



HAL
open science

Nanoparticules multifonctionnelles excitables par les rayons X pour la thérapie photodynamique

Rima Chouikrat

► **To cite this version:**

Rima Chouikrat. Nanoparticules multifonctionnelles excitables par les rayons X pour la thérapie photodynamique. Autre. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0294 . tel-01754588

HAL Id: tel-01754588

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754588v1>

Submitted on 30 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité

Génie des Procédés et des Produits

Présentée par

Rima CHOUIKRAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Nanoparticules multifonctionnelles excitables par les rayons X pour la thérapie photodynamique

Soutenue le 17 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Gilles LEMERCIER, Pr	Rapporteur	Université de Reims
Serge MORDON, DR ₁ INSERM	Rapporteur	Université de Lille 1
Laurence RAEHM, MdC	Examineur	Université de Montpellier
Régis VANDERESSE, CR ₁ CNRS	Examineur	Université de Lorraine
Céline FROCHOT, DR ₂ CNRS	Directrice de thèse	Université de Lorraine
Marc VERELST, Pr	Co-directeur de thèse	Université de Paul Sabatier

Dédicaces

Je dédie cette thèse

À mon père, sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui...

À ma mère, dont les prières m'ont accompagnée tout le long de mes études,

Je vous dois mon courage et ma détermination dans la poursuite de mon cursus scolaire.

A la mémoire de ma grand-mère paternelle « *Jida* » qui m'a entourée de toute son affection avant que Dieu ne la rappelle à Lui.

A la mémoire de mes grands-pères et de ma grand-mère maternelle.

A la mémoire du petit « Youcef » qui est parti trop vite rejoindre les jardins du paradis.

A mes tantes et mes oncles que j'aime tant.

A mes cousins et cousines à qui je dédie ce travail en témoignage de l'affection et des sentiments de fraternité qui nous unissent. A vous tous, je souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de succès. Que Dieu vous garde et vous ouvre les portes de la réussite.

A tous les membres de ma famille, petits et grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère.

A tous mes ami(e)s et tous ceux qui me sont chers.

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de thèse, Madame Céline Frochot, de m'avoir guidée durant cette thèse. Merci pour ses conseils avisés et sa disponibilité. Merci pour la liberté qu'elle m'avait laissé ainsi que la confiance dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon co-directeur de thèse, Monsieur Marc Verelst pour son aide et ses conseils avisés.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Régis Vanderesse et le remercie pour sa disponibilité, son aide et ses conseils que j'ai appréciés à leur juste valeur.

Merci à Monsieur Jean-Claude André pour son aide précieuse et son soutien.

Je remercie Mesdames et Messieurs les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du Laboratoire ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration et la réalisation de ce projet.

Une pensée particulière à mes collègues que je remercie pour leur aide et leur soutien.

Merci à toutes les personnes du LRGP, du LCPM, du CEMES et du CRAN dont j'ai pu croiser la route au cours de ces années.

Enfin, mes pensées vont, bien sûr, aux membres de ma famille qui ont toujours été présents pour m'encourager. Sans leur soutien inconditionné, il m'aurait été impossible de réaliser cette thèse et de poursuivre des études aussi longues. Merci pour votre soutien quotidien, vos conseils et votre amour.

Table des matières

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Liste des figures</i>	3
<i>Liste des tableaux</i>	8
<i>Introduction générale</i>	9
Chapitre 1 : La Thérapie Photodynamique (PDT)	13
I- Le cancer et ses traitements.....	15
I-1. Chirurgie de résection.....	17
I-2. Chimiothérapie/ traitements médicaux.....	17
I-3. Radiothérapie.....	17
II- Thérapie photodynamique anti-tumorale.....	21
II-1. Principe de la PDT anti-tumorale.....	21
II-1-1. Mécanisme photophysique.....	22
II-1-2. Généralités sur les transferts d'énergie électronique (TEE).....	26
II-2. Mécanisme physiologique de la PDT anti-tumorale.....	32
II-2-1 Effet direct.....	32
II-2-2 Effet indirect.....	34
II-3. Les photosensibilisateurs.....	35
II-3-1. Bref historique de la PDT.....	35
II-3-2. Les photosensibilisateurs naturels.....	36
II-3-3. Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques.....	38
II-3-3-a. Les porphyrines.....	38
II-3-3-b. Les chlorines.....	52
II-3-3-c. Les phtalocyanines.....	55
II-3-4. Evolution des photosensibilisateurs vers un PS idéal.....	60
II-3-4-a. Photosensibilisateurs de la première génération.....	60
II-3-4-b. Photosensibilisateurs de deuxième génération.....	61
II-3-4-c. Photosensibilisateurs de troisième génération : thérapie ciblée.....	63
II-3-4-d. Photosensibilisateurs de quatrième génération.....	70
Chapitre 2 : Place des nanoparticules dans la PDT anti-tumorale et dans la radiothérapie	72
I- Définition des nanoparticules.....	74

I.1. Nanoparticules de première génération : nanoparticules nues.....	75
I-2. Nanoparticules de deuxième génération : nanoparticules furtives.....	76
I-3. Nanoparticules de troisième génération : nanoparticules ciblantes.....	76
I-4. Nanoparticules multifonctionnelles.....	76
II- Classification des nanoparticules.....	77
II-1. Nanoparticules organiques.....	78
II-2. Nanoparticules inorganiques.....	80
III. Place des nanoparticules en thérapie photodynamique.....	80
III-1. Nanoparticules organiques.....	80
III-2. Nanoparticules inorganiques.....	81
IV- Nanoparticules et radiothérapie.....	94
IV-1. Rappels sur la radiothérapie.....	94
IV-2. Les scintillateurs.....	112
IV-2-1. Principe de la scintillation.....	112
IV-2-2. Les lanthanides.....	116
IV-2-2-a. Caractéristiques électroniques des terres rares.....	116
IV-2-2-b. Propriétés optiques des terres rares.....	118
IV-2-2-c. Propriétés magnétiques des terres rares.....	121
V- Nanoparticules, PDT et radiothérapie.....	122
Objectif de la thèse.....	128
Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles.....	130
I- Synthèse et caractérisation photophysique des photosensibilisateurs.....	132
I-1. Synthèse des photosensibilisateurs.....	132
I-1-1. Synthèse de la porphyrine.....	132
I-1-2. Synthèse de la chlorine zinguée.....	133
I-1-3. Amélioration des conditions de synthèse des composés : utilisation des micro-ondes.....	134
I-1-4. Synthèse de la 2-(4-carboxyphényl) phtalocyanine de zinc (ZnPc).....	143
I-2. Caractérisation photophysique des photosensibilisateurs.....	143
I-2-1. Propriétés d'absorption.....	143
I-2-2. Propriétés d'émission de fluorescence.....	147
I-2-3. Propriétés de production d' ¹ O ₂	148

II- Greffage de la porphyrine sur une nanoparticule de Tb_2O_3 excitable par rayons X.....	149
III- Synthèse de nouvelles nanoparticules $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ excitables par rayons X.....	158
III-1. Synthèse $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ (5%).....	158
III-2. Fonctionnalisation des nanoparticules de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$	159
III-3. Pegylation des nanoparticules $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ -DETA.....	160
III-4. Couplage du photosensibilisateur sur les nanoparticules $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ -DETA- PEG250.....	160
III-5. Caractérisation des nanoparticules $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ -DETA-PEG250.....	160
IV- Etude du transfert d'énergie entre les nanoparticules de $Gd_2O_2S :Eu^{3+}$ -DETA ou $Gd(OH)CO_3:Tb^{3+}$ -DETA-PEG250 avec la ZnTPC, ZnPc et une porphyrine.....	171
IV-1. Calcul du rayon de Forster et estimation théorique du transfert.....	171
IV-2. Etude du transfert énergétique entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs dans l'éthanol.....	172
IV-3. Estimation de la part du transfert d'énergie radiatif.....	179
 <i>Conclusion générale et perspectives</i>	 186
 <i>Références bibliographiques</i>	 190
 <i>Liste des publications et des communications</i>	 206
 <i>Résumé</i>	 208

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
τ_Δ	Temps de vie de l'oxygène singulet
τ_F	Temps de vie de fluorescence
Φ_Δ	Rendement quantique d'oxygène singulet
Φ_F	Rendement quantique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide aminolévulinique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI	Conversion Interne
CIS	Croisement Inter Système
DCM	Dichlorométhane
DETA	N-(3-Triméthoxysilylpropyl)diéthylènetriamine
DIEA	Diéthyleamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO	Diméthylesulfoxyde
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
Gd ₂ O ₂ S:Eu	Oxysulfure de gadolinium dopé à l'euporium
HbO ₂	Hémoglobine
HBTU	Hexafluorophosphate de O-benzotriazole-N,N,N',N'-tétraméthyluronium
HP	Hématoporphyrine
HpD	Hématoporphyrin Derivative
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDL	Intervalle Drogue-Lumière
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCPM	Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
MeOH	Méthanol
MMP	Métalloprotéinases matricielles (Matrix MetalloProteinases)

m-THPC	meta-tétrahydroxyphénylchlorine
NH ₂	Amine primaire
NRP-1	Neuropiline - 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P ₁	5-(4-carboxyphényle)-10,15,20-triphényle porphyrine
Pc	Phtalocyanine
PDT	Thérapie Photodynamique (PhotoDynamic Therapy)
PEG	PolyEthylèneGlycol
pH	Potentiel Hydrogène
PMB	Photodynamic Molecular Beacon
PS	Photosensibilisateur
p-TSH	para-toluènesulfonylhydrazine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
S ₀	Etat fondamental singulet
S ₁	Premier état excité singulet
S _n	n ^{ème} état excité singulet
T ₁	Premier état excité triplet
T _n	n ^{ème} état excité triplet
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TNBSA	Acide trinitrobenzènesulfonique
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPC	5-(4-carboxyphényle)-10,15,20-triphényle chlorine
TPP	Tétraphénylporphyrine
UV	Ultra-Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VTP	Vascular Targeted Photodynamic Therapy
ZnPc	2-(4-carboxyphénoxy) phtalocyanine de zinc
ZnTPC	Zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10, 15, 20-triphenylchlorin

Liste des figures

Figure 1 :	Prolifération des cellules tumorales	15
Figure 2 :	Représentation schématique du phénomène d'angiogenèse.....	16
Figure 3 :	Pouvoir de pénétration des différents rayonnements.....	18
Figure 4 :	Effets direct et indirect des radiations ionisantes sur l'ADN.....	19
Figure 5 :	Principe de la PDT.....	21
Figure 6 :	Diagramme simplifié de Jablonski.....	22
Figure 7 :	Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le photosensibilisateur à l'état triplet.....	23
Figure 8 :	Exemple d'oxydation et de cyclisation de molécules après réaction avec $^1\text{O}_2$	26
Figure 9 :	Principe du transfert d'énergie.....	26
Figure 10 :	(a) Compatibilité énergétique, (b) Intégrale de recouvrement entre spectres	28
Figure 11 :	Evolution de l'efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance entre les fluorophores.....	29
Figure 12 :	Principe des mesures du FRET par mesure d'intensité en utilisant un spectromètre.....	30
Figure 13 :	Principe des mesures du FRET basée sur la mesure du temps de vie	31
Figure 14 :	Mécanisme de destruction tumorale après PDT.....	32
Figure 15 :	Modification morphologique cellulaire au cours de la nécrose	33
Figure 16 :	Modification morphologique cellulaire au cours de l'apoptose	33
Figure 17 :	Psoralène	36
Figure 18 :	Structure chimique du Bleu de Méthylène	37
Figure 19 :	Structure chimique de l'hypéricine.....	37
Figure 20 :	Structure chimique du Rose de Bengale	37
Figure 21 :	Structure chimique de l'éosine	38
Figure 22 :	Structure chimique de l'érythrosine	38
Figure 23 :	Structure générale d'une porphyrine base libre et d'une métalloporphyrine.....	39
Figure 24 :	Nomenclature selon Fischer et l' IUPAC	39
Figure 25 :	Exemple de macrocycle tétrapyrrolique naturel : l'hème	40
Figure 26 :	Schéma de la synthèse de la TPP effectuée par Rothemund en 1941	41
Figure 27 :	Synthèse de la méso-tétraphénylporphyrine (TPP) selon Adler et Longo	42
Figure 28 :	Synthèse de porphyrines meso-tetrasubstituées par la méthode des « aldéhydes mixtes » de Little.....	43

Figure 29 :	Distribution statistique des porphyrines synthétisées par la méthode des aldéhydes mixtes avec un mélange d'aldéhydes A et B en proportion 3:1.....	44
Figure 30 :	Synthèse sur phase solide d'une porphyrine asymétrique	45
Figure 31 :	Mécanisme de formation d'une tétraarylporphyrine selon Lyndsey.....	46
Figure 32 :	Synthèse de différentes 5,10,15,20-tetraarylmétalloporphyrines sous irradiation micro-onde (Jain et al., 2005).....	48
Figure 33 :	Schéma de synthèse « 2+2 » d'une porphyrine asymétrique	48
Figure 34 :	Schéma de la synthèse du noyau porphyrine par la méthode « 3+1 »	49
Figure 35 :	Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base libre	50
Figure 36 :	Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines base libre	50
Figure 37 :	Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées	51
Figure 38 :	Structures chimiques des macrocycles porphyriniques : porphyrine, chlorine et bactérochlorine.....	52
Figure 39 :	Réduction des octa-alkylporphyrines pour l'obtention d'une dihydrochlorine	53
Figure 40 :	Synthèse de la méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC)	54
Figure 41 :	Spectres d'absorption des composés tétrapyrroliques dans l'éthanol. Porphyrine, chlorine et bactérochlorine.....	55
Figure 42 :	Structure chimique d'une phtalocyanine	56
Figure 43 :	Structure de la chloroaluminium phtalocyanine sulfonée	56
Figure 44 :	Première synthèse de la phtalocyanine d'hydrogène, H ₂ P _C	57
Figure 45 :	Cyclisation des phtalonitriles en phtalocyanine	58
Figure 46 :	Synthèse d'une phtalocyanine d'hydrogène et d'une phtalocyanine métallée à partir de la 1,3-diiminoisindoline.....	58
Figure 47 :	Synthèse à partir d'un anhydride phtalique.	59
Figure 48 :	Spectre d'absorption d'une phtalocyanine zinguée ZnPc-COOH dans l'éthanol	59
Figure 49 :	Structures chimiques de l'hématoporphyrine et du Photofrin	60
Figure 50 :	Structures chimiques du Visudyne® et du Foscan®	61
Figure 51 :	Stratégies générales de ciblage des photosensibilisateurs vis-à-vis des cellules	63
Figure 52 :	Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres	64
Figure 53 :	Structure chimique des conjugués «m-THPC-like» - acide folique synthétisé par Julien Gravier, 2008.....	65
Figure 54 :	Mécanisme de l'endocytose médiée par les récepteurs à l'acide folique	65

Figure 55 :	Schéma synthétique des principaux effecteurs biologiques lors de l'angiogenèse tumorale.....	66
Figure 56 :	Structure chimique du peptide ATWLPPR	67
Figure 57 :	Structure chimique du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR	67
Figure 58 :	Structure chimique du peptide DKPPR	68
Figure 59 :	Structure chimique du peptide TKPPR	68
Figure 60 :	Schéma d'activation par clivage enzymatique d'un PMB pour la thérapie photodynamique.....	69
Figure 61 :	Scéma des cellules endothéliales	70
Figure 62 :	Imagerie de fluorescence confocale de cellules vivantes MCF7 traitées avec les TP...	70
Figure 63 :	Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques (thèse Wan, 2012).....	74
Figure 64 :	Evolution des nanoparticules. Première génération : nanoparticule « nue ». Deuxième génération : nanoparticules « furtives ». Troisième génération : nanoparticules « ciblantes »	75
Figure 65 :	Nanoparticule multifonctionnelle (Ferrari, 2005)	77
Figure 66 :	Les différentes nanoparticules utilisées en thérapie	78
Figure 67 :	Fenêtre thérapeutique en radiothérapie (Nanobiotix®).....	94
Figure 68 :	Représentation schématique de l'ouverture de la fenêtre thérapeutique de la radiothérapie apportée par les nanoscintillateurs, radiothérapie seule, radiothérapie en présence de nanoparticules (Nanobiotix®).....	95
Figure 69 :	Principe de la scintillation en différentes étapes (absorption des rayonnements très énergétiques, multiplication et émission dans le visible) (Retot et al., 2009).....	112
Figure 70 :	Interactions entre rayonnement et matière en fonction du numéro atomique Z et de l'énergie des photons.....	113
Figure 71 :	Effet photoélectrique.....	113
Figure 72 :	Effet Compton.....	114
Figure 73 :	Effet paire électron-positron.....	114
Figure 74 :	Visualisation des pièges nuisibles en scintillation (pièges à électrons) (Viana et al., 2011).....	115
Figure 75 :	Abondance relative des éléments dans l'écorce terrestre en ppm.....	116
Figure 76 :	Spectres d'émission normalisés des principaux ions lanthanides.....	119

Figure 77 :	Principales transitions luminescentes de l'ion Eu^{3+}	120
Figure 78 :	Exemples complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} développés par CISBIO, International (A), Perkin Elmer Life Sciences (B), Invitrogen (C) et Amersham (D).....	121
Figure 79 :	Fenêtre thérapeutique optique : spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques (eau, mélanine et oxyhémoglobine HbO_2) (Wang et al., 2007).....	122
Figure 80 :	Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde (Agostini et al., 2011)	123
Figure 81 :	Principe du phénomène d'absorption à deux photons et de l'« up-conversion » (Frochot, 2015).....	124
Figure 82 :	Représentation d'une nanoparticule excitable par rayons X (Chen et al., 2008).....	125
Figure 83 :	Quenching de la photoluminescence du ADPA avec irradiation RX : (a) ADPA + porphyrine - (b) ADPA + nanoparticules de $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ Conjuguées à MTCP - (c) ADPA + nanoparticules de $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ conjuguées à MTCP et à l'acide folique (d) (Liu et al., 2008).....	126
Figure 84 :	Activité métabolique cellulaire du glioblastome humain normalisée à travers des mesures MTT (48 heures après exposition aux RX pendant 15 min (120 kVp, 20 mAs), [PhotofrinII]= 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, [$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Tb}$]=5mg/mL, temps d'incubation : 2 h (Abliz et al., 2011).....	127
Figure 85 :	Schéma des nanoparticules synthétisées	128
Figure 86 :	Synthèse de la porphyrine notée P1.	133
Figure 87 :	Synthèse de la bactériochlorine et de la TPC.....	134
Figure 88 :	Réactions de synthèse aux micro-ondes.....	136
Figure 89 :	Synthèse de la ZnTPC	143
Figure 90 :	Spectres d'absorption de la P1, TPC, ZnTPC et ZnPc dans l'éthanol.....	144
Figure 91 :	Spectres d'émission de la P1, TPC, ZnTPC et ZnPc dans l'éthanol.....	147
Figure 92 :	Spectres d'émission d'oxygène singulet de la P1, TPC, ZnTPC et ZnPc dans l'éthanol	148
Figure 93 :	Représentation de : (a) la structure $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ et (b) des polyèdres de coordination présents dans cette structure.....	159
Figure 94 :	N-(3-Triméthoxysilylpropyl) diéthylènetriamine)	160
Figure 95 :	Base de calcul de la probabilité maximale de transfert lié à la présence d'accepteur à une distance du donneur présent en surface de $2.R_0$ ($R \gg R_0$).....	172

Figure 96 :	Influence de la concentration de la P1 sur la luminescence du terbium à $\lambda_{em}=545$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc}=310$ nm)	173
Figure 97 :	Influence de la concentration de P1 en solution sur τ_1 et τ_2 du terbium à $\lambda_{em} = 545$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 310$ nm)	173
Figure 98 :	Influence de la concentration de la ZnPc sur la luminescence de l'Eu ³⁺ à $\lambda_{em} = 625$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 467$ nm)	175
Figure 99 :	Influence de la concentration de la ZnPc en solution sur τ_1 et τ_2 de l'euporium à $\lambda_{em} = 626$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 467$ nm).....	176
Figure 100 :	Influence de la concentration de ZnTPC sur la luminescence de l'euporium à $\lambda_{em} = 710$ nm pour $\lambda_{exc} = 365$ nm.....	177
Figure 101 :	Influence de la concentration en ZnTPC sur τ_1 et τ_2 de l'euporium à $\lambda_{em} = 710$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 365$ nm)	178
Figure 102 :	Relation de type Stern-Volmer entre les nanoparticules Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ et la P1 ...	179
Figure 103 :	Relation de type Stern-Volmer entre les nanoparticules Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA et la ZnPc.....	180
Figure 104 :	Variations de $1/\tau_1$ et de $1/\tau_2$ en fonction de la concentration en ZnPc.....	181
Figure 105 :	Intensité de luminescence intégrée en fonction de la concentration en ZnPc.....	182
Figure 106 :	Variation de l'intensité de fluorescence mesurée à 626 nm (PS absorbe et émet à cette longueur d'onde).....	183
Figure 107 :	Intensité de luminescence intégrée en fonction de la concentration en TPC.....	184

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Photosensibilisateurs utilisés cliniquement et leurs principales indications thérapeutiques (Plaetzer et al., 2009).....	62
Tableau 2 :	Position des lanthanides dans le tableau périodique des éléments.....	117
Tableau 3 :	Configuration électronique des ions trivalents des lanthanides.....	118
Tableau 4 :	Principales bandes caractéristiques de l'Eu (III) ainsi que les longueurs d'onde associées.....	120
Tableau 5 :	Conditions utilisées pour la synthèse de P1, bactériochlorine, TPC, ZnTPC et ZnP1.....	135
Tableau 6 :	Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la P1 dans l'éthanol.....	144
Tableau 7 :	Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la TPC dans l'éthanol.....	145
Tableau 8 :	Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnTPC dans l'éthanol.....	145
Tableau 9 :	Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnPc dans l'éthanol.....	146
Tableau 10 :	Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnP1 dans l'éthanol.....	146
Tableau 11 :	Longueur d'onde maximale d'émission et rendement quantique de fluorescence des photosensibilisateurs.....	148
Tableau 12 :	Rendements quantiques de production d' ¹ O ₂ des différents photosensibilisateurs synthétisés.....	149
Tableau 13 :	Valeurs des R ₀ dans les trois systèmes.....	171
Tableau 14 :	Durées de vie du terbium dans les NPs Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA et Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA-P1.....	174
Tableau 15 :	Durée de vie de Tb ³⁺ dans différentes nanoparticules.....	174
Tableau 16 :	Durées de vie de l'euprium dans les NPs Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA et Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA-ZnPc.....	176
Tableau 17 :	Durée de vie de Eu ³⁺ dans différentes nanoparticules.....	177
Tableau 18 :	Durées de vie de l'euprium dans les NPs Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA et Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA-TPC.....	178
Tableau 19 :	Durée de vie de Eu ³⁺ dans différentes nanoparticules.....	179

Introduction générale

Introduction générale

Les tumeurs cérébrales malignes (gliomes, médulloblastomes...) sont soit des tumeurs primaires soit des tumeurs secondaires métastatiques qui ont migré vers le cerveau. Dans la majorité des cas, la chirurgie reste l'option thérapeutique de référence, suivie par des traitements supplémentaires comme la radiothérapie ou la chimiothérapie pour détruire l'ensemble de la tumeur. La thérapie photodynamique (PDT) interstitielle se présenterait comme une alternative thérapeutique intéressante pour les tumeurs cérébrales de type astrocytaires, comme le glioblastome multiforme (GBM).

La PDT est basée sur l'activation par la lumière de molécules photo-activables qui ne sont pas toxiques en absence de lumière. Après excitation, ces molécules génèrent des espèces très réactives qui sont toxiques pour les tissus avoisinants : oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et autres radicaux libres.

