensitization. The concept of this structure is that SiO_2 nanoparticles are triplet *quenchers* of the photosensitizer and/or $^1O_2$* at alkaline pH. In weak acidic solutions, the photosensitizer is released from the nanoparticle and can then produce $^1O_2$*. By monitoring $^1O_2$* luminescence, Φ_Δ were found to be pH-dependent, dropping from ~ 0.45 in a pH range of 3–6 to 0.08 at pH 8–9. (For free TMPyP Φ_Δ = 0.58 at pH 7.35). The lower Φ_Δ values obtained from SiO_2-TMPyP relative to those from free TMPyP in acidic solutions might be due to aggregation of TMPyP and *quenching* of triplet TMPyP and/or $^1O_2$* by SiO_2 nanoparticles.

Table X.1 Inorganic nanoparticles (except quantum dots, TiO_2, SiO_2) with encapsulated or grafted photosensitizers whose formation of $^1O_2^*$ has been compared with the formation of $^1O_2^*$ of the free photosensitizer.

X. 9 Conclusion and perspectives

As a conclusion, it is worthwhile analyzing the results in terms of the factors that can influence Φ_Δ such as oxygen access, *quenching* of $^1O_2$ by the nanoparticle itself and the effects of PS loading or nanoparticle surface modification because for each type of nanoparticle, an increase or decrease of Φ_Δ could be observed. In fact, there are few publications whose authors compare the $^1O_2$* formation by the photosensitizer alone to that by the photosensitizer coupled to the nanoparticles and therefore it is difficult to draw a general conclusion. For gold nanoparticles, it seems that the surface plasmonic effect of AuNPs could enhance Φ_Δ. With silica nanoparticles, the diffusion of the O_2 and of the chemical probe into the silica shell or the pores could increase the local concentration and efficiency of the reaction between the probe and also $^1O_2$* is improved. For graphene, authors have claimed that the adsorption of methylene blue on graphene oxide increased the yield of intersystem crossing which leads to enhanced $^1O_2$ quantum yield by the nanoparticles. In general, nanovehicles can protect the photosensitizer (photobleaching) and act as a nanoreactor and appropriate loading also results in a decrease of aggregation. In the future, it might be useful to design experiments to evaluate the influence of each parameter on the formation and consumption of $^1O_2$*. Parameters such as chemical composition of the nanoparticles, size of the nanoparticles, PS loading could be taken into account to evaluate the benefit of the encapsulation/grafting onto nanoparticles for the formation and consumption of $^1O_2$* compared to free photosensitizers.

Captions

Table X.1 Inorganic nanoparticles (except quantum dots, TiO_2, SiO_2) with encapsulated or grafted photosensitizers whose formation of $^1O_2^*$ has been compared with the formation of $^1O_2^*$ of the free photosensitizer.

References

1. P. Couleaud, V. Morosini, C. Frochot, S. Richeter, L. Raehm and J. O. Durand, *Nanoscale*, 2010, **2**, 1083.
2. R. Vanderesse, C. Frochot, M. Barberi-Heyob, S. Richeter, L. Raehm and J. O. Durand, in *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications, Fundamental Biomedical Technologies* A. Prokop Springer Science+Business, Editon edn., 2011, vol. 5, pp. 511-565.
3. D. C. Hone, P. I. Walker, R. Evans-Gowing, S. FitzGerald, A. Beeby, I. Chambrier, M. J. Cook and D. A. Russell, *Langmuir*, 2002, **18**, 2985.
4. M. K. K. Oo, X. Yang, H. Du and H. Wang, *Nanomedicine*, 2008, **3**, 777.
5. M. Benito, V. Martin, M. D. Blanco, J. M. Teijon and C. Gomez, *J. Pharm. Sci.*, 2013, **102**, 2760.
6. Z. Chu, C. Yin, S. Zhang, G. Lin and Q. Li, *Nanoscale*, 2013, **5**, 3406.
7. B. K. Wang, J. H. Wang, Q. Liu, H. Huang, M. Chen, K. Y. Li, C. Z. Li, X. F. Yu and P. K. Chu, *Biomaterials*, 2014, **35**, 1954.
8. W. S. Kuo, C. N. Chang, Y. T. Chang and C. S. Yeh, *Chem. Commun.*, 2009, 4853.
9. T. Shang, C. D. Wang, L. Ren, X. H. Tian, D. H. Li, X. B. Ke, M. Chen and A. Q. Yang, *Nano.Res.Let*, 2013, **8**, ???
10. Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei and C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10643.
11. Z. Zhu, Z. Tang, J. A. Phillips, R. Yang, H. Wang and W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10856.
12. S. Erbas, A. Gorgulu, M. Kocakusakogullari and E. U. Akkaya, *Chem. Commun.*, 2009, 4956.
13. M. Wojtoniszak, D. Roginska, B. Machalinski, M. Drozdzik and E. Mijowska, *Mater. Res. Bull.*, 2013, **48**, 2636.
14. Y. H. Wang, H. G. Wang, D. P. Liu, S. Y. Song, X. Wang and H. J. Zhang, *Biomaterials*, 2013, **34**, 7715.
15. F. Li, S. Park, D. Ling, W. Park, J. Y. Han, K. Na and K. Char, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**, 1678.
16. G. Kantonis, M. Trikeriotis and D. F. Ghanotakis, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2007, **185**, 62.
17. F. Wang, X. L. Chen, Z. X. Zhao, S. H. Tang, X. Q. Huang, C. H. Lin, C. B. Cai and N. F. Zheng, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 11244.
18. D. B. Tada, L. L. R. Vono, E. L. Duarte, R. Itri, P. K. Kiyohara, M. S. Baptista and L. M. Rossi, *Langmuir*, 2007, **23**, 8194.
19. W. Tang, H. Xu, R. Kopelman and M. A. Philbert, *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**, 242.
20. Z. W. Li, C. Wang, L. Cheng, H. Gong, S. N. Yin, Q. F. Gong, Y. G. Li and Z. Liu, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9160.
21. L. M. Rossi, P. R. Silva, L. L. R. Vono, A. U. Fernandes, D. B. Tada and M. S. Baptista, *Langmuir*, 2008, **24**, 12534.
22. F. Yan and R. Kopelman, *Photochem. Photobiol.*, 2003, **78**, 587.
23. J. Zhou, L. Zhou, C. Dong, Y. Feng, S. Wei, J. Shen and X. Wang, *Mater. Lett.*, 2008, **62**, 2910.

24. L. Zhou, W. Wang, Y. Feng, S. Wei, J. Zhou, B. Yu and J. Shen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 6172.
25. L. Zhou, J. H. Liu, J. Zhang, S. H. Wei, Y. Y. Feng, J. H. Zhou, B. Y. Yu and J. Shen, *Int. J. Pharm.*, 2010, **386**, 131.
26. B. Zhao, J. J. Yin, P. J. Bilski, C. F. Chignell, J. E. Roberts and Y. Y. He, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, **241**, 163.
27. V. Simon, C. Devaux, A. Darmon, T. Donnet, E. Thienot, M. Germain, J. Honnorat, A. Duval, A. Pottier, E. Borghi, L. Levy and J. Marill, *Photochem. Photobiol.*, 2010, **86**, 213.
28. C. Wang, H. Q. Tao, L. Cheng and Z. Liu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6145.
29. R. Zhang, C. Wu, L. Tong, B. Tang and Q. H. Xu, *Langmuir*, 2009, **25**, 10153.
30. I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty and P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7860.
31. E. Thienot, M. Germain, K. Piejos, V. Simon, A. Darmon, J. Marill, E. Borghi, L. Levy, J. F. Hochepied and A. Pottier, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2010, **100**, 1.
32. P. Couleaud, D. Bechet, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, A. C. Faure, S. Roux, O. Tillement, S. Porhel, F. Guillemin and C. Frochot, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 995.
33. A. Uppal, B. Jain, P. K. Gupta and K. Das, *Photochem. Photobiol.*, 2011, **87**, 1146.
34. T. Y. Ohulchanskyy, I. Roy, L. N. Goswami, Y. Chen, E. J. Bergey, R. K. Pandey, A. R. Oseroff and P. N. Prasad, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2835.
35. Z. Li, J. Wang, J. Chen, W. Lei, X. Wang and B. Zhang, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 115102/1.
36. H. L. Tu, Y. S. Lin, H. Y. Lin, Y. Hung, L. W. Lo, Y. F. Chen and C. Y. Mou, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 172.
37. F. Selvestrel, F. Moret, D. Segat, J. H. Woodhams, G. Fracasso, I. M. R. Echevarria, L. Bau, F. Rastrelli, C. Compagnin, E. Reddi, C. Fedeli, E. Papini, R. Tavano, A. Mackenzie, M. Bovis, E. Yaghini, A. J. MacRobert, S. Zanini, A. Boscaini, M. Colombatti and F. Mancin, *Nanoscale*, 2013, **5**, 6106.
38. A. Seve, P. Couleaud, F. Lux, O. Tillement, P. Arnoux, J. C. Andre and C. Frochot, *Photochem. Photobiol Sci*, 2012, **11**, 803.
39. W. B. Li, W. T. Lu, Z. Fan, X. C. Zhu, A. Reed, B. Newton, Y. Z. Zhang, S. Courtney, P. T. Tiyyagura, R. R. Ratcliff, S. F. Li, E. Butler, H. T. Yu, P. C. Ray and R. M. Gao, *J. Mater. Chem.*, 2013, **22**, 12701.
40. W. S. Kuo, C. N. Chang, Y. T. Chang, M. H. Yang, Y. H. Chien, S. J. Chen and C. S. Yeh, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 2711.
41. K. Záruba, J. Králová, P. Øezanka, P. Pouèková, L. Veverková and V. Král, *Org. Biomol. Chem.* , 2010, **8**, 3202.
42. F. Liu, X. Zhou, S. Ni, X. Wang, Y. Zhou and Z. Chen, *Curr. Nanosci.*, 2009, **5**, 293.

Table X.1: Inorganic nanoparticles (except quantum dots, TiO_2, SiO_2) with encapsulated or grafted photosensitizers whose formation of $^1O_2^*$ has been compared with the formation of $^1O_2^*$ of the free photosensitizer.

Type of Nanoparticles	PS	C/E	Phototoxicity test: *In vitro* model	Ref	Detection of $^1O_2$	PS-NP compared to PS
Gold	Zn*Pc*	C	-	3	Time resolved luminescence	Increase
	ALA	E	human neonatal dermal fibroblast and HT 1080	4	DCFH-DA	Increase
	Rose Bengal	C	Cal-27	7	ABDA and H_2DCFDA	Increase
	5-ALA PpIX	C	Hela	5	H_2DCFDA	Increase
	Indocyanine green	C	A549	40	direct detection	Increase
	Porphyrin-brucine	E	PE/CA-PJ34	41	*In vivo*	Increase
	Toluidine blue O	C	bacteria	8	direct detection	Increase
	ZnPc4	E	Hela	9	DMA	Same
	MB	E	HepG2	6	SOSG	Decrease
	*Pc*4	C/E	Hela	10	DPBF	decrease
Graphene	MB	E	-	13	ABDA	Increase
	ZnPc	C	Hela, KB	14	DPBF	Decrease
	Ce6	E	Hela	15	DMA	Decrease
Mg-Al hydroxides	PpIX	E	-	16	imidazole, 2,3-dimethyl-2-butene and linoleic acid	Increase
	Zn*Pc*	C	QGY-7703, HeLa	17	DPBF	Increase
	Methylene blue	E	-	18	Direct detection DPBF.	Decrease
	Purpurin-18 ou HPPH	E	-	42	RNO	Increase
Iron oxide	Ce6	C	4T1	20	SOSG *in vivo*	-
Silica	*m*-THPC	E	-	22	ADPA	Increase
	Hypocrellin A	E	Hela	23, 25	EPR and ADPA	Increase
	PpIX	C	-	24	DPBF and direct detection	Increase
	*Pc*4	E	A-375 and B16-F10	26	ABDA and EPR	Increase
	Hypocrellin A	E	Hela	24	ADPA	Increase
	Hematoporphyrin	C	HO-8910	29	ABDA	Increase
	PpIX	E	HCT 116 and HT29, A431, LLBC37, MDA-MB-231	27	APF kit (*in vivo*)	Increase
	HPPH	E	UCl-107, Hela	30	Direct detection and ADPA	Same
	PpIX	E	HCT 116	31	DPBF	Same
	TPC	C	MDA-MB-231	32	Direct detection	Same
	RB	E/C	MCF-7	33	SOSG	Same
	IP	C	colon 26	34	Direct detection and ADPA	Same
	Meso-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine	E	SK-BR-3	39	Direct detection	Decrease
	TPP	E	-	35	AMDA + EPR	Decrease

	PpIX	C	Hela	[36]	Direct detection and DPBF	Decrease
	TPC	C	H1299	[38]	Direct detection	Decrease
	MB	E	C6	[30]	ADPA	Decrease
	Porphyrin, chlorin, mTHPC	C	KB, A549, HUVEC	[37]	Direct detection	Decrease
	chlorin e6	C	Hela	[28]	RNO	Decrease

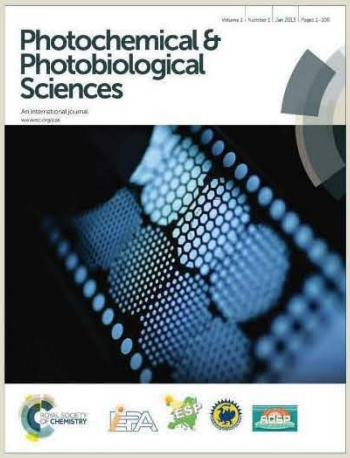
PS: photosensitizer; C/E: C covalently coupled, E encapsulated;
4T1: Murine breast cell line; A 375: human amelanotic melanoma cell line; A 431: epidermoid carcinoma cell line; A 549: human lung carcinoma malignant cell line; ABDA: 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid; ADPA: anthracene-9,10-dipropionic acid;ALA: aminolevulinic acid ;AMDA: anthracene-9,10-bis-methylmalonate; APF: 2-[6-(4V-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid; B16-F10: Mouse melanoma cell line; C6: glial cell line; Cal-27: human oral squamous cell carcinoma; Ce6: chlorin e6;DCFH-DA: Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate;DMA: 9,10-dimethylanthracene; DPBF: 1,3-diphenylisobenzofuran; H_2DCFDA: 2', 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; EPR: Electron Paramagnetic Resonance; H1299: lung cancer cell line; HCT 116: colon cancer cell line; Hela: human malignant cervical cells; HepG2: Human hepatocellular liver carcinoma cell line;HO8910-PM cells: human ovarian cancer cell line;HPPH: 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide; HT29: human colorectal adenocarcinoma cell line; HT 1080: human fibrosarcoma; IP: iodobenzylpyropheophorbide; KB: human nasopharyngeal epidermal carcinoma cell line; MB: methylene blue; LLBC37: lymphoblastoid cell line; MCF-7: squamous carcinoma 4451 cell lines, MCF-7; MDA-MB-231: breast cancer cells; *m*THPC*: meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin; NP: nanoparticle; PAA: polyacrylic acid; *Pc*4: silicon phthalocyanine 4; PE/CA-PJ34: squamous cell carcinoma cells line; PpIX: protoporphyrin IX; QGY-7703: human Hepatoma cells; RB: Rose bengal; RIF-1: Human Rap1-interacting protein;RNO: *p*-nitrosodimethylaniline; SK-BR-3: breast cancer cell lines; SOSG: Singlet Oxygen Sensor Green; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin; TPP: *meso*-tetraphenylporphyrin; UCl-107: human epithelial ovarian carcinoma; Zn*Pc*: Zinc(II) phthalocyanine; ZnPc4: zinc phthalocyanine; "-" : not specified.

View Article Online
View Journal

Photochemical & Photobiological Sciences

Accepted Manuscript

This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: A. Stallivieri, F. Le Guern, R. Vanderesse, D. Meledje, G. Jori, C. Frochot and S. Acherar, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, DOI: 10.1039/C5PP00139K.



This is an *Accepted Manuscript*, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this *Accepted Manuscript* with the edited and formatted *Advance Article* as soon as it is available.

You can find more information about *Accepted Manuscripts* in the Information for Authors.

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard Terms & Conditions and the Ethical guidelines still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this *Accepted Manuscript* or any consequences arising from the use of any information it contains.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

www.rsc.org/pps

Photochemical & Photobiological Sciences

Photochemical & Photobiological Sciences

Dynamic Article Links ►
View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/pps

PAPER

Synthesis and photophysical properties of photoactivable cationic porphyrin 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide for anti malaria PDT†

Aurélie Stallivieri,[a,b] Florent Le Guern,[a,b,c,d] Régis Vanderesse,[c,d] Esme Meledje,[a,b,c,d] Giulio Jori,[e*] Céline Frochot[a,b] and Samir Acherar*[c,d]

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXX 20XX
DOI: 10.1039/b000000x

This article describes a new synthetic method for obtaining three water soluble porphyrins. The more sophisticated porphyrin [5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide], also named C12 porphyrin, was obtained through a three steps methodology. The improvements, compared to syntheses described in the literature, mostly concern the purification procedures. The photophysical properties of the three porphyrins are described and the C12 porphyrin presents a very good $^1O_2$ yield compared to its chemical intermediates. This porphyrin seems to be a very promising candidate for PDT applications.

1. Introduction

Malaria is a vector-borne disease transmitted by female mosquitoes and which kill many persons every day most in the African Continent. Because no effective-vaccine exists, the anti-malarial strategies consist of protecting persons by using sprays or treating patients with artemisinin based combination drug. Otherwise, photodynamic therapy (PDT) is a powerful method mainly used clinically to destroy cancer cells or to treat age macular degeneration.[1] PDT involves a photoactivatable compound called photosensitizer, light, and oxygen. After excitation of the photosensitizer and energy transfer to oxygen, reactive oxygen species (ROS and mainly singlet oxygen) are produced which are able to destroy the surrounding cells. PDT is applied clinically every day in dermatology, but has also applications for example in urology, neurology, head and neck cancer, lung cancer[2] and PDT for prostate cancer is in phase III.[3] This strategy could also be at the origin of the development of new larvicides and the concept is based on the use of an encapsulated photosensitizer that will be added in stagnant water. After released in the gastric caeca of mosquito larvae, sun exposure will lead to the formation of ROS that will destroy the larvae. Recently, Jori's group[4] demonstrated that a C14 porphyrin presented a strong photosensitising activity against *Aedes aegypsi* larvae. In 2012, the same team, in collaboration with the Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) located in Burkina Faso, studied the potential of C12 porphyrin as a photolarvicide for the control of anopheles.[5] Two different formulations were developed that is to say Eudragit or cat food pellets. Eudragit is a copolymer of ethyl acrylate, methyl methacrylate and a low content of methacrylic acid ester with quaternary ammonium groups. C12 encapsulated in cat food pellets proved to be very efficient.

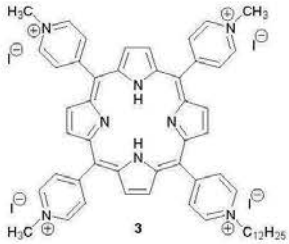


Fig. 1 Chemical structure of 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide **3**, also named C12 porphyrin.

In order to develop at larger scale this molecule, the aim of this study was to find an efficient synthetic route with high synthetic yields and easy and not expensive purifications. Moreover, the

[a] *Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, UMR 7274, 1 rue Grandville BP 20451, Nancy Cedex, France*
[b] *Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), CNRS, UMR 7274, 1 rue Grandville BP 20451, Nancy Cedex, France*
[c] *Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Université de Lorraine, UMR 7375, 1 rue Grandville BP 20451, Nancy Cedex, France*
[d] *Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), CNRS, UMR 7375, 1 rue Grandville BP 20451, Nancy Cedex, France*
[e] *Department of Biology, University of Padova, via U. Bassi 58/B, 35131 Padova, Italy*
E-mail: samir.acherar@univ-lorraine.fr; Fax: +33-3-83379977; Tel: +33-3-83175176
** This paper is dedicated to Giulio Jori who involved us in this project using PDT to fight against malaria.*

Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

photophysical properties of the molecule (absorption, fluorescence emission, singlet oxygen formation) have been evaluated.

2. Experimental

2.1 Materials and Instruments

All chemicals were obtained commercially and used as received unless otherwise noted. Pyrrole and CH_2Cl_2 were redistilled before use. All reactions were performed in the dark. Chromatography was performed on neutral Al_2O_3. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using aluminium-backed silica gel plates (Macherey–Nagel ALUGRAM® SIL G/UV254). TLC spots were viewed under ultraviolet light. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 spectrometer. Multiplicities are reported as follow: s = singlet, d = doublet, q = quadruplet, m = multiplet, br = broad, Ar. = aromatic. Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were recorded on a Brucker MicroTof-Q HR spectrometer. 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 grooves/mm blazed at 330 nm). The fluorescence was measured by the UV-Visible detector through a SPEX double grating monochromator (600 grooves/mm blazed at 500 nm). The singlet oxygen production was measured by the IR detector through a SPEX double grating monochromator (600 grooves/mm blazed at 1 µm). All spectra were recorded using four optical faces quartz cells. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using tetraphenyl porphyrin (TPP) solution in toluene as fluorescence standard (Φ_f = 0.11. Rose Bengal was chosen as reference solutions thanks to their high $^1O_2$ quantum yields in ethanol (Φ_Δ = 0.68).[6] The absorbance value at the excitation wavelength of the reference and the sample solutions were set to around 0.2. Fluorescence lifetimes were measured by Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) 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 four channels router PHR-800 (both PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Fluorescence monoexponential decays were recorded using the single photon counting method (four optical faces quartz cells for pure products in ethanol). Data was collected up to 1000 counts accumulated in the maximum channel and analyzed using TCSPC software Fluofit (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) based on iterative reconvolution using a Levensberg-Marquandt algorithm. Singlet oxygen lifetime measurements have been performed on a TEMPRO-01 spectrophotometer (Horiba JobinYvon – Palaiseau France) composed with a pulsed diode excitation source SpectraLED-415 emitting at 415 nm, cuvette compartment, a Seya-Namioka type emission monochromator (600 – 2000 nm) and a H10330-45 near-infrared photomultiplier tube with thermoelectric cooler (HAMAMATSU) as detection system. The system is monitored by a single photon counting controller FluoroHub-B and the software DataStation and DAS6 (Horiba JobinYvon).

2.2 Synthesis of 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin 1

Under N_2 atmosphere, pyrrole (3.48 g, 51.9 mmol) was added dropwise to a refluxed solution (140°C) of 4-pyridiylcarboxaldehyde (5.80 g, 54.1 mmol) dissolved in propionic acid (40 mL) and the mixture is stirred under reflux for 3 hours. After removal of propionic acid *in vacuo*, the crude solid was dissolved in CH_2Cl_2 filtered through a small pad of silica gel and washed with CH_2Cl_2/EtOH (95/5, v/v). After removal of solvent under vacuum, MeOH (500 mL) was added and the resulting mixture was heated under reflux (80°C) for 1 h. The mixture was allowed to return to room temperature and compound **1** was crystallized by freezing and storing in a refrigerator overnight. The crystals were filtered and washed with cold MeOH to afford pure **1** with 10% yield (802 mg) as a light purple powder; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.07 (d, *J* = 4.3 Hz, 8H, $H_{o\text{-}py}$), 8.87 (s, 8H, H_{pyrr}), 8.17 (d, *J* = 4.3 Hz, 8H, $H_{m\text{-}py}$), -2.91 (s, 2H, NH) ppm; HRMS (ESI+) [$C_{40}H_{26}N_8$]: calcd. $[M+H]^+$ 619.2358, found 619.2353.

2.3 Synthesis of 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin monoiodide, 2

Under N_2 atmosphere, to a solution of **1** (390 mg, 0.630 mmol) dissolved in glacial acetic acid (16 mL) was added 1-iodododecane (192 mg, 0.649 mmol) and the mixture was stirred for 3 days under reflux (130°C). After removal of acid *in vacuo*, the crude solid was dissolved in MeOH (500 mL) and the resulting mixture was heated under reflux (80°C) for 1 h. The mixture was allowed to return to room temperature and unreacted **1** was crystallized by freezing and storing in a refrigerator. The compound **1** crystals were filtered off (78 mg, 80% conversion) and the crude filtrate was evaporated under vacuum and purified by neutral Al_2O_3 column chromatography (CH_2Cl_2/EtOH=96:4) to afford **2** (174 mg, isolated yield 30%) as a light purple powder; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 9,83 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, $H_{o\text{-}N\text{-}dodecylpy}$), 9.08 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, $H_{o\text{-}py}$), 9.02 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, $H_{m\text{-}N\text{-}dodecylpy}$), 8.92 (s, 4H, H_{pyrr}), 8.93-8.81 (m, 8H, H_{pyrr} and $H_{o\text{-}py}$), 8.15 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, $H_{m\text{-}py}$), 8.08 (d, *J* = 5.7 Hz, 4H, $H_{m\text{-}py}$), 5.37-5.29 (m, 2H, α-$CH_{2(dodecyl)}$), 2.42-2.35 (m, 2H, β-$CH_{2(dodecyl)}$), 1.69-1.13 (m, 18H, $CH_{2(dodecyl)}$), 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, $CH_{3(dodecyl)}$), -2.91 (s, 2H, NH) ppm; HRMS (ESI+) [$C_{52}H_{51}N_8$]: calcd. $[M]^+$ 787.4236, found 787.4231.

2.3 Synthesis of 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide, 3

Under N_2 atmosphere, to a solution of **2** (50.3 mg, 5.5 10^{-2} mmol) dissolved in DMF (6 mL) was added iodomethane (456 mg, 3.23

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

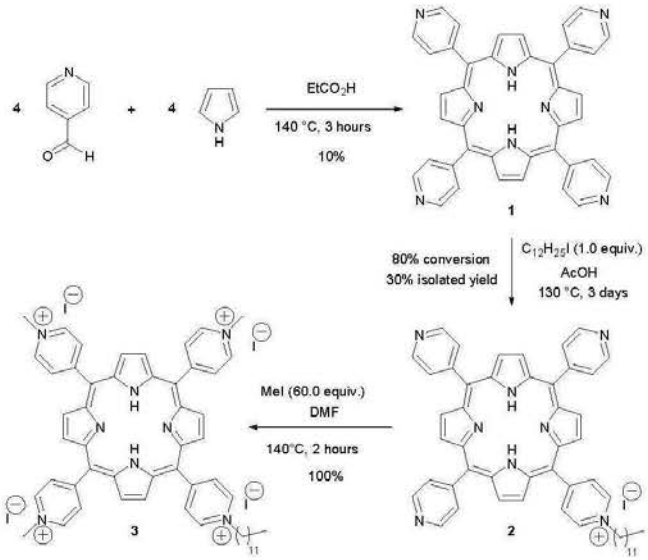
Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

mmol) and the mixture was stirred for 3 h at 140°C. The DMF and excess of iodomethane were removed with rotary vane pump under heating (60°C) to afford pure **3** in quantitative yield (73.7 mg) without purification as a light purple powder; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.57 (d, J = 6.3 Hz, 2H, $H_{o\text{-}N\text{-dodecylpy.}}$), 9.49 (d, J = 6.3 Hz, 6H, $H_{o\text{-}N\text{-methylpy.}}$), 9.26 (m, 2H, $H_{pyrr.}$), 9.20 (s, 6H, $H_{pyrr.}$), 9.01 (m, 8H, $H_{m\text{-}py.}$), 4.96 (t, J = 7.2 Hz, 2H, α-$CH_{2(dodecyl)}$), 4.74 (s, 9H, N^+-CH_3), 2.30 (m, 2H, β-$CH_{2(dodecyl)}$), 1.40 (m, 18H, $CH_{2(dodecyl)}$), 0.87 (m, 3H, $CH_{3(dodecyl)}$), -3.09 (s, 2H, NH) ppm; HRMS (ESI+) [$C_{55}H_{58}N_8$]: calcd. $[M+2H]^{2+}$ 415.2392, found 415.2387.

3. Results and discussion

3.1 Synthesis

In going through the literature, we noticed that all 5-(4-*N*-alkylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrins used in various studies, were commercially available from Frontier Scientific Inc, Logan, UT, U.S.A. This American company synthesized these porphyrins based on a US Patent n° 6 573 258 filed in collaboration with the team of Prof. Giulio Jori (University of Padova, Italy). Unfortunately, since 2012, these porphyrins, including **3**, were no longer commercially available. Our goal was to synthesize 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide **3**, also named C12 porphyrin, and evaluate its photophysical properties for a potential application in PDT against malaria. We decided to improve the purification conditions of **3** in particular in avoiding the use of HPLC that requires a lot of time and solvent. Thus, the synthesis of pure **3** was done in three steps (Scheme 1) with 3% overall yield using only two purification stages (crystallization for the first step, flash chromatography for the second and no purification is required for the final).



Scheme 1 Synthesis of 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide **3**.

Our first idea was to synthesize porphyrins under very mild conditions using the known Lindsey's method[7] (condensation of aldehydes and pyrrole in the presence of BF_3-Et_2O in CH_2Cl_2 followed by addition of *p*-chloranil). To that end, we tried two different conditions, the first consisting in the use of 4-formyl-methylpyridinium benzene sulfonate, 4-pyridylcarboxaldehyde and pyrrole, and the second with 4-pyridylcarboxaldehyde and pyrrole. However these different attempts to use Lindsey's method didn't lead to the expected porphyrins. After these failures, we undertook a second strategy involving Adler-Longo's method[8] by using the earlier procedure described by Little *et al.*[9] (hot propionic acid as solvent). In this context, a one-pot synthesis to obtain the expected porphyrin **3** was explored with a mixture of 4-formyl-methylpyridinium benzene sulfonate, *N*-dodecylpyridine-4-carboxaldehyde iodide and pyrrole in hot propionic acid, but this strategy was unsuccessful. Finally, we decided to synthesize porphyrin **3** in three steps. First, we used the previous procedure with a mixture of 4-pyridylcarboxaldehyde and pyrrole in hot propionic acid for 3 hours and, we obtained pure **1** with 10% yield after crystallization in MeOH. The second step consisted of mono *N*-dodecylating the TPyP **1**. To achieve this, several trials were performed and summarized in Table 1. The best result was provided by the use of one equivalent of 1-iodododecane for 3 days in AcOH under

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

reflux to afford 80% conversion and 30% isolated yield of the mono *N*-dodecylated porphyrin **2**. The unreacted TPyP **1** was removed after crystallization in MeOH. However, in opposition to the patent that proposed to purify mono *N*-dodecylated porphyrin **2** by HPLC with concentrated hydrochloric acid, we decided to purify it by neutral Al_2O_3 column chromatography using elution with CH_2Cl_2/EtOH (96:4) to afford pure compound **2** with 30% yield. Finally, pure 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide **3** was obtained after tri *N*-methylation of **2** by a large excess of iodomethane in DMF at 40 °C for 3 hours in quantitative yield without further purification.

Table 1 Several trials for the mono *N*-dodecylation of TPyP **1**.

Trial	Conditions	Results
1	• Iodododecane (1.0 equiv.) • DMF, reflux (140°C) • 3 days	TPyP **1** was sparingly soluble in DMF even after sonification in contrast to the mono *N*-dodecylated porphyrin **2** which was completely soluble in DMF. For this reason, compound **2** was more reactive than TPyP **1** and afforded side-products (di-, tri- and tetra-dodecylated porphyrins).
2	• Iodododecane (1.0 equiv.) • $Cl_2CH_2CH_2Cl_2$, reflux (140°C) • 1 week	The reaction was started when we added a catalytic amount of AcOH. TPyP **1** was completely soluble in $Cl_2CH_2CH_2Cl_2$ but the reaction time was too long (around 20% of conversion after one week and several side-products appeared).
3	• Iodododecane (0.80, 1.0 or 1.5 equiv.) • AcOH, reflux (130°C) • 1 day to 1 week	TPyP **1** was fully soluble in AcOH and three different amounts of iodododecane were tested. With 0.8 equiv. of iodododecane, a lot of TPyP **1** remained and with 1.5 equiv., only 20% of the desired mono *N*-dodecylated porphyrin **2** was obtained with several side-products and degradation. The best result was provided by the use of 1.0 equiv. of iodododecane during 3 days. These conditions have provided 80% conversion and 30% isolated yield of the mono *N*-dodecylated porphyrin **2** accompanied by some side-products and degradation (not quantified).
4	• Dodecyl trifluoromethanesulfonate (1.0 equiv.) • AcOH, room temperature • 3 days	Dodecyl trifluoromethanesulfonate was more reactive than iodododecane and it was not necessary to heat the reaction mixture. These conditions have largely provided side- products.
5	• Iodododecane (1.0 equiv.) • AcOH, 100°C under microwave irradiations • 2 runs at 200W for 30 min. then 1 run at 300W for 1 hr and to finish 1 run at 300W during 2 hrs	After the last run, there was still a lot of starting material and a very small amount of the mono *N*-dodecylated porphyrin **2**. The reaction time was too long.

3.2 Photophysical properties

As shown in Figure 2a, the porphyrins present an intense Soret absorption band in the UV region and four Q-bands in the remaining range of the visible region. Increasing the degree of quaternization results in a small red-shift of the absorption spectra (Table 2).

Otherwise, all molecules exhibit low fluorescence quantum yields, ranging between 0.05 and 0.08 (Figure 2b and Table 2).

The different level of porphyrin's quaternization seems not to affect the fluorescence emission. Fluorescence lifetimes are very similar for the 3 compounds (Figure 3a and Table 2) as well as the singlet oxygen lifetimes (Figure 3b and Table 2).

The curves in Figure 3b are composed of three parts: i) an increase of luminescence, ii) a plateau which are both the fonction of apparatus, and finally, iii) the decay of $^1O_2$ luminescence.

Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

Photochemical & Photobiological Sciences

Photochemical & Photobiological Sciences

Dynamic Article Links ►
View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/pps

PAPER

Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

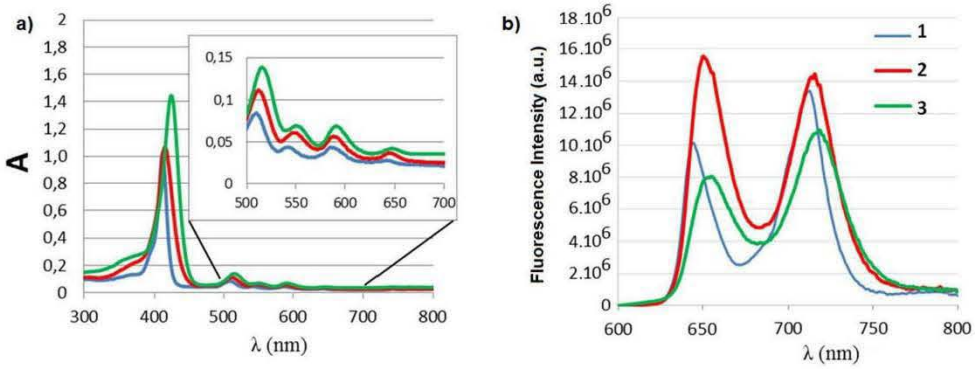


Fig. 2 a) Absorption spectra at c = 6.68 μmol.L^{-1} and b) Fluorescence emission spectra performed at $\lambda_{exc.}$ = 414 nm of **1-3** in EtOH at room temperature, A_{414nm} = 0.2.

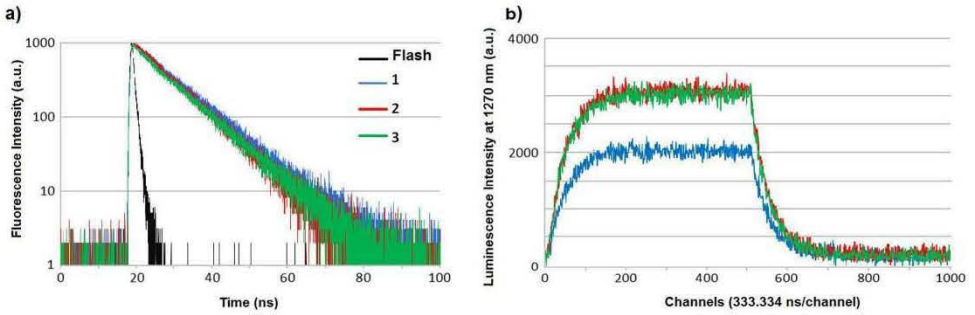


Fig. 3 a) Fluorescence decay and b) Singlet oxygen decay of **1-3** after excitation at $\lambda_{exc.}$ = 408 nm in EtOH at room temperature, c = 1.50 μmol.L^{-1}.

Table 2 Photophysical data for **1-3**.

Compound	λ_{max} [a] (nm)	ε [b] (Soret)	ε [b] (Q_{IV})	ε [b] (Q_{III})	ε [b] (Q_{II})	ε [b] (Q_{I})	Φ_f [c]	Φ_Δ [d]	τ_f [e]	τ_Δ [f]
1	413	154000	12370	6580	6580	4340	0.05	0.60	10.1	14.2
2	416	160000	16800	9150	8550	5550	0.08	0.77	9.3	14.3
3	425	216000	20800	10500	10300	6440	0.06	0.83	9.5	14

[a] Maximum absorption in EtOH; [b] ε in L/mol.cm; [c] Fluorescence quantum yield determined in EtOH, relative to fluorescence of TPP as a standard ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm); [d] Singlet oxygen production quantum yield determined in EtOH, relative to the emission of Rose Bengal ($\lambda_{exc.}$ = 414 nm); [e] Fluorescence lifetime (ns); [f] Singlet oxygen lifetime (μs).

Singlet oxygen quantum yields have been evaluated (Figure 4 and Table 2). The addition of a dodecyl chain on **1** increases the production of singlet oxygen significantly (from 0.60 to 0.77). Moreover, the tri-*N*-methylation of **2** has the same effect (from 0.77 to 0.83). Finally **3** presents the highest singlet oxygen quantum yield, making it a very good candidate for PDT applications. The reason why compound **3** presents the highest singlet oxygen quantum yield is not known but an hypothesis is

View Article Online
DOI: 10.1039/C5PP00139K

Published on 21 May 2015. Downloaded by Universite de Lorraine on 22/05/2015 13:48:01.

that the introduction of positive charges increases the solubility and decreases the formation of aggregates.

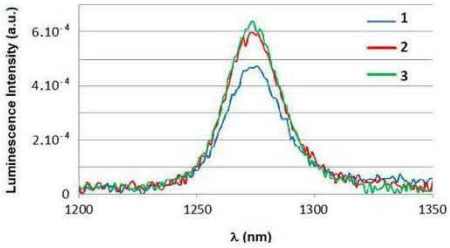


Fig. 4 Singlet oxygen production spectra performed at $\lambda_{exc.}$ = 414 nm of **1-3** in EtOH at room temperature, A_{414nm} = 0.2.

4. Conclusions

Our goal was to synthesize the 5-(4-*N*-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-*N*-methylpyridyl)-21*H*,23*H*-porphyrin tetraiodide **3** and evaluate for photophysics experiments for a potential application in PDT against malaria. The more important optimisation described here is the purification of the intermediate after step 2, which has been successfully achieved by alumina chromatography instead of HPLC in drastic condition. The photophysical properties, especially the singlet oxygen quantum yield, make it a very good candidate for PDT applications.

Acknowledgements

The authors acknowledge Mrs M. Achard for performing Mass experiments, Mr P. Arnoux for Photophysic experiments and Mr O. Fabre for running NMR experiments.

References

1 G. C. Brown, M. M. Brown, J. Campanella and G. R. Beauchamp, *Am. J. Ophthalmol.*, 2005, **140**, 679.
2 P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene and D. Kessel, *CA Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 250.
3 A. R. Azzouzi, E. Barret, C. M. Moore, A. Villers, C. Allen, A. Scherz, G. Muir, M. de Wildt, N. J. Barber, S. Lebdai and M. Emberton, *BJU Int.*, 2013, **112**, 766.
4 L. Lucantoni, M. Magaraggia, G. Lupidi, R. K. Ouedraogo, O. Coppellotti, F. Esposito, C. Fabris, G. Jori and A. Habluetzel, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, **5**, e1434.
5 C. Fabris, R. K. Ouedraogo, O. Coppellotti, R. K. Dabiré, A. Diabaté, P. Di Martino, L. Guidolin, G. Jori, L. Lucantoni, G. Lupidi, V. Martena, S. P. Sawadogo, M. Soncin and A. Habluetzel, *Acta Tropica*, 2012, **123**, 239.
6 R. W. Redmond and J. N. Gamlin, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**, 391.
7 J. S. Lindsey, H. C. Hsu and I. C. Schreiman, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4969.
8 A. D. Adler, F. R. Longo and W. Shergalis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 3145.
9 R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach and J. A. Ibers, *J. Heterocycl. Chem.*, 1975, **12**, 343.

Photochemical & Photobiological Sciences Accepted Manuscript

This journal is © The Royal Society of Chemistry [year]

The interest of folic acid in targeted photodynamic therapy

Aurélie Stallivieri[1], Francis Baros[1], Gulim Jetpisbayeva[1], Bauyrzhan Myrzakhmetov[1], Céline Frochot[1*]

[1] *Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, CNRS, Université de Lorraine, 1, rue Grandville, BP451, 54001 Nancy Cedex, France*

** GDR 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"*

e-mail: celine.frochot@univ-lorraine.fr

List of Keywords:

Folic acid, nanoparticle, photosensitizer, photodynamic therapy, singlet oxygen.

Abstract:

Photodynamic therapy is an alternative to chemotherapy and radiotherapy for cancer treatment. PDT is clinically applied to treat age-related macular degeneration and several types of cancer. Most of the time, the selectivity of the treatment is brought about by the application of light. Another strategy to improve selectivity is to design and synthesize targeted photosensitizers or nanoparticles, which can identify and selectively accumulate within tumour tissues. This review presents our inventory of all the data concerning the use of folic acid as a promising targeting unit to improve the selectivity of photosensitizers to folic acid receptors. We will discuss the strategies that are developed to couple folic acid to photosensitizers or nanoparticles as well as the influence of the presence of folic acid on the objects' photophysical properties and their effects on selectivity and phototoxicity *in vitro* and *in vivo*.

Abbreviations

ABDA: 9,10- anthracenediyl-bi(methylene)dimalonic acid ; ADPA: anthracene 9,10-dipropionic acid BODIPY: boron dipyrromethene; ce6: chlorin e6; CAT: catalase; CH_2Cl_2: dichloromethane; CNT: carbon nanotube; DCFH-DA: dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; DD-PpIX: 2,4-diacetyl deuteroporphyrin IX dimethyl ether; DHLA: bidentate dihydrolipoic acid; DHMA: 1,8-Dihydroxy-3-methylanthraquinone; DHR: dihydrorhodamine 123; DMF: dimethylformamide; DMSO: dimethylsulfoxide ; DOX: doxorubicin; DPPC: 1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPBF: diphenylisobenzofuran; DPPE-PEG2000: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine- N-[methoxypoly(ethylene glycol)-2000]; DSPE-PEG2000-amine: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[aminopoly(ethylene glycol)-2000]; EDA:

ethylendiamine; EG3: triethylene glycol; EPR: enhanced permeability and retention; Et_2O: diethyl ether; FA: Folic acid; FAR: folic acid receptor ; FHP: folate-heparin-Pheo-a; FITC: fluorescein isothiocyanate; GO: graphene oxide; GSH-Px glutathione peroxidase activities ; RP-HPLC: reverse phase high performance liquid chormatography; HRP: horseradish peroxidase; IC_{50}: concentration of a drug that is required for 50% inhibition *in vitro*; IONP: iron oxide nanoparticle; LD_{50}: light dose that is required for 50% destruction *in vitro*; *m*-THPC: m-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin; MC540: merocyanine 540; MEH-PPV: poly[2-methoxy-5-((2-ethylhexyl)oxy)-p-phenylenevinylene]; MRI: magnetic resonance imaging; MSN: mesoporous silica nanoparticles; NHS: *N*-hydrosuccinimide; NLS: Nuclear Localization Signal ; NP: nanoparticle; OQLCS: amphiphilic octadecyl-quaternized lysine-modified chitosan; OEG: 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine; OOPS: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3[phospho-L-serin](sodium salt) ; ORMOSIL: organically modified silica; P1-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)–10,15,20–triphenylporphyrin; PAA: polyacrylamide; PBS: phosphate buffered saline; PAH: polyallylamine hydrochloride; PC: phthalocyaninedihydroxyle; *Pc*: phthalocyanine; PCR: polymerase chain reaction; PDT: photodynamic therapy; PEG: polyethylene glycol; PEOzPLA: poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(D,L-lactide) ; PF-NLC: nuclear-targeted polysaccharide-folate coated nanostructured lipid carrier; Pheo-a: pheophorbide a; PMB: Photomolecular Beacon ; POPC: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ; PpIX: Protoporphyrin IX; pRb: retinoblastoma protein; PS: photosensitizer; RFC: reduced folate carrier; ROS: Reactive Oxygen Species; RTT: thermal therapy; SOC: N-succinyl-N-octyl chitosan; SOD: superoxide dismutase); MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; TOAP: tetrakis(o-aminophenyl)porphyrin; UCN: upconverting nanoparticles; UV-Vis: ultraviolet-visible; ZnaPc: zinc tetraaminophthalocyanine ; ZnPc: Zinc(II) phthalocyanine.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative to chemotherapy and radiotherapy for cancer treatment. PDT is clinically applied to treat age-related macular degeneration and several types of cancer. PDT uses photosensitizers (PSs) and requires oxygen and light. When PSs are exposed to a specific wavelength of light, the excited triplet state can transfer energy to oxygen to form singlet oxygen [1]. Singlet oxygen ($^1O_2$) is highly reactive and toxic and can react with various cellular constituents to cause cell damage and eventually cell death. Certain of the PSs' properties limit the use of PDT namely their light absorption capacity, singlet oxygen production and biodistribution, while the tumour selectivity involved still remains to be optimized. A new generation of PSs is currently under development and study to handle these limitations of PDT. Tumour targeting therapy is a promising therapeutic strategy (active targeting and passive targeting) [2]. It can be

achieved *via* the vectorization of PSs meaning either the introduction of the latter into liposomes or their encapsulation in nanoparticles (NPs). It can also be carried out using the addressing strategy by conjugation of the PS with molecules known to have specific interactions with receptors, which are overexpressed on tumour cells as this enhances their selectivity for cancerous tissue as opposed to healthy tissue.