La PDT consiste donc à activer un photosensibilisateur (PS) par la lumière en présence d'oxygène pour détruire des tissus malades. Elle est utilisée pour traiter des tumeurs de surface telles que les kératoses actiniques et des tumeurs accessibles aux fibres optiques utilisées pour véhiculer la lumière au plus près de la tumeur.

Une des limites de la PDT est liée à la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus et à cet effet, des recherches sont menées pour lever ce verrou et une nouvelle méthode basée sur l'utilisation des rayons X pour activer indirectement le photosensibilisateur est proposée.

Le sujet de la thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche qui envisage une stratégie thérapeutique novatrice pouvant combiner les principes de la PDT et de la radiothérapie. Il a été choisi d'utiliser les rayons X car ces derniers sont très connus pour leur pouvoir pénétrant caractéristique, utilisé en imagerie médicale pour les radiographies et les tomographies (scanners). Plus précisément, il s'agit de développer des nanoparticules (NPs) contenant un scintillateur. Le concept est le suivant : excité par des rayons X, le scintillateur peut émettre des photons qui sont réabsorbés par un photosensibilisateur (lui-même greffé sur la nanoparticule) qui, alors, peut générer de $^1\text{O}_2$ et engendrer la destruction des cellules ciblées. Ces nanoparticules possèdent dans leur cœur du gadolinium (agent permettant un rehaussement positif du signal IRM) dopé à l'euprimum ou au terbium (pour une absorption importante des RX) et des photosensibilisateurs (porphyrine, Zn-chlorine et Zn-phtalocyanine) en surface.

Ce manuscrit débute avec une introduction générale sur le sujet ; le chapitre I traite de l'état de l'art en PDT anticancéreuse et présente les principaux photosensibilisateurs utilisés aujourd'hui en clinique et développés dans le domaine de la recherche.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons brièvement les différentes NPs existantes ainsi que leur intérêt pour la thérapie médicale, notamment pour la thérapie photodynamique et pour la radiothérapie.

Une revue faisant l'état des lieux de l'utilisation de nanoparticules pour la PDT a été écrite et jointe à ce chapitre. D'autre part, une autre revue, également incluse dans ce chapitre, porte sur l'intérêt d'utiliser des nanoparticules pour augmenter l'effet de la radiothérapie.

Le troisième chapitre de ce manuscrit présente l'élaboration de ces nouvelles nanoplateformes excitable par RX pour des applications en PDT. Nous avons optimisé les conditions de synthèse des PS et la publication correspondante est incluse dans le chapitre. Nous avons également contribué à l'élaboration et la caractérisation photophysique de nanoparticules de Tb_2O_3 couplés à une porphyrine dont la publication est insérée dans ce chapitre. Nous discutons le choix des couples photosensibilisateur/nanoparticule, les synthèses et la stratégie de couplage des photosensibilisateurs aux nanoparticules. Les analyses physicochimiques et photophysiques des systèmes étudiés sont présentées, de même que l'efficacité du transfert entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs des différents systèmes.

Chapitre 1

La thérapie photodynamique (PDT)

I- Le cancer et ses traitements

Ce sont plus de 8,2 millions de personnes qui meurent chaque année du cancer dans le monde. A l'échelle européenne, on estime chaque année le nombre de nouveaux cancers à plus de 3,4 millions et le nombre de décès par cancer à 1,75 millions (51%) (Ferlay et al., 2013).

355 000 personnes ont été victimes du cancer en France durant l'année 2012. Avec environ 148 000 décès par an (85000 hommes et 63000 femmes), le cancer représente la première cause de mortalité en France (Institut national du Cancer INCA, 2014).

Ces chiffres effroyables montrent l'ampleur des dégâts du cancer et on comprend pourquoi ce dernier suscite une grande attention de la part des chercheurs et des pouvoirs publics.

Des milliards d'euros sont investis dans la lutte contre le cancer pour permettre aux chercheurs de mieux comprendre la maladie et de faire progresser les méthodes diagnostiques et de traitement. En France, depuis 30 ans, les taux de mortalité causés par tous les cancers combinés et par la plupart des cancers diminuent chez les deux sexes. Bien que ces progrès soient encourageants, le cancer demeure la première cause de mortalité en France, tous âges confondus.

Le cancer est une maladie plurifactorielle influencée par des facteurs environnementaux (cancérogènes) et génétiques (gènes de prédisposition au cancer). Il est parfois associé à des agents infectieux (15% des cas) mais il résulte généralement d'une accumulation de mutations dans le génome. Cette maladie est caractérisée par l'immortalité, la perte d'identité et la multiplication anarchique des cellules touchées (prolifération incontrôlée) (figure 1).

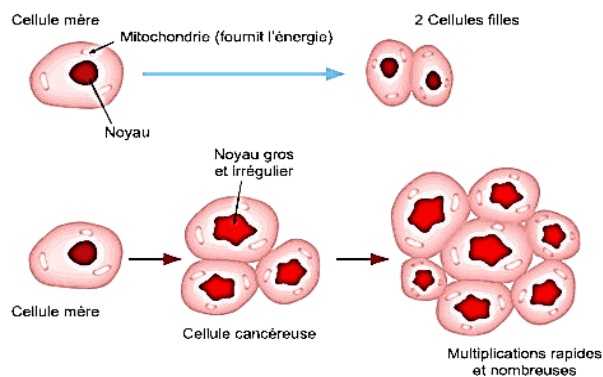


Figure 1: Prolifération des cellules tumorales

Les cellules cancéreuses possèdent également une capacité anormale à stimuler l'angiogénèse (formation de vaisseaux sanguins irriguant la tumeur) ainsi que la capacité de se propager dans le corps par les systèmes sanguin et lymphatique (à l'origine de métastases). La croissance d'un tissu donne naissance à une nouvelle zone tissulaire qui est mal desservie par la circulation sanguine. Les cellules de cette zone non vascularisée sécrètent du VEGF qui stimule la prolifération des cellules endothéliales (figure 2). Cette stimulation provoque la création de nouveaux vaisseaux sanguins en direction de cette zone et permet sa vascularisation.

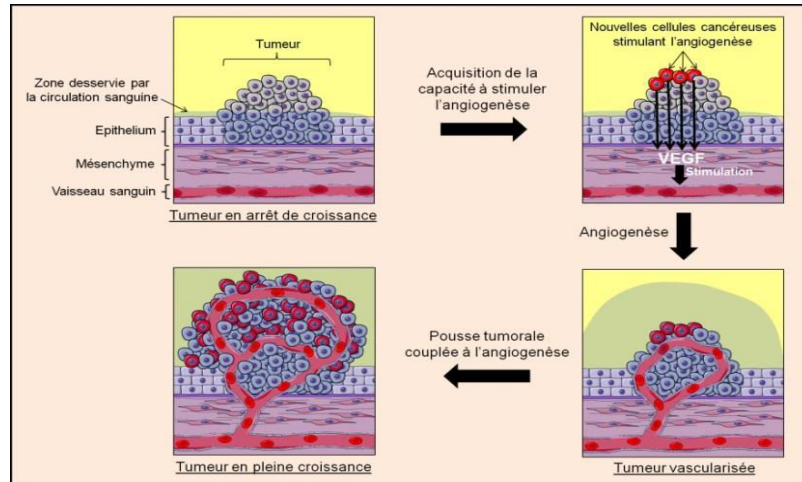


Figure 2 : Représentation schématique du phénomène d'angiogénèse.
© Grégory Ségala

Les traitements anti-cancéreux sont nombreux, ils varient en fonction du type de cancer, chaque type pouvant être traité à ses différents stades. On distingue trois grands types de traitement :

- i. La chirurgie de résection (ablation chirurgicale de la tumeur et, éventuellement, de ses extensions) ;
- ii. La radiothérapie (traitement par diverses sources et modalités de rayonnement) ;
- iii. Les traitements médicaux (chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie).

Dans certains cas et dans un souci de meilleure efficacité deux types de traitements, voire trois, sont associés.

I-1. Chirurgie de résection

La chirurgie de résection consiste à retirer chirurgicalement la tumeur avec parfois une marge de tissu sain entourant la tumeur pour assurer l'élimination de toutes les cellules cancéreuses. Cette technique est très courante dans les cas des cancers solides.

I-2. Chimiothérapie/ traitements médicaux

La chimiothérapie utilise des substances chimiques qui permettent de s'attaquer aux cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme ou/ et de réduire le volume de la tumeur primitive. Elle est utilisée dans le cas des cancers inopérables d'emblée et dans le cas des cancers non localisés, les métastases, les cancers qui touchent des organes vitaux. Cependant, les effets secondaires de la chimiothérapie détériorent la qualité de vie des patients qui, en plus de la chimiothérapie, ont recours à d'autres traitements pour apaiser les effets secondaires dont la fatigue, la nausée, l'immunodépression et le vieillissement prématuré. Aujourd'hui, la recherche de traitements contre le cancer a progressé dans l'espoir d'améliorer l'efficacité du traitement et de la qualité de vie des personnes traitées. Par exemple, dans le cadre du traitement du cancer du cerveau, la barrière hémato-encéphalique limite l'accès des agents chimiothérapeutiques à la tumeur. Des travaux de recherche sont actuellement en cours pour tenter d'ouvrir cette barrière et rendre accessibles les cellules tumorales (Bellavance et al., 2008) aux molécules de chimiothérapie. Certains effets secondaires peuvent être limités, voire évités, grâce à la thérapie photodynamique et à la radiothérapie.

I-3. Radiothérapie

La radiothérapie est une technique en constante évolution depuis la découverte des rayonnements ionisants (RI) par Röntgen en 1895. Elle utilise les « rayons ionisants », des rayons X ou des rayons gamma, faisant intervenir des sources de faible transfert linéaire d'énergie (TEL). La première guérison d'un patient traité par rayonnements ionisants intervient dès 1899. Ce n'est qu'en 1962 que la planification des doses administrées « la dosimétrie » et l'utilisation d'accélérateurs ont débuté. L'imagerie a permis une utilisation de plus en plus précise de la radiothérapie jusqu'à contribuer à la guérison d'un cancer sur deux en 2000 (Heron et al., 2010).

Un rayonnement ou une radiation correspond à un processus d'émission ou de transmission d'énergie impliquant une onde, une particule. Il s'agit d'un rayonnement ionisant lorsque celui-ci est capable de fournir assez d'énergie à la matière qu'il traverse pour provoquer l'arrachement et/ou l'excitation des électrons des atomes de cette matière, provoquant son ionisation. Deux types de

rayonnements sont à différencier : les rayonnements α et β qui sont directement ionisants et les rayonnements X et γ qui sont indirectement ionisants (Durand et al., 2014).

Les rayonnements α sont constitués de grosses particules chargées de noyaux d'hélium (deux protons et deux neutrons). Ils sont arrêtés par une simple feuille de papier de quelques millimètres (figure 3). Les rayonnements β sont constitués de particules chargées d'électrons/positrons. Ils sont arrêtés par une feuille d'aluminium (figure 3). Ces radiations ont donc une capacité faible de pénétration dans la matière car elles interagissent fortement avec celle-ci, permettant l'ionisation et/ou l'excitation directe des atomes la composant.

Les rayonnements électromagnétiques X et γ , de nature électromagnétique, sont composés de photons de haute énergie. Il faut recourir à de fortes épaisseurs de plomb ou de béton pour arrêter les rayonnements X et γ (figure 3). Ces rayons sont dépourvus de charge et peuvent être extrêmement pénétrants. L'importance des diverses interactions des photons avec la matière est dépendante de la nature de la cible, du numéro atomique Z du milieu d'absorption et de l'énergie des photons.

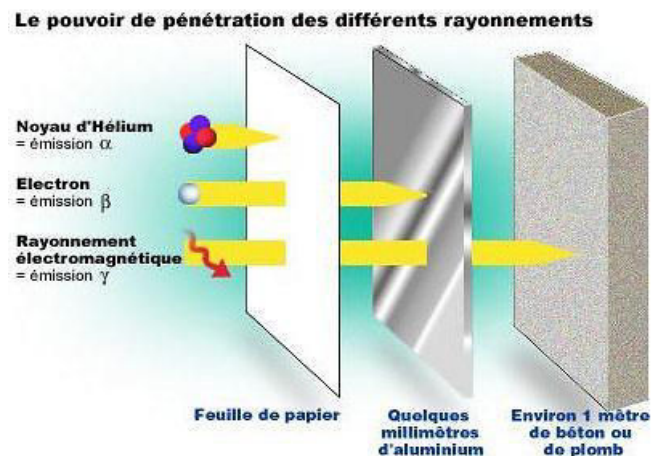


Figure 3 : Pouvoir de pénétration des différents rayonnements. © IRSN

Le but de la radiothérapie est de pouvoir appliquer des quantités d'énergie importantes en profondeur dans les tissus. Les photons ou rayons X, de très haute énergie et de très bonne capacité de pénétration dans la matière, sont les rayonnements les plus couramment utilisés actuellement en radiothérapie (utilisés dans 90% des cas) (INCA, 2014).

Lorsque les cellules sont exposées aux rayonnements ionisants, l'altération peut se produire par action directe ou action indirecte.

- **Effet direct**

Les électrons d'ionisation interagissent directement avec les différents composants cellulaires, tels que les protéines, les lipides, les glucides et surtout l'ADN, qui est la cible principale dans la cellule, en causant des coupures simple-brin ou des coupures double-brin de la double hélice d'ADN (figure 4) (entre 10^{-5} et 1 seconde après irradiation) : c'est l'effet direct qui causerait de 30 à 40% des dommages par les rayons X et gamma (Chapman et al., 1973) ; (Roots et al., 1975).

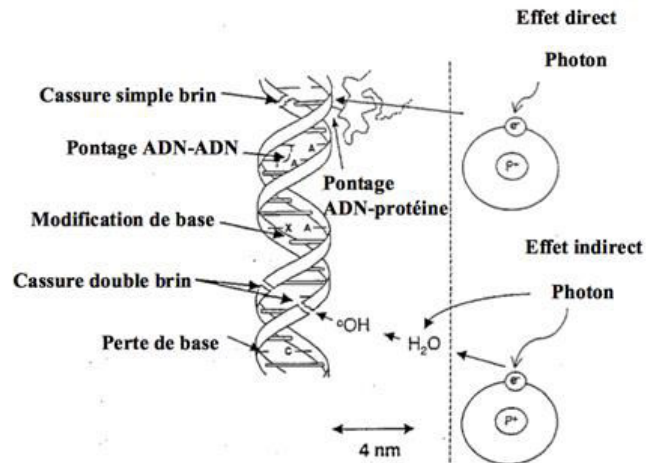


Figure 4 : Effets direct et indirect des radiations ionisantes sur l'ADN.

(Source : *Radiobiologie (ISBN 2 70566530 7) Tubiana M, ed., Hermann-Médecine, Paris, 2008*)

- **Effet indirect**

Les électrons d'ionisation n'interagissent pas directement avec les composants cellulaires mais avec les molécules d'eau environnantes et cause la radiolyse de l'eau. Il s'agit de cascades de réactions conduisant à la dégradation des molécules d'eau pour conduire à la formation d'un certain nombre de radicaux libres comme le radical hydroxyle HO^\bullet très réactif et qui sont délétères sur l'ADN cellulaire (Gillepsie et al., 1981). Ce type de phénomène causerait entre 60 et 70% des dommages indirects sur des cellules (Cadet et al., 1999).

Les rayonnements sont produits par un accélérateur de particules, la dose reçue est exprimée en Gray, abrégé en Gy, et correspond à l'énergie transférée à une masse donnée. Ainsi, 1Gy est égal à 1 joule diffusé dans une masse d'1 kilogramme (IRSN).

Etant un traitement local, la radiothérapie n'est d'aucun secours pour les cancers non localisés (ex : leucémies) et des métastases distantes susceptibles de se développer dans d'autres régions de l'organisme d'où son association très fréquente avec la chimiothérapie. L'inconvénient majeur de la radiothérapie réside dans le fait que l'on ne peut éviter totalement d'irradier les tissus sains environnants et donc d'altérer les cellules non cancéreuses. Cependant, la plupart de ces cellules sont capables de se reconstituer, à l'inverse des cellules irradiées de la tumeur sauf dans le cas des cancers des organes vitaux et particulièrement le cancer du cerveau (tumeur primaire ou métastase). Les lésions au niveau du cerveau sont irréversibles et ce, malgré le fait que la radiothérapie puisse traiter des tumeurs de cerveau profondes. Certaines études rapportent que la radiothérapie pourrait activer certaines molécules clefs de la métastase (Madani et al., 2008). Par exemple, l'irradiation de cellules de gliomes de rat à des doses sublétales provoque la formation de tumeurs satellites dans le striatum de cerveaux (Park et al., 2006), (Zhai et al., 2006). L'irradiation du tissu sain augmenterait l'invasion des cellules cancéreuses résiduelles.

Malgré le fait qu'on puisse traiter aujourd'hui par radiothérapie des tumeurs de cerveau faisant moins de 3 cm de diamètre en épargnant le plus possible le tissu sain, l'ajout d'une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie augmente significativement le contrôle locorégional, de même que la survie (Kalkanis et al., 2010) (Patchell et al., 1998).

Bien que la radiothérapie, seule ou en association avec la chirurgie, soit très utilisée pour le traitement du cancer du cerveau, des améliorations sont nécessaires car la survie des patients atteints de glioblastome (une des formes les plus communes et les plus agressives de cancer du cerveau) n'augmente pas, malgré les nombreuses avancées réalisées par la communauté scientifique. Ces résultats décevants sont mis sur le compte d'un manque de sélectivité de la radiothérapie qui, tout en n'étant pas assez efficace pour détruire les tumeurs, affecte inopportunément les tissus sains environnants (Cui et al., 2014). Deux solutions peuvent donc être envisagées :

- Des radiosensibilisateurs efficaces, permettant d'augmenter l'effet thérapeutique de la radiothérapie tout en minimisant la dose d'irradiation, ce qui diminue aussi la dose reçue dans les tissus sains environnants,
- Des photosensibilisateurs permettant de traiter sélectivement les cellules cancéreuses sans irradier les tissus sains environnants. Cette thérapie s'appelle « la Thérapie photodynamique » (PDT).

II- Thérapie photodynamique anti-tumorale

Comparée à la radiothérapie, la thérapie photodynamique utilise de la lumière visible donc une radiation de plus faible énergie, non mutagène.

II-1. Principe de la PDT anti-tumorale

Le principe de la thérapie photodynamique est basé sur l'activation par la lumière de molécules photoactivables qu'on appelle photosensibilisateurs (PS), préférentiellement retenues dans les tissus néoplasiques. Sous l'effet de la lumière (de longueur d'onde appropriée dépendante du PS), et en présence d'oxygène, le PS, non toxique en absence de la lumière, génère des espèces fortement cytotoxiques pour les cellules hôtes des PS (le plus souvent l'oxygène singulet 1O_2 , mais aussi des radicaux comme $OH\cdot$, $O_2\cdot^-$). La durée de vie de ces espèces réactives de l'oxygène (EROs) étant courte, la diffusion des espèces est limitée (quelques dizaines de nanomètres) et le traitement est ciblé.

Dans le cadre d'un traitement anti-tumoral, le PS est administré dans un premier temps au patient, généralement par voie intraveineuse (i.v) (figure 5), mais parfois de manière topique (pour le traitement des lésions cutanée) ou intratumorale. Une fois dans le sang, le PS va se lier à certaines protéines plasmatiques (lipoprotéines, albumine et globuline) qui vont le transporter vers le tissu tumoral.

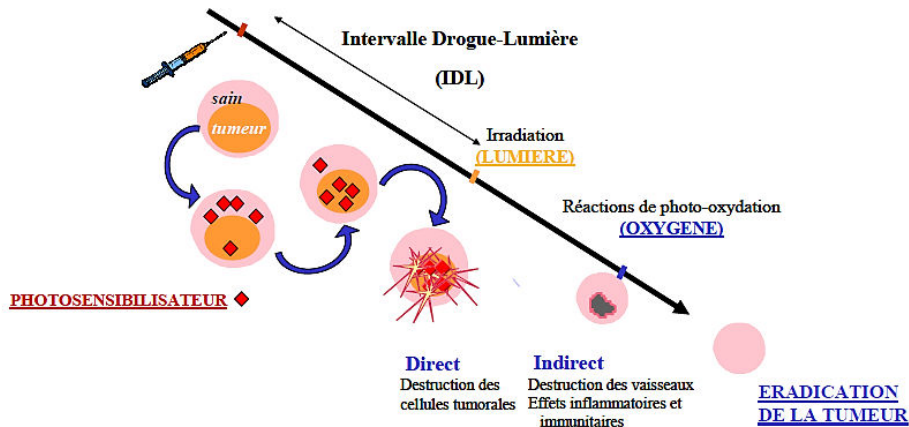


Figure 5 : Principe de la PDT.

Après un intervalle de temps variable, dépendant du type de pathologie, du photosensibilisateur (de la lumière et de la de longueur d'onde adaptée aux propriétés d'absorption du PS), la tumeur est irradiée avec de la lumière (Hsieh et al., 2003) (Ficheux et al., 2009). Cet intervalle est appelé Intervalle-Drogue-Lumière (IDL), pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours. Il correspond à

la durée nécessaire pour une localisation du PS en faveur du tissu tumoral par comparaison aux tissus sains (temps longs) (Dougherty et al., 1998) ou une localisation vasculaire (temps courts).

La double sélectivité de la thérapie photodynamique se traduit donc par l'accumulation préférentielle du PS dans le tissu néoplasique et par la possibilité de limiter l'activation du PS dans ce tissu (Sharman et al., 1999). Cela permet donc la destruction de la tumeur avec un minimum d'effets néfastes sur les tissus sains (Derosa et al., 2002).

II-1-1. Mécanisme photophysique

Le principe photophysique de la PDT est décrit dans la figure 6

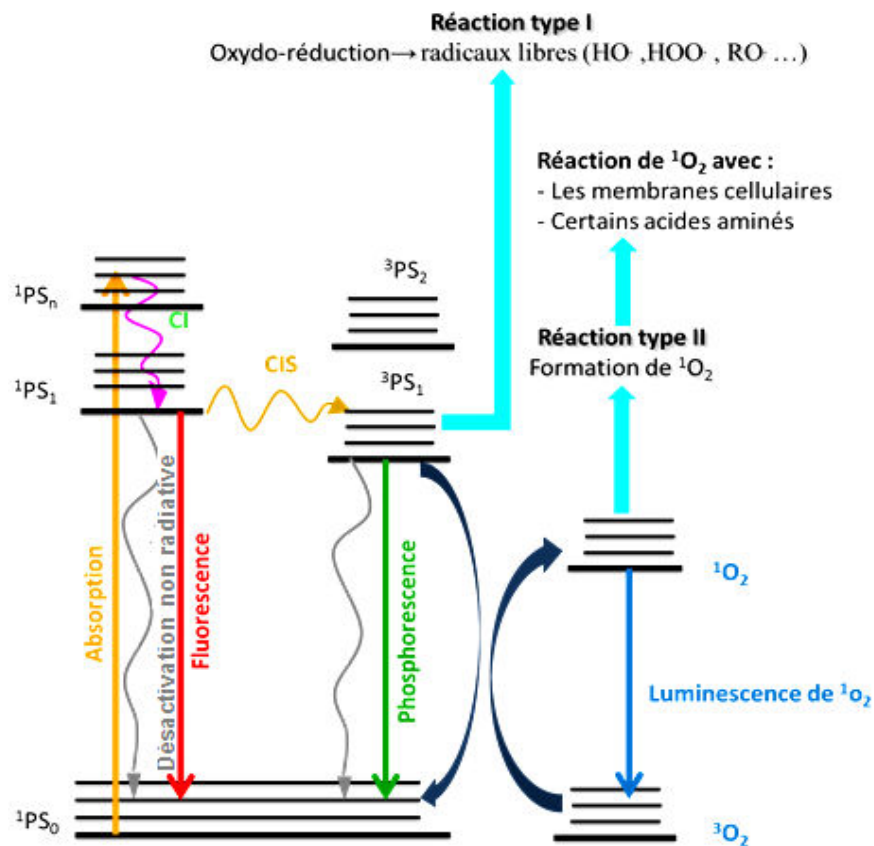
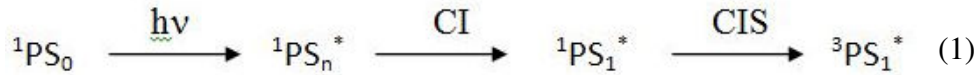


Figure 6 : Diagramme simplifié de Jablonski
(CI : conversion interne ; CIS : croisement intersystème).