Folic acid (FA) has many of the qualities required for such an addressing molecule: 1- its high receptor affinity ($K_d \sim 10^{-10}$ M); 2- its small size (imparting better pharmacokinetic properties to the conjugate); 3- its easy availability and cheapness; 4- its compatibility with organic and aqueous solvents; and 5- its stability during storage. Folate penetrates into the cells in three different ways - the reduced folate carrier (RFC, low affinity), the proton-coupled folate transporter and the folate receptor (FAR, high affinity) [3]. FAR is a cell surface glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycopolypeptide [3], which allows FA internalization (oxidized form) into cells in vesicles by endocytosis [4, 5]. There are three isoforms of this receptor, α, β, γ. Each of them has a specific tissue distribution and a different ability to bind folate [6]. FRs exhibit limited expression on healthy cells, but are often present in large numbers on cancer cells [7]. For example, FARs are known to be overexpressed in various epithelial cancers of the ovary, mammary gland, colon, lung, prostate, nose, throat and brain and in leukemic cells [8]. Therefore targeted PDT using FARs appears to be a promising treatment for various type of cancers.

Numerous reviews related to this topic have been published, for example [9] to deliver chemotherapeutic agents [10], as gene delivery systems [11], to improve the selectivity of magnetic NPs [12], vectors of protein toxins [13], oligonucleotides [14], imaging, radiotherapeutic, immunotherapeutic agents and enzyme constructs for prodrug therapy [15]. As far as we know, no review has focused on the use of FA for targeted PDT. We will discuss the strategies that have been developed to couple FA to PSs or NPs, the influence of the presence of FA on the photophysical properties of the objects and finally the effects on selectivity and phototoxicity *in vitro* and *in vivo*. All the data are summed up in Table 1.

Table 1: Folic acid targeted photosensitizers or nanoparticles for PDT applications.

reference	Folic acid coupling	Purification	Type of object (Yield if determined)	Number of FA units	PS	Spacer	Φ_f	Φ_Δ	In vitro	In vivo
FA-Targeted photosensitizer										
[22]	FA-NHS + PS-NH_2 (1) ZnTAPc (2) ZnTAPcFA	Precipitation in CH_2Cl_2/hexane HPLC (C18 column)	ZnTAPcFA 67%	1	ZnaPc	no	(1) 0.015 (2) 0.037 in DMSO	ZnTAPc 0.31 ZnTAPcFA 0.21 in DMSO	no	no
[23]	FA-NHS + PS-NH_2	Precipitation in CH_2Cl_2/hexane C_{18}-HPLC	ZnaPc-FA	1	ZnaPc	no	no	DPBF	KB(+) A549 (-) *MC, Comp, PDT(1 and 2 photons)*	no
[32]	FA-hex-NH_2 + PS-NHS (1) PS-PEG-NH_2 + FA-NHS (2)	Precipitation/Washing with Et_2O/CH_2Cl_2	(1) P1-hex-AF 34 % (2) P1-PEG-FA 28 %	1	P1-COOH	Hexane-1,6-diamine or (2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine	(1) = 0.098 (2) = 0.099 In EtOH	nd	KB(+) *Comp, PDT*	no
[34]	FA-spacer-NH_2 + PS-COOH (activation with DCC/NHS)	Dialyze in deionized water Reverse phase silica column	Chlorin-PEG-FA 36.5%	1	Like m-THPC	PEG (Mw: 3350)	(1) 0.12 (2) 0.10 in DMF	(1) 0.75 (2) 0.74 in DMF *in vitro*: NaN_3 and D-mannitol	Hela (+) Hep-2(+) A549 (-) *MC, Comp, PDT*	no
[42]	"click chemistry" FA-spacer- N_3 + CH≡C-PS	Precipitation/Washing with Et_2O C_{18}-HPLC	Bodipy-PEG-FA (1) : 32% Bodipy-S-PEG-FA (2) : 27%	1	BODIPY	PEG= 2-[2-(2-**azido**ethoxy)ethoxy]ethanamine (S)	(1) 0.20 (2) 0.20 in DMF	DPBF	KB(+) MCF7(-) *MC, Comp, PDT*	No
[17]	PS-spacer-NH_2 + FA (activation with DCC)	Precipitation/ Wahing with Et_2O/CH_2Cl_2 Dialyze (saline and water) C_{18}-HPLC	Chlorin-PEG-FA 79 %	1	*m*-THPC like	PEG (2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine	(1) 0.20 (2) 0.18 in EtOH	*m*-THPC like : 0.72 chlorin-PEG-FA : 0.57 in EtOH	no	Nude mice xenografted with KB(+) or HT29(-) *Optical fiber fluorimetry, Design of experiment*

[33]	FA-spacer1-NH_2 + PS-NHS	Column chromatograpy	Ce6-spacer-FA 55.8% (**1**)	1	Ce6	Hexane-1,6-diamine (**1**)	nd	0.70 (H_2O), 0.80 (triton-100), 0.63 (HAS, H_2O), 0.68 (pyridine)	Hela(+) *Comp, PDT*	Rats with sarcoma-1 *PDT*
[21] [19]	PS-spacer-NH_2 + FA-NHS	Precipitation in Et_2O HPLC (C_3 column)	Pyro-GDEVDGSGK-FA 95% Pyro-K-FA 87%	1	Pyro	Peptide GDEVDGS GK or lysine	nd	nd	KB(+) HT1080(-) CHO(-) *MC, FC, Comp, PDT*	Nude mice xenografted with KB(+) or 1080(-) *Imaging, ex vivo organ distribution*
FA-targeted triggered photosensitizer (caspase-3)										
[49]	PS-spacer-NH_2 + FA-NHS	Precipitation in Et_2O C_3-HPLC	Pyro-K(FA)GDEVDG SGK(BHQ-3) FA-targeted PMB : 59%	1	Pyro	Lateral chain of lysine	nd	nd	KB(+) HT1080(-) CHO(-) *MC, FC, PDT*	Nude mice xenografted with KB(+) or 1080(-) *Imaging, histology, ex vivo organ distribution, PDT*
FA-targeted nanoparticles without release of photosensitizer										
[53]	PS-spacer-NH_2 + FA (activation with EDC)	Dialyze	C60-IONP-PEG-FA	nd	Fullerene C60	NH_2-PEG(2000)-NH_2	nd	*In vitro*: DCFH-DA	MCF7 * *Apoptosis assay* * *PDT and RTT*	Female BALB/c mice xenografted with 1080 *PDT and RTT*
[48]	PS-spacer-NH_2 + FA-NHS	Precipitation/Washing with Et_2O/CH_2Cl_2	DOX-hydrazone-fullerenol-FA	nd	Fullerene C60	EG3 Triethylene glycol	nd	ABDA	Hela (+) L929(-) A549 (-) *CM, FC, PDT chemo therapy with doxorubicin*	no
[29]	GO-NHS + FA-NH_2 +$Zn(NO_3)_2$	Washing with water	GO-FA GO-FA-ZnO	nd	Graphene ZnO	no	nd	*In vitro*: DCFH-DA	Hela *CM, PDT*	no
[50]	QD-spacer-NH_2 + FA-NHS	Dialyze (saline aqueous solution)	CdTe(S)-type QD	-	QD	(1) 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine (2) jeffamine D-400)	nd	nd	KB(+) HT29(-) * experimental design for PDT	no

[46]	FA-spacer-NH_2 + Lipo-FMSNs/PpIX	Centrifugation/Washing with PBS	Phospholipid-capped, PS loaded MSN	nd	PpIX	DSPE-PEG_{2000}-NH_2	nd	I^-	Hela(+) A549(-) *PDT*	BALB/c nude mice with subcutaneous inoculation of B16F10 cells *Histology, immunoblotting, PDT*
[51]	Nanoparticles(PS)-spacer-NH_2 + FA-NHS	-	ORMOSIL nanoparticles	nd	Alkoxy silane PS (P1 or *m*-THPC)	NH_2-PEG-silane	nd	nd	A549, CCD-34Lu *Comp*	no
[52]	Nanoparticles-spacer-NH_2 + FA-NHS then ZnPc added	Centrifugation/Washing with PBS	Upconverting nanoparticles	nd	ZnPc	PEI	nd	ADPA	HT29 *CM, Comp*	Yes but not with the targeted NP
[31]	*reverse-phase evaporation method*: FA-OQLCS (water phase) + UCN and MC540 (oil phase)	Centrifugation	Polymeric liposome nanocarrier	nd	MC540	no	nd	ABDA *In vitro*: Image-IT Live ROS	OSCC (+) *CM, PDT*	No
[24]	FA-NHS + Nanoparticles(FITC)-NH_2	Centrifugation/Washing with PBS	Silica coated multifunctional up converting NPs	nd	DHMA	no	nd	ABDA	Hela(+) HepG2 293T(-) *CM, Comp, PDT* *Western blot*	No
[25]	FA-NHS + Nanoparticles(PS)-NH_2	Centrifugation/Washing with PBS	Silica coated multifunctional up-converting NPs	nd	hypericin	no	nd	ABDA	293T(+) Hela(+) *CM, Comp, PDT* *Western blot*	No
[37]	FA-NHS + aqueous sol of SOC-NH_2 = FASOC FA-SOC coated on the surface of Nps *via* hydrophobic interaction then ZnPc added	Centrifugation/Washing with distilled water	Upconversion nanoparticles	nd	ZnPc	SOC	nd	DPBF *In vitro*: DCFH-DA	HELF(+) Bel-7402(+) MDA-MB-231(+) A549(-) *CM, Comp*	Female athymic nude mice and normal (Kumming) mice with Bel-7402 and S180 *Fluorescence imaging, PDT, Histology*
FA-targeted nanoparticles with release of the photosensitizer										
[44]	Extrusion : solution of FA-spacer-NH_2 + Liposomes(PS)	-	Liposomes (DPPlsC)	nd	$AlPcS_4^{4-}$	PEG3350-DSPE	nd	nd	KB(+) *CM, PDT*	No

[45]	Extrusion : solution of FA-spacer-NH_2 + Liposomes +solution of PS	-	liposomes	nd	*m*-THPC	PEG5000-DSPE	nd	nd	A549(-) KB(+) *CM, Comp, PDT*	No
[43]	Microemulsification: solution of FA-spacer-NH_2 + Liposomes +solution of PS	-	Liposomes (POPC/OOPS)	nd	ZnTPP	PEG2000-DSPE	nd	*In vitro:* $^1O_2$ hν	Hela(+) A549(-) *CM, Comp, PDT*	No
[26]	FA-COOH + Copolymer-OH and *m*-THPC encapsulation in parallel using thin film method (activation with DDC/DMAP)	-	polymeric micelles	12% of PEOz-PLA coupled by folate	*m*-THPC	no	nd	nd	HT29(-) KB(+) *CM, Comp*	Female BALB/cAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrlNarl nude mice with KB or HT-29 *PDT, Biodistributio, Histology*
[39]	FA-spacer- Polymer-NH-NH_2 + PS-$COCH_3$	Precipitation in Et_2O Washing with THF	pH-sensitive polymeric micelles	1	DD-PpIX	PEG	nd	nd	Hela(+) *CM, FC, PDT*	no
[41]	CDI-activated Pdots (with PS) + FA-spacer-NH_2	Filtration/Washing with PBS	Polymer dots	nd	*m*-THPC	PEG_{2000}	nd	ABDA *In vitro*: Image-IT Live ROS	C6(+) MCF-7(+) NIH 3T3(-) *CM, PDT*	No
[28]	Pullulan-OH + FA-COOH (PF) (activation with DDC/DMAP) OH-PF + PS-COOH PFP-1: 2.3 pheoA/100 anhydroglucose) PFP-2: 4.5 pheoA/100 anhydroglucose) PFP-1: 6.2 pheoA/100 anhydroglucose)	Dialyze (distilled water)	Polysaccharide-based nanogels	1.6 FA/100 glucose units	Pheo-a	no	nd	DMA In DMF/PBS Phéo-a 0.52/0.17 PFP-1 0.43/0.13 PFP-2 0.43/0.01 PFP-3 0.44/0.01	Hela cells(+) *CM, PDT*	Male Balb/C-nu mice * imaging
[27]	Pullulan-OH + FA-COOH (PF) (activation with DDC/DMAP) Emulsion: Pullulan-FA (PF) + NLC with Pheo-a	Dyalize (deionized water)	PF-NLC (Nano lipid carrier) 91-95%	3.36 FA/100 glucose units	Pheo-a	no	nd	DPBF	Hela(+) *CM, PDT* *Hemolysis assay*	no
[54]	FA-spacer-NH_2 + PS-spacer-NH_2 + heparin-COOH (FHP) (activation with EDC)	Dialyze	Folate-heparin-pheophorbide a	2.67 or 3.04	Pheo-a	Ethylene diamine	nd	HP1= 0.47 HP2= 0.47 FHP1=0.48	Hela(+) *CM, PDT*	no

	FA:heparin:phéo HP1: 0; 1; 4.67 HP2: 0; 1; 7.24 FHP1: 3.04; 1; 4.14 FHP2: 2.67; 1; 6.71	Washing with MeOH	(FHP nanoparticles)					FHP2= 0.47 in DMF DMA		
[38]	FA-spacer-NH_2 + heparin-COOH (HF) HF-COOH + RA-spacer-NH_2 (activation with EDC)	Dialyze	Heparin-folate-retinoic acid (HFR) 70 %	H:FA:RA 1:2.2:10.96	Pheo-a	Ethylene diamine	nd	(DMF/PBS) HFR-P 0.40/0.07	Hela(+) HT29(-) *CM, PDT*	No
[40]	FA-spacer-Polymer-SH + AuNp	Dialyze (deionized water)	Gold Nps pH sensitive	nd	Pheo-a	PEG	nd	nd	Hela(+) *CM, FC, PDT*	No
[36]	Nps + FA-spacer-NH_2 DSPE-PEG2000-FA commercially available	Centrifugation/ washing with ultrapure water	Selenium-rubyrin loaded nanoparticles	nd	$NMe_2Se_4N_2$	DSPE-PEG_{2000}-NH_2	nd	DPBF 0.04 pH=7.4 0.69 pH=5.0 *In vitro*: DCFH-DA	Hela(+) *CM, FC, PDT* IC_{50}=35 µg/mM	BALB/c nude mice with Hela tumor * histology * PDT
[20]	Nanoparticles Nps-spacer-OH + PS then Nps-spacer(PS)-NH_2 + FA-NHS Liposomes FA-NHS+ PE-NH_2 FA-PE + talin + Nps-PS conjugates (encapsulation)	Dialyze Ion exchange resin	Nanoparticles Liposomes (phosphatidyl ethanolamine (PE))	nd	TOAP	L-Cysteine	nd	nd	nd	nd
[35]	Boc-hydrazine-CNT-NHS + FA-NH-OEG-NH_2 deprotection + DOX = DOX-hydrazone-CNT-FA	Precipitation/Washing with Et_2O/CH_2Cl_2/isopropyl alcohol Dialyze	Carbon nanotube	FA : 0.033 mmol/g	Carbon nano tube	OEG	nd	ABDA	Hela (+) L929(-) A549 (-) *CM, FC, PDT* *chemotherapy with doxorubicin*	no
[30]	GO-NHS + FA-NH_2 then loading of PS	Dialyze (sodium bicarbonate and water)	FA-GO loaded with Ce6	nd	Ce6	no	nd	nd	MGC803 *CM, Comp, PDT*	no

ABDA: 9,10- anthracenediyl-bi(methylene)dimalonic acid ; ADPA: anthracene 9,10-dipropionic acid BODIPY: boron dipyrromethene; ce6: chlorin e6; CH_2Cl_2: dichloromethane; CNT: carbon nanotube; DCFH-DA: dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; DD-PpIX: 2,4-diacetyl deuteroporphyrin IX dimethyl ether; DHLA: bidentate dihydrolipoic acid; DHMA: 1,8-Dihydroxy-3-methylanthraquinone; DMF: dimethylformamide; DOX: doxorubicin; DPPC: 1,2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPBF: diphenylisobenzofuran; DPPE-PEG2000: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine- N-[methoxypoly(ethylene glycol)-2000]; DSPE-PEG2000-amine: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[aminopoly(ethylene glycol)-2000]; EDA: ethylendiamine; EG3: triethylene glycol; Et_2O: diethyl ether; FA: Folic acid; FITC: fluorescein isothiocyanate; GO: graphene oxide; RP-HPLC: reverse phase high performance liquid chormatography; HRP: horseradish peroxidase; IC_{50}: concentration of a

drug that is required for 50% inhibition *in vitro*; IONP: iron oxide nanoparticle; LD_{50}: light dose that is required for 50% destruction *in vitro*; m-THPC: m-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin; MC540: merocyanine 540; MEH-PPV: poly[2-methoxy-5-((2-ethylhexyl)oxy)-p-phenylenevinylene]; MSN : mesoporous silica nanoparticles nd: not determinated; NHS: *N*-hydrosuccinimide; OEG : 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine; OOPS : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3[phospho-*L*-serin](sodium salt); OQLCS: amphiphilic octadecyl-quaternized lysine-modified chitosan; OEG: 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine; P1-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)–10,15,20–triphenylporphyrin; PBS: phosphate buffered saline; PDT: photodynamic therapy; PEG: polyéthylène glycol; PEOzPLA : poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(D,L-lactide) ; Pheo-a: pheophorbide a; PF-NLC : nuclear-targeted polysaccharide-folate coated nanostructured lipid carrier; PMB: Photomolecular Beacon; POPC : 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ; PS: photosensitizer; RTT: thermal therapy; SOC: N-succinyl-N-octyl chitosan ; TGA: thioglycolic acid; MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; TOAP: tetrakis(o-aminophenyl)porphyrin; UCN: upconverting nanoparticles; ZnaPc : zinc tetraaminophthalocyanine.

CM : confocal microscopy, FC : flow cytometry, Comp : competition experiments with free FA

1. Chemistry of FA targeted PSs or NPs

Synthesis

FA is a small water-soluble molecule and vitamin in the B group, which is shown in Figure 1. The FA molecule consists of three components: a pterin residue, *p*-aminobenzoate and a glutamic acid residue. Folic acid can be coupled *via* either α- or γ-carboxyl groups of its glutamate residue (Figure 1), but it is described that only the γ-conjugate is capable of binding to FR [16]. It is therefore important to determine the relative amounts of each of the α- and γ-carboxyl-linked conjugates. In a previous study [17], we determined by RP-HPLC and ^{1}H NMR that ca. 70% of the PSs were linked through the γ-carboxyl group. These proportions of α- and γ-products are consistent with the previously reported results obtained for coupling of FA with amine derivatives. [18].

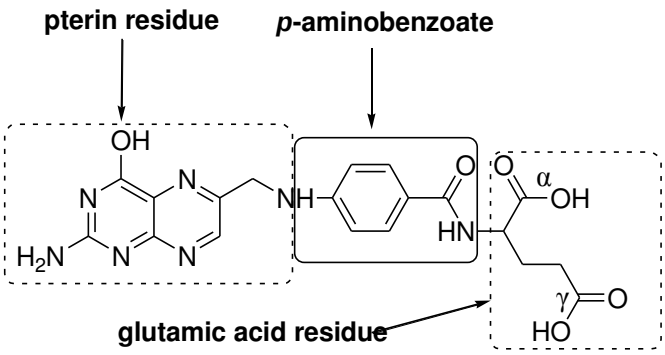


Figure 1: Chemical structure of FA.

FA can be conjugated to small or large drug molecules such as PSs, liposomes, or gold nanoparticles (AuNPs) without disruption of its binding properties. In most cases, the conjugation may be performed *via* a spacer introduced between the FA and the different objects. The nature of the linker is often a polyethylene glycol (PEG) arm of different lengths. A peptide or just one amino acid such as lysine or cysteine have also been used but less frequently [19,20,21].

Different strategies can be used to couple FA to PS or NP *via* a spacer or by directly linking them together. These are summed up in Figure 2:

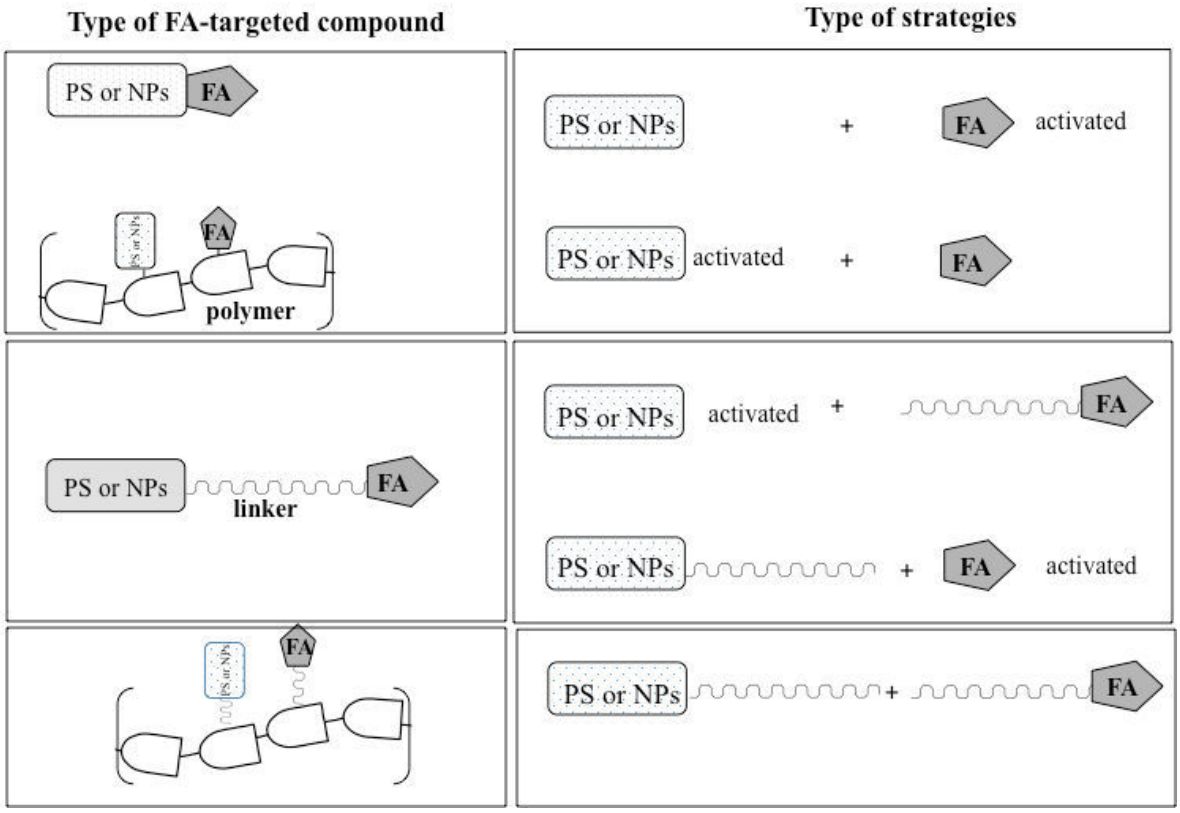


Figure 2: Strategies for conjugation of FA with PS or NPs.