Selon le diagramme simplifié de Jablonski (figure 6), après irradiation et absorption d'un photon, le PS initialement à son état énergétique fondamental (1PS_0), va passer à un état singulet excité ($^1PS_1^*$, $^1PS_2^*$, $^1PS_n^*$) qui correspond à un état d'énergie supérieure. Par une succession de relaxations vibrationnelles (qui sont des conversions internes, CI), le PS revient à son état excité de plus basse énergie ($^1PS_1^*$). Peu de réactions photochimiques peuvent typiquement avoir lieu à partir de cet état

électronique de la molécule en raison de sa faible durée de vie (typiquement 10^{-9} s). $^1PS_1^*$ peut se désactiver selon 3 voies (équation 1) :

- Désactivation non radiative pour retourner à 1PS_0 ,
- Emission de fluorescence pour retourner à 1PS_0 ,
- Passage à l'état triplet $^3PS_1^*$ par conversion inter-système (CIS).



Dans son état triplet de durée de vie plus longue (de quelques μ S à quelques secondes en fonction de son environnement), le PS va générer des espèces photoactives à partir des deux voies principales de photo-oxydation de type I et II (Foote et al., 1991) (figure 7).

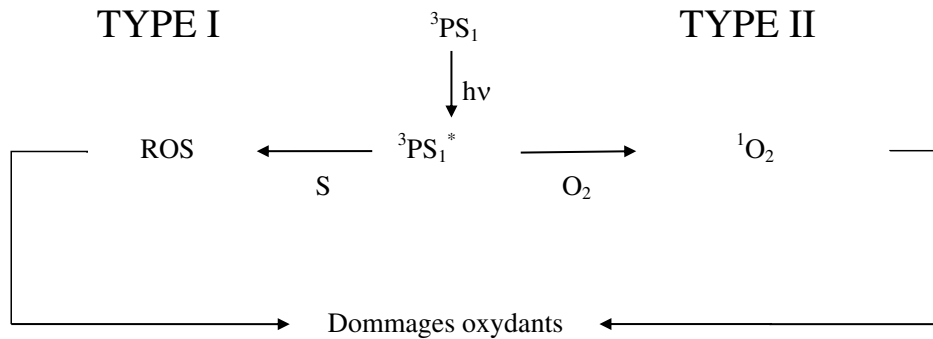


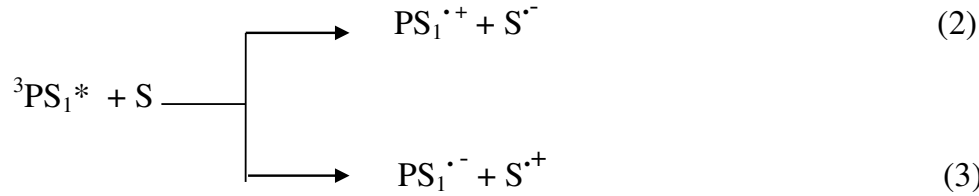
Figure 7 : Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le photosensibilisateur à l'état triplet.

La compétition entre ces deux mécanismes (type I et II) va être contrôlée par plusieurs paramètres, telles que la nature du photosensibilisateur, sa localisation, la concentration en oxygène (Dennis et al., 2003).

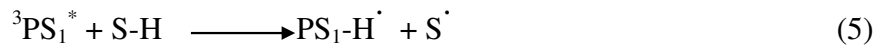
Réaction de type I

La réaction photochimique de type I, se traduit par la génération de radicaux libres ou d'ions radicalaires suite au transfert d'un électron (équations 2 et 3) ou d'un hydrogène (équations 4 et 5)

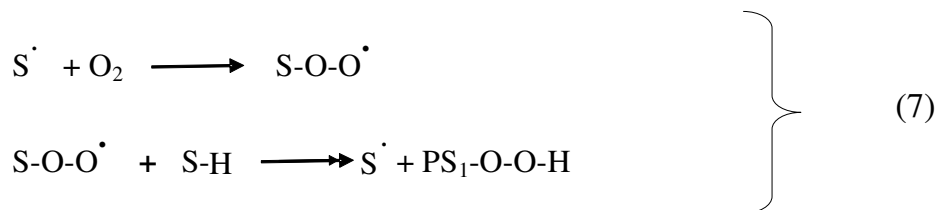
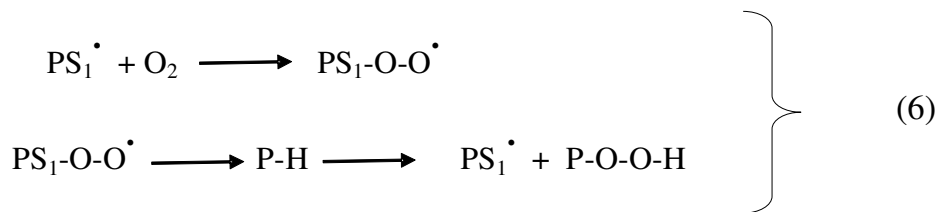
entre le PS à l'état triplet et le substrat biologique S. Le transfert d'électrons peut s'effectuer du photosensibilisateur vers le substrat (équation 2) ou du substrat vers le photosensibilisateur (équation 3). Cependant, la plupart des substrats biologiques subissent une oxydation (équation 3).



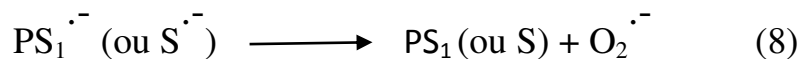
De la même manière, le photosensibilisateur à l'état triplet (équation 4) ou le substrat (équation 5) peut jouer le rôle de donneur d'hydrogène.



Les formes oxydées du PS ou du substrat ainsi formées peuvent rapidement réagir avec l'oxygène présent dans le milieu pour former des radicaux peroxydes (équation 6), initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation.

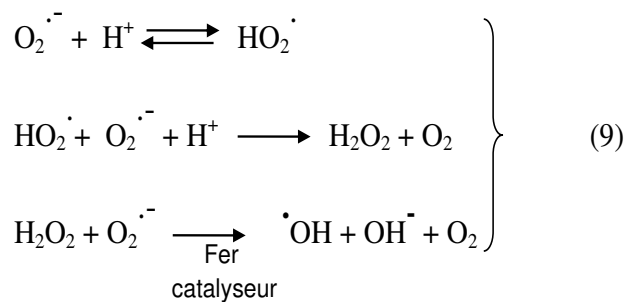


Les formes semi-réduites du PS ou du substrat (équation 8) peuvent également réagir avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électrons qui se produit entre les deux réactifs aboutit à la formation de l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$.



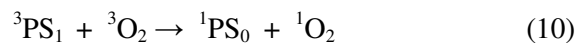
L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ peut ensuite réagir directement avec différents substrats ou comme précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène. Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle (OH^{\cdot}).

Les différentes espèces réactives de l'oxygène formées (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot}) sont connues pour être de très puissantes espèces oxydantes pour une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine) (Halliwell et al., 1999).



Réaction de type II

La réaction photochimique de type II n'est pas basée sur un transfert de matière (électron ou atome d'hydrogène) mais sur un transfert d'énergie. Elle nécessite la présence d' O_2 dès la première étape du processus. Dans ce cas, un transfert d'énergie s'effectue entre le PS à l'état triplet et l'oxygène moléculaire (équation 9), ce qui va engendrer la formation d'oxygène singulet (1O_2) (l'état de l'oxygène dont l'énergie est la plus faible) et le retour du PS à son état énergétique le plus fondamental.



L'oxygène singulet 1O_2 est une espèce très réactive et qui est susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son proche environnement. De nombreux substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec l'oxygène singulet (figure 8). L'ensemble de ces réactions peut entraîner la dégradation de certains constituants cellulaires et donc la mort cellulaire par nécrose, apoptose, voire autophagie.

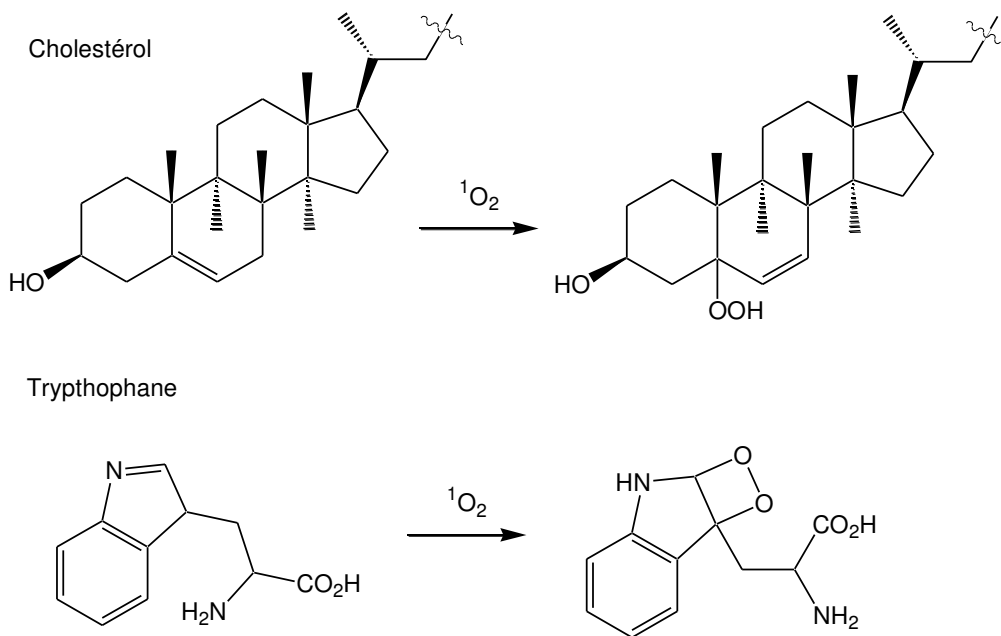


Figure 8 : Exemple d'oxydation et de cyclisation de molécules après réaction avec $^1\text{O}_2$.

II-1-2. Généralités sur les transferts d'énergie électronique (TEE)

Les réactions de type II sont donc basées sur un transfert d'énergie. Dans le paragraphe suivant, nous allons faire un bref rappel des différents mécanismes de transfert énergétique.

Les transferts d'énergie sont dus aux interactions entre activateurs. Une molécule se trouvant à l'état excité, nommée donneur (D), peut interagir avec une ou plusieurs molécules voisines, nommée accepteur (A) et lui transmettre une partie de son énergie d'excitation (figure 9).

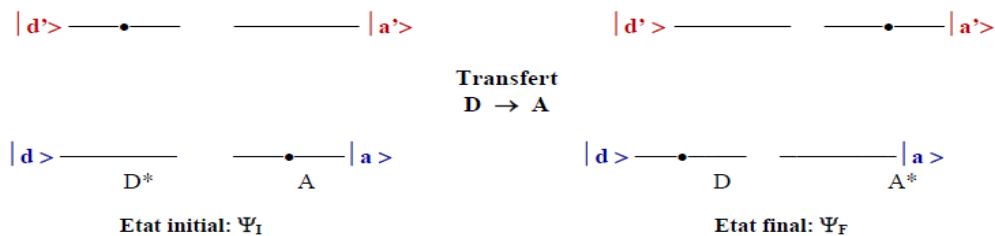


Figure 9 : Principe du transfert d'énergie.

Ce transfert de l'énergie d'excitation peut s'effectuer selon un mécanisme radiatif ou selon un mécanisme non-radiatif.

- **Mécanisme radiatif**

Ce processus prend place en deux étapes, durant lesquelles un photon est émis par D* puis réabsorbé par A.



Ce transfert est efficace lorsque les transitions mises en jeu par A sont permises par les règles de sélection. Il dépend des propriétés spectroscopiques des molécules impliquées, et notamment du recouvrement de leurs spectres d'absorption et de fluorescence. Il dépend également de la concentration des molécules. Cette absorption-réabsorption n'est pas véritablement un processus de quenching puisqu'il n'entraîne pas une diminution de la durée de vie de la molécule excitée.

- **Mécanismes non radiatifs**

Les mécanismes non-radiatifs peuvent être divisés en deux catégories : le transfert d'énergie peut s'effectuer par interactions coulombiennes multipolaires ou par échange d'électrons. Ainsi, contrairement au mécanisme radiatif décrit juste avant, le transfert d'énergie non radiatif implique une interaction spécifique entre le donneur et l'accepteur.

- **Transfert par interaction coulombiennes multipolaires**

Ce type de transfert intervient à grande distance, il est nommé FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Il provient d'un couplage de type dipôle-dipôle électrique (d-d), dipôle-quadripôle (d-q) ou quadripôle-quadripôle (q-q). Les couplages de type d-q et q-q sont en général très faibles par rapport au transfert (d-d). Comme ce mécanisme dépend des dipôles de transition, les règles de sélection concernant le spin électronique doivent être respectées.

Les molécules D (donneur) et A (accepteur) peuvent être soit différentes, soit de même nature mais doivent être « **énergétiquement compatibles** » (figure 10 a). Cela signifie que le spectre d'émission du donneur doit recouvrir, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur (figure 10 b).

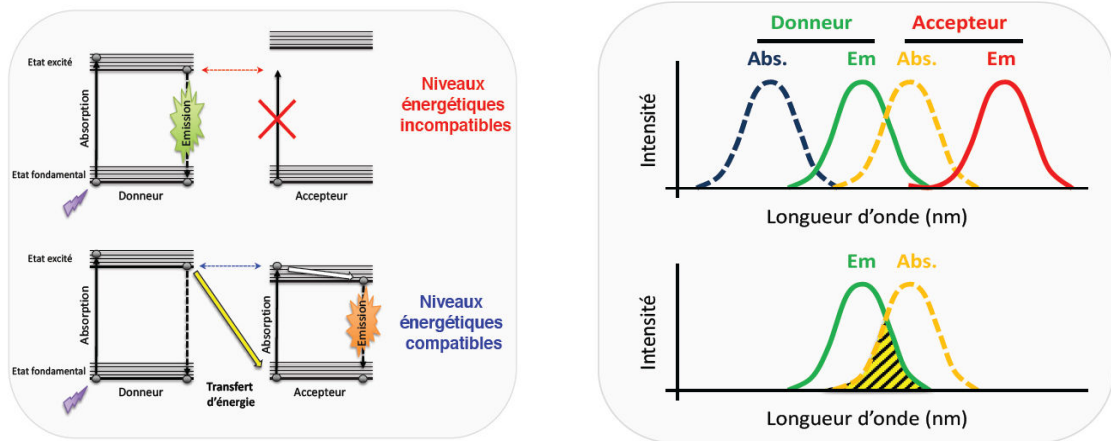


Figure 10 : (a) compatibilité énergétique, (b) Intégrale de recouvrement entre spectres.

Le recouvrement des spectres est défini par une intégrale appelée intégrale de recouvrement $J(\lambda)$ (zone hachurée) :

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

où f_D est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et ϵ_A est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde. C'est un processus qui dépend de la distance séparant les deux molécules, donneur et accepteur, avec :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

où R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster. Ce dernier correspond à la distance entre le donneur et l'accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50 %. Cela signifie que lorsque la distance donneur-accepteur est égale au rayon de Förster, la probabilité pour que le donneur se désexcite par transfert d'énergie non radiatif sur l'accepteur est de 50 % (figure 11).

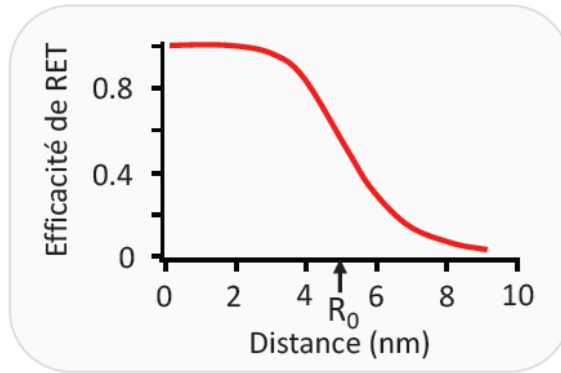


Figure 11 : Evolution de l'efficacité du transfert d'énergie en fonction de la distance entre les fluorophores. Le R_0 correspond au rayon de Förster.

Cette probabilité de désexcitation augmente en faveur du transfert d'énergie lorsque la distance entre les fluorophores donneur et accepteur diminue. Les autres voies de désexcitation correspondent aux voies radiatives (fluorescence) et non radiatives (extinction par l'oxygène, quenching, etc.). Le rayon de Förster dépend de la nature des fluorophores utilisés, et est généralement compris entre 1 et 10 nm. Au-delà de cette gamme, l'efficacité du transfert d'énergie chute très rapidement. L'expression mathématique pour le calcul de cette distance s'écrit :

$$R_0 = (10^{-3} \kappa^2 n^{-4} Q_D J)^{1/6} \times 9730$$

où J est l'intégrale de recouvrement, n l'indice de réfraction du milieu n^{-4} est généralement compris entre 1/3 et 1/5), Q_D le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur et κ^2 le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation relative des dipôles du donneur et de l'accepteur. Même si la valeur de κ^2 est théoriquement comprise entre 0 et 4, 2/3 est la valeur habituellement utilisée pour déterminer le R_0 . En effet, κ^2 est assimilé à 2/3 lorsque le donneur et l'accepteur présentent un degré de liberté suffisant pour être aléatoirement orientés dans l'espace. Cette condition est généralement satisfaite pour les fluorophores attachés à des biomolécules car ils peuvent avoir une certaine liberté de rotation (mais dépendant fortement de processus de transport à l'échelle moléculaire).

La constante de vitesse de réaction entre donneur et accepteur est exprimée par la relation suivante où τ_D est la durée de vie du donneur (en l'absence de l'accepteur) :

$$K_{T(r)} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

Pour mettre en évidence le FRET, deux méthodes sont classiquement utilisées :

➤ **Signature en intensité**

Elle comprend la quantification des variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de l'intensité de fluorescence du donneur et l'augmentation de celle de l'accepteur ou en calculant le rapport des intensités de fluorescence de l'accepteur et du donneur (figure 12).

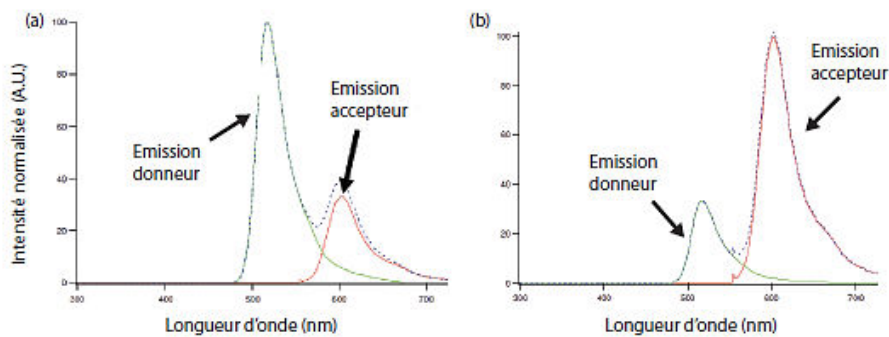


Figure 12 : Principe des mesures du FRET par mesure d'intensité en utilisant un spectromètre.

(a) En l'absence de FRET. (b) En présence de FRET.

En l'absence de FRET (figure 12(a)), le spectre d'émission obtenu correspond à la somme du spectre d'émission de D et du spectre d'émission de A obtenus par excitation directe. En présence de FRET (figure 12(b)), il y a augmentation du nombre d'accepteurs à l'état excité et donc augmentation du signal de fluorescence des accepteurs et diminution du signal de fluorescence du donneur.

➤ **Signature en temps de vie**

Elle consiste à mesurer le changement de la durée de vie de fluorescence du donneur et de l'accepteur à cause du FRET. Dans la plupart des cas, la diminution de la durée de vie du donneur est utilisée pour analyser l'efficacité du FRET.

En présence de l'accepteur, des nouveaux canaux pour la désexcitation du donneur s'ouvrent, la probabilité que le donneur se désexcite dans un intervalle de temps Δt est plus grande et donc le temps de vie du donneur est plus petit. Sur les courbes de déclin de fluorescence en échelle logarithmique, on observe une différence de pente (figure 13). La mesure du déclin de fluorescence du donneur en absence et en présence de l'accepteur permet de révéler l'existence du FRET.

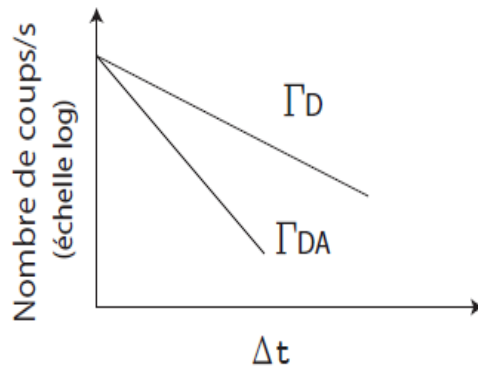


Figure 13 : Principe des mesures du FRET basée sur la mesure du temps de vie.

- **Transfert par échange électronique**

Ce transfert également appelé mécanisme de Dexter, intervient à courte distance, plus courte que l'interaction coulombienne, entre 6 et 20 Å. Il s'agit d'un double transfert d'électrons entre D* et A. Un recouvrement direct ou indirect des nuages électroniques des centres D et A est nécessaire, et donc un contact entre les molécules D* et A est obligatoire. Comme ce type d'échange ne fait pas intervenir les dipôles de transition, des transferts d'énergie peuvent avoir lieu avec un changement de multiplicité.

Pour distinguer les deux types de transferts :

- Pour un **transfert radiatif**, la population de l'état excité du donneur ne dépend pas du transfert puisqu'il s'agit uniquement d'une réabsorption de la lumière émise. Son déclin de fluorescence n'est pas modifié.
- Pour un transfert de **type FRET**, comme les déclins de luminescence sont liés à l'évolution de la population du niveau excité, un tel transfert se caractérise par une accélération du déclin du donneur.

En résumé, la preuve d'existence du transfert est donnée par une augmentation du temps de vie de l'accepteur : l'émission et allongement de son déclin. L'identification de la nature du transfert (radiatif ou FRET) se fait par une étude du déclin de l'émission du donneur s'il reste inchangé c'est un transfert radiatif, s'il est accéléré, c'est du FRET.

II-2. Mécanisme physiologique de la PDT anti-tumorale

Trois mécanismes de destruction tumorale sont décrits dans la littérature (figure 14) :

- un effet direct de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie ;
- un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale, privant la tumeur de nutriments et dioxygène (hypoxie) et conduisant ainsi à la destruction tumorale ;
- un effet indirect dû à des réactions immunitaire et inflammatoire de l'hôte.

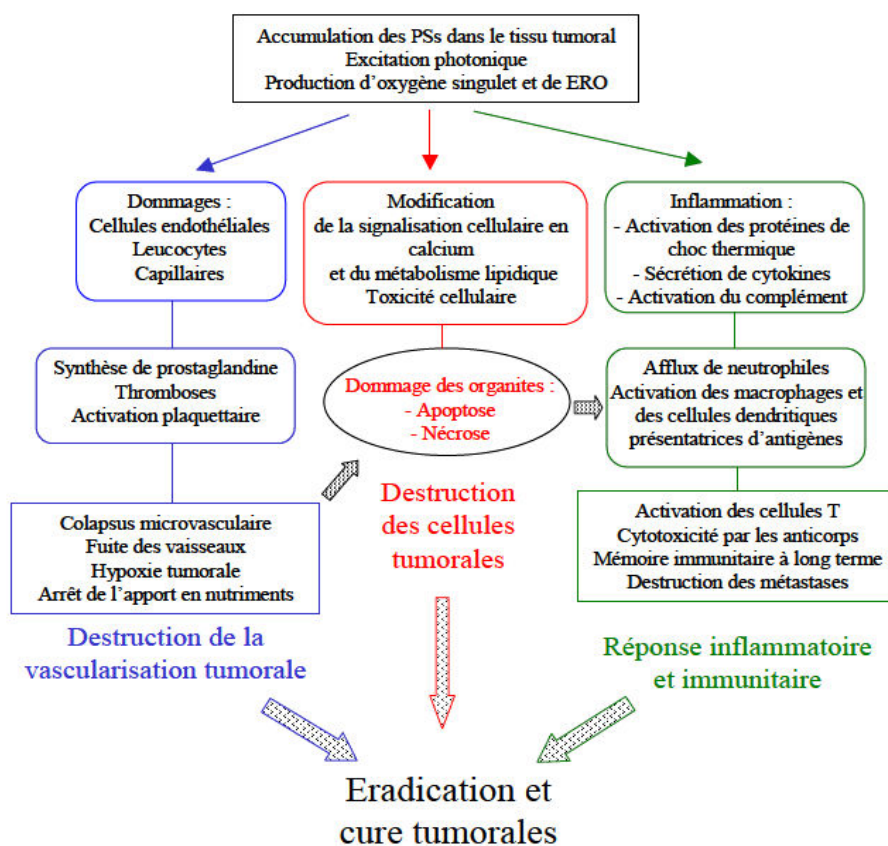


Figure 14 : Mécanisme de destruction tumorale après PDT (Castano et al., 2005).

II-2-1. Effet direct

Les dommages cellulaires engendrés par le PS se traduisent par deux effets principaux : la nécrose et l'apoptose (Wyld et al., 2001). La nécrose est une mort cellulaire non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. Elle se traduit par un gonflement du cytoplasme, une destruction des organites, une peroxydation des lipides membranaires et donc une altération de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, qui conduit à la libération

d'enzymes cytoplasmiques et lysosomales (figure 15). Ces enzymes provoquent une réaction inflammatoire dans le milieu environnant la cellule (Castano et al., 2005).

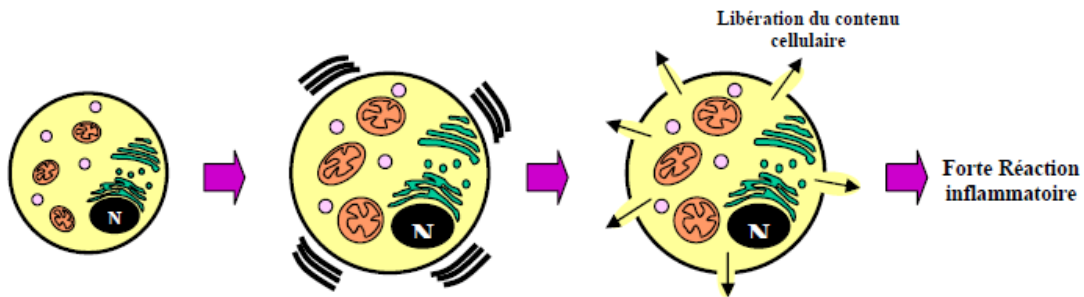


Figure 15 : Modification morphologique cellulaire au cours de la nécrose (Thèse Garrier, 2011).

L'apoptose est une mort cellulaire programmée correspondant à une élimination normale des cellules, en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Elle est activée pour éliminer sélectivement des cellules devenues indésirables (figure 16). Elle est régie à la fois par des signaux intra- et extracellulaires, par exemple la libération de cytochrome C et de TNF α , (Tumor Necrosis Factor α) conduisant à des modifications biochimiques et morphologiques. Au cours de l'apoptose, les constituants cellulaires sont dégradés à l'intérieur de la cellule, sans rupture de la membrane cytoplasmique. Ce type de mort cellulaire ne va donc pas engendrer d'inflammation comme c'est le cas pour la nécrose.

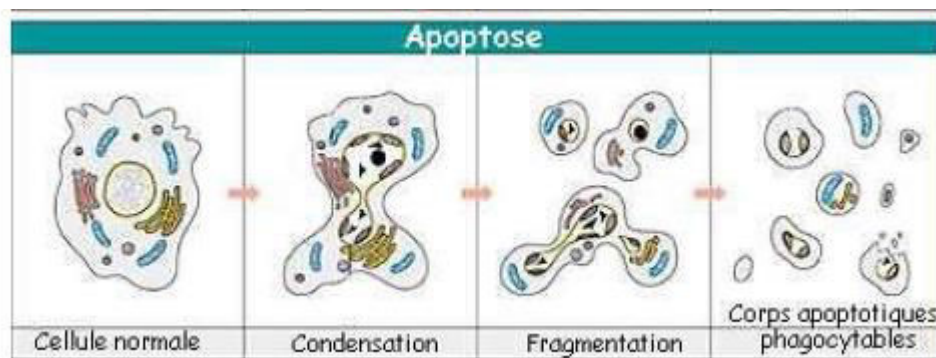


Figure 16 : Modification morphologique cellulaire au cours de l'apoptose.

(d'après lecerveau.mcgill.ca)

Des études récentes ont mis en évidence un autre type de mort cellulaire programmé après PDT : l'autophagie (Green et al., 2005). Elle est réalisée par des enzymes lysosomales qui dégradent la plupart des organites de la cellule, provoquant son « autodigestion ».

II-2-2. Effets indirects

- Effets antivasculaires

L'effet antivasculaire consiste en des dommages vasculaires qui contribuent à long terme à l'éradication tumorale (Abels et al., 2004) soit par action directe sur les cellules endothéliales, soit par rupture de l'équilibre des facteurs de coagulation.

L'altération des cellules endothéliales a pour conséquence la formation de lésions des vaisseaux irrigant la tumeur (nécrose, apoptose ou déformation du cytosquelette) (Casas et al., 2008). Ces modifications vont engendrer des fuites sanguines hors des vaisseaux et l'adhésion de leucocytes sur les parois, ce qui va réduire le diamètre interne des vaisseaux et provoquer une thrombose. Ceci conduit à l'asphyxie de la tumeur et donc son éradication. Lorsque le PS est en circulation, les espèces oxydantes générées peuvent rompre l'équilibre des facteurs régulant la coagulation. Les espèces réactives peuvent aussi interagir avec le monoxyde d'azote (NO), une molécule vasodilatatrice et anticoagulante (Korbelik et al., 2000), (Henderson et al., 1992). Cette dernière réagit avec l' O_2^- pour former du peroxynitrite (ONOO⁻) qui induit des dommages oxydatifs à l'ADN, aux lipides et aux protéines.

- Effets immunitaires et inflammatoires

Suite à une nécrose cellulaire, les médiateurs de l'inflammation sont déversés massivement dans le milieu extracellulaire (Agarwal et al., 1993), (Yamamoto et al., 1991).

Les signaux inflammatoires post-PDT initient une invasion massive de neutrophiles, de mastocytes, de monocytes mais également de macrophages (Krosl et al., 1995). Les épitopes présentés à la surface de ces macrophages peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4). Ces lymphocytes ainsi activés activent à leur tour des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (LTCD8) qui pourront détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes (Korbelik et al., 1999) (Vonarkx et al., 1997). La réponse immunitaire systémique qui s'ensuit peut alors détruire les cellules tumorales restantes ou prévenir les métastases par développement d'une réponse immunologique à mémoire (Gomer et al., 1987) (Schreiber et al., 2002).

II-3. Les photosensibilisateurs

II-3-1. Bref historique de la PDT

Il y a des milliers d'années, on connaissait déjà des effets délétères de l'exposition à la lumière solaire. Les Egyptiens, les Indiens et les Chinois utilisaient la lumière pour traiter diverses maladies tels que le psoriasis, le vitiligo et le cancer de la peau. Le texte le plus ancien sur la question retrouvé à ce jour est un livre sacré hindou du nom d'Atharva veda datant de 1500 ans avant J.C. On y trouve une thérapie du vitiligo (dépigmentation de la peau) à base de molécules photoactivables extraites de graines d'une plante, (babchi) répertoriée sous le nom de *Psoralea corylifolia*. Selon le même principe, la médecine populaire de la vallée du Nil a utilisé pendant des siècles l'espèce végétale *Ammi majus* contre la même affection. On peut en retrouver la trace dans le livre d'un érudit arabe datant du 13^{ème} siècle.

En 1898, O. Raab montra les effets cytotoxiques de la combinaison de l'acridine et de la lumière sur des paramécies « *Paramecium caudatum* » (Raab, 1900).

En 1901, Finsen traita la variole avec la lumière rouge et la tuberculose avec l'UV. Dès 1902, Ledoux-Lebard poursuivit ces travaux et décrivit le rôle majeur de l'oxygène dans cette toxicité photo-induite (Ledoux-Lebard et al., 1902).

En 1903, le terme « action photodynamique » fut introduit pour la première fois par Jesionek et von Tappeiner (Professeur de O. Raab) qui avaient traité des tumeurs cutanées avec l'application locale d'éosine et la lumière blanche (Von Tappeiner et al., 1903), (Von Tappeiner et al., 1904). La thérapie photodynamique (PDT) était née.

A la recherche de nouvelles substances photoactives, Hausmann étudia en 1911 les effets de l'hématoporphyrine (Hp) qui se révéla très efficace sur des petites lésions de psoriasis en association avec la lumière UV (Silver et al., 1937).

L'accumulation préférentielle de l'Hp au sein des tumeurs fut mise en évidence en 1924 par Policard (Policard et al., 1924), suivis de Figge et al. qui proposèrent d'utiliser la fluorescence de ce composé pour le diagnostic et la délimitation des tumeurs en raison de sa rétention spécifique dans le tissu tumoral (Figge et al., 1948).

L'Hp, constituée d'un mélange complexe de porphyrines et d'impuretés, fut purifiée en 1955 par Schwartz (Schwartz et al., 1955) suivi par Lipson pour donner naissance à l'hématoporphyrine dérivée

(HpD) (Lipson et al., 1960) qui fut appliquée chez l'homme pour l'amélioration des méthodes de diagnostic, en particulier endoscopiques (Lipson et al., 1964).

Ce n'est qu'au cours des années 1970 que la PDT connut un véritable essor avec les expérimentations de Dougherty et son équipe. Il utilisa en 1975 avec succès l'HpD couplée à une lampe à arc à xénon dans le traitement de tumeurs mammaires chez la souris. En 1978, il réalisa les premiers essais chez l'homme et obtint des résultats encourageants (Dougherty et al., 1978). Il remplaça, par la suite, la lampe à arc à xénon par le laser, qui permet de focaliser sélectivement la zone à irradier. Il identifia entre 1983 et 1985 les fractions actives de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisatrices au mélange (l'éther et l'ester de dihématoporphyrine), donnant naissance au Photofrin[®]. Ce dernier a été approuvé pour la première fois en 1993 au Canada et a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans plusieurs pays (USA, France, Japon....) (Dougherty et al., 2002).

Il existe de nombreux PS d'origine naturelle ou synthétique qui sont facilement différenciables selon leur nature chimique (tétrapyrrolique ou non-tétrapyrrolique) mais les molécules les plus utilisées cliniquement en PDT anti-tumorale sont les PS tétrapyrroliques.

II-3-2. Les photosensibilisateurs naturels

Parmi les photosensibilisateurs naturels nous pouvons citer :

- **Le psoralène** (figure 17) : Cette molécule est utilisée en puvathérapie (psoralène + UVA) pour le traitement de plusieurs maladies : le psoriasis, l'eczéma, le vitiligo, certains lymphomes cutanés (Hannani et al., 2010). Cette molécule agit comme agent intercalant de l'ADN, qui, après irradiation UVA, induit des pontages entre deux thymines, qui se traduisent par un blocage de la réplication de l'ADN et stoppe le développement de la maladie.

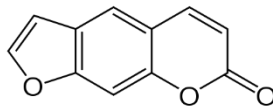


Figure 17 : Psoralène.

- **Le Bleu de Méthylène** (figure 18) : ce composé cationique hydrosoluble est caractérisé par une forte absorption à 660 nm dans l'eau (Tardivo et al., 2005) et a longtemps été utilisé comme marqueur de cellules tumorales. Il est cependant peu utilisé en PDT en raison de son manque de stabilité *in vivo* (Tang et al., 2008) (Aghahosseini et al., 2006).

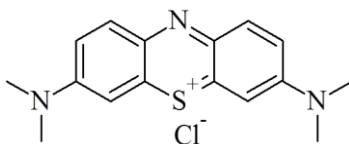


Figure 18 : Structure chimique du Bleu de Méthylène.

- **L'hypéricine** (figure 19) : ce composé de la famille des quinones est extrait du millepertuis (*Hypericum perforatum*). Il est caractérisé par une absorption à 590 nm dans l'éthanol et est utilisé en PDT pour ses propriétés de localisation tumorale, fluorescence et production d'oxygène singulet (Head et al., 2006).

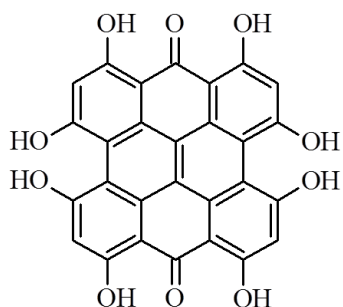


Figure 19 : Structure chimique de l'hypéricine.

- **Le rose de Bengale** (figure 20) : il s'agit d'un composé extrêmement hydrosoluble. Sa longueur d'onde maximale d'absorption se situe à 430 nm dans l'éthanol et il possède un rendement de production d'oxygène singulet important (0,69 dans l'éthanol).

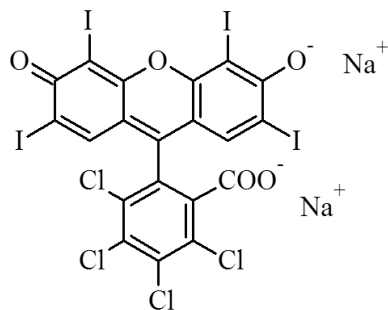


Figure 20 : Structure chimique du rose de Bengale.

- **L'éosine** (figure 21) : ce composé a été utilisé par H. von Tappeiner lors de la première expérience PDT en collaboration avec A. Jesionek en 1903. Son spectre d'absorption est caractérisé par une bande intense vers 510 nm dans l'éthanol.

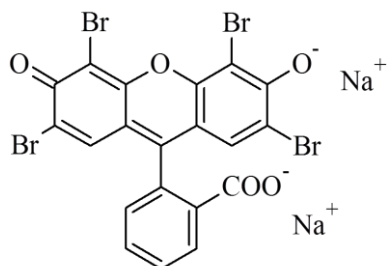


Figure 21 : Structure chimique de l'éosine.

- **L'érythrosine** (figure 22) : ce composé est apparenté au rose de Bengale et a été utilisé dans le cas de traitements antibactériens par PDT (Metcalf et al., 2006).

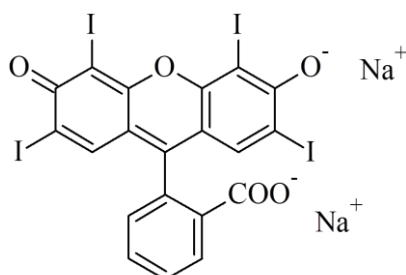


Figure 22 : Structure chimique de l'érythrosine.

II-3-3. Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques

Les macrocycles tétrapyrroliques sont aussi très largement présents dans les milieux vivants tels que la chlorophylle, l'hème et la vitamine B12.

II-3-3-a. Les porphyrines

- **Structure**

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques fortement conjugués, formés de quatre unités pyrroliques reliées entre elles par des ponts méthine. Cette structure est donc composée de 16 atomes

de carbone entièrement conjugués (figure 23) avec 18 électrons π , lui conférant ses caractéristiques photophysiques si particulières. De plus, ces structures hétérocycliques se comportent comme des diacides ou des diacides, selon le pH, et elles peuvent être métallées par presque tous les métaux de la classification périodique. Dans le premier cas, la molécule est dite "base libre", dans le second cas, elle est dite "métallée".

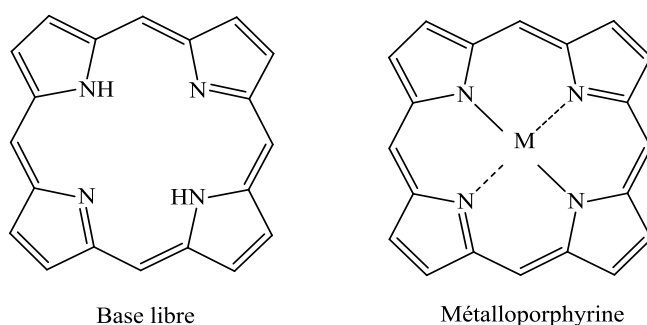


Figure 23 : Structure générale d'une porphyrine base libre et d'une métalloporphyrine.

Dans les années 30, Fischer propose pour la première fois un système de nomenclature, encore souvent utilisé de nos jours (Fischer et al., 1934). Ainsi, les atomes de carbone des groupes méthine, appelés " meso " portent les lettres grecques α , β , γ et δ et les atomes de carbone β -pyrroliques sont numérotés de 1 à 8 (figure 24). Afin de généraliser la nomenclature de ces molécules, une nouvelle numérotation systématique du macrocycle a été adoptée en 1987 (Dixon et al., 1987). Les atomes de carbone des positions « méso » portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 respectivement. Enfin, les positions 21, 22, 23, 24 ont été attribuées aux quatre atomes d'azote (figure 24).

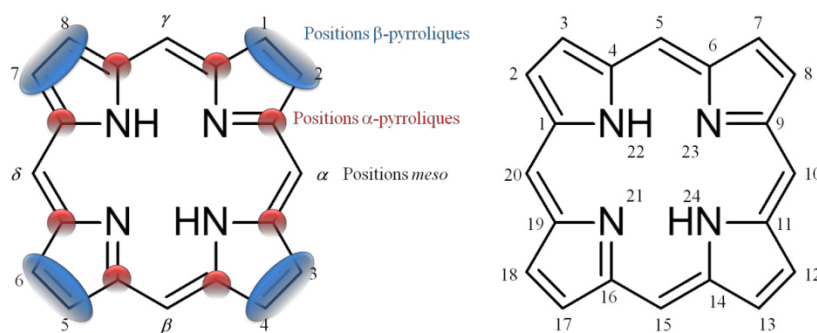


Figure 24 : A gauche : nomenclature selon Fischer. A droite : nomenclature IUPAC.

Les porphyrines sont de structure géométrique normalement plane mais peuvent adopter dans certains cas des conformations non planes. En effet, la protonation des atomes d'azote, la présence de groupements volumineux en position *meso*, la substitution des carbones β -pyrroliques ou encore la métallation peuvent engendrer des distorsions (Jentzen et al., 1995).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les porphyrines peuvent accepter un ion métallique au centre du macrocycle, généralement dicationique. Cet ion peut être introduit de manière chimique ou enzymatique.

Le métal associé à la biomolécule peut être un atome de zinc, un fer, un magnésium, un cobalt (figure 25).

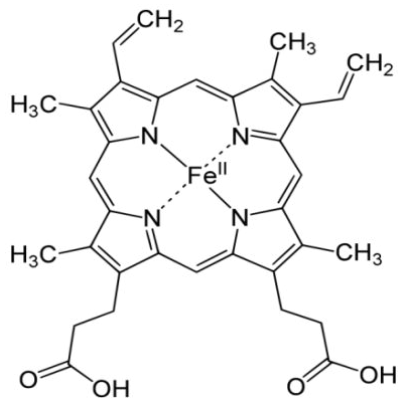


Figure 25 : Exemple de macrocycle tétrapyrrolique naturel : l'hème.

Les métalloporphyrines jouent un grand rôle en biologie et sont généralement associées à des protéines. En effet, le transport des gaz respiratoires (O_2 , CO_2) est assuré par l'hémoglobine, protéine dont le groupe prosthétique est la protoporphyrine IX métallée par du fer au degré d'oxydation +2 (l'hème) (Perutz et al., 1979). La myoglobine est, quant à elle, une protéine de structure très proche de celle de l'hémoglobine, possédant également l'hème (figure 25) comme groupe prosthétique. Elle participe au stockage de l'oxygène dans les tissus musculaires ainsi qu'à sa diffusion vers les mitochondries. Ces molécules participent sous leur forme métallée à de nombreux processus naturels d'oxydo-réduction thermique ou photochimique des milieux biologiques.

• Synthèse chimique

Au cours des 80 dernières années, l'intérêt pour les macrocycles tétrapyrroliques ne cessant d'augmenter, de nombreuses stratégies de synthèse de porphyrines ont été élaborées. Ainsi, deux grands types de porphyrines ont été développés :

- des porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, pour leurs structures semblables aux porphyrines naturelles,
- des porphyrines substituées sur les positions « méso ».

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux méthodes de préparation de méso-porphyrines.

➤ **Voie 1 : Synthèse par condensation du pyrrole et d'aldéhyde**

- **Synthèse de Rothemund**

À partir de 1935, Rothemund synthétise une porphyrine substituée en position méso, en faisant réagir, dans un tube scellé, du pyrrole (3,6 M), du benzaldéhyde (4,9 M) dans la pyridine à 220 °C pendant 48 heures. Il obtient la méso-tétraphénylporphyrine avec un rendement de l'ordre de 5% à 10% (figure 26) (Rothemund et al., 1941).

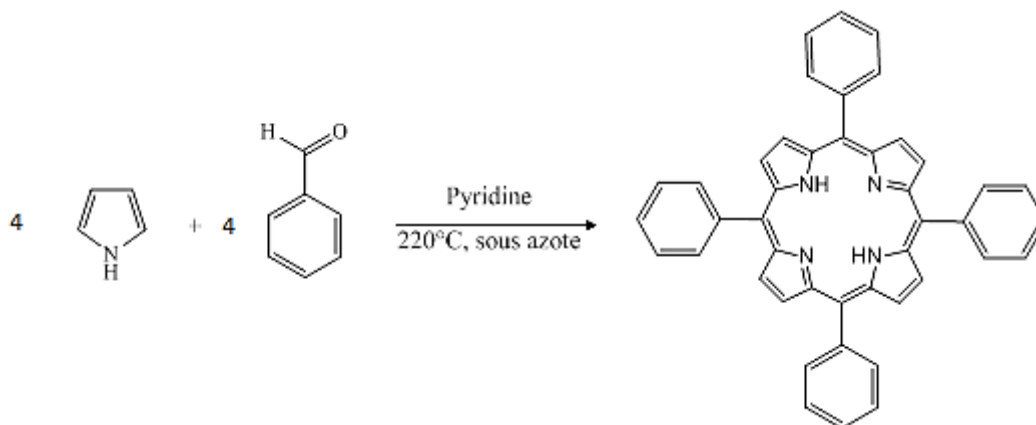


Figure 26 : Schéma de la synthèse de la TPP effectuée par Rothemund en 1941.

En 1945, Ball a réussi à doubler le rendement dans les mêmes conditions mais en ajoutant au milieu réactionnel de l'acétate de zinc (Ball et al., 1946). Ainsi, ils ont synthétisé la méso-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc avec un rendement de 11%.