Direct folate coupling

Few articles describe the synthesis of molecules directly connected to FA even though it seems a simple strategy for improving the tumour selectivity of these objects thanks to the FA unit. Several methods for the preparation of these new targeted systems have been reported in the literature. The first and most widely used method involves binding the –COOH group of FA and the $–NH_2$ group of PSs (only zinc phthalocyanines used, Figure 3, [22,23]), or each being bound to the surface of amine-functionalized silica-coated converting nanocomposites [24,25] thus providing an amide bond. FA is activated by *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and then coupled to the PS or NPs. It is also possible to link the carboxylic function of FA *via* another type of amide bond. Secondly, Folate has been conjugated to a polymer (benzyl-PLA-PEOz) *via* an ester bond (Figure 3) formed between the –COOH group of FA and the -OH of the polymer [26]. Thirdly, the same method has been used to synthesize polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-PS conjugates [27,28]. In these three cases, FA is activated by using the DCC coupling agent with DMAP. PS is attached to pullulan in the same way as folate *via* its carboxylic group [28] whereas an emulsion is required for the second case [27]. FA-conjugated graphene (GO)–ZnO nanohybrid [29] has also been synthesized by using the binding of the $–NH_2$ group of FA and the –COOH group of the graphene to provide an amide bond. (Figure 3) [29,30]. An unusual method has also been developed to synthesize a merocyanine 540 (MC540) and UCN co-loaded functional

polymeric liposome nanocarrier, (MC540+ UCN)/FPL. A reverse-phase evaporation method was used to transfer UCNs and MC540 from the oil phase to the aqueous phase where the folate acid is grafted OQLCS (FA-OQLCS) [31].

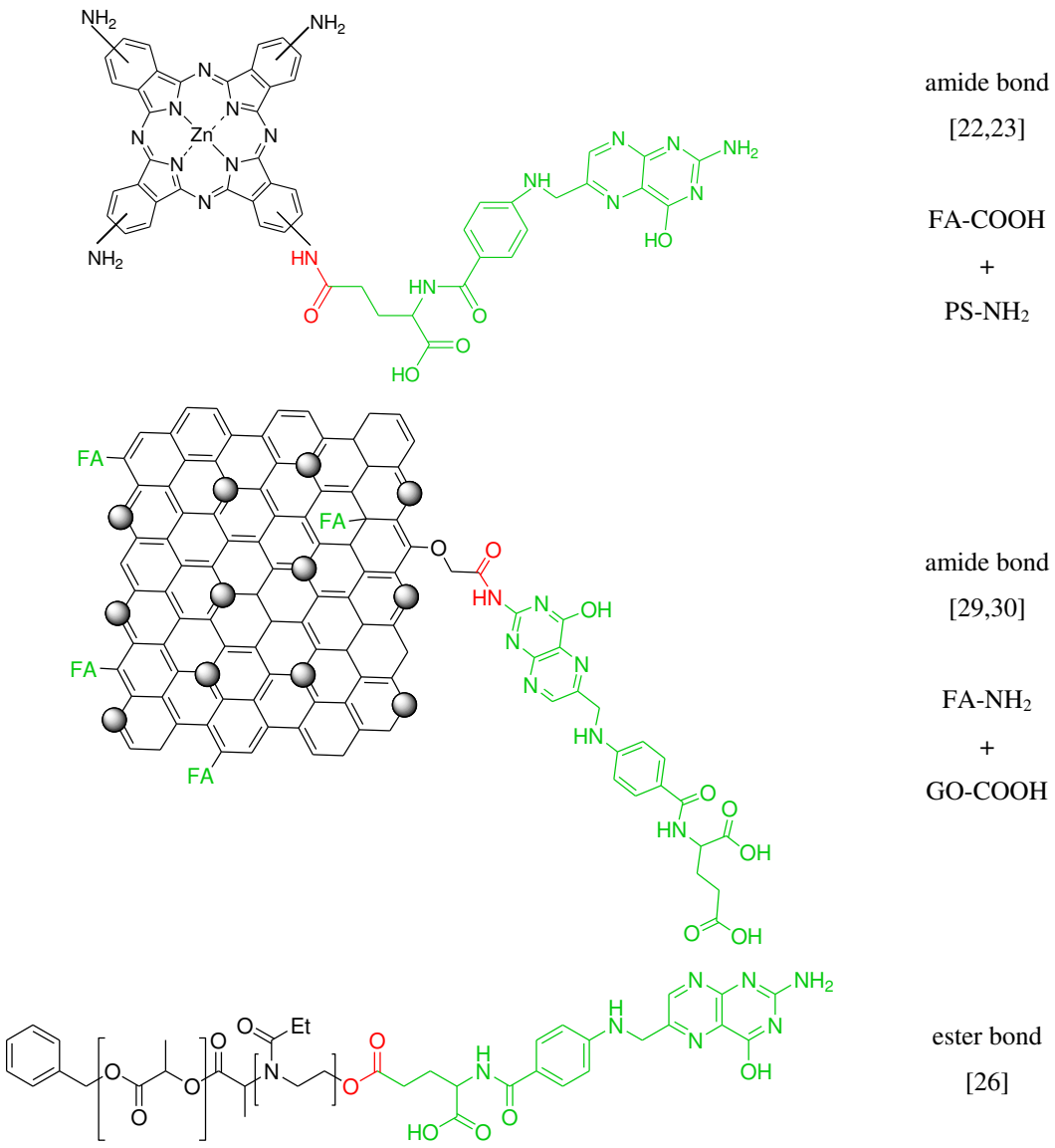


Figure 3: Examples of FA conjugates by direct Folate coupling.

Folate coupling via a spacer

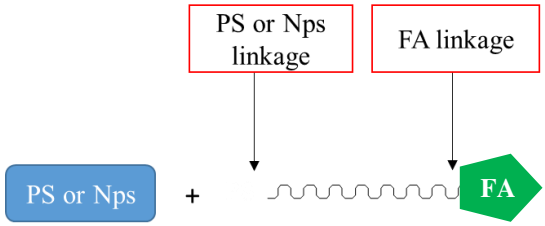
Two different ways are principally used: the spacer introduced is linked on (1) the FA moiety or (2) the object chosen for improving PDT tumour selectivity.

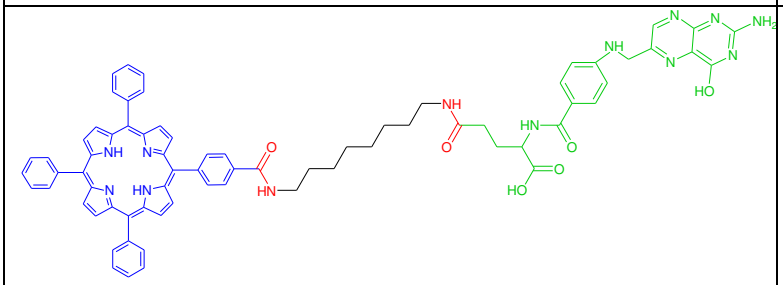
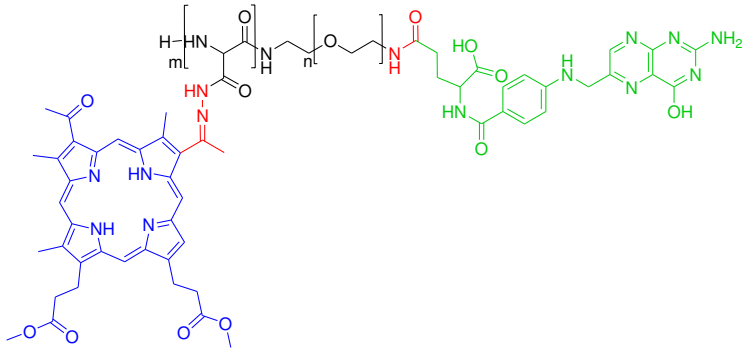
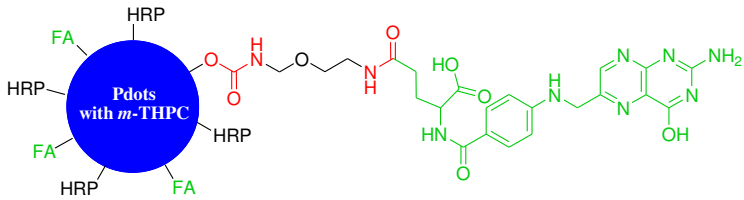
1- A convenient method is to attach a spacer with $–NH_2$ groups at the extremities which enables it to be linked with FA at one end and to then conjugate this FA-spacer-NH_2 to the carboxylic function of objects involving an amide bond. PSs-spacer-FA were synthesized by this strategy using *N*-hydroxysuccinimide activated PSs [32,33] or un-activated PS [34] (Table 2). In the latter case, activation is achieved by adding a coupling

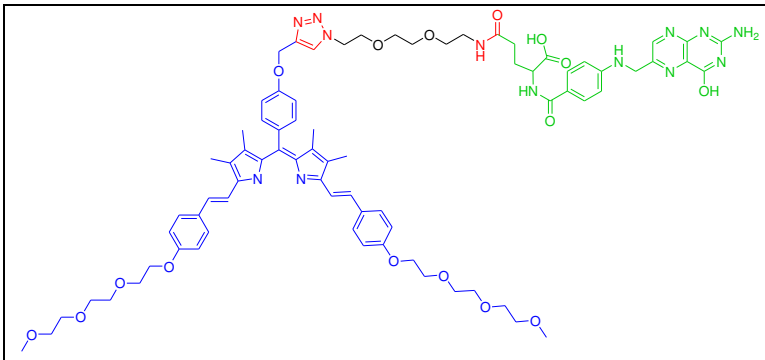
agent (EDC) during the coupling reaction. Sulfo-hydroxysuccinimide-activated CNTs [35] and selenium-rubyrin loaded NPs [36] have been conjugated with FA in this same way mixing NPs or CNTs with FA-spacer-NH_2. It is the same idea as for the synthesis of FA-SOC upconversion NPs loaded with ZnPc (Zinc II phthalocyanine) - FA-SOC-NH_2 are sonicated in a solution with the corresponding NPs [37]. Amphiphilic heparin-folate-retinoic acid bioconjugate (HFR) can be synthesized using the same chemical conjugation of FA (F) and retinoic acid (R) to a heparin backbone. The HFR bioconjugate can self-assemble into NPs with an efficient encapsulation of a hydrophobic PS - pheophorbide a (Pheo-a) [38]. Novel FA (FA)-conjugated amphiphilic block copolymers of PEG and poly-β-benzyl-L-aspartate (PBLA) with the potential to act as pH-responsive drug release reservoirs have also been synthesized [39]. To achieve this, first FA-PEG-PBLA copolymers were prepared by ring-opening polymerization of BLA-NCA mixed with FA-PEG-NH_2. The difference comes in the second step - the PS, 2,4-diacetyl deuteroporphyrin IX dimethyl ether (DD-PpIX), was conjugated to the copolymers through pH-sensitive hydrazone linkage (Table 2) [39] and not *via* an amide bond as for the previous cases. The –$COCH_3$ function of DD-PpIX will therefore be linked with the–CO-NH-NH_2 group of the copolymer. The first syntheses used DMSO/pyridine as the solvent whereas DMF and acetic acid were used for the conjugation of DD-PpIX. AuNPs were successfully modified with FA (FA)-conjugated biocompatible blocked copolymers through a bidentate dihydrolipoic acid (DHLA) linker. Then, as described for the last study, the hydrophobic PS, Pheo-a, was conjugated to the stable vectors through a pH-sensitive linkage (hydrazone linkage) [40]. A similar approach was used to prepare FA and horseradish peroxidase (HRP)-bifunctionalized semiconducting polymer dots (FH-Pdots). FA-PEG_{2000}-NH_2 and HRP were conjugated onto the surface of Pdots through stable urethane linkages (Table 2) between the *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI)-activated hydroxyl groups and the terminal amino groups of HRP or FA-PEG_{2000}-NH_2 [41].

Recently, two folate-conjugated diiododistyryl boron dipyrromethenes were prepared by click chemistry. FA was treated with a NH_2-spacer-N_3 in the presence of DCC and pyridine in dimethylsulfoxide (DMSO) and in this case the aim was to obtain an azido folate rather than an amine folate. This folate component was then clicked with the alkynyl distyryl BODIPYs to provide the targeted conjugates (Table 2) [42]. Folate-targeted liposomes for porphyrin incorporation were prepared by microemulsification following standard procedures [43], by the conventional film method followed by extrusion [44,45] or simply by mixing Folate-PEG-liposomes with a suspension of NPs [46]. Folate-PEG-liposomes, such as Folate-PEG3350-DSPE, can be prepared as described in the literature [47], by reacting FA-NHS with NH_2-PEG-liposomes suspension but they can also be obtained commercially (from Aventi Polar Lipids for example).

Table 2: Examples of FA conjugates by folate coupling *via* a spacer introduced with the FA moiety.



Conjugates	PS or Nps linkage	FA linkage
 [32]	amide linkage	amide linkage
 [39]	hydrazone linkage	
 [41]	urethane linkage	

 [42]	triazole linkage	

2- In another, widely used method, the spacer is linked to the PS [21,34,48,49] or NP [20,50,51,52] to introduce a $–NH_2$ group at the extremity to facilitate the coupling of activated -COOH FA. In this case, *N*-hydroxysuccinimide (NHS) activated FA was first synthesized by a classical preparation with NHS in dichloromethane (CH_2Cl_2) before the coupling reaction with PS or NP-spacer-NH_2 is carried out. Only two papers described methods which directly used FA and added a coupling agent (EDC) during the conjugation reaction with PS or a NP component [17,53].

3- A combination of these last two strategies exists. Both FA and PS are linked to a spacer (ethylene diamine) and then coupled to a polymeric carbohydrate molecule. Novel amphiphilic polysaccharide/PS conjugates were synthesized by the chemical conjugation of heparin (-COOH groups) with FA-spacer-NH_2 and PS-spacer-NH_2 [54].

Even if it is possible to couple FA *via* the amino group of its pterin residue [29,30], most cases in the literature reported FA coupling *via* one of the carboxyl groups of its glutamate residue. Direct coupling only provided amide or ester bonds. Folate coupling *via* a spacer has been much more studied than direct FA coupling and in these cases, FA was always linked to the spacer *via* an amide linkage whereas the PS, Nps or polymers were conjugated to the the spacer through different types of linkage such as hydrazone, urethane, triazole and amide linkages. As we previously mentioned, FA can be coupled *via* either its α- or its γ-carboxyl groups. Unfortunately, even if it has been shown in literature that only the γ-conjugate is capable of binding to FAR, only three papers specified the relative amounts of each of the α- and γ-carboxyl-linked conjugates. By ^{1}H-NMR and RP-HPLC, authors determined that 70 - 85% [17,32,42] of the conjugate mixture corresponds to the γ-isomer. The less hindered environment of the γ-carboxy group favoured its conjugation with other molecules compared to the α-carboxy group.

Purification and Yields

As shown in Table 1, all papers describe the same types of purification for all FA conjugates:

- precipitation or centrifugation (often in cold diethyl ether) to collect the bioconjugates following by washing (Et_2O, CH_2Cl_2, water ec.).
- or dialysis to remove non-reacted FA.

In the case of FA-targeted PSs, purification on reversed-phase HPLC is often performed. These conjugates were purified on C18 [17,22,23,42] or C3 [19,21,49] columns.

On one occasion, the separation of liposome-encapsulated NP-PSs from free NP-PSs was achieved *via* an ion exchange method based on the affinity of an exchange resin for charged NP-PSs and the repulsion by the same resin of oppositely-charged liposome-encapsulated NP-PSs [20].

Yields are generally given for publications describing the syntheses of FA-targeted PSs. The synthesis of FA directly conjugated with phthalocyanine gave a good yield of 67% [22]. In the case of syntheses of FA-spacer-PS, the majority were synthesized with a yield of between 27 and 36.5% [32,34,42]. Our team [17] succeeded in obtaining a good yield of 79% for the *m*-THPC-PEG-FA compound (*m*-THPC: *m*-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin) and in isolating the γ-isomer from crude mixture with 51% yield. A Korean team obtained a similar compound, Ce6-PEG-FA, with a 55.8% yield [33]. The best yields for FA-targeted PSs were obtained when the spacer was composed of amino acids - 87% for Pyro-K-Folate (PKF) and 95 % for Pyro-GDEVDGSGK-FA (PPF) [19,21]. Only two other publications provide details of yields and these concern FA-targeted NPs with a release of the PS. The reaction yield was about 70% for folate–heparin–retinoic acid bioconjugates (HFR, [38]) and 91-95% for FA conjugation on pullulan [27].

All studies on FA coupling gave good yields. Adding a spacer between PS and FA decreased somewhat the yield of conjugates (67% for direct coupling compared to 30-50% for FA coupling *via* a spacer) except when the spacer is a peptide.

FA quantification

All publications dealing with the coupling of one PS (porphyrin, chlorin, phthalocyanine) to FA only describe a 1/1 ratio. In the future, a new strategy could be to increase the quantity of FA per PS to increase the affinity for FAR (FA receptor). For example, it would be interesting to compare the affinity and PDT efficiency of a monocarboxylic tetraphenyl porphyrin coupled to FA with that of a bi- or tetra-carboxylic tetraphenyl porphyrin.

Less data is available on the quantification of FA onto NPs. For polymeric micelles, the ratio of folate conjugation on the PEOz-PLA diblock copolymer was determined by comparing the integral peak area associated with the feature signals of folate and benzyl-PLA; 12% of PEOz-PLA was coupled to folate [26] whereas the ratio for other polymeric micelles is one FA on the

polymer, which is perhaps due to the presence of a spacer between the polymer and the FA moiety [39]. In the case of Pullulan/folate-PSs conjugates, the degree of substitution for each FA/Pullulan (the number of FA per hundred glucose units in pullulan) was determined by UV-visible spectrophotometry [27] or by assignments of ^{1}H-NMR peaks [28]. The calculated degrees of folate substitution in pullulan were 1.6 [28] or 3.36 [27] per hundred glucose units. The PS Pheo-a was coupled to the pullulan/folate conjugate. Samples with different degrees of Pheo-a substitution were synthesized. The degrees of substitution calculated were 2.3, 4.5 and 6.2 Pheo-a groups per 100 anhydroglucose units of pullulan, respectively [28].

For Heparin-folate-PS conjugates, the coupling ratios of folate and Pheo-a for folate–heparin–Pheo-a (FHP) were 3.04 and 4.14 for FHP1 and 2.67 and 6.71, for FHP2, respectively [54]. The feed molar ratio of folate for folate–heparin–retinoic acid bioconjugates (HFR) was 5, whereas for Pheo-a it was found to be 20 % [38].

In the case of CNTs, the drug load of DOX–hydrazone–CNT–FA and the FA content on the prodrug was determined by thermogravimetric analysis. The amount of carboxyl groups on the CNT surface was 2.48 mmol/g, the amount of DOX on the prodrug was estimated to be 0.148 mmol/g and the amount of FA on the prodrug surface was 0.033 mmol/g [35]. Finally, for heparin, pullulan and CNTs–folate bioconjugates, publications have only reported on compounds with a ratio of PSs higher than the ratio of FA units.

2. Photophysical properties of FA targeted PSs or NPs

Fluorescence emission properties

One of the advantages of PSs is that they can emit fluorescence as well as producing ROS. Their emission properties are of great interest for the visualization of their incorporation into cancer cells which enable tumour sites to be detected. Unfortunately, only 5 publications have reported the influence of grafting FA onto the fluorescence properties of PSs. We first described the coupling of FA onto a monocarboxylic tetraphenyl porphyrin *via* two small spacers in 2005 [32]. We found no change in the fluorescence quantum yield (Φ_f) after FA grafting [55,32]. In our second study dealing with a modified *m*-THPC chlorin coupled to FA with a small PEG, the Φ_f decreased slightly from 0.20 to 0.18 in ethanol. Li *et al.* [34] synthesized the same molecule with a longer PEG spacer (PEG 3350) and also observed a slight decrease of Φ_f from 0.12 to 0.10 in DMF. Ke *et al.* [42] developed folate-conjugated distyryl boron dipyrromethene PSs and could not detect any difference in Φ_f in DMF (0.20 for targeted and not FA-targeted compound). Conversely, Khoza *et al.* [22] observed a 2.5 fold increase of Φ_f of the FA-targeted zinc tetraaminophthalocyanine in DMSO compared to non-targeted zinc tetraaminophthalocyanine.

The authors attributed this effect to the fact that low Φ_f values are known for amino-substituted phthalocyanines. The coupling of FA can thus decrease the quenching effect due to the engagement of one amine function in the amide bond with FA. No studies have been carried out concerning the fluorescence of FA when coupled to PSs or NPs.

In conclusion, grafting FA on PSs does not change their fluorescence properties except for amino PSs (see Table 3).

Table 3: Influence of FA targeting on PS's fluorescence emission.

Reference	PS	ϕ_f	
		PS	FA-targeted-PS
[32]	Porphyrin	0.10	0.10 (EtOH)
[17]	Chlorin	0.20	0.18 (EtOH)
[34]	Chlorin	0.12	0.10 (DMF)
[42]	Distyryl boron dipyrromethene	0.20	0.20 (DMF)
[22]	Tetraamino phthalocyanine	0.15	0.37 (DMSO)

ROS production

Different methods can be used to detect singlet oxygen. Direct singlet oxygen ($^1O_2$) luminescence can be recorded and singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) evaluated by comparison with a known PS. Another technique consists of using chemical probes whose absorption or fluorescence spectra are modified upon reaction with ROS. Four papers compared the influence of FA grafting on PSs upon $^1O_2$ production. We measured the Φ_Δ of FA-targeted monocarboxylic tetraphenyl porphyrin [32] compared to monocarboxylic tetraphenyl porphyrin. In ethanol, we did not observe any change in Φ_Δ (unpublished data). With *m*-THPC-like PS [17], we measured a decrease of 1.3 fold. This is in agreement with the work of Koza *et al*. [22] on zinc tetraaminophthalocyanine that also revealed a decrease of 1.48. Li *et al*. [34] also developed a chlorin coupled to a long PEG and FA and could not observe any decrease in the Φ_Δ. Introducing a larger spacer might prevent the quenching of $^1O_2$ by FA.

Few papers provide quantitative information about the formation of $^1O_2$ by FA-targeted NPs. Tian *et al*. [36] developed pH-activatable rubyrin-$NMe_2Se_4N_2$ NP. They evaluated Φ_Δ using DPBF at different pH but they did not compare the influence of the presence or absence of FA on Φ_Δ. It increased from 0.06 at pH 7.4 to 0.69 at pH 5. Li *et al*. designed NPs of heparin-folate PS [54] and ran comparisons using 9,10-dimethylanthracene (DMA). No difference could be observed between the Φ_Δ of the two NPs and they found =0.47 in DMF. The same team synthesized a heparin-folate-retinoic acid bioconjugate that could encapsulate Pheo-a [38]. They compared the

Φ_Δ of FA-targeted or non-targeted NPs to Pheo-a in DMF and found Pheo-a = 0.52, Pheo-a loaded into NP = 0.33 and Pheo-a loaded into FA-targeted NP = 0.40. If Φ_Δ decreases after encapsulation of Pheo-a into the NP, the coupling of FA does not prevent $^1O_2$ formation - on the contrary, it improves it (factor of 1.2) compared to the non-FA-targeted NP. In PBS, the $^1O_2$ formation decreased drastically due to the self-quenching effect of Pheo-a. The same observations were made by Bae and Na [28] who studied self-quenching polysaccharide-based nanogels composed of pullulan coupled to FA with the encapsulation of different amounts of Pheo-a. Using DMA, they found Φ_Δ 0.43 in DMF whatever the loading of Pheo-a which decreased to 0.13 in PBS for the NP with less Pheo-a and to 0.01 for the NP with the highest amount of Pheo-a.