- **Synthèse d'Adler et Longo**

En 1967, Adler et Longo (Adler et al., 1967) ont amélioré de manière significative la synthèse de porphyrines par condensation de quatre équivalents de pyrrole avec quatre équivalents de benzaldéhyde, en solution dans de l'acide propionique, en chauffant pendant une demi-heure à reflux

(141°C) à l'air libre. Adler et Longo ont établi que le rendement de cette réaction dépendait de la température (élevée), de l'acidité du milieu, du solvant et de la concentration initiale des réactifs, mais surtout de la présence de dioxygène. La condensation des deux réactifs conduit à la formation d'un intermédiaire, un porphyrinogène, qui est directement oxydé en porphyrine grâce à la présence d'oxygène dans le milieu (figure 27).

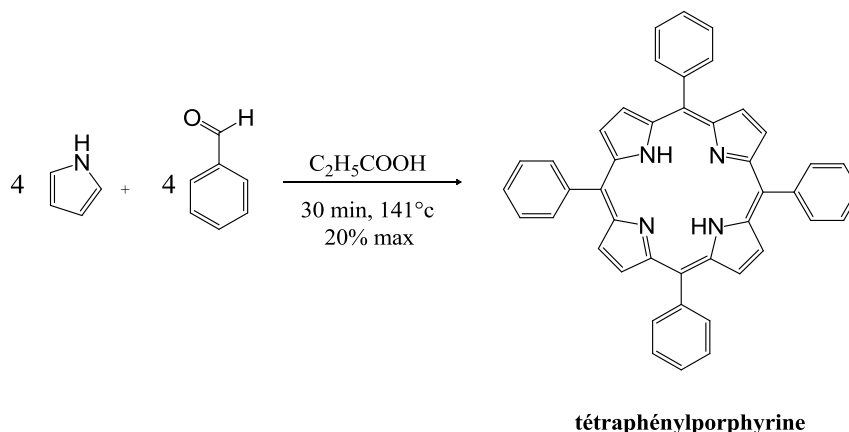


Figure 27 : Synthèse de la méso-tétraphénylporphyrine (TPP) selon Adler et Longo.

La méso-tétraphénylporphyrine (TPP) est rapidement obtenue avec un rendement de l'ordre de 20%.

La méthode de Adler-Longo, grâce aux conditions de réaction plus douces, a permis l'utilisation d'une plus grande diversité d'aldéhydes, et par conséquent, la synthèse d'une importante variété de méso-tétraarylporphyrines symétriques mais elle ne s'applique pas à l'utilisation de benzaldéhydes portant des groupes sensibles à la température ou ionisables. De plus, la purification se fait par cristallisation ou précipitation dans de l'acide propionique, ce qui exclut donc certaines porphyrines solubles. Cependant, le rendement n'est pas reproductible (Adler et al., 1967).

- **Synthèse de Little**

En 1975, Little a adapté cette méthode à la synthèse de méso-arylporphyrines non symétriques. Cette synthèse dite synthèse des « aldéhydes mixtes » consiste à condenser du pyrrole et deux aldéhydes différents dans l'acide propionique à reflux (figure 28).

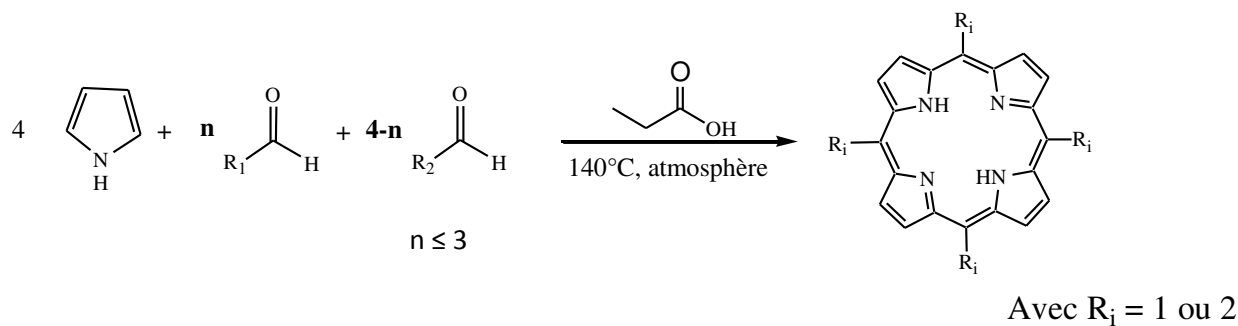


Figure 28 : Synthèse de porphyrines méso-tetrasubstituées par la méthode des « aldéhydes mixtes » de Little.

La condensation entre un aldéhyde A unique et le pyrrole donne un seul type de porphyrine symétrique, appelée A_4 . En revanche, en fonction des quantités stœchiométriques de plusieurs aldéhydes, on obtient un mélange de plusieurs porphyrines substituées par un, deux, trois ou quatre groupements identiques. Par exemple, des aldéhydes A et B introduits en proportion 1:3 vont donner six porphyrines différentes dont la distribution statistique est donnée dans la figure 24. Ces conditions ont été choisies de façon à augmenter le rendement de synthèse de la porphyrine de type A_3B (5 à 25%) (figure 29).

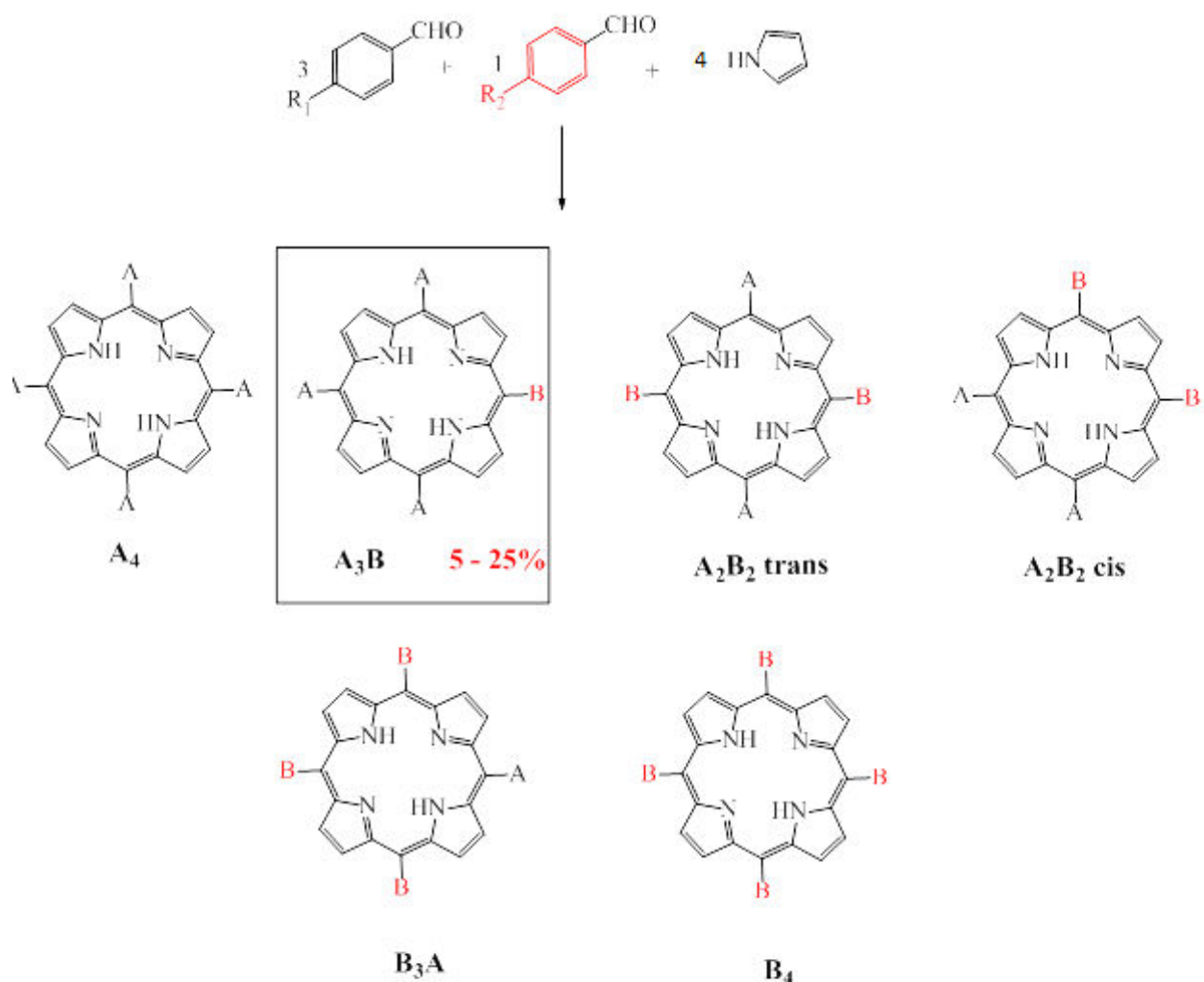


Figure 29 : Distribution statistique des porphyrines synthétisées par la méthode des aldéhydes mixtes avec un mélange d'aldéhydes A et B en proportion 3:1.

- **Synthèse sur support solide**

En 1978, Svirskaya et Leznoff (Leznoff et al., 1978) proposent, pour la synthèse de la 5-hydroxyphényl-10,15,20-tritolporphyrine, un protocole, en phase solide, qui présente l'avantage de limiter les étapes fastidieuses de purification des intermédiaires (figure 30). Leur approche consiste dans une première étape à fixer le 3- (ou 4-)hydroxybenzaldéhyde sur une résine polystyrène portant du chlorure de benzoyle puis, dans une seconde étape, à faire réagir ce support avec le pyrrole et le *para*-tolualdéhyde dans l'acide propionique à reflux.

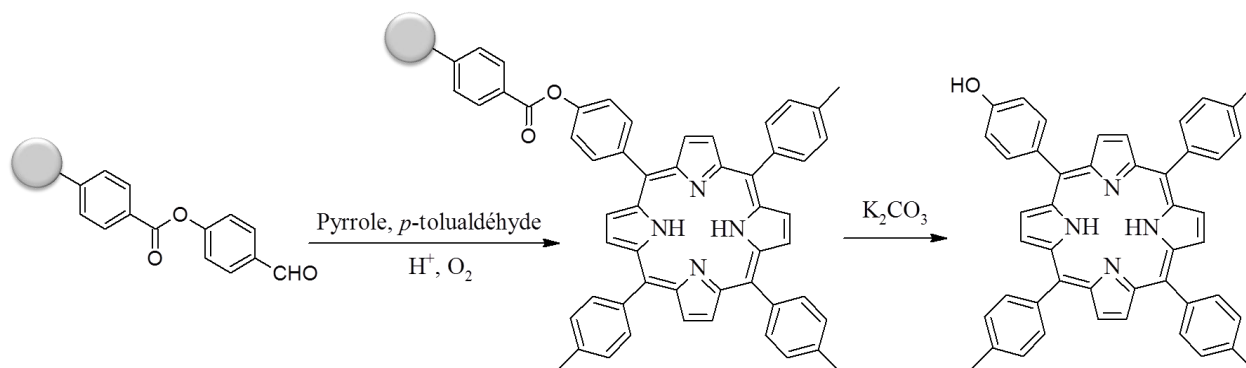


Figure 30 : Synthèse sur phase solide d'une porphyrine asymétrique (Lyndsey et al., 2000) et (Leznoff et al., 1978).

Cette méthode, bien que permettant de simplifier la purification, n'a malheureusement pas conduit aux résultats escomptés, la porphyrine monosubstituée ayant été obtenue avec des faibles rendements allant de 2% à 4,5%. Aujourd'hui encore, ce rendement très modeste n'est toujours pas clairement expliqué. D'autre part, 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. Plus récemment, d'autres stratégies de synthèse en phase solide ont été développées mais les résultats restent peu concluants (Chaleix et al., 2003) (Montierth et al., 2000).

- Synthèse de Lyndsey

J. S. Lindsey a mis au point une méthode permettant d'obtenir des porphyrines méso-substituées, dans des conditions plus douces à partir de benzaldéhydes sensibles. Elle évite, également, les problèmes de purification et permet d'obtenir la TPP en petites quantités avec un bon rendement (40-50%) (Lindsey et al., 1987) reproductible (Lindsey et al., 1986) (Lindsey et al., 1989).

La condensation entre quatre équivalents de pyrrole et quatre équivalents de benzaldéhyde est réalisée dans du dichlorométhane ou du chloroforme, sous atmosphère inerte, en présence d'un catalyseur acide et à température ambiante. Elle conduit à la formation de tétrapyrrométhane, qui peut se cycliser en porphyrinogène et se polymériser pour former des polypyrrométhanes.

La cyclisation en porphyrinogène est thermodynamiquement favorisée dans les conditions expérimentales décrites. Cette réaction est réversible, elle correspond à un équilibre, fonction, entre autres, de la concentration initiale des réactifs. Lorsque l'équilibre est atteint, c'est-à-dire quand le tétraphénylporphyrinogène est l'espèce majoritaire, on oxyde irréversiblement celui-ci pour obtenir la porphyrine désirée (figure 31).

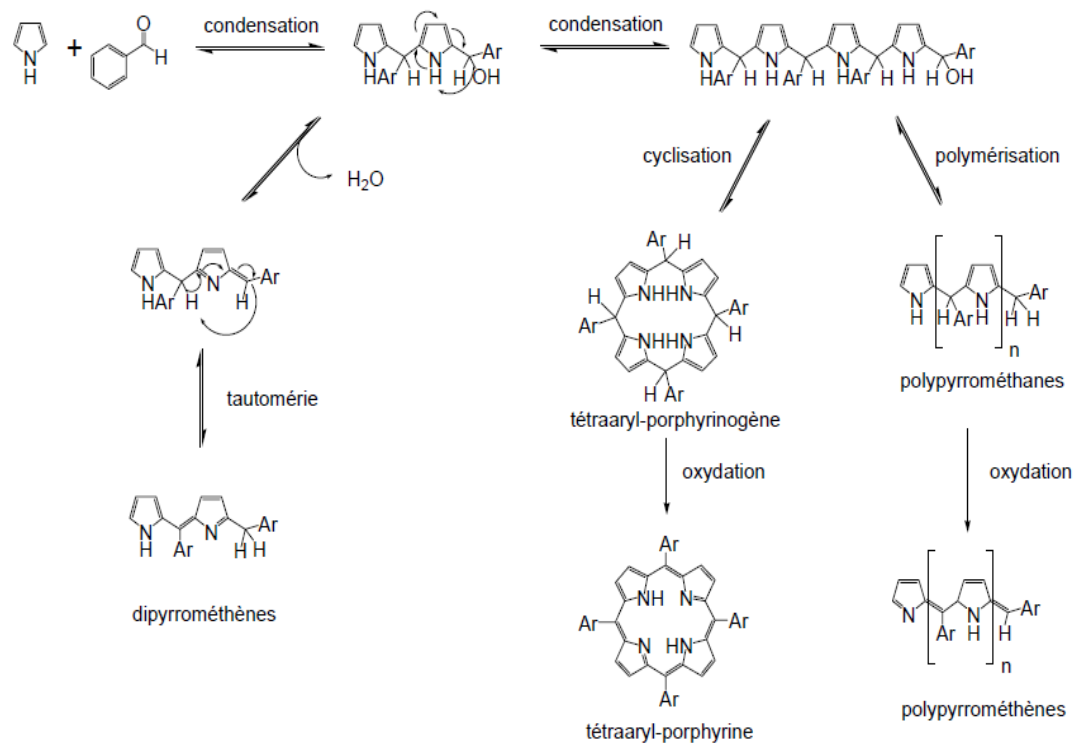


Figure 31 : Mécanisme de formation d'une tétraarylporphyrine selon Lindsey (Lindsey et al., 1989).

Les conditions de Lindsey sont des conditions douces nécessitant l'emploi d'un catalyseur acide (Lindsey et al., 1989). Celui-ci peut être $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ou l'acide trifluoroacétique, TFA. Cependant, l'emploi du TFA augmente le rendement en dipyrrométhènes indésirables.

Lors de la première étape, il se produit la réaction de cyclisation voulue mais également une polymérisation, réaction parasite qui explique le rendement maximum de 50% en porphyrine.

Les réactions de cyclisation et de polymérisation sont donc en compétition et l'emploi de concentrations 10^{-2} M donne un rendement maximal de formation de porphyrines (40 à 50%), tandis qu'à des concentrations de 10^{-1} ou 10^{-3} M, le rendement final baisse autour de 10 à 15%. Plusieurs types d'oxydants peuvent être utilisés. Le *p*-chloranil (2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone) ou la DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) sont les plus communs. Le *p*-chloranil nécessite un chauffage à reflux d'environ une heure, alors que l'oxydation par la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) se fait instantanément à température ambiante. La purification de la porphyrine se fait en général par chromatographie sur colonne de silice.

Comme la méthode de J. S. Lindsey se fait dans des conditions douces, il est possible d'employer un grand nombre de benzaldéhydes différents, portant des groupes sensibles ou ionisables permettant la synthèse de plusieurs porphyrines. En effet, elle ne permet pas uniquement la synthèse de porphyrines symétriques mais également, si la condensation est réalisée entre deux aldéhydes différents et le pyrrole, un mélange de porphyrines (Lindsey et al., 1994).

Le seul inconvénient de cette méthode est la dilution qui, à moins de travailler avec d'énormes volumes de solvant, ne permet pas l'obtention de très grandes quantités de produit.

- **Synthèse sous irradiation micro-onde**

La technologie des micro-ondes est utilisée dans la chimie organique depuis le milieu des années 1980 (Giguere et al., 1986) (Gedye et al., 1986). Cette technique présente des avantages considérables d'un point de vue écologique ainsi que de rapidité et de sélectivité des produits obtenus (Yaseen et al., 2009).

La première synthèse de porphyrine réalisée par micro-onde a eu lieu en 1992 par Petit. Il a obtenu la tétraphénylporphyrine en un temps inférieur à 10 min, avec un mode de purification très simplifié mais le rendement ne dépassait pas 8% (Petit et al., 1992).

Treize ans plus tard, Jain a décrit la synthèse de métalloporphyrines utilisant l'irradiation micro-onde avec un rendement de synthèse de 71 à 98% et un temps de réaction de 3 minutes (Jain et al., 2005) (figure 32). Des dérivées de la porphyrine (bactéριοchlorines et des chlorines) ont également été synthétisés par irradiation aux micro-ondes par Nascimento en un temps de 25 min et 3 min respectivement (Nascimento et al., 2010). Ces travaux prometteurs nous ont encouragés à utiliser l'irradiation aux micro-ondes pour la synthèse de nos porphyrines, bactéριοchlorine, chlorine, chlorine zinguée et porphyrine zinguée (Chouikrat et al., 2014).

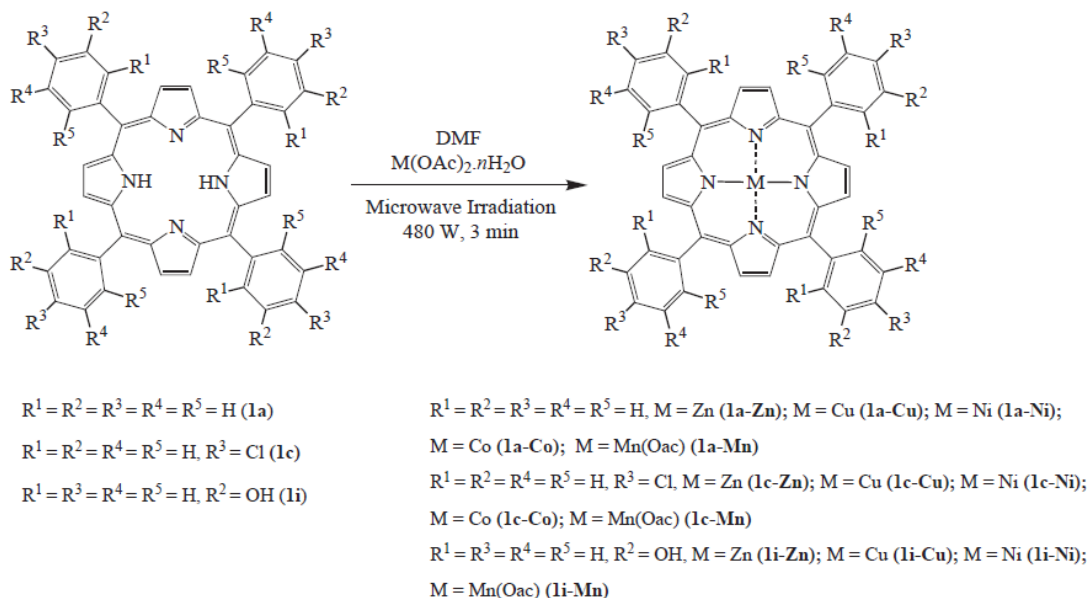


Figure 32 : synthèse de différentes 5,10,15,20-tetraarylmétalloporphyrines sous irradiation micro-onde (Jain et al., 2005).

➤ **Voie 2 : Synthèse « 2+2 »**

Cette méthode est connue aussi sous le nom de la méthode de MacDonald (Woodward et al., 1960). Woodward et MacDonald ont synthétisé des porphyrines β -substituées par réaction d'un dipyrrométhane non substitué sur les positions 5 et 5' avec un 5,5'-bis-formyldipyrrométhane (figure 32), avec un rendement de 50-60% (Arsenault et al., 1960). La réaction conduit dans un premier temps à la formation d'un porphyrinogène qui est, dans un second temps, oxydé par une quinone.

En préparant des dipyrrométhanes par la méthode de Lindsey, un grand nombre de synthons de base pour la porphyrine peuvent être créés (Lee et al., 1995). La condensation des entités dipyrrométhanes peut se faire par l'intermédiaire d'aldéhydes portant des groupements variés. Cette méthode, est donc particulièrement adaptée pour la synthèse de porphyrines asymétriques (figure 33).

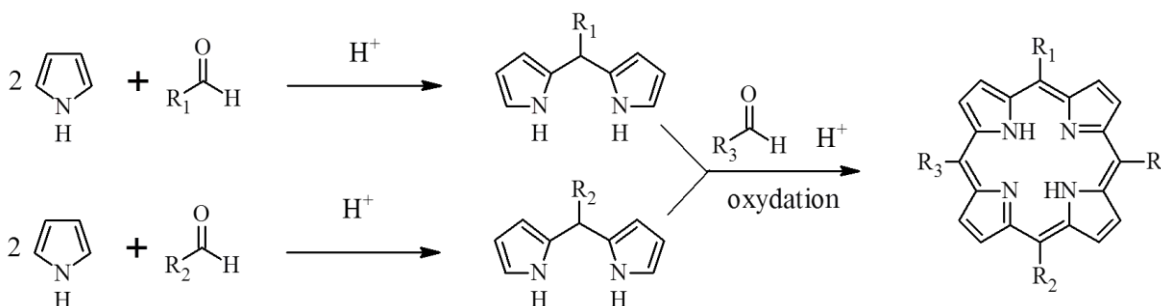


Figure 33 : Schéma de synthèse « 2+2 » d'une porphyrine asymétrique.

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

➤ **Voie 3 : Synthèse « 3+1 »**

Cette méthode consiste à faire réagir un tripyrane dont les atomes de carbone en positions 1 et 14 sont non substitués, avec un pyrrole portant deux fonctions aldéhyde (figure 34).