Many papers have described the formation of $^1O_2$ by FA-targeted PSs or NPs after excitation even *in vitro* without any quantification.

Zhang *et al.* [41] developed horseradish peroxidase (HRP) semiconductor polymer dots doped with *m*-THPC and FA. They coupled HPR that acts as the catalyst for the H_2O_2-HRP chemiluminescence system that can excite *m*-THPC. They used ABDA to detect reactive oxygen species (ROS), and concluded that including *m*-THPC in the Pdots could constitute an effective PS for PDT applications.

Most of the authors aiming to determine intracellular ROS used DCFH-DA. Tian *et al.* [36] developed pH-activatable rubyrin-$NMe_2Se_4N_2$ NP and looked at the production of ROS *in vitro* in Hela cells using DCFH-DA and vitamin C or NAC (N-acetyl cysteine) as ROS scavengers. They proved that FA-$NMe_2Se_4N_2$ NP could produce ROS *in vitro* that could be quenched with vitamin C or NAC in a dose-dependent manner. Cui *et al.* [37] designed UCN with ZnPc and coated them with folate-modified amphiphilic chitosan and also used DCFH-DA in Bel-7402 cells after direct light excitation of ZnPc or excitation of the NP to prove the formation of ROS *in vitro*. They also checked with DBBF in a physiological solution and observed that the production of ROS was higher after 660 nm light excitation (68%) than 980 nm light (53%). Shi *et al.* [53] determined ROS formation in an MCF-7 human breast cancer cell line after incorporation of C60 decorated with iron oxide nanoparticles (IONP) onto fullerene and functionalized by PEG2000 with or without FA grafting. By confocal microscopy, green fluorescence of DCFH could be observed in cells treated with FA-targeted NPs whereas control cells incubated with non-targeted NP showed negligible fluorescence. Hu *et al.* [29] also used DCFH-DA to monitor the intracellular accumulation of ROS in Hela cells after incubation with FA-graphen oxide (GO)-ZnO nanobybrid both targeted and not targeted by FA. GO-ZnO caused significant intracellular ROS accumulation but the ROS concentration was found to be higher for FA-targeted-GO-ZnO. In a solution with redox-sensitive dihydrorhodamine 123 dye (DHR), they observed no difference between ROS levels caused by the FA-GO-ZnO and GO-ZnO.

Wang *et al.* [31] also synthesized polymeric-liposome-shell encapsulating UCN and decorated these with folate. ABDA was chosen to detect the formation of $^1O_2$. In this case, *in vitro*, Image-

iT Live ROS detection was used. In addition to DCFH-DA, the kit provides the common inducer of ROS production tert-butyl hydroperoxide (TBHP), as a positive control and the blue-fluorescent, cell-permeant nucleic acid stain Hoechst 33342. The authors detected more ROS production for the targeted folate NP than for non- targeted ligand.

The team of Nonell [43] introduced ZnTPP into a folate-targeted liposomal formulation and looked at direct $^1O_2$ luminescence at 1270 nm *in vitro*. They carried out a D_2O-based PBS (D-PBS) cell suspension incubated in the FA-liposomes or non-targeted liposomes and showed that the kinetics of production and decay in Hela cells did not change because of the presence of FA.

In conclusion, we report in Table 4 the papers giving quantitative information. Grafting FA on photosensitizers do not drastically modify $^1O_2$ but encapsulating PS into NPs could lead to a decrease of $^1O_2$ formation.

Table 4: Influence of FA targeting on PSs' ROS formation.

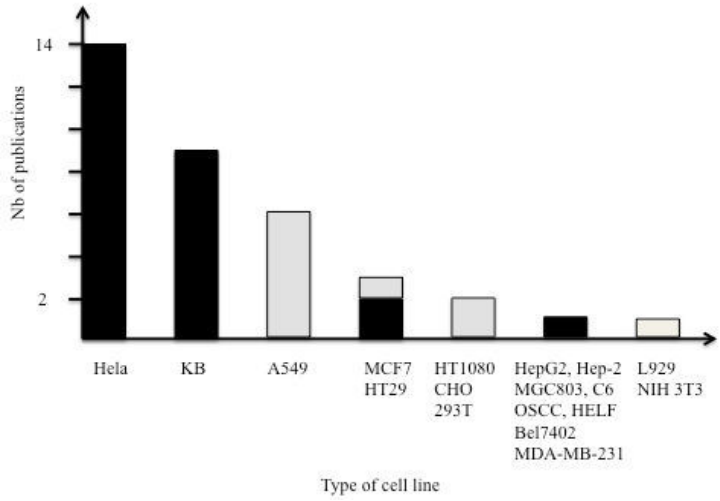
Reference	**PS**	**ϕ_Δ**	
		PS	**FA- targeted-PS/NP**
unpublished	Porphyrin	0.51	0.52 (EtOH)
[17]	Chlorin	0.72	0.57 (EtOH)
[34]	Chlorin	0.75	0.74 (DMF)
[42]	Distyryl boron dipyrromethene	0.20	0.20 (DMF)
[22]	Tetraamino phthalocyanine	0.31	0.21 (DMSO)
[24]	Pheo-a coupled heparin	0.47	0.47 (DMF)
[38]	Pheo-a encapsulated into FA-retinoid acid bioconjugates heparin	0.52	0.40 (DMF)
[28]	Pheo-a into polysaccharide-based nanogel	0.43	0.01-0.13 (DMF)

3. *In vitro* studies

Most of the authors performed *in vitro* studies (Figure 4). Different cell lines were used which were presumed to involve an over-expressed FA receptor or not and these are presented in Figure 4. It should be noted that Hela (+) and KB(+) cell lines are often used as positive controls whereas the A549(-) cell line is the preferred negative cell line. Saul *et al*. [56] evaluated the expression of folate receptor on KB cells to be 279.10^3 folate receptors/cell.

Surprisingly, three cell lines have been used either as a negative or a positive control. Shi *et al*. evaluated [53] the PDT efficiency of C60 decorated with IONP and functionalized by PEG2000

with or without FA grafting onto MCF-7cells *in vitro.* Conversely, Ke *et al*. [42] (who developed FA-conjugated distyryl boron dipyrromethene PS) investigated photodynamic activities on KB (+) and used MCF-7 cells for their low expression of folate receptors (they referred to Kim *et al*. [457]). Our team [32,50,17] and others [26] used HT29 cell line as a negative control but Chatterjee and Yong [52] used this same cell line to study their PEI/$NaYF_4$:Yb^{3+}, Er^{3+} NPs and referred to [58]. Once NPs were coated with FA, they observed a decrease of incorporation by adding an excess of free FA in the medium.



Hela: human cervical epithelioid carcinoma, KB: human breast cancer, A549: human lung carcinoma, MCF7: human breast cancer, HT29: colorectal cancer, HT1080: human fibrosarcom, CHO: chinese hamster ovary, 293T: human embryonic kidney 293, HepG2: hepatocellular liver carcinoma, Hep-2: human laryngeal carcinoma, MGC803: human stomach cancer, C6: glioma, OSCC: oral squamous carcinoma, HELF: human embryo lung, Bel7402: human hepatocellular carcinoma, MDA-MB-231: human breast carcinoma, L929: murine aneuploidy fibro sarcoma, NIH 3T3: fibroblast.

Figure 4: Cell lines used to evaluate the potential of FA-targeted PSs or NPs in PDT (black: cell lines that overexpress FAR, grey: cell lines that do not express FAR).

Affinity for FAR

To demonstrate the importance of the effect of FA on the affinity of compounds for FAR, the authors used competition experiments with free FA and also compared the incorporation into cell lines expressing the FA receptor or not. For the targeted FA-PSs [32,21,15,23,42], all the papers indicate a decrease in FA-targeted PS incorporation after competition with free FA, using confocal microscopy [23,34,42], flow cytometry [21] or fluorescence intensity in cells [32]. We found that the addition of free FA does indeed decrease porphyrin-spacer-FA acid incorporation but that there is still some non-specific uptake. In [42], adding FA increased cell viability from 50% to 94% and the average fluorescence in KB(+) is 5-fold higher than in MCF7 (see figure 5).

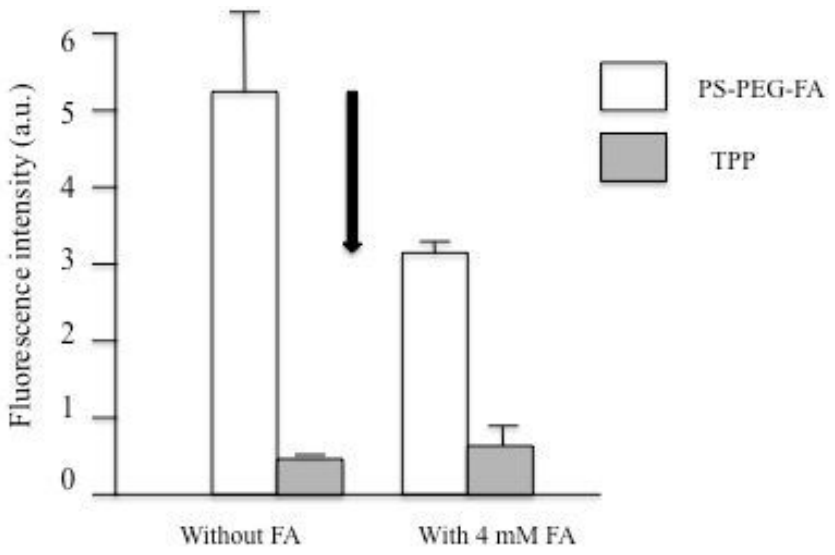


Figure 5: Incorporation of PS-PEG-FA and TPP in KB cells with or without a competing concentration of FA (4mM).

Concerning the FA-targeted NPs, all the authors observed decrease of FA-targeted NPs in different cell lines by competition with free FA. Huang *et al*. [30] reported no fluorescence of non-FA-targeted graphen-oxide in MGC803 cells whereas they observed an intense cytoplasmic fluorescence of FA-GO-Ce6. The same phenomenon was observed in KB cells for *m*-THPC-loaded micelles by checking intracellular fluorescence signals by confocal microscopy and spectrofluorimetric methods. FAR-targeted and non-targeted liposomes containing ZnPc were incorporated in Hela (+) and A549 (-) cell-lines by Garcia-Diaz *et al* [43]. An increase of 70% fluorescence was evaluated for folate-targeted liposomes in overexpressing Hela cells. The addition of FA significantly reduced the incorporation. These authors also increased the number of folate units in the liposome and found an increased uptake at the highest FA-PEG-DSPE concentration. Other liposomes developed by Moret *et al*. were found to present the same behaviour on KB(+) cells [45]. The highest ratio was for FA-targeted liposomes in KB cells after 1 hour of incubation, which was found to be 1.94. Nevertheless, adding free FA did not inhibit the uptake to the level of untargeted liposomes in compliance with our results [32]. Cui *et al.* used semi-quantitative fluorescence analysis to demonstrate that there are significant differences in the cellular uptake of the UCN with FAR-blocking or non-blocking by free FA in HEFF(+), Bel7402(+), MDA-MB-231(+) and A549(-) [37]. Chatterjee and Yong [52] reported that FA-targeted UCN did not accumulate in HT29 using an excess of free FA in the medium. Zheng's team designed a pyro-peptide-folate with a caspase 3 cleavable sequence [49] and showed that the compound accumulates better in folate-overexpressing cells (KB(+)) than in folate receptor-deficient cells (HT1080(-)) using confocal microscopy.

In conclusion, all the PS targeted with FA present a better affinity for FAR than untargeted PS, whatever the nature of the PS. Concerning targeted NPs, the same conclusion can be drawn in

different cell-lines by competition with free FA. Finally, the exception was in the work of Selvestrel *et al*. [51], who used FA-targeted ORMOSIL NPs and did not detect any difference in the incorporation of the NPs in KB(+) or A549(-) with or without free FA. This might be due to interactions of FA with the NP layer.

In vitro PDT efficiency

PDT efficiency is directly linked to PS incorporation. Many authors have shown that introducing a FA unit increases the affinity of the FA-targeted PS or FA-targeted NPs to FAR, leading to a better PDT efficiency. PDT efficiency in KB cells was suppressed after adding free FA for ZnPc-FA in KB cells [23]. We evaluated the phototoxicity of TPP versus FA-conjugated PSs with hexyl or PEG spacer. The LD50 values were 22.6 and 6.7 J/cm^2 respectively in KB cells [32]. In another study [50] we examined the parameters which could influence the photodynamic activity using targeted or non FA-targeted quantum dots with a fractional factorial design of experiments. We found it likely that the coupling of FA improves PDT efficiency.

Phototoxicity of chlorin-PEG-FA was evaluated in Hela (+) and Hep-2(+) cells [34].With 17.5 µM of conjugate and 18 J/cm^2, the viability of Heal and Hep-2 cells were 34.9% and 26.8 % respectively. The phototoxicities were 2.5 and 3.5 times greater than non FA-conjugated chlorin. As expected, folate-conjugated distyryl boron dipyrromethene exhibited higher phototoxicity in KB (+) cells than in MCF7 cells especially for the compound with a shorter oligoethylene glycol linker (better incorporation and less aggregation) [42]. Zheng's team [21] compared the PDT effect of pyro-peptide-folate in KB(+) and CHO(-) and found that they needed 10-fold concentration and 2-fold light for a CHO(-) cell-line to obtain the same PDT effect (Figure 6).

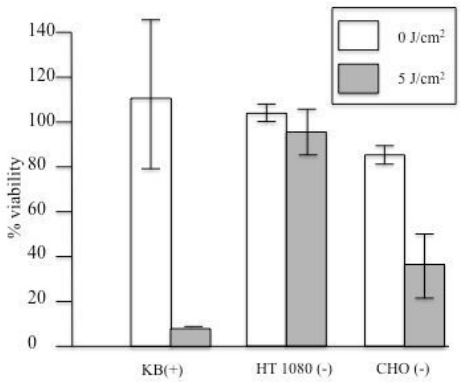


Figure 6: Viability of KB (+), HT 1080 (-) and CHO(-) cells incubated with Pyro-GDEVDGSGK-FA (5µM) and treated with light (5 J/cm^2) or kept in the dark (adapted from [21]).

In another study they designed a pyro-peptide-folate with a caspase 3 cleavable sequence [49] and showed by MTT assay that their compound is an effective PDT agent. Shi *et al*. [53] developed

C60-IONP NPs and studied PDT and RTT efficiencies on MCF-7 cell lines. These were found to be very good candidates for both RTT and PDT and moreover, a synergistic therapeutic effect could be observed when RTT and PDT were performed simultaneously. Other fullerenes developed by Fan *et al*. [48] also present photodynamic action in Hela cells and can also allow intracellular doxorubicin (DOX) release. The same team [35] synthesized a carbon nanotube with DOX and FA. Finally, they concluded that the fullerene system exhibited a greater capability to reduce the viability of Hela(+) cells after blue light irradiation than CNTs for a similar DOX content.

Graphen oxide-FA–ZnO NPs [29] induced apoptotic death in Hela (+) cells; the authors noticed a decrease in cell survival after light excitation, elevation of oxidative stress as well as a decrease in SOD (superoxide dismutase), CAT catalase and GSH-Px glutathione peroxidase activities. Phosphospholid-FA-targeted mesoporous silica NPs [46] also presented good levels of PDT efficacy in Heal cells compared to A549 cells. Wang *et al*. co-loaded MC540 and UCN in a polymeric liposome nanocarrier decorated with FA [31]. PDT efficacy was assessed by MTT assay. After excitation at 980 nm, the NPs targeted with FA were found to induce more MCF-7 cell destruction than untargeted NPs. Other UCN with DHMA were designed by Wang *et al*. [24] and PDT efficiency tests were performed on Hela cells. The targeted NP induced 80% of cell death after 30 minutes of 980 nm laser irradiation. Annexin V-FITC and PI staining were used to demonstrate that the targeted FA-NPs in Hela and HepG2 cells induced early apoptosis more than necrosis. The same team [25] developed UCN with hypericin as a PS covalently bound to the silica shell. Cell apoptosis was observed after 980 nm irradiation by flow cytometry, fluorescence imaging with Annexin V-FITC/PI and caspase-3 western blotting in Hela cells and 293 T cells. Early and late apoptosis in Hela cells was 36.30 % upon irradiation for only 15 min.

Qualls and Thompson [44] were the first to use FA in the field of PDT, by targeted acid-labile diplasmenylcholine liposomes with folate and encapsulating chloroaluminum phthalocyanine. Phototoxicity induced by the FA-targeted liposome after irradiation (30 min, λ>610 nm, 26 mW/cm^2) in KB(+) cells was found to be higher than with free PS or non-targeted liposomes. This is due to the enhancement of the liposome uptake into the cells thanks to FA and in compliance with a cytoplasmic PS delivery mechanism. Moret *et al*. [45] also described FA-pegylated liposomes in which they encapsulated *m*-THPC. In KB cells after irradiation with 0.8 J/cm^2 red light (600-700 nm), the phototoxicity induced by FA-targeted Fospeg was 1.5-fold higher than with the untargeted Fospeg (Figure 7).

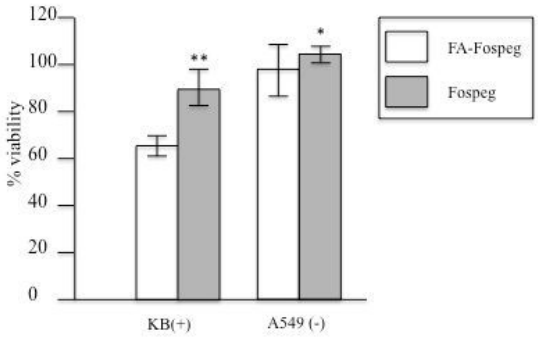


Figure 7: Viability of KB (+), and A549(-) cells incubated with FA-Fospeg and Fospeg, with 0.5 µM m-THPC, irradiated with 0.8 J/cm^2 red light (600-700 nm). (*p<0.05 and **p<0.001 significantly different from FA-Fospeg values (Student's *t*-test) (adapted from [45]).

Liposomes developed by Garcia-Diaz *et al*. [43] were tested in A549 and Hela cells. For 1mM ZnTPP incubated for 24 hours and irradiated at 10 J/cm^2 with green light, non-targeted liposomes induced 35% cell death in both cell-lines. With FAR-targeted liposomes, the cell mortality increased to 94 % in Hela(+) and stayed at 60% in A549(-) cells, meaning than the cell mortality was enhanced by 50% in Hela(+) cells.

GO-FA-Ce_6 induced high photodynamic efficacy in MGC803 cells after 633 nm irradiation (30 mW/cm^2, 10 min). They obtained 90% loss of viability for an FA-GO/Ce_6 2/1 [30] ratio.

In vitro phototoxicity of PEG and PBLA block polymers coupled to DD-PpIX and FA was performed in Hela cells (0.4 mW/cm^2, 670 nm) at pH 6.4 and cell viability was drastically decreased compared to pH 7.4 or even free PS. This is due to the pH-sensitive hydrazine linkage between the PS and the NP which is hydrolysed under acid conditions [39]. The same observation was made by Zhao *et al*. [40]. They developed block-copolymer-Gold NPs coupled to FA via bidentate dihydrolipoic acid (DHLA) linker and checked the phototoxicity of their NPs *in vitro* in Hela cells. Targeted NP was found to present better phototoxicity than free Pheo-a. Moreover, the cell viability at pH 6.4 was lower than that at pH 7.4 due to the release of the PSs after hydrolysis of the pH-sensitive hydrazine linkage. Tian *et al*. [36] developed pH-activatable rubyrin-$NMe_2Se_4N_2$ NP and performed *in vitro* PDT experiments in Hela(+) cells. After 630 nm excitation at 30 J/cm^2, the $NMe_2Se_4N_2$ NP-treated cells showed apoptotic characteristics using AnnexinV-FOTC/PI whereas this was not the case for non-targeted FA-NPs. Moreover, using HaCaT(-) cells, no decrease in viability was observed leading to the conclusion that the NPs are not toxic for normal cells.

Zhang *et al.* [41] studied the phototoxicity of horseradish peroxidase (HRP) semiconductor polymers dots doped with *m*-THPC and FA on MCF7(+), C6(+) and NIH 3T3(-) cell lines in the presence of chemiluminescence substrate. For 10 mg/mL, cell viabilities for MCF7(+), C6(+) and

NIH 3T3(-) were respectively 17%, 32% and 72% in agreement with the expression of folate receptors, confirmed by confocal microscopy.

Bae and Na [28] evaluated the phototoxicity of self-quenching polysaccharide-based nanogels composed of pullulan coupled to FA and encapsulated different amounts of Pheo-a in Hela cells, with light at a dose of 1.2 J/cm^2 at 670 nm. They found IC_{50} 0.23 μg/mL for the nanogel and IC_{50} 0.20 μg/mL for the free PS (Pheo-a). An annexin V study revealed early and late apoptotic cell death mechanisms as is observed for free Pheo-a. Two years later the same team [27] fabricated biocompatible polysaccharide lipid NPs functionalized by FA, NLS (nuclear localization signal) peptide and encapsulating Pheo-a. *In vitro* phototoxicity was also performed in Hela (+) cells. Under high light energy fluence rate (25 mW/cm^2) applied for 1 minute, the phototoxicity induced by free Pheo-a or targeted NP was the same but at low energy the NP induced more phototoxicity than the free PS. This could be due to the presence of NLS peptide, which targets the molecule to the hypersensitive cellular nucleus and leads to the formation of ROS there. These authors also [54,38] encapsulated Pheo-a in a heparin polysaccharide conjugate (HP), with FA (FHP) with or without retinoic acid. In [54], they used 1.2 J/cm^2 at 670 nm on Hela cells and found IC_{50}=0.15 μg/mL for HP, IC_{50} 0.14 μg/mL for targeted-HP, IC_{50} 0.40 μg/mL for HP which could be due to better incorporation but also to the decrease in Pheo-a aggregation into the NPs. In [38] they added retinoic acid onto HFR. Phototoxicity was evaluated in Hela(+) and HT29(-) cells in the same light conditions. The cell viability was found to decrease by 20-87% after treatment with light and Pheo-a or FHP. At a similar Pheo-a concentration, the phototoxicity induced by FHP NPs was found to be higher than non FA-targeted NPs (30% versus 60%) showing the importance of FA units.

In conclusion, in all the publications in which the phototoxicity induced by FA-targeted NP or PS is compared to that induced by non-targeted PS or NP, the authors observe that phototoxicity is higher for FA-targeted compounds than for non-targeted PS or NP. This is mainly linked to the fact that the FA-targeted compounds present a better incorporation into the cells that over-express FAR.

4 *In vivo* PDT with FA-targeted NPs or PSs

Among all the publications, only 9 refer to *in vivo* PDT experiments.

In 2008, we published our results *in vivo* concerning an *m*-THPC-like PS coupled to FA. We used athymic mice as our animal model and implanted them subcutaneously with KB(+)or HT29(-) cells [17]. To determine *in vivo* accumulation we performed optical fibre fluorimetry. Our factorial analysis determined the most important parameters for a good level of accumulation by varying the type of cells (KB(+), HT29(-)),diet (food with or without FA), the type of PS (with or without

FA), the post-injection time (4 hours and 24 hours) as well as the type of tissue (tumor/skin). We concluded that the type of PS (with or without FA) and that of tissues (tumor/skin) were the most important parameters.