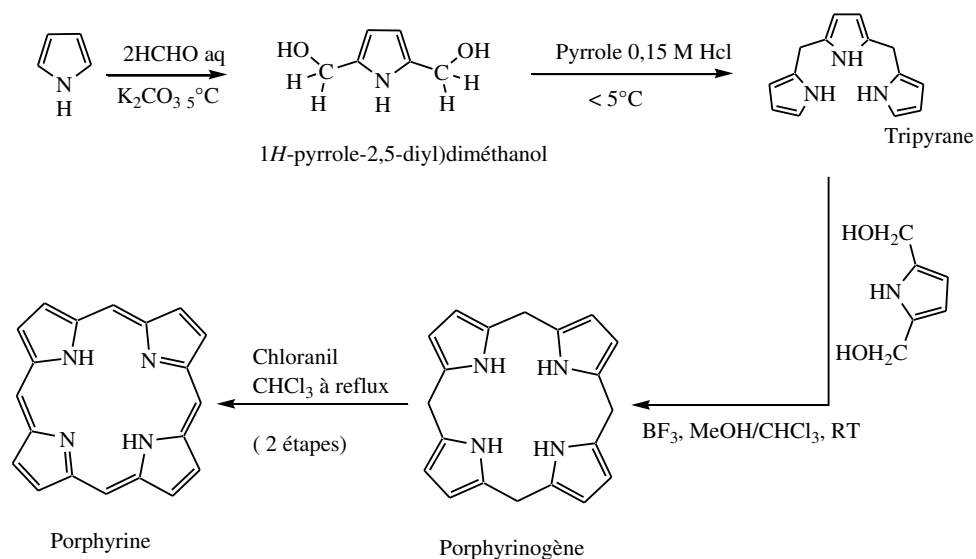


Figure 34 : Schéma de la synthèse du noyau porphyrine par la méthode « 3+1 ».

Par cette méthode, il est possible de former des porphyrines β -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole avec des rendements de l'ordre de 35% (Joule et al., 2010) (Lyndsey et al., 1999).

• **Propriétés photophysiques**

Comme nous l'avons vu précédemment, les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugué. Ces molécules absorbent donc dans le domaine du visible et présentent des spectres d'absorption très caractéristiques qui sont fonction de la structure et de la présence ou non d'un métal (figure 35). Ils se composent d'une bande intense entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre bandes de moindre intensité aux plus grandes longueurs d'onde (entre 500 et 680 nm) nommées bandes Q.

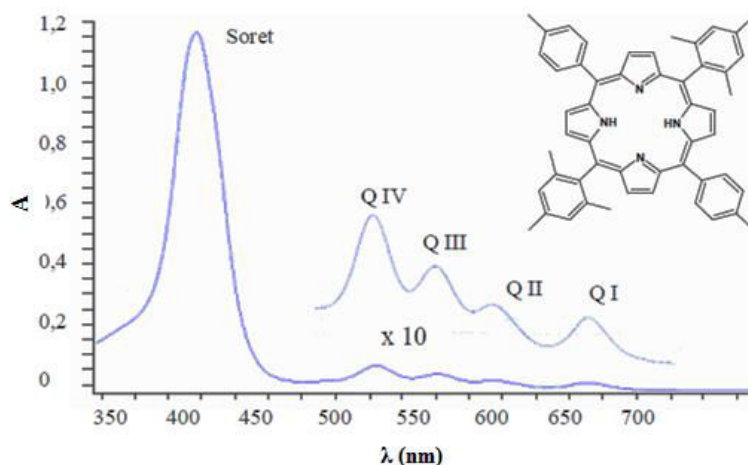


Figure 35 : Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base libre.

Les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants (Fischer et al., 1934). On distingue ainsi essentiellement quatre types de spectres, appelés : *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo* (figure 36) (Dixon et al., 1987).

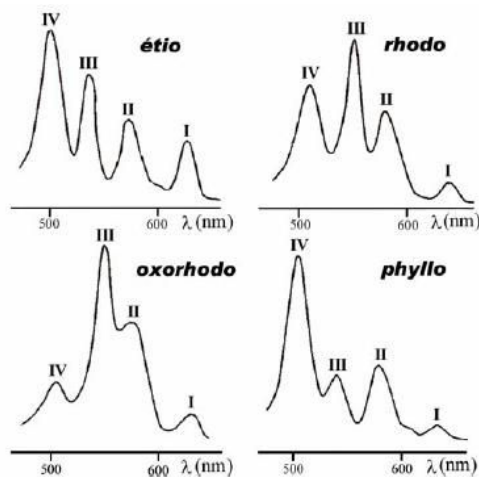
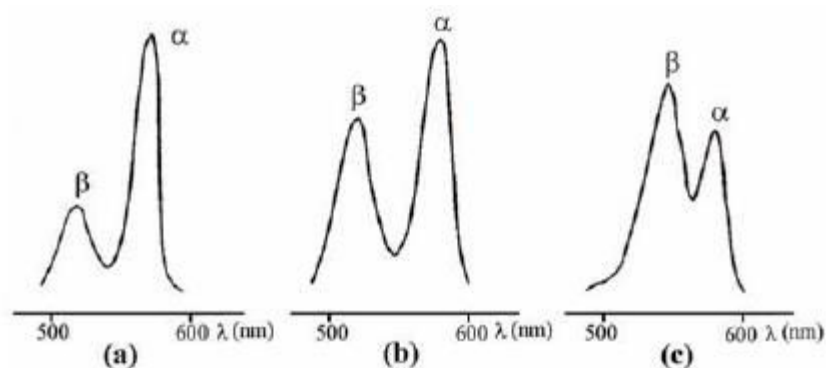


Figure 36 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines base libre.

On rencontre principalement le type *etio* dans le cas de porphyrines β -substituées par au moins 6 groupements, ou dans le cas de la plupart des méso-arylporphyrines. Si ces dernières portent un substituant saturé (par exemple une chaîne alkyle) à la place de l'aryle, elles auront généralement un spectre de type *phyllo*. La présence de groupements riches en électrons π en position β -pyrrolique

génère un profil de spectre de type *rhodo*, alors que la présence de deux de ces mêmes groupements en position β -pyrrolique sur deux pyrroles opposés conduit plutôt à un spectre de type *oxorhodo*.

Dans le cas des porphyrines métallées ou protonées, on observe toujours la présence de la bande de Soret, mais le nombre de bandes Q est réduit à deux ou trois en fonction de la nature du métal et de son degré d'oxydation. Ces dernières sont nommées α et β en partant des grandes longueurs d'onde (figure 37). Dans ce cas, la substitution du macrocycle a très peu d'influence sur les intensités relatives des bandes α et β . En revanche, la nature de l'ion métallique fixé engendre d'importantes modifications du rapport des intensités de ces deux bandes. En effet, un rapport $\alpha/\beta > 1$ indique généralement la présence d'un métal impliqué dans le complexe plan, stable avec la porphyrine (c'est le cas par exemple du Ni(II) ou encore du Zn(II)). En revanche, lorsque le métal peut être facilement remplacé par deux protons, on observe un rapport $\alpha/\beta < 1$ (par exemple avec du Cd(II)).



**Figure 37 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par :
(a) Ni(II) ; (b) Zn(II) ; (c) Cd(II).**

En plus d'un spectre d'absorption caractéristique, les porphyrines ont des propriétés d'émission de fluorescence et de production d'oxygène singulet. Dans le cas de porphyrines non métallées, nous observons deux pics de fluorescence. La première bande se situe entre 620 et 700 nm avec un maximum vers 650 nm et la seconde, d'intensité plus faible, entre 700 et 750 nm avec un maximum vers 720 nm. La longueur d'onde d'émission, ainsi que le rendement quantique de fluorescence, sont dépendants de la substitution (Mathai et al., 2007). Ces caractéristiques photophysiques viennent se complexifier avec la formation d'un complexe métal-porphyrine, dont les effets sont directement dépendants de la nature du métal inséré dans le macrocycle. En effet, la nature de l'ion métallique fixé, peut engendrer d'importants déplacements de longueurs d'onde de fluorescence.

II-3-3-b. Les chlorines

- **Structure**

Les porphyrines peuvent subir deux réactions de réduction. Deux pyrroles du macrocycle porphyrinique peuvent être réduits successivement ; la première réduction donne une chlorine et la seconde donne une bactériochlorine (figure 38).

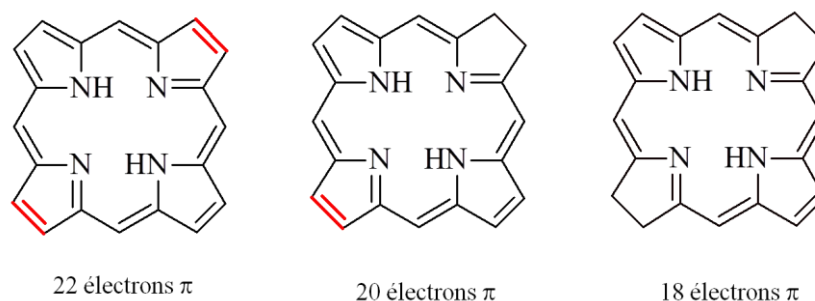


Figure 38 : Structures chimiques des macrocycles porphyriniques. De gauche à droite : porphyrine, chlorine et bactériochlorine.

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. Les bactériochlorines dont les doubles liaisons réduites sont sur deux entités pyrroliques vicinales sont dites isobactériochlorines.

Comme les porphyrines, les chlorines et bactériochlorines sont des molécules planes, pouvant accueillir un métal en leur centre (Kadish et al., 2010).

- **Synthèse**

Les chlorines représentent une avancée importante en ce qui concerne l'amélioration des propriétés photophysiques des macrocycles tétrapyrroliques. En effet, les chlorines présentent une meilleure absorption dans le rouge. En 1940, Fischer et Eckoldt ont décrit l'oxydation des octaalkylporphyrines par le tétraoxyde d'osmium (OsO_4) conduisant à la dihydroxychlorine correspondante (Fischer et al., 1940) (Fischer et al., 1944). Cette méthode a permis à Brückner et Dolphin (Brückner et al., 1995) de synthétiser la méso-2,3-dihydroxytétraphénylchlorine (figure 39).

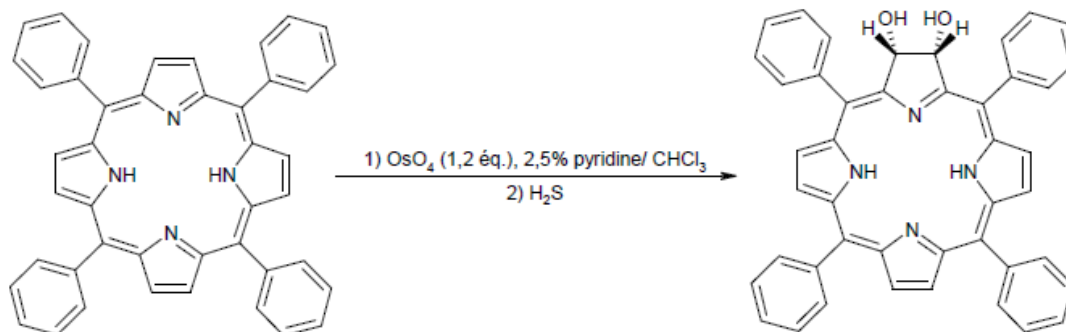


Figure 39 : Réduction des d’octa-alkylporphyrines pour l’obtention d’une dihydrochlorine.

Whitlock a mis au point une technique de réduction des porphyrines utilisant la para-toluènesulfonylhydrazine (Whitlock et al., 1969). Il est généralement connu que la décomposition thermique d’arènesulfonylhydrazide produit le réactif azoté (diimide) responsable de la réduction. Ce procédé a permis à Bonnett de synthétiser la *mé*ta-tétrahydroxyphénylchlorine avec un rendement de 20% (figure 40). La porphyrine est dans un premier temps réduite en bactériochlorine à l’aide de *para*-toluènesulfonylhydrazine puis une double liaison est générée à l’aide de *o*-chloranil.

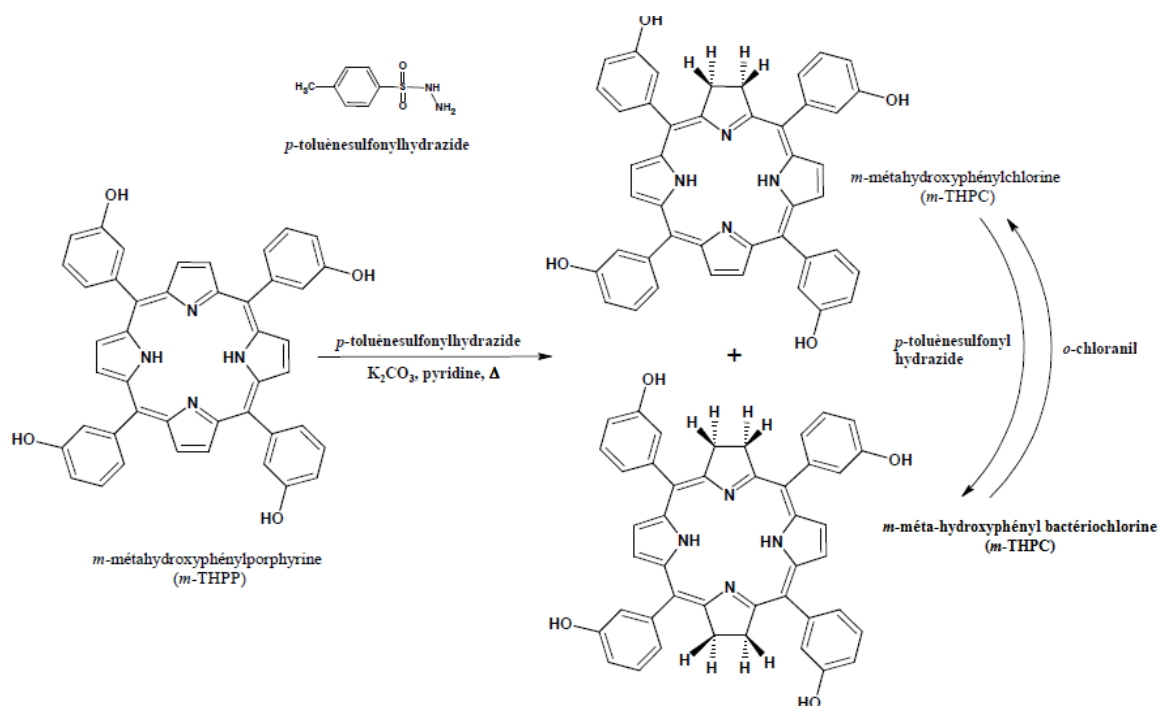


Figure 40 : Synthèse de la méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC).

- **Propriétés photophysiques**

La réduction du macrocycle apporte des changements importants dans les caractéristiques photophysiques de la molécule. La bande Q_1 des chlorines et des bactériochlorines est beaucoup plus intense et que celle de la porphyrine (figure 41). Elle est également décalée vers les grandes longueurs d'onde, ce qui rend ces molécules intéressantes pour l'efficacité de la PDT.

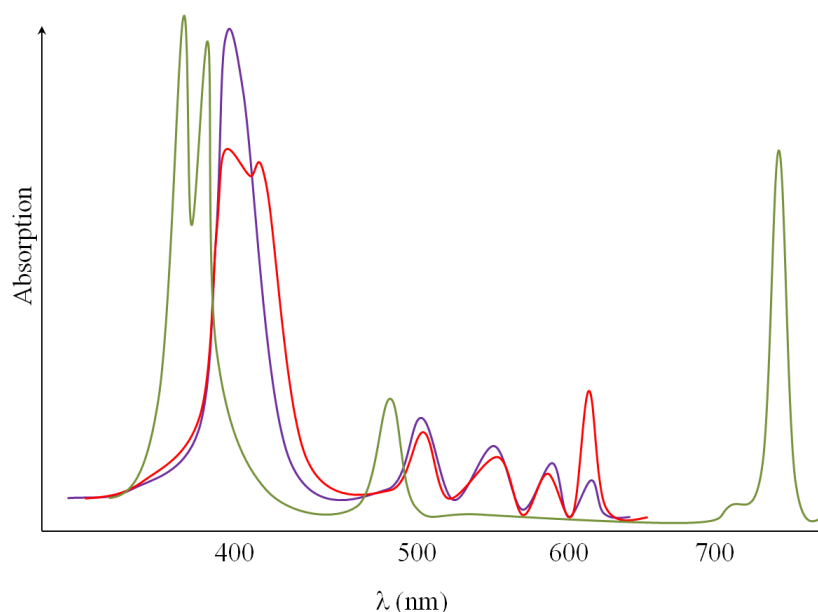


Figure 41 : Spectres d'absorption des composés tétrapyrroliques dans l'éthanol. En violet : porphyrine ; en rouge : chlorine ; en vert : bactérochlorine.

Tout comme les porphyrines, les rendements quantiques en fluorescence et en production d'oxygène singulet dépendent énormément des substituants sur les macrocycles. Ces molécules ne sont pas systématiquement stables. En effet, elles sont capables de s'oxyder à l'air (ou en milieu oxydant) et redonnent un cycle insaturé. Les bactérochlorines sont connues pour être des molécules particulièrement peu stables ; elles s'oxydent rapidement en chlorines, qui elles-mêmes peuvent s'oxyder en porphyrine. Des bactérochlorines ont été développées par modification chimique des noyaux pyrroliques pour garantir une meilleure stabilité des formes réduites ; des groupements méthyles ont été introduits en position 2 et 3 des motifs pyrroline pour bloquer cette position (Huang et al., 2010).

II-3-3-c. Les phtalocyanines

- **Structure**

Les phtalocyanines sont des porphyrines de synthèse d'où leur nom de tétrabenzotétrazaporphyrines, faisant apparaître le remplacement des groupes méthines des porphyrines par quatre atomes d'azote. Il s'agit donc de macrocycles aromatiques plans de 18 électrons π comprenant 4 groupements indoles liés en position 1-3 par des ponts azones : macrocycle tétraazaisoindole (figure 42). Ce sont des molécules très résistantes à la lumière, à la chaleur, à l'acide et aux bases alcalines. Comme pour les porphyrines, elles peuvent souvent être chelatées par de nombreux ions métalliques

comme l'aluminium et le zinc qui augmentent leur phototoxicité (Berg et al., 1989) (Milanesi et al., 1990).

La remarquable délocalisation bidimensionnelle des électrons π sur ces macrocycles conduit à une augmentation drastique de l'absorption de ces composés à des longueurs d'onde oscillant entre 700 et 800 nm (Roeder et al., 1990).

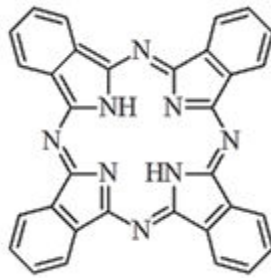


Figure 42 : Structure chimique d'une phthalocyanine.

L'inconvénient majeur de ces molécules est leur très mauvaise solubilité dans les solvants usuels, et notamment dans l'eau. Des dérivés hydrophiles, comme la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée (figure 43), la plus connue et la plus utilisée, ont été synthétisés, en fonctionnalisant les motifs isoindoliques avec des groupements SO_3^- . Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont été menées sur cette molécule (Peng et al., 1991).

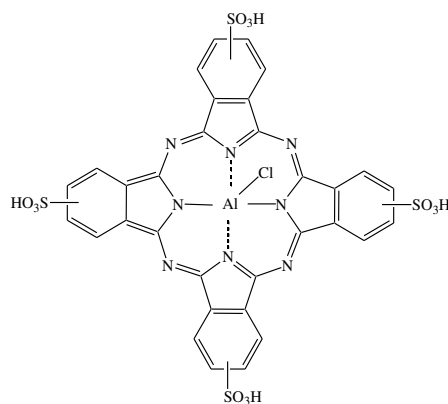


Figure 43 : Structure de la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée.

- **Synthèse**

Braun et Tcherniac sont les premiers à avoir synthétisé, sans la caractériser, la phtalocyanine d'hydrogène H_2P_C , par chauffage d'*o*-cyanobenzamide dans l'éthanol à reflux (Tcherniak et al., 1907) (figure 44).

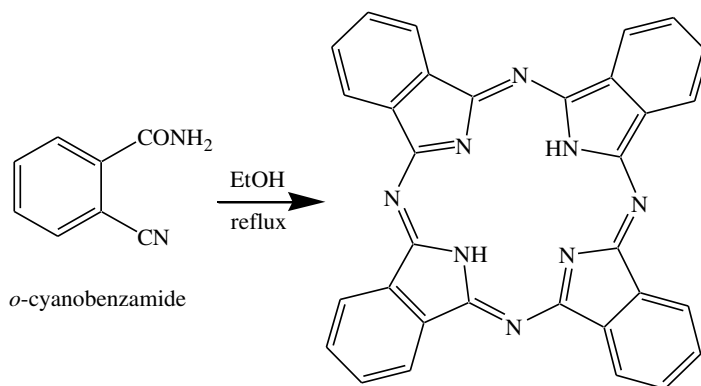


Figure 44 : Première synthèse de la phtalocyanine d'hydrogène, H_2P_C .

➤ **A partir de phtalonitrile**

Pour les phtalocyanines métallées, une première synthèse est basée sur la cyclisation du 1,2-dicyanobenzène (phtalonitrile), ou 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 (Olivier et al., 1987). La première étape de la cyclisation (figure 45) est la formation de l'alcoolate RO^- qui réagit par addition nucléophile sur le carbone d'une des fonctions nitrile du 1,2-dicyanobenzène pour former l'intermédiaire (a). La seconde étape est la réaction entre l'intermédiaire (a) et le phtalonitrile qui conduit à l'intermédiaire (b). A partir de cet intermédiaire, le processus se poursuit par la réaction de (b) sur une nouvelle molécule de phtalonitrile.

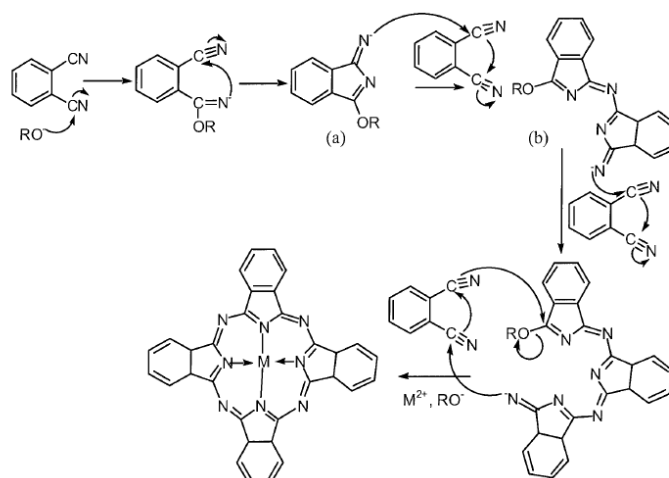


Figure 45 : Cyclisation des phthalonitriles en phthalocyanine (Olivier et al., 1987).

Le phthalonitrile peut également réagir avec une base, le 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU), dans l'éthanol (Drager et al., 2000) (Cosimelli et al., 2003) à reflux. Le DBU arrache un proton du solvant pour former l'éthanolate nécessaire à la cyclisation. Pour obtenir des Pcs non métallées, on peut aussi faire réagir un phthalonitrile avec un alkoxide de sodium ou de lithium qui donne l'alkalimétal Pc correspondante, "démétallable" par un acide minéral (Torres et al., 2000).

➤ **A partir de dérivés phthalimide**

La condensation de la 1,3-diiminoisoindoline sur elle-même peut former la phthalocyanine d'hydrogène, ou une phthalocyanine métallée si la réaction a lieu en présence d'ion métallique. Cette réaction s'effectue dans le diméthylaminoéthanol (DMAE) (Saummerauer et al., 1996), (Leznoff et al., 1985) (figure 46).