Zheng's team [21] used nude mice inoculated subcutaneously with KB(+) cells and HT 1080(-) cells in the leg. They compared the Pyro-GDEVDGGSG molecule versus Pyro-GDEVDGGSG-FA. They performed fluorescent imaging on mice. The mice were killed and the organs imaged directly after dissection. 6.5 hours after injection, the targeted compounds were found to accumulate significantly more in KB tumours than in HT 1080 tumours. The non-targeted compound accumulates as much in a KB tumour as in HT 1080 tumours. The organs showed strong fluorescence in KB tumours, a weak signal in kidney and liver and no signal in muscle, heart, adrenal glands or spleen. The ratio of KB to HT1080 was found to be 2.5/1 (Figure 8).

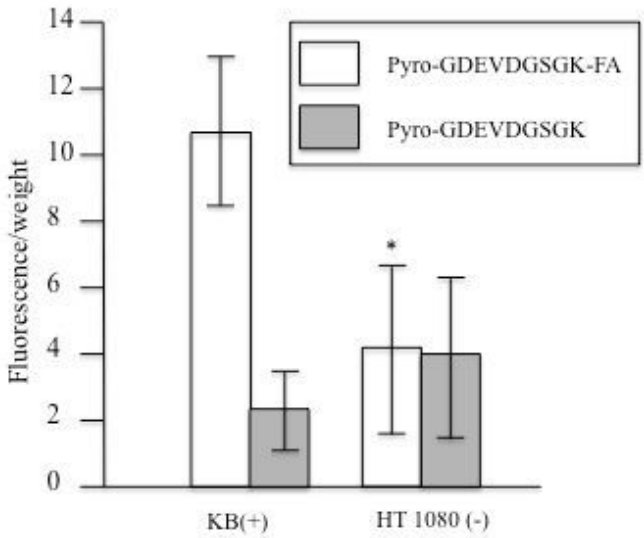
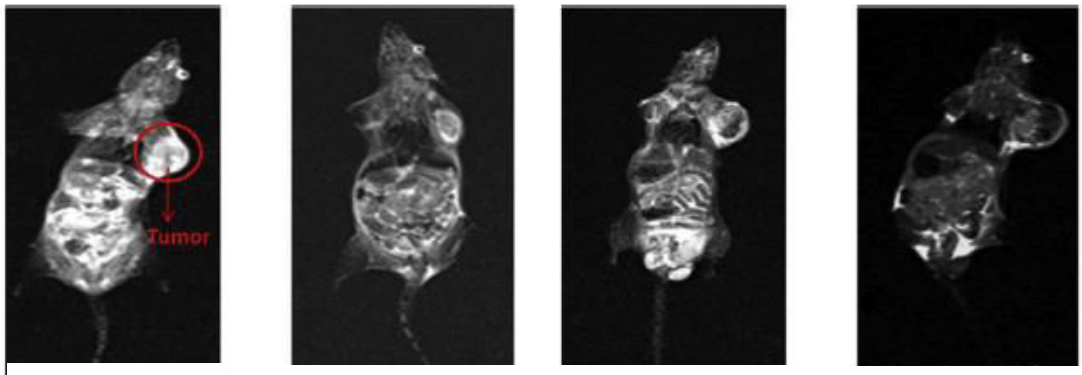


Figure 8: Incorporation of Pyro-GDEVDGSGK-FA and Pyro-GDEVDGSGK *in vivo* in mice inoculated subcutaneously with KB (+) and HT 1080 (-) cells (10^7). (*$p<0.05$, n=3 is significantly different from fluorescence of the KB (+) tumour (Student's *t*-test)) (adapted from [21]).

Then, these authors replaced the GDEVDGGSG peptide with a lysine to decrease the distance between the PS and FA (the compound is called PKF). At 6.5 h most of the PKF was retained by the excretion organs and did not accumulate in the tumour to any great extent. This accumulation in the liver and spleen was found to be 50-fold higher for PKF than for Pyro-GDEVDGGSG-FA. The same team looked at the *in vivo* properties of a targeted PMB, the Pyro-K(FA)GDEVDGGSGK(BHQ3), and also used nude mice inoculated subcutaneously with KB(+) cells and HT 1080(-) cells in the leg [49]. They concluded that the compound preferentially accumulated in KB tumours, that they could observe a caspace-3 cleavage of the peptide and that the tumour is apoptotic.

S180 tumour models were used by Shi *et al*. in subcutaneous injection of cells in the shoulder of female BALB/c mice [53]. They injected C60-IONP-PEG-FA or C60-IONP-PEG and looked at *in vivo* MR imaging under a 3T clinical MR scanner, *in vivo* PDT and RTT. The decrease in MRI signal intensity was 26±4.8% for non FA-targeted C60-IONP-PEG and 47±3.9% for C60-IONP-PEG-FA (Figure 9).



Control C60-IONP-PEG C60-IONP-PEG-FA C60-IONP-PEG-FA/magnet

Figure 9: *in vivo* T2-weighted MRI images.

The FA-targeted NP presents excellent PDT and RTT efficacies and the toxicity of the treatment was minimal.

Teng *et al*. [46] tested their phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers encapsulating PpIX and targeted with FA in nude mice bearing B16F10 melanoma on their flanks. After irradiation at 630 nm (power: 320 mW, fluence: 2.02 10^{20} photons/s.m^2) they observed 65% destruction of tumours. By immunohistochemical analysis, they proved that proliferation was stopped in the treated group. By immunoblotting analysis, they monitored cytochrome c, intra-tumour caspase 3 and caspase 8 and confirmed that intrinsic apoptosis occurred. They also monitored two restriction factors of the cell cycle and found an inactivation of cyclin D1 and hypophosphorylation of pRb (retinoblastoma protein).

Bae and Na [28] used six-week-old male Balb/C–nu mice for *in vivo* imaging of pullulan/FA/Pheo-a conjugates (PFP2). No *in vivo* PDT experiments were performed. Comparing the fluorescence signal of free Pheo-a and PFP2, two different types of behaviour were observed. In the case of free Pheo-a, the signal increased for 30 min after the injection and decreased over 3 days. No signal was observed after 4 days. For NP, the signal only appeared after 30 minutes and increased for 12 hours due to degradation of the nanogel in the cancerous cells.

Tian *et al*. [36] performed *in vivo* PDT in subcutaneous Hela cells, with a 808 nm excitation wavelength. They observed a complete tumour growth even 12 days after PDT treatment. They studied tumour-bearing mice with pH-activatable rubyrin-$NMe_2Se_4N_2$ NP by HαE staining and could observe necrosis. Blood circulation profiles gave a half-time of 4.65 h and NPs accumulated

in the tumour with negligible amounts in other organs such as liver, lung and kidney. After 30 days, the tumour was completely eliminated and no organ damage or metastasis could be detected. Cui *et al*. [37] evaluated the acute toxicity of their UCN $NaYF_4$:Yb,Er encapsulating ZnPc and targeted with FA (FA-UNC-ZnPc) in healthy Kunming mice. *In vivo* biodistribution and tumour-targeting of FA-UNC-ZnPc were performed on female athymic nude mice and normal (Kunming) mice. These were subcutaneously injected with Bel-7402(+) and S180 cells (+). 24 hours post-injection, a tumour to skin ratio was found to be 11 for FA-targeted UCN against 5.5 for non-targeted UCN. *Ex vivo* fluorescence images confirmed this result. PDT treatment was given to mice with S180 tumours with 980 nm light (0.2 W/cm^2, 30 min) or 660 nm light (0.2 W/cm^2, 30 min). For the subcutaneous tumour, PDT using 660 nm light induced 77% of tumor inhibition and 66% with 980 nm light. Conversely, for the tumour covered with 1-cm pork tissue to simulate deep tumours, PDT using 660 nm light induced 18% of tumour inhibition and 50% with 980 nm light. Survival rates of mice with 1-cm pork tissue reached 75% with 660 nm light irradiation) and 88% with 980 nm light irradiation). Thanks to histology, apoptotic and necrotic cells were observed in all the PDT-treated groups.

Folate conjugated PEOz-PLA (poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(D,L-lactide)) micelles encapsulating *m*-THPC were tested *in vivo* on a mouse KB tumour model with a dose of 15 J/cm^2 [26]. After PDT with FA- PEOz-PLA encapsulating *m*-THPC, the tumour volumes were significantly smaller than with *m*-THPC or PEOz-PLA encapsulating *m*-THPC. They isolated the tumors and confirmed these results. By modulating the amount of *m*-THPC, they showed that a *m*-THPC concentration of 0.2 mg/kg in FA- PEOz-PLA micelles induced the same effect as *m*-THPC at 0.3 mg/kg. Using FA-targeted micelles allows the division of the injected dose of 1.5. The biodistribution of free *m*-THPC, micelles with *m*-THPC and FA-targeted micelles with *m*-THPC were compared. The tumour-to-muscle ratio of *m*-THPC and micelles with *m*-THPC were 3.53 and 3.64 respectively and increased to 7.5 for FA-targeted micelles with *m*-THPC. Moreover, a decrease of the build-up in the liver was observed along with reduced skin photosensitivity. By immunochemical analysis, PDT with FA-targeted micelles with *m*-THPC was shown to induce a lower rate of cell proliferation and a decrease in the vascular density.

Conclusion

FA has many qualities required for addressing molecules and targeted PDT. Using FAR appears to be a promising treatment for various type of cancers. More and more research is focusing on the development of FA-targeted PS and FA-targeted NPs and 2 patents have already been taken out for FA-targeted PS as you can see in Figure 10. Nevertheless, it is surprising that only 9 *in vivo* studies have been performed. Maybe one of the reasons is the lack of a validated animal model. 4 authors used nude mice xenografted with KB cells (oral carcinoma). The other studies

are performed with sarcoma, B16F10 cells (melanoma), human BEL-7402 hepatocellular carcinoma, Hela cells. It would not be surprising if in the near future FA-targeted PS will be used for clinical PDT, maybe in another field. Indeed, in 2011, Van Dam *et al*. [59] described the first in-human results of FA coupled to fluorescein (FITC) for imaging of ovarian cancer. They concluded that this FA-targeted compound was very efficient for the intra-operative detection of ovarian cancer. To confirm their data, larger international multicentre studies will be needed with calibrated camera systems combined with folate-FITC.

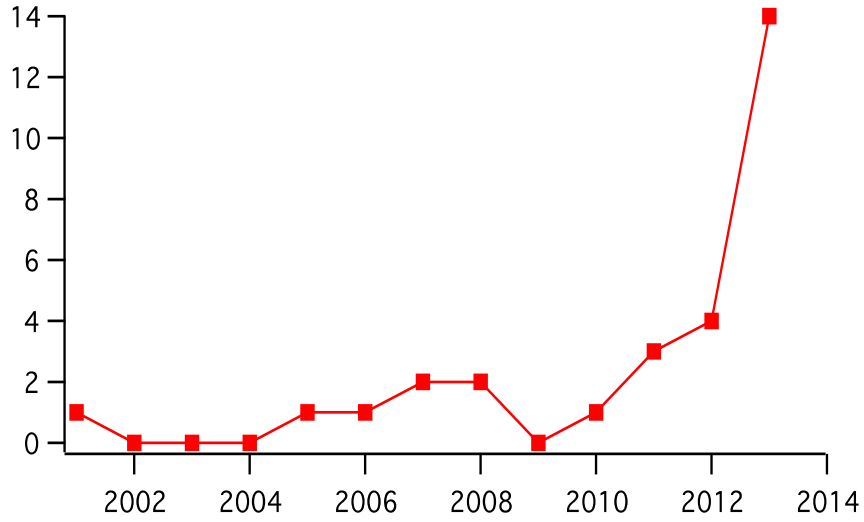


Figure 10: Number of papers per year related to FA and PDT.

In particular, FAR γ shows promising prospects in targeting ovarian cancer cells and intraperitoneal PDT. Indeed, ovarian cancer prognosis remains dire after primary therapy. 60% of women with advanced epithelial ovarian cancer develop a recurrent disease within five years. Recently, we published two papers that dealt with FA-targeted PDT as an additional therapy to cytoreductive surgery, to treat peritoneal micrometastasis [60,61]. In particular, we demonstrated that NuTu-19 cells express FRα *in vitro* and *in vivo* and that Female Fischer 344 rats can be an efficient preclinical model to study the treatment of ovarian peritoneal carcinoma by FA-targeted PDT. We showed that the incorporation of FA-targeted porphyrin is higher in tumoral cells than in normal cells (to be published). This is in good agreement with the work of Van Dam *et al*. [59]. We are convinced that PDT will have a future in the treatment of this disease.

References

[1] Ochsner, M., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photoch. Photobio. B*, **1997**, 39, 1-18.

[2] Bugaj, A.M., Targeted photodynamic therapy, a promising strategy of tumor treatment. *Photochem Photobiol Sci*, **2011**, 10(7), 1097-109.

[3] Salazar, M.D.; Ratnam, M., The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev*, **2007**, 26(1), 141-52.

[4] Kamen, B.A.; Capdevila, A., Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83 (16), 5983-5987.

[5] Luhrs, C.A.; Slomiany, B.L., A Human Membrane-associated Folate Binding Protein Is Anchored by a Glycosyl-Phosphatidylinositol Tail. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264(36), 21446–21449.

[6] Antony, A.C., Folate Receptors. *Annu. Rev. Nutr.*, **1996**, 16, 501-521.

[7] Hilgenbrink, A.R.; Low, P.S., Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J. Pharm. Sci*, **2005**, 94(10), 2135-46.

[8] Amiji, M.M., *Nanotechnology for Cancer Therapy,* Taylor & Francis/CRC Press, **2006**.

[9] Reddy, J.A.; Allagadda, V.M.; Leamon, C.P., Targeting therapeutic and imaging agents to folate receptor positive tumors. *Curr. Pharm. Biotechnology*, **2005**, 6(2), 131-150.

[10] Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Horowitz, A.T.; Zalipsky, S., Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipids-anchored folic acid-PEG conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, 56, 1177-92.

[11] Lo, Yu-Lun; Lo, Pei-Chi; Chiu, Chien-Chih; Wang, Li-Fang, Folic Acid linked Chondroitin Sulfate-Polyethyleneimine Copolymer Based Gene Delivery System. *J. Biomed. Nanotech.*, **2015**, 11(8), 1385-1400.

[12] Shahnaz, K.; Nazanin, F.; Mirabdullah, S. S., Design and fabrication of core-shell gold coated Fe3O4 magnetic nanoparticles as Cancer Cells targeting agent. *Res. J. of Biotech.*, **2015**, 10(5), 27-33.

[13] Low, P.S.; Henne, W.A.; Doorneweerd, D.D., Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for Imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of Chem. Res.*, **2008**, 41(1), 120-129.

[14] Shanmugan,V.; Chien,Y.H.; Cheng, Y.S.; Liu, T.Y.; Huang, C.C.; Su, C.H.; Chen, Y.S.; Kumar, U.; Hsu, H.F.; Yeh, C.S., Oligonucleotides-Assembled Au Nanorod-Assisted Cancer Photothermal Ablation and Combination Chemotherapy with Targeted Dual-Drug Delivery of Doxorubicin and Cisplatin Prodrug. *ACS Appl. Mat. & Interfaces*, **2014**, 6(6), 4382-4393.

[15] Sega, E.; Low, P., Tumor detecting folate-receptor-targeted imaging agents.*Cancer and Metastasis reviews*, **2008**, 27, 655-664.

[16] Wang, S.; Lee, R. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Low, P. S., Synthesis, purification, and tumor cell uptake of 67Ga-desferoxaminefolate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging. *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 56–62.

[17] Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M.. Improvement of méta tetra(Hydroxyphenyl)chlorin-Like Photosensitizer Selectivity with Folate-Based Targeted Delivery. Synthesis and in Vivo Delivery Studies. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3867–3877.

[18] Mantovani, L. T.; Miotti, S.; Menard, S.; Canevari, S.; Raspagliesi, F.; Bottini, C.; Bottero, F.; Colnaghi, M. I., Folate binding protein distribution in normal tissues and biological fluids from ovarian carcinoma patients as detected by the monoclonal antibodies MOv18 and MOv19. *Eur. J. Cancer,***1994**, 30, 363–369.

[19] Zheng, G.; Stefflora, K. Targeted photodynamic therapy agent. U.S. Patent 2010/0075899 A1, March 25, 2010.

[20] Chen W.; Zhang W. Nanoparticle based photodynamic therapy and methods of making and using same. U.S. Patent 2007/0218049 A1, September 20, 2007.

[21] Stefflova, K.; Li, H.; Chen, J.; Zheng, G. Peptide-Based Pharmacomodulation of

a Cancer-Targeted Optical Imaging and Photodynamic Therapy Agent. *Bioconjugate Chem.,* **2007***,* 18, 379-388.
[22] Khoza, P.; Antunes, E.: Chen, J.Y.; Nyokong, T., Synthesis and photophysicochemical studies of a water soluble conjugate between folicacid and zinc tetraaminophthalocyanine. *Journal of Luminescence*, **2013**, 134, 784–790.
[23] Wang, S.; Wang, J.; Chen, J.Y.. Conjugates of folic acids with zinc aminophthalocyanine for cancer cell targeting and photodynamic therapy by one-photon and two photon excitations. *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 1594-1602.
[24] Wang, F.; Yang, X.; Ma, L.; Huang, B.; Na, N.; E, Y.; Heb, D.; Ouyang, J.. Multifunctional up-converting nanocomposites with multimodal imaging and photosensitization at near-infrared excitation. *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 24597-24604.
[25] Yang, X.; Xiao,Q.; Niu, C.; Jin, N.; Ouyang, J.; Xiao, X.; Heb, D.. Multifunctional core–shell upconversion nanoparticles for targeted tumor cells induced by near-infrared light. *J.Mater.Chem.B,* **2013**, 1, 2757-2763.
[26] Syu, W.J.; Yu, H.P.; Hsu, C.Y.; Rajan, Y.C.; Hsu, Y.H.; Chang, Y.C.; Hsieh, W.Y.; Wang, C.H.; Lai, P.S.. Improved Photodynamic Cancer Treatment by Folate-Conjugated Polymeric Micelles in a KB Xenografted Animal Model. *Small*, **2012**, 8 (13), 2060–2069.
[27] Ling, D.; Bae, B.C.; Park, W.; Na, K.. Photodynamic efficacy of photosensitizers under an attenuated light dose via lipid nano-carrier-mediated nuclear targeting. *Biomaterials,* **2012**, 33, 5478-5486.
[28] Bae, B.C.; Na, K.. Self-quenchingpolysaccharide-basednanogelsofpullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamictherapy. *Biomaterials,* **2010**, 31, 6325-6335.
[29] Hu, Z.; Li, J.; Li, C.; Zhao, S.; Li, N.; Wang, Y.; Wei, F.; Chen, L.; Huang, Y.. Folic acid-conjugated graphene–ZnO nanohybrid for targeting photodynamic therapy under visible light irradiation. *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1, 5003-5013.
[30] Huang, P.; Xu, C.; Lin, J.; Wang, C.; Wang, X.; Zhang, C.; Zhou, X.; Guo, S.; Cui, D.. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. *Theranostics,* **2011**,1, 240-250.
[31] Wang,H.; Liu, Z.; Wang, S.; Dong, C.; Gong, X.; Zhao, P.; Chang, J.. MC540 and Upconverting Nanocrystal Coloaded Polymeric Liposome for Near-Infrared Light-Triggered Photodynamic Therapy and Cell Fluorescent Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces,* **2014**, 6, 3219−3225.
[32] Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Muller, J.F.; Barberi-Heyob, M., Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targetedtetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* **2005***,* 13, 2799–2808.
[33] Lee, E.H.; Kim, H.J.; New chlorine E6-folic acid conjugated compound, preparation method thereof, and pharmaceutical composition containing the same for treatment of cancer. E.P. 2 431 366 A1, March 21, 2012.
[34] Li, D.;i Li, P.; Lin, H.; Jiang, Z.; Guo, L.; Li, B.. A novel chlorin–PEG–folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* **2013**, 127, 28–37.
[35] Fan, J.; Zeng, F.; Xu, J.; Wu, S..Targeted anti-cancer prodrug based on carbon nanotube with photodynamic therapeutic effect and pH-triggered drug release. *J. Nanopart. Res*, **2013**, 15:1911.
[36] Tian, J.; Ding, L.; Xu, H.J.; Shen, Z.; Ju, H.; Jia, L.; Bao, L.; Yu, J.S.. Cell-Specific and pH-Activatable Rubyrin-Loaded Nanoparticles for Highly Selective Near-Infrared Photodynamic Therapy against Cancer. *J. Am. Chem. Soc.,* **2013**, 135, 18850−18858.
[37] Cui, S.; Yin, D.; Chen, Y.; Di, Y.; Chen, H.; Ma, Y.; Achilefu, S.; Gu, Y.. In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light Triggered Upconversion Nanoconstruct. *ACS Nano*, **2013**, 7, 676-688.

[38] Tran, T.H.; Bae, B.C.; Lee, T.K.; Na, K.; Huh, M.H.. Heparin-folate-retinoic acid bioconjugates for targeted delivery of hydrophobic photosensitizers. *Carbohydrate Polymers,* **2013**, 92, 1615–1624.
[39] Zhao, L.; Kim, T.H.; Huh, K.M.; Kim, H.W.; Kim, S.Y. Self-assembled photosensitizer-conjugated nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *Journal of Biomaterials Applications,* **2012**, 28(3), 434–447.
[40] Zhao, L.; Kim, T.H.; Ahn, J.C.; Kim, H.W.; Kim, S.Y.. Highly efficient "theranostics" system based on surfacemodified gold nanocarriers for imaging and photodynamic therapy of cancer. *J. Mater. Chem. B*, **2013**, 1, 5806-5817.
[41] Zhang, Y.; Pang, L.; Ma, C.; Tu, Q.; Zhang, R.; Saeed, E.; Mahmoud, A.E.; Wang, J.. Small Molecule-Initiated Light-Activated Semiconducting Polymer Dots: An Integrated Nanoplatform for Targeted Photodynamic Therapy and Imaging of Cancer Cells. *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 3092−3099.
[42] Ke, M.R.; Yeung, S.L.; Ng, D.K.P.; Fong, W.P.; Lo, P.C.. Preparation and in Vitro Photodynamic Activities of Folate-Conjugated Distyryl Boron Dipyrromethene Based Photosensitizers. *J. Med. Chem.,* **2013**, 56, 8475−8483.
[43] García Díaz, M.. Drug delivery in photodynamic therapy: From pharmaceutics to animal testing. Doctoral thesis, Univ. Ramon Llull (Esp), **2012**.
[44] Qualls, M.M.; Thompson, D.H.. Chloroaluminium Phthalocyanine Tetrasukfonate delivered via Acid-labile Diplasmenylcholine-Folate Liposomes: Intracellular Localization and Synergistic Phototoxicity. *Int. J. Cancer*, **2001**, 93, 384–392.
[45] Moret, F.;Scheglmann, D.; Reddi, E.. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)- chlorin (m-THPC). *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, 12, 823-834.
[46] Teng, I.T.; Chang, Y.J.; Wang, L.S.; Lu, H.Y.; Wu, L.C.; Yang, C.M.; Chiu, C.C.; Yang, C.H.; Hsu, S.L.; Ho, J.A.. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials*, **2013**, 34, 7462-7470.
[47] Lee, R.J.; Low, P.S.. Delivery of Liposomes into Cultured KB Cells via Folate Receptor-mediated Endocytosis. *J.Bio.Chem.*, **1994**, 269(5), 3198-3204.
[48] Fan, J.; Fang, G.; Zeng, F.; Wang, X.; Wu, S.. Water-Dispersible Fullerene Aggregates as a TargetedAnticancer Prodrug with both Chemo- and Photodynamic Therapeutic Actions. *Small*, **2013**, 9(4), 613–621.
[49] Stefflova, K.; Chen, J.; Li, H.; Zheng, G.. Targeted Photodynamic Therapy Agent with a Built-In Apoptosis Sensor for In Vivo Near-Infrared Imaging of Tumor Apoptosis Triggered by Its Photosensitization In Situ. *Molecular Imaging*, **2006**, 5(4), 520–532.
[50] Morosini, V.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Schneider, R.; François, A.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M.. Quantum dot–folic acid conjugates as potential photosensitizers in photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 10, 842-851.
[51] Selvestrel, F.; Moret, F.; Segat, D.; Woodhams, J.H.; Fracasso, G.; Rio Echevarria, I.M.; Bau, L.; Rastrelli, F.; Compagnin, C.; Reddi, E.; Fedeli, C.; Papini, E.; Tavano, R.; Mackenzie, A.; Bovis, M.; Yaghini, E.; MacRobert, A.J.; Zanini, S.; Boscaini, A.; Colombatti, M.; Mancin, F..Targeted delivery of photosensitizers: efficacy and selectivity issues revealed by multifunctional ORMOSIL nanovectors in cellular systems. *Nanoscale*, **2013**, 5, 6106-6116.
[52] Chatterjee, D.K.; Yong, Z.. Upconverting nanoparticles as nanotransducers for photodynamic therapy in cancer cells. *Nanomedicine*, **2008**, 3, 73-82.
[53] Shi, J.; Wang, L.; Gao, J.; Liu, Y.; Zhang, J.; Ma, R.; Liu, R.; Zhang, Z.. A fullerene-based multi-functional nanoplatform for cancer theranostic applications. *Biomaterials*, **2014**, 35, 5771-5784.
[54] Li, L.; Bae, B.C.;Tran, T.H.; Yoon, K.H.; Na, K.; Huh, K.M.. Self-quenchable biofunctional nanoparticles of heparin–folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 86, 708– 715.
[55] Bulin, A.L.; Truillet, C.; Chouikrat, R.; Lux, F.; Frochot, C.; Amans, D.; Ledoux, G.; Tillement, O.; Perriat, P.; Barberi-Heyob, M.; Dujardin, C.. X-ray induced Singlet

Oxygen Activation with Nanoscintillator coupled Porphyrins. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117(41), 21583-21589.
[56] Saul, J. M.; Annapragada, A.; Natarajan, J. V.; Bellamkonda, R. V.. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. *J. Controlled Release*, **2003**, 92, 49-67.
[57] Kim, S.H.; Kim, J.K.; Lim, S.J.; Park, J.S.; Lee, M.K.; Kim, C.K.. Folate-tethered emulsion for the target delivery of retinoids to cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, 68, 618-625.
[58] De Nonacourt-Didion, M.; Gueant, J.L.; Adjalla, C.; Chery, C.;. Hatier, R.; Namour, F.. Overexpression of folate binding protein alpha is one of the mechanism explaining the adaptation of HT29 cells to high concentration of methotrexate. *Cancer Lett.*, **2001**, 171, 139-145.
[59] Van Dam, G.M.; Themelis, G.; Crane, L.MA.; Harlaar,N.J.; Pleijhuis, R.G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; De Jong,J.S.; Arts, H.J.G; Van der Zee, A.G.J.; Bart, J.; Low, P.S.; Ntziachristos,V., Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-α targeting: first in-human results. *Nature Medicine*, **2011**, 17(10),1315-1320.
[60] Azaïs, H.; Moussaron, A.; Khodja Bach, S.; Bassil, A.; Betrouni, N.; Frochot, C.; Collinet, P.; Mordon, S., Fra: a target for prophylactic photodynamic therapy of ovarian peritoneal metastasis. *Bulletin du cancer*, **2014**, 101(12), 1109-13.
[61] Azaïs, H.; Queniat, G.; Bonner, C.; Kerdraon, O.; Tardivel, M.; Jetpisbayeva, G.; Frochot, C.; Betrouni, N.; Collinet, P.; Mordon, S., Fischer 344 rat: a preclinical model for epithelial ovarian cancer folate-targeted therapy. *International Journal of Gynecological Cancer*, under press.

Assessment of the specificity of a new folate-targeted photosensitizer for peritoneal metastasis of epithelial ovarian cancer to enable intraperitoneal photodynamic therapy. A preclinical study.

AZAÏS Henri [1,2], SCHMITT Caroline [3], TARDIVEL Meryem [4], KERDRAON Olivier [5],

STALLIVIERI Aurélie [6], FROCHOT Céline [6], BETROUNI Nacim [1],

COLLINET Pierre [1,2], MORDON Serge [1].

1- INSERM U1189 - ONCO-THAI, University of Lille, 59000 Lille, France.

2- Department of Gynecology, University of Lille, 59000 Lille, France.

3- Centre Français des Porphyries, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Louis Mourier, Colombes, France and INSERM U1149, Paris Diderot University, 75018 Paris, France.

4- Plate-forme d'imagerie cellulaire BICEL – IFR 114. Pôle recherche, University of Lille, 59000 Lille, France.

5- Centre de biologie-pathologie, University of Lille, 59000 Lille, France.

6- Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS - University of Lorraine, France.

Corresponding Author
Henri AZAÏS
INSERM U1189 - ONCO-THAI
University of Lille
1, avenue Oscar Lambret
59037 Lille - France
henriazais@gmail.com

ABSTRACT

Background Ovarian cancer's prognosis remains dire after primary therapy. Recurrence rate is disappointingly high as 60% of women with epithelial ovarian cancer considered in remission will develop recurrent disease within five years. Special attention to undetected peritoneal metastasis during surgery is necessary as they are the main predictive factors of recurrences. Folate Receptor α (FRα) shows promising prospects in targeting ovarian cancerous cells and intraperitoneal photodynamic therapy (PDT) could be a solution in addition to macroscopic cytoreductive surgery to treat peritoneal micrometastasis.

The aim of this preclinical study is to assess the specificity of a folate-targeted photosensitizer for ovarian peritoneal micrometastasis.

Methods We used the NuTu-19 epithelial ovarian cancer cell line to induce peritoneal carcinomatosis in female Fischer 344 rats. Three groups of 6 rats were studied (Control (no photosensitizer) / Non-conjugated photosensitizer (**Porph**) / Folate-conjugated photosensitizer (**Porph-s-FA**)). 4 hours after the administration of the photosensitizer, animals were sacrificed and intraperitoneal organs tissues were sampled. FRα tissue expression was evaluated by immunohistochemistry. Tissue incorporation of photosensitizers was assessed by confocal microscopy and tissue quantification.

Results FRα is overexpressed in tumor, ovary, and liver whereas peritoneum, colon, small intestine and kidney don't express it. Cytoplasmic red endocytosis vesicles observed by confocal microscopy are well correlated to FRα tissue expression. Photosensitizer tissue quantification shows a mean tumor-to-normal tissue ratio of 9.6.

Conclusion We demonstrated that this new generation folate-targeted photosensitizer is specific of epithelial ovarian peritoneal metastasis and may allow the development of efficient and safe intraperitoneal PDT procedure.

Keywords Folate receptor, targeted-therapy, photodynamic therapy, ovarian peritoneal carcinomatosis, photosensitizer.

INTRODUCTION

The prognosis of advanced epithelial ovarian cancer remains poor. The current treatment is the association of complete macroscopic cytoreductive surgery and platinum-based chemotherapy. It is accepted that the absence of residual disease after surgery is a key to improve prognosis [1,2]. 60% of patients treated by complete cytoreductive surgery and chemotherapy will develop peritoneal recurrence [3].

Peritoneal cavity must be oncologically considered as an organ in its own right [4] and the surgeon must treat peritoneal metastasis with a curative intent. Our aim is to provide another option to improve the completion of cytoreductive surgery by inducing necrosis of micrometastasis by targeted photodynamic therapy (PDT) and so to decrease the incidence of recurrence. PDT is a non-invasive ways of treating malignant tumors that is clinically applied in wide range of medical conditions. In the photodynamic reaction, after ligth absorption, the photosensitizer (PS) is promoted to an excited singlet state and then to a triplet state that transfers its energy to oxygen leading to the production of highly toxic reactive oxygen species such as singlet oxygen. The selectivity of the treatment is brought by light, the photosensizer being active only after irradiation. A limit of this technique is the toxicity induced by the low PS specificity for tumor tissue if the light cannot be specifically applied. This would be the case in peritoneal metastasis in advanced ovarian cancer. To solve this problem, a solution is the design of selective PS, that is to say PS coupled to an unit that target over-expressed receptors on tumoral cells.

Folate receptor alpha (FRα) is a promising target as it is highly specific of epithelial ovarian cancer [5,6]. It is a well-known tumor associated protein that can actively internalize bound folates *via* endocytosis allowing delivering high concentrations of cytotoxic agent to tumor expressing high levels of the folate receptor [7]. In previous studies we already demonstrated the potential of folate-targeted porphyrin or chlorin *in vitro* and *in vivo* to improve the selectivity of the PS and the improvement of PDT efficiency [8,9]. Our objective is to assess the specificity of a new generation photosensitizer (N-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}folic acid}-4-carboxyphenylporphyrin) targeted by folate (called **Porph-s-FA**) for ovarian peritoneal metastasis in a preclinical study.

MATERIAL AND METHODS

Preclinical model of peritoneal carcinomatosis (ovarian cancer)

Pathogen-free Fischer 344 female rats (140-160g) were obtained from HARLAN Laboratories (Gannat, France). They were housed in a pathogen-free animal facility and given commercial basal diet and water *ad libitum*. The protocol was approved by our animal use and ethic committee (DHURE - Departement Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale), University of Lille, France (n° = 59-350120).

NuTu-19 is a syngeneic adenocarcinoma used to develop ovarian cancer in an immunocompetent rat model [10]. It is a poorly differentiated adenocarcinoma originally derived from a female athymic mouse after injection of Fischer 344 ovarian surface epithelial cells that spontaneously underwent malignant transformation *in vitro*.

NuTu-19 cells were cultured in DMEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin 1% and streptomycin 1%. Cell culture plates were incubated under standardized conditions (5% carbon dioxide, 100% humidity, 37°C). The cell line was cryopreserved in liquid nitrogen (10^7 cells/vial). Each experiment was performed by thawing a vial of cells and expanding them biweekly to provide the appropriate cell number. After harvesting the NuTu-19 cells with 0.25% trypsin (Gibco Life Technologies™, NY, USA), they were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, Gibco Life Technologies™, NY, USA) and counted. Viability was testing using trypan blue exclusion. With a minimum of 90% survival, 10^6 cells ml^{-1} PBS were injected intraperitoneally in the Fischer rats. Small nodules up to 2 mm form along the peritoneal lining of the abdominal wall, pelvis, and omentum with haemorrhagic ascites.

This preclinical model enables to study folate-targeted therapy [11].

Photosensitizers

5-(4-carboxyphenyl)–10,15,20–triphenylporphyrin (**Porph**) and N-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}folic acid}-4-carboxyphenylporphyrin called **Porph-s-FA** (Figure 1) were provided by a French research laboratory (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274 CNRS - University of Lorraine, France) [9] and were stored in powder form and kept refrigerated. Synthesis of this compounds have been described previously [9]. Samples were prepared immediately prior to use by dissolution of the powder in 200 µL of DMSO first and then in phosphate buffered saline (PBS), and were protected from light exposure.

Tissue sampling protocol

18 rats were divided into three groups:

1) Control. No photosensitizer injected (n=6).
2) Injection of 5-(4-carboxyphenyl)–10,15,20–triphenylporphyrin (**Porph**) (n=6).
3) injection of N-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}folic acid}-4-carboxyphenylporphyrin (**Porph-s-FA**) (n=6)

6-8 weeks, after peritoneal injection of NuTu-19 cells, the PS was administered. Each animal received an intraperitoneal injection of 3 x 10^{-6} mol/kg of **Porph** (group 2, 1.8 mg/kg) or **Porph-s-FA** (group 3, 3.6 mg/kg). Animals from group 1 didn't receive any injection. Animals were sheltered from light prior tissue sampling. 4 hours after administration, according to Gravier et al. [8], they were anesthetized with isofluran and placed in the supine position to perform a precise surgical examination of the peritoneal cavity. Then, they were sacrificed by blood depletion, and sampling of the tissues (liver, kidney, colon, small intestine, ovary, peritoneum and tumor) was immediately performed under dim light. Peritoneal fluid was carefully wiped off the tissues and feces were evacuated from the intestine by gentle pressure.

Samples for PS tissue quantification were dropped into liquid nitrogen immediately after removal and then conserved at - 80°C. Samples for histology analysis and confocal microscopy were dropped into formaldehyde solution for 24 hours and then into ethanol 70% before paraffin

inclusion. All tissue samples were individually covered in aluminum to protect them from light exposure.

FRα tissue expression by immunohistochemistry

Tissue expression of FRα was determined for several organs of the peritoneal cavity. Two primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology™ and Antibodies-online™) were previously tested and adjusted on human high grade serous ovarian carcinoma used as a positive control. Optimal staining was obtained with Santa Cruz Antibody™.

Tissue sections were fixed on glass slides. They were deparaffinised with xylene, rehydrated through a graded series of ethanol and rinsed in distilled water. Antigen retrieval was achieved by heating in EDTA buffer solution pH8 for 9 min at 98°C. Slides were cooled down to room temperature and rinsed with PBS. After blocking endogenous peroxidase in 3% H_2O_2 in PBS for 15 min, sections were pre-treated by avidin/biotin reagents to reduce non-specific background. Sections were incubated with the primary antibody FL-257 (Santa Cruz Antibody™) for 60 min in a 1:1000 dilution at room temperature. After washing with PBS, sections were incubated with secondary biotinylated anti-rabbit antibody. Peroxidase activity was visualized with 3,3-diaminobenzidine and slides were counterstained with haematoxylin, mounted with mounting medium and coverslips were added. All histology has been assessed by a senior pathologist.

Accumulation Assay

The uptake of the PS was examined in peritoneal carcinomatosis nodules, normal peritoneum, liver, colon, small intestine, kidneys and ovaries, after thawing of the samples.

50 mg tissue samples were carefully cut in 500 µL 0,9% saline solution, then sonicated for three periods of 12 seconds (Bioblock Scientific™). Total protein concentration was determined using Coomassie Blue reagent (Protein Assay, BioRad Laboratories™). Porphyrins were extracted from the suspension by a ten-fold dilution with 1N perchloric acid: methanol (1:1 v/v). After mixing and centrifugation, the supernatant was isolated for quantification of PS by spectrofluorometry,

using a VARIAN Cary Eclipse spectrofluorometer fitted with a red sensitive photomultiplier (excitation at 438 nm, emission at 672 nm). The results were given in nanomoles per gram of proteins. The different types of endogenous porphyrins in tissue were also determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) and quantified (excitation at 410 nm, emission at 600 nm) (data not shown).

***In vivo* visualization of photosensitizer uptake**

Tissue **Porph-s-FA** specific fluorescence was studied by confocal microscopy for each tissue sample of groups 1 (control) and 3 (**Porph-s-FA**). Tissue sections were fixed on glass slides. They were deparaffinised with xylene, rehydrated through a graded series of ethanol and rinsed in distilled water. Slides were then mounted with DAPI (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI, Vector Laboratories™) and coverslips were added. For each organ, a control slide was mounted with mounted medium alone (Shandon Immuno-Mount, Thermo Scientific™), to identify tissue autofluorescence emission. Slide preparation was performed under dim light.

Tissue slides were examined with an inversed confocal microscope Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss™, Jena, Germany), with 10x and 40x magnification. We used the ZEN 2010 software (Zeiss Efficient Navigation, Carl Zeiss™, Jena, Germany) for pictures acquisition with an excitation wavelength at 405 nm and an emission wavelength at 650 nm

Statistical analysis

The Wilcoxon test for matched samples was used for the statistical analysis using JMP® Pro 10.0.0 (SAS Institute Inc. - NC - USA) software. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Expression of FRα *in vitro* and *in vivo.*

The description of this preclinical model for folate-targeted therapy has been published elsewhere [11]. To assess the specificity of FRα expression by tumor tissue, immunohistochemistry techniques were used to determine the specific expression of the receptor in several organs of the abdominal cavity. Ovary, peritoneum, small intestine, colon, liver, kidney and tumor tissue have been examined. Ovary, liver and tumor tissue showed FRα-positive cell contingents. On the contrary, peritoneum, small intestine, colon, kidney were FRα-negative tissue. In the ovary, the expression of FRα is mainly located at the epithelial surface of the organ. In the liver, FRα is expressed by cells located near the endothelium, which may correspond to human hepatic stellate cells.

Cytoplasmic red endocytosis vesicles observed in confocal microscopy are well correlated to FRα tissue expression

Figure 2 shows tissue expression of FRα observed on slide section of ovary, small intestine, colon, peritoneum, kidney, and liver. Confocal microscopy allows visualizing the fluorescence of **Porph-s-FA** 4 hours after administration (group 3). Folate-targeted PS appears in confocal microscopy under the form of a red vesicle of endocytosis which is absent in control tissue (group 1). Cell nuclei appear in blue after DAPI application. The specific red signal is cytoplasmic, and is different from red cell autofluorescence which is observed in extracellular space and with a larger size (approximately 7 µm). Some tissue (kidney, liver) are emitting autofluorescence, but this autofluorescence is similar between groups 1 and 3 and so independent of the PS administration. Ovarian epithelium expresses FRα. Specific red signal indicating the presence of PS is observed in ovarian tissue after administration of **Porph-s-FA**. In the liver, we have observed the expression of FRα by cells locating near the endothelium and which could correspond to human hepatic stellate cells. A specific red signal in relation to accumulation of the folate-targeted PS was observed into the cytoplasm of those cells.

The study of colon, small intestine, kidney and peritoneum didn't demonstrate any expression of FRα, and confocal microscopy images confirm these results since no fluorescence could be detected in those tissues.

In tumor tissue, a heterogeneous expression of FRα was observed, and incorporation of **Porph-s-FA** was detected by confocal microscopy (Figure 3).

Tissue quantification shows specificity of the folate-targeted photosensitizer

Details of PS tissue quantification results are given on Tables 1-2 and Figures 4-5. Those results have been obtained only from bulk photosensitizer extraction of snap frozen specimens. PS quantification in the different organs allows providing precise information on the ratio of the incorporation in normal/tumoral tissues. A higher level of tissue concentration of PS was observed in tissues which express FRα (tumor, ovary and liver). On the contrary, low level of PS was observed in those tissues after administration of non-conjugated compound (**Porph**).

Due to the variable growth of peritoneal carcinomatosis in our model, we could provide only results from four samples originating from two rats of the third group. Those results range from 6.8 to 282 nmol / g prot (mean 87.30 +/- 131.17) in the third group, as they range from 0.1 to 0.3 nmol / g prot (mean 0.19 +/- 0.09) in the group 1. We are unable to provide a statistical analysis regarding this poor number of data. Nevertheless, the order of magnitude isn't the same between group 3 and 1, and those results are in agreement with confocal microscopy observation, and with tissue receptor expression. By extrapolation, and based on literature data, as it has been shown that FRα expression was highly selective in epithelial ovarian cancer among women, a folate-targeted PS could be an answer to the lack of specificity of older non-targeted PS.

The mean tumor-to-normal tissue ratio in the "**Porph-s-FA**" group was 9.6. Ovary was the organ with the higher concentration of PS (tumor-to-ovary ratio: 2.5). This ratio calculated for liver, colon, peritoneum, small intestine and kidney was respectively 8.5; 26.7; 31; 48 and 84.5.

DISCUSSION

We report preclinical evidences to assess the high specificity of a folate-targeted photosensitizer which could enable intraperitoneal photodynamic therapy for peritoneal carcinomatosis of ovarian origin.

One unsolved issue in advanced ovarian cancer surgical management is the treatment of peritoneal metastasis which are ignored during surgery because of their small size, even with a fluorescence-guided surgical strategy to enhance the completion of the surgery, and particularly in the case of platinum resistance. Our aim is to develop a PDT (photodynamic therapy) procedure performed at the end of complete cytoreductive surgery to induce necrosis of undetectable lesion and improve cytoreductive strategy. Molecularly targeted PS have a strong clinical potential and are needed to improve therapeutic index of intraperitoneal PDT [12]. It is necessary to get a PS specific and a light of appropriate wavelength to decrease side effects of the procedure and improve its tolerance and efficacy.

We have shown that this folate-targeted PS accumulate in the tissues which express FRα and that this incorporation is allowed by the conjugation with the folate, as non-conjugated PS is less incorporated into tissue. It is necessary to avoid intraperitoneal organs injuries. The observation of FRα expression and photosensitizer uptake by ovary hasn't any clinical relevance in this context as this organ isn't concern by this strategy, and always removed during cytoreductive surgery.

It has been stated by Elnakat and Ratnam that there is variability in the expression levels of the receptor among tumors obtained from different patients as well as heterogeneity in its expression within the same tumor [13]. We have observed a heterogeneous expression of folate receptor in the tumor tissue and this observation may have an impact regarding the efficacy of the photodynamic therapy procedure and interfere with the complete destruction of the tumor tissue. Regarding our findings, a limitation was that only a few commercial polyclonal antibodies were available to evaluate FRα expression in a murine model, compared to the amount of antibodies available for human tissue applications. This could explain the low quality staining in tumor tissue.

Nevertheless, two different commercial polyclonal antibodies (*Santa Cruz Biotechnology*™ and *Antibodies-online*™) were tested by an expert pathologist of Lille University Hospital, and adjusted with human high grade serous ovarian carcinoma. We observed specific staining in the tumor, and folate receptor, as a target, has several advantages [14]: its expression profile seems to be similar between primary tumors and recurrences [5], and chemotherapy hasn't any impact on receptor expression by residual lesions [15,16].

Our folate-targeted PS has been first designed by Schneider et al., and its photodynamic efficacy has been assessed in vitro on KB cells which express folate receptor [9]. It has been shown that when conjugated to folate, porphyrin or chlorin (which are commonly used as PS) had a better selectivity for tumor tissue, a better solubility, less normal tissue cytotoxicity and a better photodynamic activity [8,17,18].

While recent folate-targeted chemotherapy, like vintafolide [19,20], hasn't shown clinical evidences to improve prognosis of epithelial ovarian cancer, folate receptor remains a promising target among available tumor targets and markers [7], as it is expressed by 72-100% of serous carcinoma and absent of the normal tissue [5,21,22], and as it allows incorporation of conjugated compounds by endocytosis into cancerous cell cytoplasm.