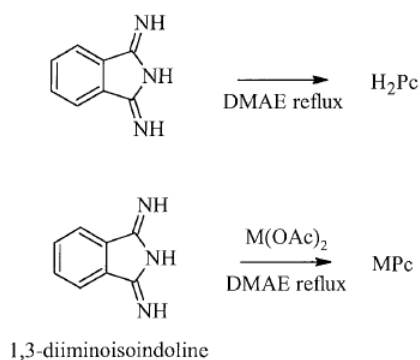


Figure 46 : Synthèse d'une phthalocyanine d'hydrogène et d'une phthalocyanine métallée à partir de la 1,3-diiminoisoindoline.

➤ **A partir d'anhydride phtalique**

L'anhydride phtalique par réaction avec un sel d'ion métallique, en présence d'urée et d'un sel de molybdène jouant le rôle de catalyseur, conduit à l'obtention d'une phtalocyanine métallique (figure 47).

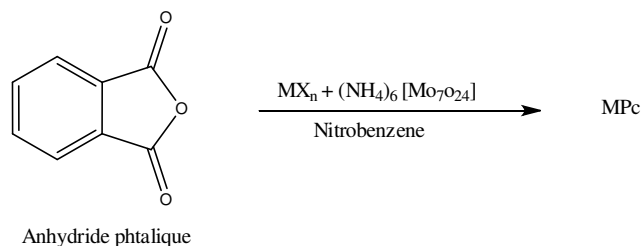


Figure 47 : Synthèse à partir d'un anhydride phtalique.

• **Propriétés photophysiques**

Les phtalocyanines présentent une forte absorption entre 600 et 700 nm avec maximum d'absorption à 665 nm, ce qui rend leurs spectres d'absorption complètement différents de leurs homologues porphyriniques ; cette forte absorption dans le rouge est dûe à leur conjugaison étendue (figure 48).

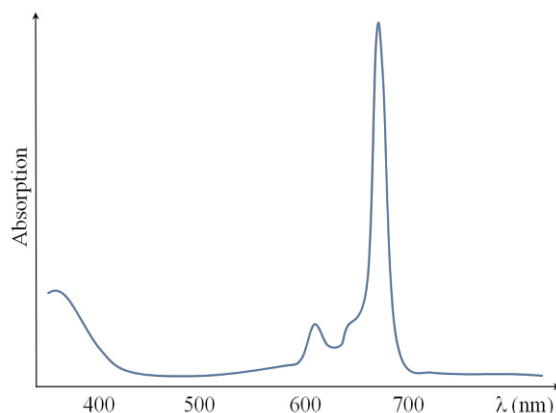


Figure 48 : Spectre d'absorption d'une phtalocyanine zinguée ZnPc-COOH dans l'éthanol.

Les phtalocyanines émettent de la fluorescence vers 670 nm, mais la bande d'émission ainsi que le rendement quantique de fluorescence dépendent aussi de la substitution tout comme la production d'oxygène singulet qui est très dépendante de l'agrégation de ces molécules.

Coefficient d'extinction molaire élevé, à des longueurs d'onde situées dans la «fenêtre thérapeutique», c'est-à-dire dans la région rouge du spectre de la lumière visible, voire dans le proche infrarouge (600-850 nm), afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales pour le traitement de tumeurs profondes.

- Bons rendements quantiques en production d'oxygène singulet et formation de l'état triplet du PS ;
- Solubilité en milieu aqueux, afin de faciliter l'administration systémique ;
- Clairance élevée ;
- Sélectivité pour le tissu tumoral.

II-3-4-b. Photosensibilisateurs de deuxième génération

Les PS de seconde génération présentent de nombreux avantages par rapport aux PS de première génération. Certains absorbent la lumière de longueur d'onde comprise entre 600 et 800 nm, permettant une augmentation de la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus. En plus de leurs propriétés de fluorescence, les PS de seconde génération montrent de bons rendements quantiques de production d' 1O_2 . Ce sont des composés purs. Enfin, ils sont rapidement éliminés par les tissus, limitant ainsi la photosensibilisation cutanée. Cette seconde génération de PS comprend plusieurs familles de molécules telles que les porphyrines (*o*-THPP), les précurseurs de porphyrines endogènes (5-ALA), les chlorines (Foscan®) (figure 50), les purpurines (Purlytin™), les texaphyrines (Xcytrin™, Lutrin™).

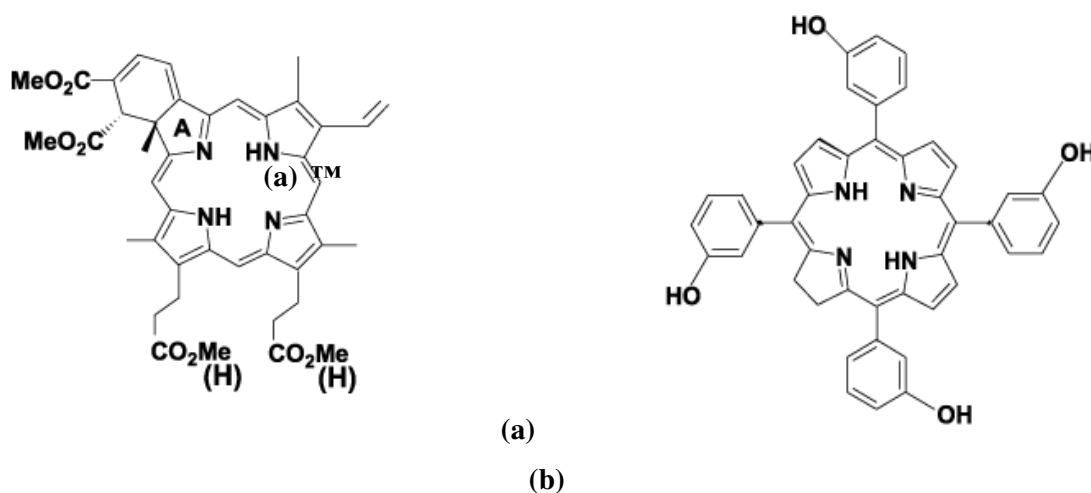


Figure 50 : Structures chimiques de la Visudyne® (a) et du Foscan® (b).

Différentes molécules ayant obtenu une AMM ou étant en essai clinique sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Photosensibilisateurs utilisés cliniquement et leurs principales indications thérapeutiques (Plaetzer, 2009)

Nom commercial	Photosensibilisateur	λ_{max} absorption (nm)	AMM	Indication thérapeutique
Photofrin®	HpD, Porfimère sodique	630	Oui (a)	Cancer du poumon non à petites cellules et de l'œsophage (palliatif)
Levulan®	Acide 5-aminolévulinique (5-ALA), précurseur de la Protoporphyrine IX	635 (PpIX)	Oui (b)	Kératoses actiniques
Metvix®	Méthyl-ester de l'ALA (MAL), précurseur de la Protoporphyrine IX	635	Oui (c)	Kératoses actiniques Carcinomes basocellulaires
Foscan®	meta-tétra(hydroxyphényl)chlorine (m-THPC ou temoporfin)	652	Oui (d)	Cancer de la tête et du cou (palliatif)
Hexvix®	Acide Hexyl- δ -aminolévulinique	635 (PpIX)	Oui (e)	Cancer de la vessie
Visudyne®	Verteoporfin, Dérivé monoacide de la Benzoporphyrine	690	Non	DMLA exsudative
Photosense®	Phtalocyanine d'aluminium	670	Oui (f)	Cancer de la tête et du cou
SnET2®	Etiopurpurine d'étain	660	Non	Cancer du sein, de la prostate et sarcome de Kaposi
Xcytrin®	Texaphyrine	732	Oui (g)	Cancer de la prostate, DMLA
Photoditazine®	Chlorine e6	662	Oui (f)	Cancer du poumon et de la prostate
Benzvix	Acide benzyl δ -aminolévulinique	635	Non	Tumeurs gastro-intestinales
BOPP	Protoporphyrine borée	630	Non	Tumeurs cérébrales
Lu-Tex	Texaphyrine de lutétium	720-760	Non	Tumeurs cérébrales, cancer de la prostate et du col de l'utérus
Pc-4	Phtalocyanine-4	670	Non	Lésions cutanées/sous-cutanées de tumeurs solides de diverses origines
Photochlor	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrophéophorbide-alpha	650	Non	Carcinome des cellules basales

(a) Canada, Etats-Unis (USA), Royaume-Uni (RU) et union Européenne (UE) ; (b) : UE et USA ;

(c) : UE et Australie ; (d) : UE ; Islande et Norvège ; (e) : UE ; (f) : Russie et (g) : USA

(b)

II-3-4-c. Photosensibilisateurs de troisième génération : thérapie ciblée

Bien que les PS de 2^{ème} génération présentent de meilleures propriétés chimiques et photophysiques par rapport aux PS de 1^{ère} génération, des progrès restent à faire pour améliorer la sélectivité envers les cellules cancéreuses. Le développement de PS de 3^{ème} génération consiste à élaborer des composés plus sélectifs des tissus tumoraux.

Le principe est de greffer sur des molécules de 2^{ème} génération des groupements chimiques visant à induire un **ciblage actif** (adressage) ou de transporter le PS dans une formulation qui induit un **ciblage passif** (vectorisation) (figure 51).

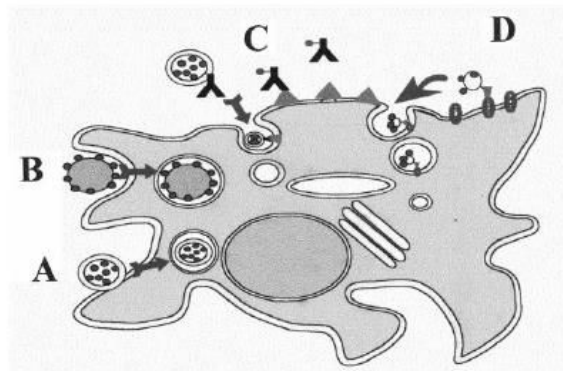


Figure 51 : Stratégies générales de ciblage des photosensibilisateurs vis-à-vis des cellules néoplasiques (Sobolev, 2000). Ciblage passif : véhiculés par les liposomes (A), délivrées par des microsphères ou nanoparticules (B). Ciblage actif : liposomes conjugués à des anticorps (C), adressage par conjugaison entre un ligand spécifique de récepteurs membranaires surexprimés (D).

Le couplage à divers vecteurs tels que l'acide folique, des sucres, des peptides, des polymères, des hydrates de carbone, le couplage à des anticorps spécifiques ou l'inclusion de PS dans des nanoparticules sont les stratégies les plus utilisées (Konan et al., 2002). Ces vecteurs possèdent une affinité particulière pour les récepteurs surexprimés sur la membrane des cellules tumorales ou endothéliales.

➤ **Ciblage actif**

On distingue deux types de ciblage actif :

- Ciblage actif direct (ciblage de la cellule cancéreuse)

Cette première stratégie consiste à amener spécifiquement le photosensibilisateur au niveau des cellules tumorales afin qu'il soit internalisé par différents mécanismes biologiques. L'affinité pour les cellules tumorales repose sur la reconnaissance de la molécule de ciblage pour un récepteur membranaire surexprimé (Tozer et al., 2004) (Tozer et al., 2005). On peut citer l'utilisation de sucres (Frochot et al., 2009) (Di Stasio et al., 2005) (figure 52) ou de l'acide folique (figure 53) qui est reconnu par des récepteurs à l'acide folique FAR surexprimés par certaines lignées tumorales (ovaire, utérus, cerveau) (Gravier et al., 2008). Il est donc un vecteur privilégié pour la PDT ciblée et même pour l'imagerie, d'autant qu'il a un poids moléculaire relativement faible ($M = 441 \text{ g.mol}^{-1}$) qui permet une bonne pénétration dans les tumeurs et un mode d'internalisation cellulaire par endocytose *via* le récepteur FAR (figure 54).

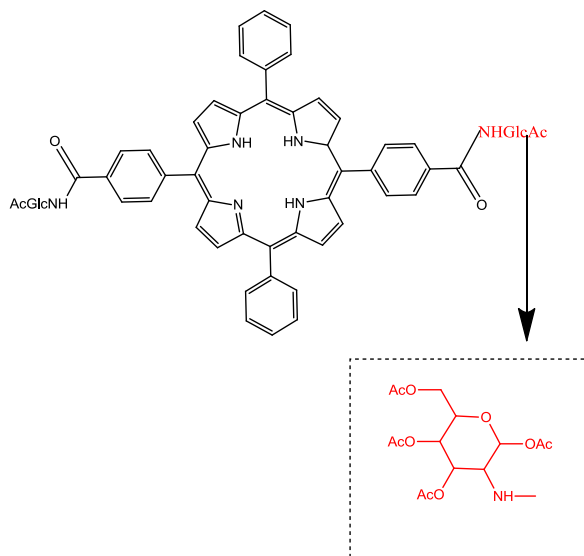


Figure 52 : Structure chimique d'une porphyrine couplée à des sucres (Di Stasio et al., 2005).

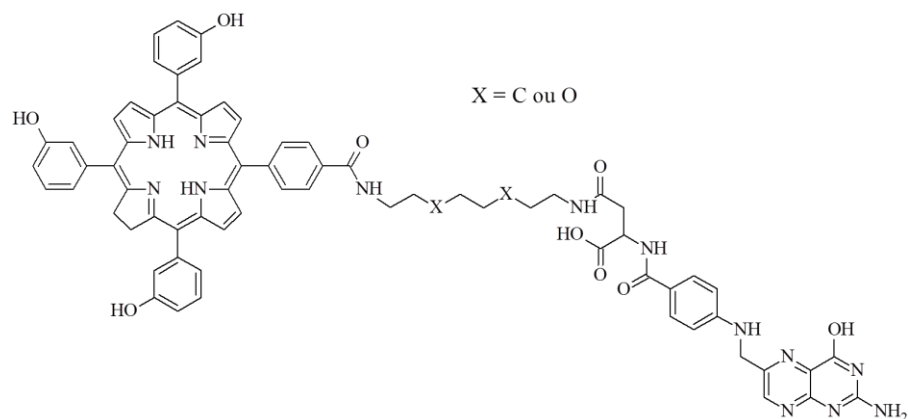


Figure 53 : Structure chimique des conjugués «m-THPC-like» - acide folique synthétisé par Julien Gravier, 2008.

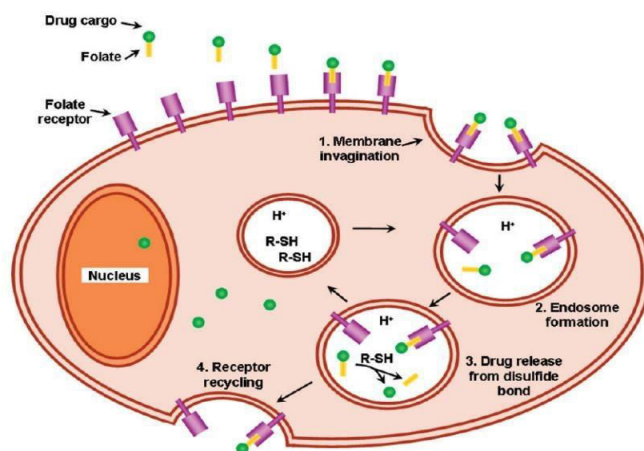


Figure 54 : Mécanisme de l'endocytose médiée par les récepteurs à l'acide folique. (Xia et al., 2010).

➤ **Ciblage actif indirect**

Une seconde stratégie consiste à cibler les néo-vaisseaux entourant la tumeur. Leur destruction conduit à la mort indirecte de la tumeur par hypoxie. La VTP (*Vascular Targeted Photodynamic Therapy*) est basée sur le fait qu'une tumeur va induire, pour son développement, la formation d'un réseau de vaisseaux sanguins. Ce phénomène est nommé angiogenèse tumorale. Ce mécanisme

biologique engendre une surexpression de certaines molécules biologiques au niveau de ces néo-vaisseaux tumoraux et plus précisément au niveau des cellules endothéliales. Ce processus fait intervenir différents substrats induits ou sécrétés par la tumeur elle-même (figure 55). Le ciblage des récepteurs associé à ces molécules a ouvert de nouvelles voies pour le ciblage actif et la destruction indirecte des tumeurs.

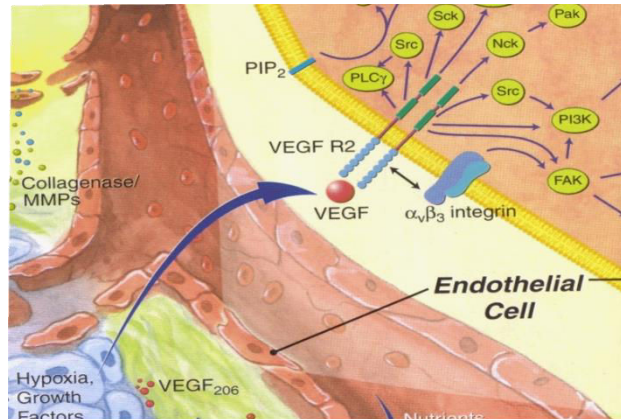


Figure 55 : Schéma synthétique des principaux effecteurs biologiques lors de l'angiogenèse tumorale (Sève, 2013).

L'hypoxie intratumorale (manque d'oxygène) va induire la surexpression de gènes angiogéniques qui vont induire l'expression du facteur de croissance endothélial (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Ce facteur de croissance va provoquer, suite à la reconnaissance par des récepteurs membranaires associés (récepteurs au VEGF), la formation de molécules qui vont intervenir lors de l'angiogenèse, comme les intégrines ou les MMPs (responsables de la dégradation de différents composés de la matrice extracellulaire). Tout ce processus biologique va permettre la prolifération de cellules endothéliales nécessaires à la formation d'un réseau de néo-vaisseaux et ainsi la tumeur sera irriguée en sang et en nutriments. Ces molécules biologiques (MMPs, récepteurs au VEGF ou intégrines) surexprimées par les cellules tumorales vont être autant de cibles pour la VTP. Le but de cette dernière est donc d'induire une ischémie tumorale par destruction de la néovascularisation à proximité de la source lumineuse par des phénomènes de vasoconstriction et lyse endothéliale. Récemment, des produits à durée de vie très courte ont été développés, par exemple la padoporfine ou la padeliporfine (WST11 ou Tookad Soluble®) (Azzouzi et al., 2013).

- Ciblage des intégrines

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont surexprimées par les cellules endothéliales activées par le VEGF. Le ciblage de ces intégrines a fait l'objet de travaux au LRGP et LCPM avec la synthèse de PS couplé au RGD sous forme cyclique (Boisbrun et al., 2008) (Chaleix et al., 2004) (Frochot et al., 2007).

- Ciblage des récepteurs au VEGF

Le LRGP et ses collaborateurs (LCPM et CRAN) se sont intéressés depuis une dizaine d'années au ciblage d'un co-récepteur au récepteur au VEGF, appelé neuropiline-1, par un peptide H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR) (figure 56). Le peptide ATWLPPR possède une forte affinité pour ce récepteur.

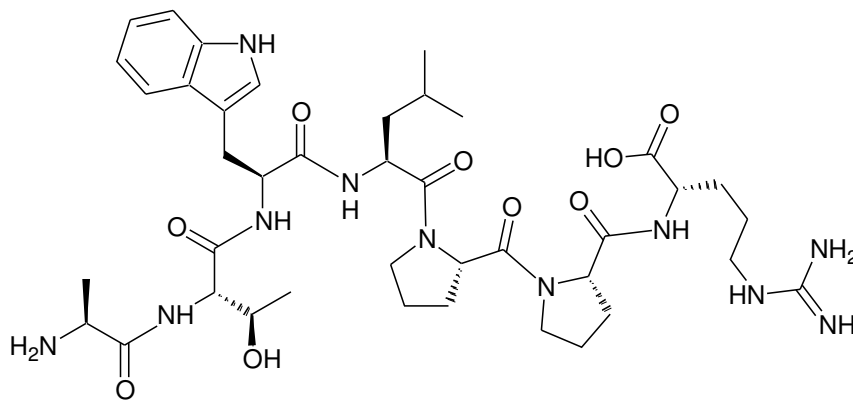


Figure 56 : Structure chimique du peptide ATWLPPR.

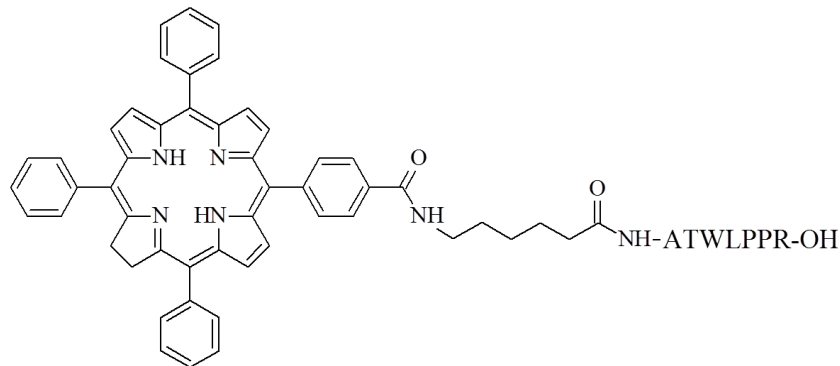


Figure 57 : Structure chimique du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR.

L'étude *in vivo* de TPC-Ahx-ATWLPPR, sur un modèle de gliome malin humain (lignée U87), xéno greffé en ectopique chez la souris *nude*, a montré que le photosensibilisateur conjugué s'accumule dans la tumeur à des taux importants, permet une accumulation sélective dans les cellules

endothéliales de la tumeur *in vivo* comparé à la chlorine non conjuguée et que l'efficacité photodynamique avec TPC-Ahx-ATWLPPR induit un retard de croissance tumorale statistiquement significatif comparé à la chlorine non couplée. L'étude de stabilité a montré que, *in vivo*, aucune dégradation n'est observée dans le plasma pendant 4 h, puis la séquence peptidique se dégrade progressivement, aboutissant à la formation du composé TPC-Ahx-A. La dégradation est très rapide dans les organes du système réticulo-endothélial (foie et rate), résultant majoritairement des peptidases lysosomales. Il a été récemment montré par la PDTeam de Nancy que les séquences peptidiques DKPPR (figure 58) et TKPPR (figure 59) ($EC_{50} \sim 1 \mu M$) possédaient une meilleure affinité pour les NRP-1 que ATWLPPR ($EC_{50} = 19 \mu M$). Ce travail a fait l'objet de la thèse de Mme Ezatul Ezleen Kamarulzaman (2011) (Kamarulzaman et al., 2015a et b).

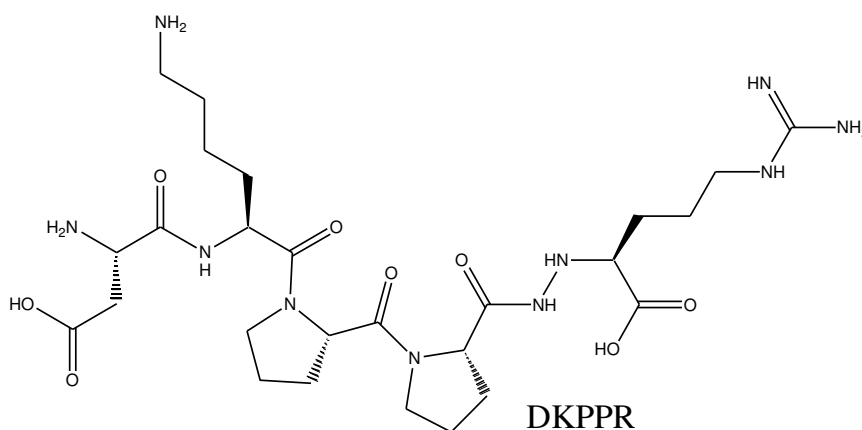


Figure 58 : Structure chimique du peptide DKPPR.