Folate receptor molecular targeting for diagnosis (imaging,…) or therapy (chemotherapy / radiotherapy) is so a topic of research for more than twenty years [23], and it has been observed an excellent tumor specificity allowing performing fluorescence-guided surgery [24], or FR-positive tissue imaging [19].

Thus, folate has been conjugated to a fluorescent dye (fluorescein-isothiocyanate) to enhance fluorescence-guided surgery in women with peritoneal metastasis requiring a complete cytoreductive surgery [24]. Authors showed a perfect correlation between fluorescence and histology to precisely detect peritoneal metastasis, and this is strong evidence to show the accuracy of folate receptor to address molecular compound. Our results are leading to the same conclusions and we have observed a strong correlation between tissue expression of FRα determined by IHC,

and tissue accumulation of the PS observed both by porphyrin tissue quantification and direct visualization by confocal microscopy under the form of specific red endocytosis vesicles. This observation is in agreement with numerous authors who have stated that membrane anchored FRα can mediate internalization of receptor-bound folate compounds and folate conjugates into cytoplasm of cells by endocytosis [6,13,21,24].

Molecularly targeted PS are needed to improve therapeutic index of intraperitoneal PDT [12]. Indeed, existing PS have been evaluated in intraperitoneal indication and their lack of specificity for tumor tissue was responsible for a poor tolerance of the procedure. The tumor-to-normal tissue ratio allows understanding the high grade morbidity observed both in preclinical and clinical studies.

Protoporphyrin IX which accumulates into tissue after administration of an exogenous precursor (hexaminolevulinate) has been tested in preclinical studies for intraperitoneal application. We have already observed that poor tolerance was imputable to a higher level of PS in other organs of the cavity than in tumor [25].

In human application, only porfimer sodium has been clinically evaluated in phase I and II trials [26–30]. Severe complications, as digestive perforation, capillary leaks syndrome [31], prolonged stay in intensive care unit, have been reported without benefit on progression-free survival or on global survival. Those complications are related to a low tumor-to-normal tissue ratio measured from 143 samples of 48 patients at a mean value of 2.1 [32]

Our results are in favor of an enhancement of this ratio. A mean ratio of 9.6 should permit to illuminate the peritoneal cavity without inducing visceral injuries. This ratio includes results obtained from ovary and this organ would be removed in case of surgery for ovarian cancer, but results regarding colon and small intestine (tumor-to-tissue ratio = 26 and 48 respectively) indicate that it could be possible to illuminate those organs with appropriate wavelength without risking a digestive perforation.

Tissue quantification has been performed by an expert team regarding tissue porphyrin quantification, and the PS used in this study has been obtained by chemical synthesis so no interference with endogenous porphyrin could have occurred during the quantification.

In conclusion, intraperitoneal PDT could offer the opportunity to decrease peritoneal recurrence rate which is a challenge to raise in order to increase survival of patient. A new specific PS is needed to make feasible a safe human evaluation. We need to assess the efficacy of this specific PS to induce necrosis in photodynamic conditions. Further preclinical studies are conducted by our team to evaluate tolerance and photodynamic efficacy in vivo. Others applications using a folate-targeted PS could be considered for other cancers which overexpress folate receptor alpha.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there have no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by SIRIC ONCOLille, Grant INCa-DGOS-Inserm 6041.

The authors thank Sylvie Simonin (Centre Français des Porphyries) for her technical work for tissue porphyrin quantification.

REFERENCES

1. Eisenkop SM, Spirtos NM, Lin W-CM. “Optimal” cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: A commentary. Gynecol Oncol 2006;103(1):329–35.

2. Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. Eur J Cancer 2011;47, Supplement 3:S88–S92.

3. Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, Bryant A, Elattar A, Chattopadhyay S, et al. Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. Cochrane Database Syst Rev 2013;2:CD008765.

4. Elias D, Goéré D, Dumont F, Honoré C, Dartigues P, Stoclin A, et al. Role of hyperthermic intraoperative peritoneal chemotherapy in the management of peritoneal metastases. Eur J Cancer Oxf Engl 1990 2014;50(2):332–40.

5. Kalli KR, Oberg AL, Keeney GL, Christianson TJH, Low PS, Knutson KL, et al. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2008;108(3):619–26.

6. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. Adv Drug Deliv Rev 2000;41(2):147–62.

7. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. The Lancet 2014;384(9951):1376–88.

8. Gravier J, Schneider R, Frochot C, Bastogne T, Schmitt F, Didelon J, et al. Improvement of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and in vivo delivery studies. J Med Chem 2008;51(13):3867–77.

9. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. Bioorg Med Chem 2005;13(8):2799–808.

10. Rose GS, Tocco LM, Granger GA, DiSaia PJ, Hamilton TC, Santin AD, et al. Development and characterization of a clinically useful animal model of epithelial ovarian cancer in the Fischer 344 rat. Am J Obstet Gynecol 1996;175(3 Pt 1):593–9.

11. Azaïs H, Queniat G, Bonner C, Kerdraon O, Tardivel M, Jetpisbayeva G, et al. Fischer 344 rat: a preclinical model for epithelial ovarian cancer folate-targeted therapy. Int J Gynecol Cancer 2015; DOI 10.1097/IGC.0000000000000497. *In press*.

12. Cengel KA, Glatstein E, Hahn SM. Intraperitoneal photodynamic therapy. Cancer Treat Res 2007;134:493–514.

13. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. Adv Drug Deliv Rev 2004;56(8):1067–84.

14. Azaïs H, Moussaron A, Khodja Bach S, Bassil A, Betrouni N, Frochot C, et al. FRα: a target for prophylactic photodynamic therapy of ovarian peritoneal metastasis? Bull Cancer (Paris) 2014;101(12):1109–13.

15. Despierre E, Lambrechts S, Leunen K, Berteloot P, Neven P, Amant F, et al. Folate receptor alpha (FRA) expression remains unchanged in epithelial ovarian and endometrial cancer after chemotherapy. Gynecol Oncol 2013;130(1):192–9.

16. Crane LMA, Arts HJG, Oosten M, Low PS, Zee AGJ, Dam GM, et al. The effect of chemotherapy on expression of folate receptor-alpha in ovarian cancer. Cell Oncol 2011;35(1):9–18.

17. Moret F, Scheglmann D, Reddi E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC). Photochem Photobiol Sci 2013;12(5):823.

18. Li D, Li P, Lin H, Jiang Z, Guo L, Li B. A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. J Photochem Photobiol B 2013;127C:28–37.

19. Naumann RW, Coleman RL, Burger RA, Sausville EA, Kutarska E, Ghamande SA, et al. PRECEDENT: A Randomized Phase II Trial Comparing Vintafolide (EC145) and Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) in Combination Versus PLD Alone in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. J Clin Oncol 2013;:JCO.2013.49.7685.

20. Razzak M. Gynaecological cancer: Vintafolide-targeting the folate receptor with a cytotoxic offers hope. Nat Rev Clin Oncol 2013;10(12):668.

21. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. Anal Biochem 2005;338(2):284–93.

22. O'Shannessy DJ, Somers EB, Smale R, Fu Y-S. Expression of folate receptor-α (FRA) in gynecologic malignancies and its relationship to the tumor type. Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol 2013;32(3):258–68.

23. Leamon CP, Low PS. Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. Proc Natl Acad Sci 1991;88(13):5572–6.

24. Van Dam GM, Themelis G, Crane LMA, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-α targeting: first in-human results. Nat Med 2011;17(10):1315–9.

25. Guyon L, Farine M-O, Lesage JC, Gevaert A-M, Simonin S, Schmitt C, et al. Photodynamic therapy of ovarian cancer peritoneal metastasis with hexaminolevulinate: a toxicity study. Photodiagnosis Photodyn Ther 2014;

26. Delaney TF, Sindelar WF, Tochner Z, Smith PD, Friauf WS, Thomas G, et al. Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. Int J Radiat Oncol 1993;25(3):445–57.

27. Sindelar WF, Sullivan FJ, Abraham E, DeLaney TF, Smith PD, Friauf GF, et al. Intraperitoneal photodynamic therapy shows efficacy in phase I trial. In: Proc Am Soc Clin Oncol. 1995. page 447.

28. Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z, et al. Technique of photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms: Phase i study. Arch Surg 1991;126(3):318–24.

29. Hahn SM, Fraker DL, Mick R, Metz J, Busch TM, Smith D, et al. A Phase II Trial of Intraperitoneal Photodynamic Therapy for Patients with Peritoneal Carcinomatosis and Sarcomatosis. Clin Cancer Res 2006;12(8):2517–25.

30. Hendren SK, Hahn SM, Spitz FR, Bauer TW, Rubin SC, Zhu T, et al. Phase II trial of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. Ann Surg Oncol 2001;8(1):65–71.

31. Canter RJ, Mick R, Kesmodel SB, Raz DJ, Spitz FR, Metz JM, et al. Intraperitoneal photodynamic therapy causes a capillary-leak syndrome. Ann Surg Oncol 2003;10(5):514–24.

32. Hahn SM, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C, et al. Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res 2006;12(18):5464–70.

LEGENDS

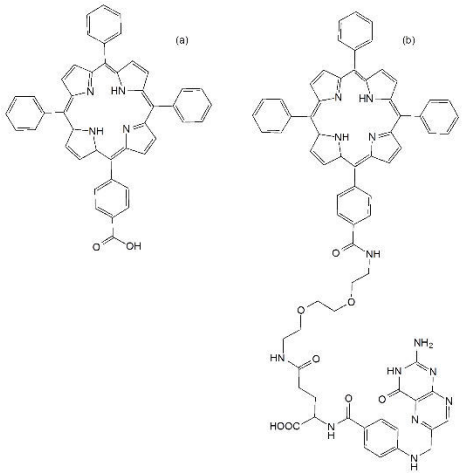


Figure 1

a) 5-(4-carboxyphenyl)–10,15,20–triphenylporphyrin (Porph)

b) N-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}folic acid}-4-carboxyphenylporphyrin (**Porph-s-FA**)

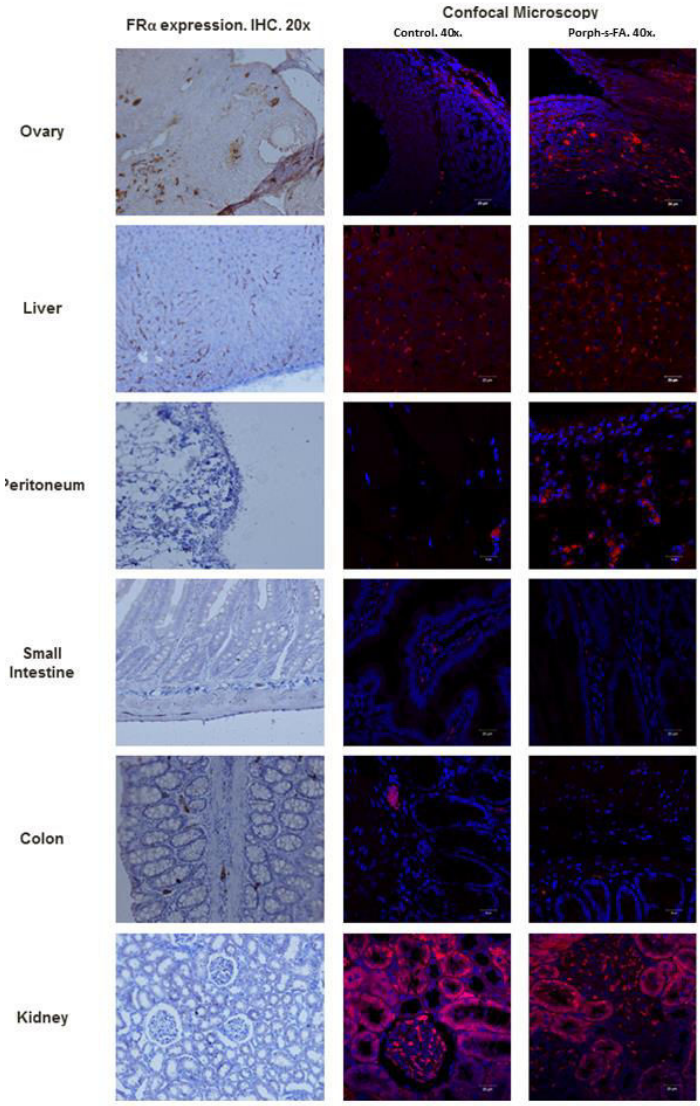


Figure 2

Tissue expression of FRα by each studied organ, and observation of a specific signal in confocal microscopy indicating the presence of **Porph-s-FA** which accumulates in red vesicles of endocytosis in tissue that expressed FRα (DAPI : Cell nuclei).

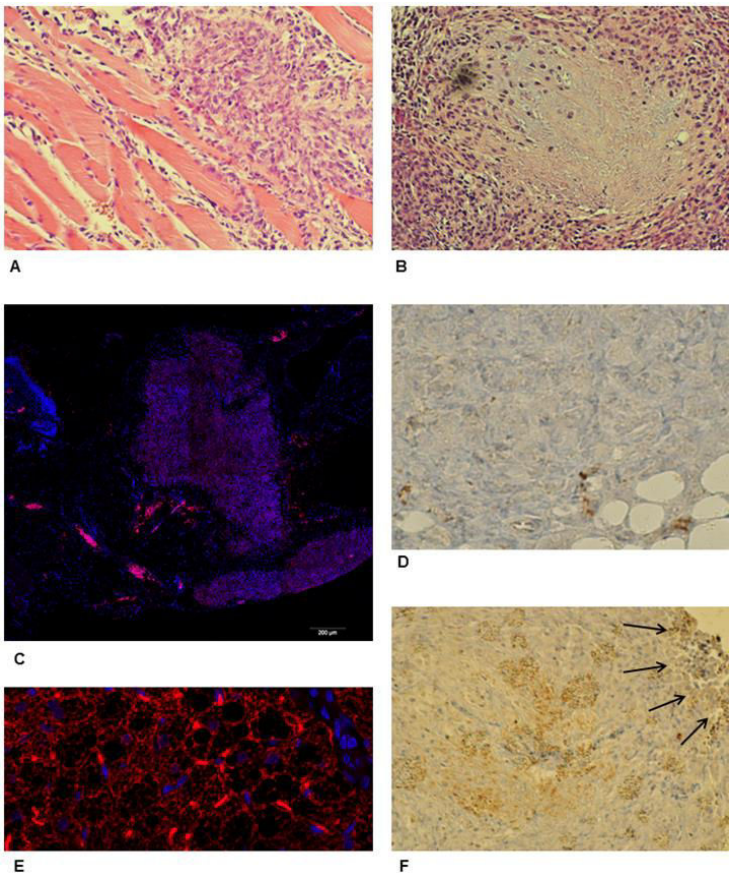


Figure 3

A : Subcutaneous tumor at the injection site of NuTu-19 cells. Muscular tissue infiltration by tumor (H&E. 20x) **B** : Diaphragmatic peritoneal metastasis with a central necrosis zone (H&E. 20x.) **D** : Tumoral tissu. Weak FRα staining. 20x. **F** : Tumoral tissue. Strong FRα staining (arrows). 20x. **C (10x) and E (40x)** : Confocal microscopy. Heterogenous intracellular signal corresponding to tissular **Porph-s-FA** incorporation.

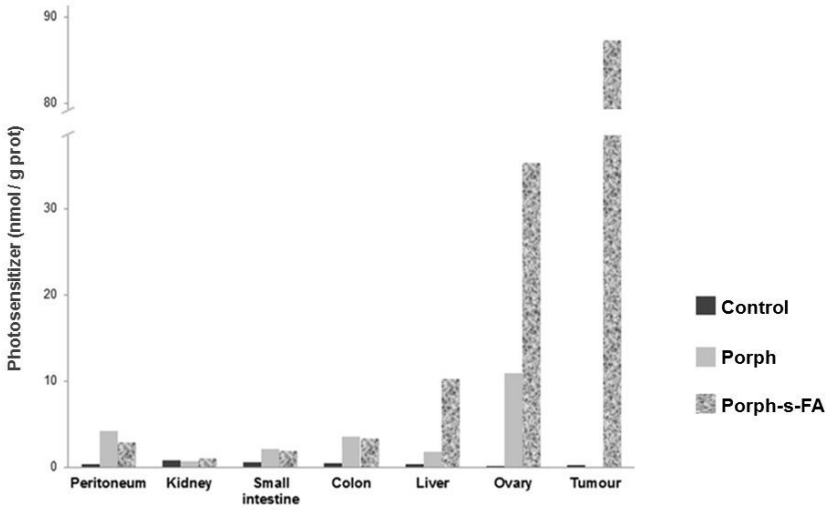


Figure 4

Tissue concentration of photosensitizer (nmol / g prot), 4 hours after its intraperitoneal administration.

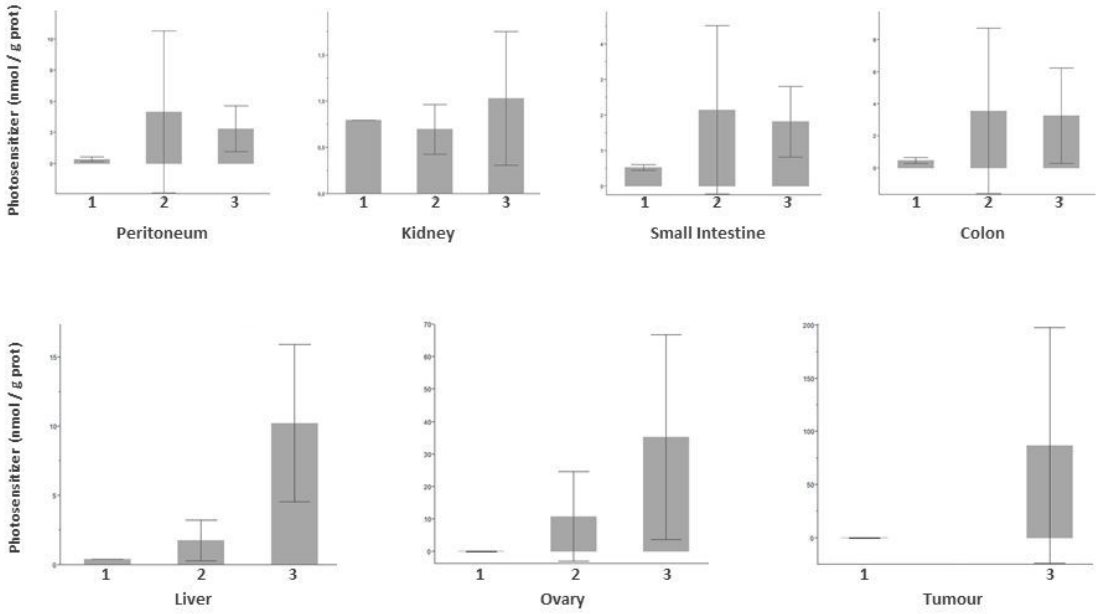


Figure 5

Tissue concentration of photosensitizer (nmol / g prot), 4 hours after its intraperitoneal administration. Details. (Group 1 : Control / Group 2 : Porph / Group 3 : Porph-s-FA)

Table 1

Tissue concentration of photosensitizer (nmol / g prot.) Mean +/- SD

	Group 1	Group 2	Group 3
Peritoneum	0.37 +/- 0.20	4.17 +/- 6.51	2.82 +/- 1.91
Kidney	0.80 +/- 0.00	0.70 +/- 0.27	1.03 +/- 0.72
Small Bowel	0.53 +/- 0.08	2.15 +/- 2.37	1.82 +/- 1.00
Colon	0.48 +/- 0.17	3.57 +/- 5.15	3.27 +/- 2.97
Liver	0.40 +/- 0.00	1.77 +/- 1.48	10.25 +/- 5.69
Ovary	0.17 +/- 0.06	10.90 +/- 13.87	35.30 +/- 31.52

Table 2
Tissue concentration of photosensitizer (nmol / g prot.). Details.

	Rat id.	Kidney	Liver	Small Intestine	Colon	Peritoneum	Ovary
Group 1	1	0.8	0.4	0.4	0.3	0.3	-
	2	0.8	0.4	0.6	0.6	0.5	0.2
	3	0.8	0.4	0.5	0.7	0.2	-
	4	0.8	0.4	0.5	0.3	0.7	0.2
	5	0.8	0.4	0.6	0.4	0.3	0.1
	6	0.8	0.4	0.6	0.6	0.2	-
Group 2	1	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1
	2	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2
	3	1	3.1	2.6	1.6	16.9	12.4
	4	1	2.7	3.9	3.8	4.2	34.7
	5	0.5	0.5	0.3	2.1	0.1	0.2
	6	0.8	3.5	5.8	13.7	3.6	17.8
Group 3	1	0.6	13.6	1.3	2.3	2.3	3.2
	2	2.5	9	3.6	7.7	1.9	22
	3	0.7	1.1	0.6	1.1	2.1	19.4
	4	0.8	7.1	2	0.7	0.5	19.6
	5	0.8	16.7	1.6	1.5	5.1	86
	6	0.8	14	1.8	6.3	5	61.6

Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique

Une des limitations de la thérapie photodynamique est la faible sélectivité des photosensibilisateurs (PS) pour les tissus tumoraux. La recherche de nouveaux PS plus sélectifs s'est orientée vers la synthèse de PS couplés à des motifs afins pour des récepteurs membranaires surexprimés dans certains cancers. Le récepteur à l'acide folique est surexprimé dans les carcinomes ovariens et des PS ont été conjugués à de l'acide folique. Des PS ont aussi été couplés à un peptide spécifique de neuropiline 1 surexprimé au niveau des cellules tumorales de médulloblastome. Une autre stratégie pour augmenter la sélectivité du traitement vise à produire les espèces réactives de l'oxygène spécifiquement au niveau du site tumoral. L'activité de clivage enzymatique de marqueurs biologiques surexprimés dans les zones tumorales est utilisée. Les gélatinases (MMP-2 et -9) et leur activateur MMP-14 sont connues pour jouer un rôle primordial dans l'angiogenèse tumorale et la croissance du glioblastome multiforme. Différents *photodynamic molecular beacons* (PMB), associant un PS et un *quencher* lié par un peptide substrat des gélatinases et MMP-14, ont été développés.

Mots-Clés : sélectivité tumorale, thérapie photodynamique, photosensibilisateur, *photodynamic molecular beacon*, acide folique, peptide.

Synthesis of new systems based on photosensitizers for the improvement of the tumor selectivity in photodynamic therapy

One limitation of photodynamic therapy is the low selectivity of photosensitizers (PS) to tumour tissue. The search of new PS more selective began to focus on the synthesis of PS coupled with substrate specific of the membrane receptors overexpressed in certain cancers. The acid folic receptor is overexpressed in ovarian carcinomas and PS were conjugated with folic acid. PS were also coupled with a specific peptide of neuropilin 1 overexpressed in tumoral cells of medulloblastoma. Another strategy for increasing the selectivity of the treatment is to produce reactive oxygen species specifically at the tumor site. The activity of enzymatic cleavage of biomarkers overexpressed in tumour areas is used. The gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their activator MMP-14 are known to play a key role in tumour angiogenesis and the growth of glioblastoma multiform. Different photodynamic molecular beacons (PMB), composed of a photosensitizer and a *quencher* linked together by a peptide substrate of gelatinases or MMP-14, were designed.

Keywords: tumor selectivity, photodynamic therapy, photosensitizer, photodynamic molecular beacon, folic acid, peptide.