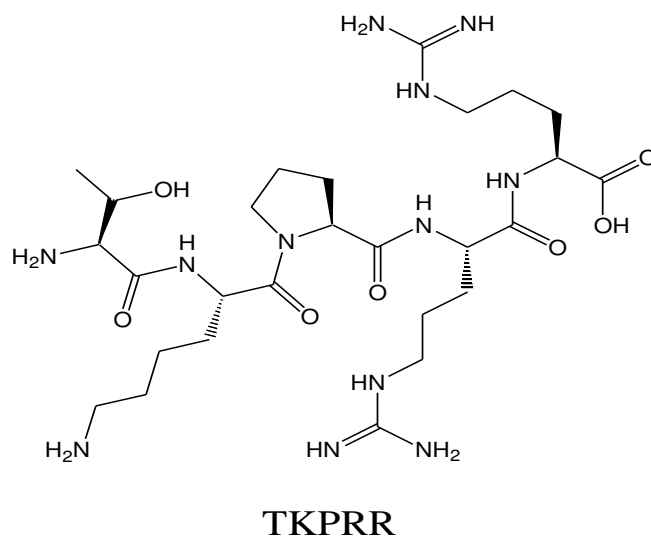


Figure 59 : Structure chimique du peptide TKPPR.

- Ciblage des Métalloprotéinases (MMPs)

Ce sujet a fait l'objet de plusieurs thèses au LRGP (Marc Verhille et al., 2012) et (Thèse Aurélie Stallivieri, 2015) en collaboration avec le LCPM. Les métalloprotéinases, MMPs, sont des enzymes sécrétées lors de l'angiogenèse. Elles vont permettre la prolifération des cellules endothéliales en dégradant certains composés de la matrice extracellulaire. Ces métalloprotéinases sont donc très présentes au niveau des néo-vaisseaux tumoraux ainsi qu'au niveau des membranes cellulaires. Ces enzymes vont aussi pouvoir être une cible potentielle pour une autre stratégie de ciblage (figure 60).

Cette stratégie originale de ciblage des MMPs par un peptide substrat spécifique va permettre d'activer le photosensibilisateur spécifiquement après dégradation du peptide par les MMPs.

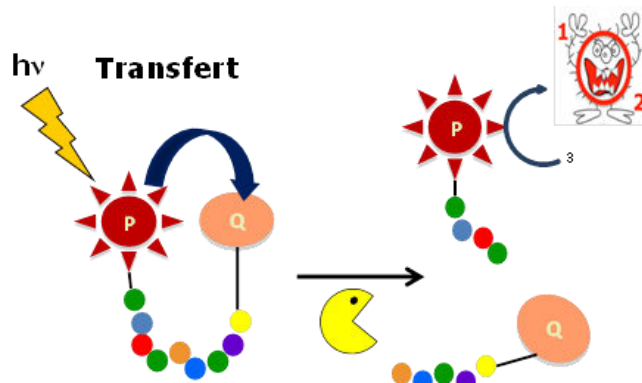


Figure 60 : Schéma d'activation par clivage enzymatique d'un PMB pour la thérapie photodynamique.

Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches se tournent vers le développement de nanoparticules pour effectuer un ciblage passif, voire actif avec l'introduction de vecteurs.

➤ **Ciblage passif**

Le ciblage passif des cellules tumorales en PDT consiste à vectoriser les PS grâce à différents systèmes de formulation facilitant leur transport et leur incorporation dans les cellules cancéreuses. Plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés comme les liposomes, les nanoparticules et les systèmes micellaires. Ces stratégies peuvent également être utilisées dans le cadre de ciblage actif vasculaire ou de cellules tumorales. Dans ces cas, les vecteurs sont associés à un système adresseur (figure 61).

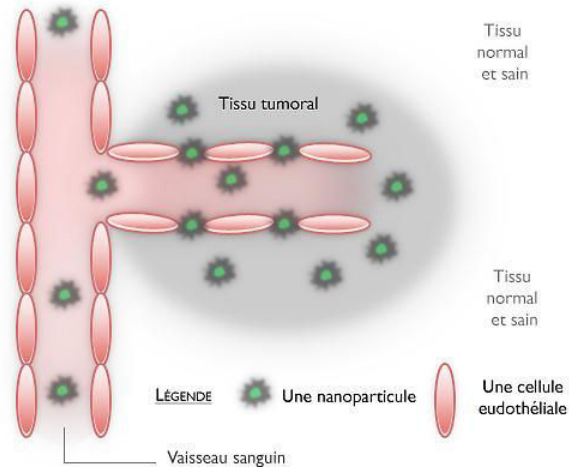


Figure 61 : Schéma des cellules endothéliales. © Onconano.

II-3-4-d. Photosensibilisateurs de quatrième génération

Les PS de quatrième génération sont de potentiels photosensibilisateurs alliant activité thérapeutique et capacité d'imagerie et en ce sens peuvent être considérés comme de nouveaux agents « théranostiques ». Ce concept qui a été développé dans les années 2000 désigne un composé qui présente à la fois des propriétés d'imagerie et de thérapie (Fang et al., 2009). Citons par exemple les vinyl-triphénylaminés (TP), fluorophores rouges ou jaunes dont l'émission de fluorescence est commutée par l'interaction avec l'ADN et qui sont employés comme marqueurs d'ADN en cellules fixées et comme marqueurs de mitochondries ou d'apoptose en cellules vivantes (figure 62).

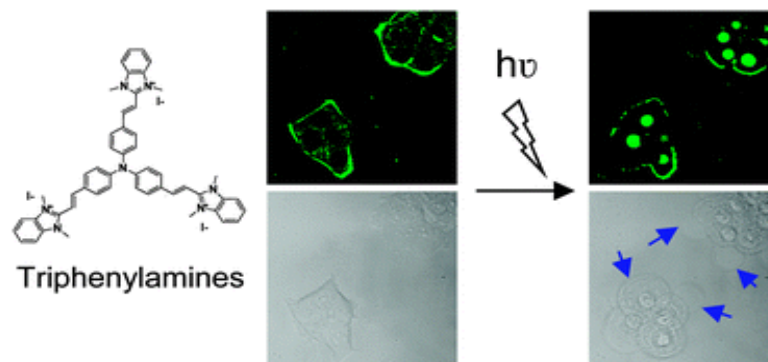


Figure 62 : Imagerie de fluorescence confocale de cellules vivantes MCF7 traitées avec les TP (Chennoufi et al., 2015).

En cellules vivantes, les TP sont localisées dans les mitochondries mais, sous excitation mono- ou bi-photonique constante, elles déclenchent l'apoptose de la cellule et se relocalisent dans le noyau. Le phénomène peut être imagé par fluorescence, et les TP pourraient donc être employées comme photosensibilisateurs théranostiques (Thèse Dumat, 2015). Toutefois, les PS de quatrième génération font le plus souvent appel à des nano-objets multifonctionnalisés (Koo et al., 2011) complexes à fabriquer.

Récemment, le concept de nanoparticules multifonctionnelles combinant des propriétés de ciblage pour la délivrance ciblée de PS à des propriétés d'agents de contraste pour le diagnostic a connu un grand engouement. Tout en combinant la PDT et l'imagerie, ces systèmes peuvent également améliorer le traitement par PDT grâce au ciblage *via* les molécules d'adressage. Ainsi, ce système multifonctionnel ciblant permet de suivre la biodistribution des PS par imagerie afin de déclencher au moment le plus opportun l'activation par flux laser permettant de les rendre cytotoxiques et également d'adapter en conséquence la dose d'activation. Ce concept sera détaillé dans le chapitre 2.

Chapitre 2

Place des nanoparticules dans la PDT anti-tumorale et dans la radiothérapie

I- Définition des nanoparticules

En octobre 2011, la commission de l'union européenne a défini un nanomatériau comme « un matériau dont les constituants principaux ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm » (JO UE, 2011). Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm.

A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (figure 63).

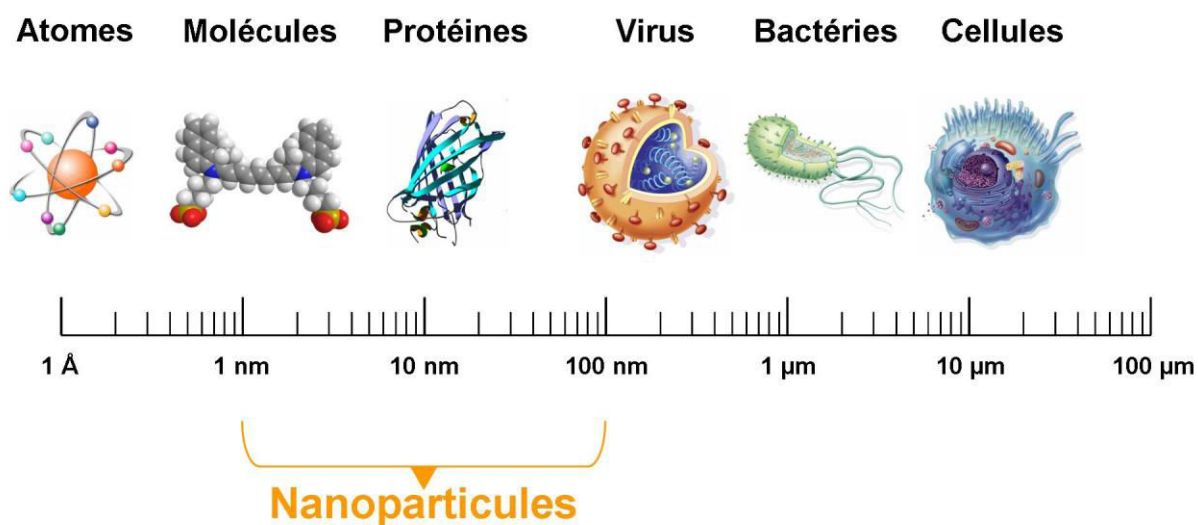


Figure 63 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques (thèse Wan, 2012).

De nombreux projets, utilisant des nanoparticules dans le but d'améliorer les traitements anticancéreux sont réalisés. L'idée est d'élaborer des nanoparticules permettant la vectorisation de principes actifs. Trois générations de nanoparticules ont vu le jour (figure 64).

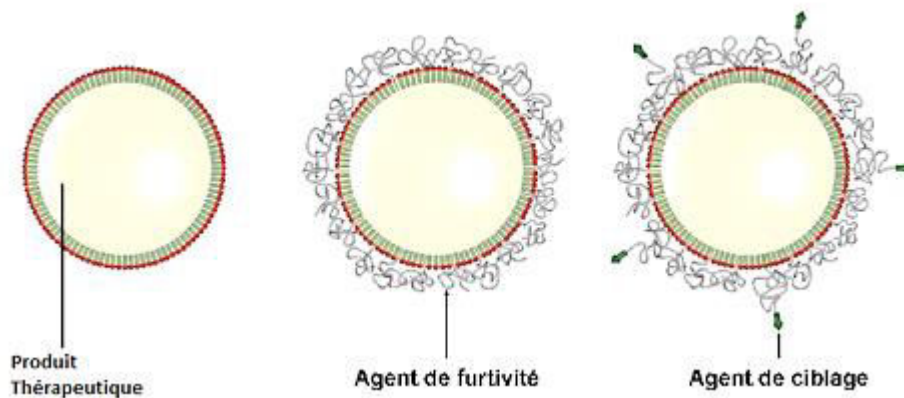


Figure 64 : Evolution des nanoparticules. Première génération : nanoparticule « nue » (à gauche). Deuxième génération : nanoparticules « furtives » (au centre). Troisième génération : nanoparticules « ciblantes » (à droite).

I-1. Nanoparticules de première génération : nanoparticules nues

Les nanoparticules de la première génération sont appelées « nanoparticules nues » du fait qu'elles ne possèdent pas de groupements fonctionnels spécifiques en surface. Elles sont généralement hydrophobes et présentent sur leur surface des groupements anioniques (Cohen-Sela et al., 2009).

Après leur injection par voie intraveineuse, les nanoparticules vont s'accumuler préférentiellement dans le système réticulo-endothélial (RES), généralement dans le foie, la rate et les reins. Ceci est dû à leur opsonisation rapide, quelques minutes après leur injection. En effet, ces nanoparticules sont rapidement reconnues comme des corps étrangers par les protéines cationiques présentes dans le sang qu'on appelle « opsonines ». Ces dernières vont s'adsorber sur la surface des nanoparticules pour favoriser leur reconnaissance par les macrophages et donc leur phagocytose (destruction par certains leucocytes appelés phagocytes) (Hillaireau et al., 2009). Ces nanoparticules ont été utiles pour le ciblage du cancer du foie et de la rate car les macrophages sont très nombreux dans ces organes, ce qui en fait leurs localisations préférentielles (Vauthier et al., 2008).

Afin de pouvoir atteindre la zone à soigner, il convient donc d'éviter la phagocytose en leurrant les défenses immunitaires ; on parle alors de furtivité.

I-2. Nanoparticules de deuxième génération : nanoparticules furtives

Les nanoparticules de première génération ont été améliorées par modification chimique de leur surface, en les recouvrant d'agents de furtivité, pour échapper à l'opsonisation, et ainsi permettre une augmentation de leur temps de séjour. Ainsi, il est possible de cibler des organes autres que ceux du système hépatosplénique mais aussi les tumeurs grâce à l'effet « EPR » (Chen et al., 2006). D'après les travaux de Pierre Gilles de Gennes (prix Nobel de physique 1991), les molécules présentes à la surface des particules vont créer un encombrement stérique empêchant la reconnaissance du vecteur comme corps étranger (Jeon et al., 1991). La plupart des agents de furtivité utilisés, sont des polymères hydrophiles tels que les polyéthylène glycol (PEG).

L'accumulation préférentielle des nanoparticules dans un tissu donné, nécessite la fonctionnalisation de leur surface par des agents de ciblage biologiques qui seront reconnus par les cellules présentes dans le tissu visé. On parle alors de nanoparticules de troisième génération.

I-3. Nanoparticules de troisième génération : nanoparticules ciblantes

Elles sont appelées aussi nanoparticules à reconnaissance moléculaire, elles permettent un ciblage spécifique des particules pour un type de cellule et ce, grâce à l'ajout d'agents de ciblage (anticorps, ligands, ...). Liés à la surface, ces agents vont permettre une accumulation préférentielle des particules dans les tissus à traiter et diminuer donc les effets secondaires dus à la non-spécificité et l'incorporation dans les tissus sains (Suh et al., 2009). Les nanoparticules vont être reconnues par les récepteurs présents dans la membrane cellulaire par la formation d'un complexe ligand-récepteur. Néanmoins, il est important de trouver un équilibre entre la furtivité nécessaire à la bonne circulation des nanoparticules et la reconnaissance pour les récepteurs (Vauthier et al., 2009). En effet, la quantité du ligand autour de la particule doit être suffisante pour favoriser le ciblage, mais pas trop importante pour ne pas défavoriser la furtivité surtout si le ligand est hydrophobe. Parmi les molécules greffées en surface de nanoparticules pour favoriser la reconnaissance avec un type cellulaire, on peut citer entre autres l'acide folique (Mittal et al., 2010), des anticorps monoclonaux ou des peptides (Kocbek et al., 2007).

I-4. Nanoparticules multifonctionnelles

Ces nanoparticules constituent une sorte de plateforme ou de noyau d'assemblage sur lequel différents agents viennent prendre place (figure 65). Leur concept a été décrit par Mauro Ferrari (Ferrari et al., 2005).

Elles regroupent :

- un ou plusieurs agents thérapeutiques,
- un agent de furtivité à leur surface pour éviter leur capture par les macrophages et augmenter leur temps de circulation dans l'organisme,
- des agents de perméation permettant de traverser les barrières biologiques (telle que la paroi des vaisseaux sanguins),
- un agent de ciblage greffé sur la nanoparticule pour un ciblage actif,
- enfin, un agent de contraste permettant son suivi dans l'organisme. Certaines NPs peuvent être suivies *in vitro* ou *in vivo* par imagerie optique, magnétique ou nucléaire en fonction de leurs propriétés (Pansare et al., 2012).

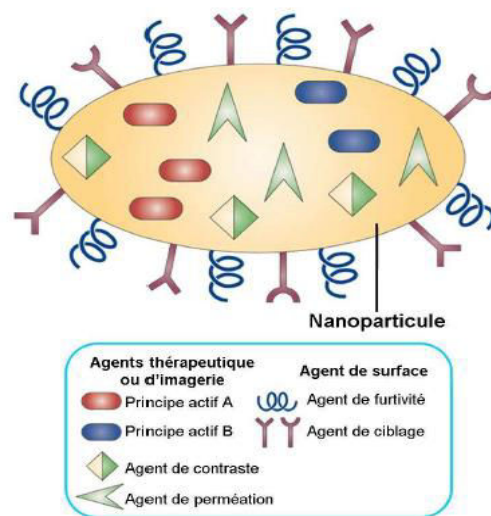


Figure 65 : Nanoparticule multifonctionnelle (Ferrari, 2005).

II- Classification des nanoparticules

En fonction de la nature chimique de leur structure, plusieurs catégories de nanoparticules sont utilisées en vectorisation (figure 66).

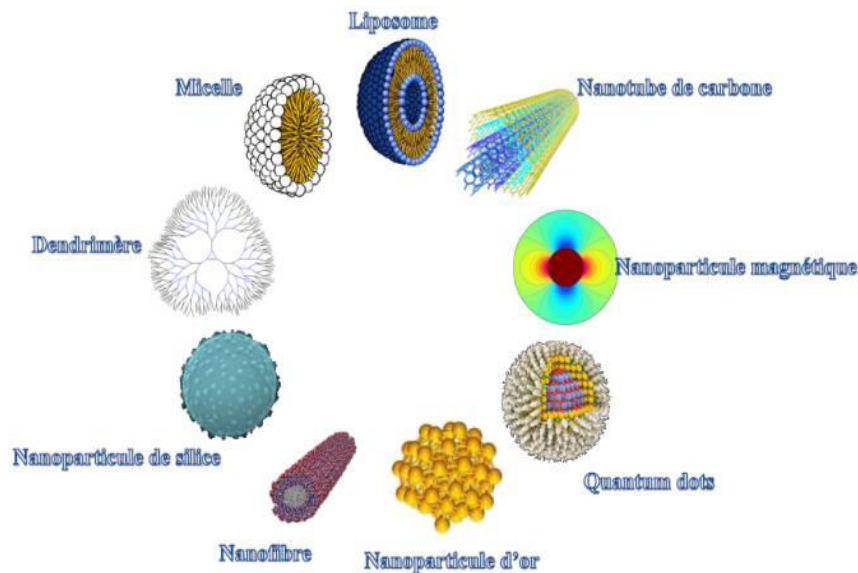


Figure 66 : Les différentes nanoparticules utilisées en thérapie.

II-1. Nanoparticules organiques

- Liposomes

Les liposomes sont des sphères artificielles constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques. Ils sont utilisés depuis de nombreuses années comme transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie (Gregoriadis et al., 1976). Le principe actif est contenu au centre de la sphère quand il est hydrophile, ou dans la bicouche quand il est hydrophobe. Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces nano-objets des systèmes très intéressants pour des applications *in vivo*.

Cependant, les liposomes peuvent présenter quelques limitations, ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche et un relargage précoce des molécules hydrophiles (Pinto-Alphandary, 2000).

- Micelles

Les micelles sont constituées d'une couronne de molécules amphiphiles entourant un cœur non solide (Letchford et al., 2007). Leur taille varie entre 10 et 100 nm et elles se forment lorsque la concentration en surfactant dépasse un seuil nommé Concentration Micellaire Critique (CMC) (Kabanov et al., 2002). En milieu aqueux, les molécules amphiphiles regroupent leurs parties hydrophobes et exposent en surface leurs domaines hydrophiles. En milieu organique en revanche, ce sont les parties hydrophiles qui sont exposées dans le cœur de la micelle. Leur facilité de préparation ainsi que leur capacité à incorporer des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes font d'elles des nanoparticules intéressantes. De plus,

des études ont montré que l'organisation stérique particulière de la couronne des micelles permet de les protéger de l'opsonisation (Kataoka et al., 2000).

- Nanocapsules

Les nanocapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide lipidique ou aqueux entouré par une mince paroi (Vauthier et Bouchemal, 2009). Les principes actifs, hydrosolubles ou non, sont généralement incorporés dans le réservoir. Les nanocapsules peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique (Letchford et al., 2007).

- Nanoémulsions

Les nanoémulsions présentent une classe d'émulsion très particulière ; elles présentent une taille de gouttes entre 20 et 200 nm obtenues par dispersion d'un mélange de phases huile/eau. Ces gouttes sont stabilisées par un surfactant (Podlogar et al., 2004), (Seki et al., 2004), (Tadros et al., 2004). Leur grand pouvoir d'encapsulation ainsi que l'absence de toxicité font d'elles un système très prometteur pour la délivrance contrôlée de médicaments. Du fait de leur grande stabilité en suspension, de leur formulation très simple et facilement transposable à l'échelle industrielle, les nanoémulsions sont très utilisées en formulation pharmaceutique notamment dans la formulation d'agents de contraste pour l'imagerie ciblée.

Les nanoémulsions peuvent aussi servir de base pour la fabrication de nanocapsules ou nanoparticules polymériques.

- Nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques les plus connues sont biodégradables telles les poly(alkylcyanoacrylates) (PACA). Ces nanoparticules se dégradent selon un mécanisme de bioérosion de surface induite par l'hydrolyse enzymatique (Nicolas et al., 2009), (Vauthier et al., 2007). On peut citer également les nanoparticules de poly(lactide-glycolide acide) PLGA, les polypeptides, polynucléotides ou les polysaccharides (Kumar et al., 2006). Les dendrimères sont également des complexes polymériques de taille comprise entre 1 et 10 nm. Ils sont constitués de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel (Boas et al., 2004). Ces constructions polymériques fortement branchées ont une structure bien contrôlée (Sahoo et al., 2003). Les molécules transportées sont insérées entre les branchements ou associées chimiquement à ceux-ci. Les propriétés des dendrimères dépendent de la nature chimique du cœur moléculaire et des branchements.

Les nanogels sont également des complexes polymériques. Contrairement aux dendrimères, les chaînes polymériques hydrophiles des nanogels, ne sont pas fortement enchevêtrées les unes dans les autres, ce qui leur attribue une flexibilité plus importante et augmenterait leur surface spécifique et ainsi leur capacité d'encapsulation (Vinogradov et al., 2002) et (Oh et al., 2008).

- Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Leur cœur est constitué de lipides à l'état solide. Ces lipides peuvent être des triglycérides hautement purifiés, des mélanges de glycérides ou des cires (Wong et al., 2007).

Ces nanoparticules stables ont une capacité d'encapsulation de molécules lipophiles supérieure à celles des liposomes et avec un meilleur contrôle de relargage.

II-2. Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont utilisées aussi bien pour le traitement que pour le diagnostic et ce grâce à leurs propriétés particulières de biocompatibilité, de magnétisme, de conductivité, de résistance, de fluorescence (Huang et al., 2011).

Parmi les plus connues, on retrouve les nanoparticules d'or connues pour leur propriétés d'optique, d'électrochimie et pour leur biocompatibilité (Boisselier et al., 2009). On retrouve aussi les nanoparticules d'argent connues pour leurs propriétés antibactériennes (Chaloupka et al., 2010) et les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques pour leur utilisation en imagerie médicale (Neuwelt et al., 2009), (Cheon et al., 2008). Les nano-cristaux semi-conducteurs tels que les Quantum Dots (QD), présentent une forte fluorescence (Li et al., 2011), (Michalet et al., 2005) et (Cai et al., 2006).

III- Place des nanoparticules en thérapie photodynamique

III-1. Nanoparticules organiques

Plusieurs des nanostructures citées précédemment présentent des avantages qui font d'elles des candidats potentiels pour la PDT. Dans le cadre d'un traitement par PDT, les structures polymériques présentent plusieurs avantages : une capacité de chargement en PS élevée et un relargage de PS contrôlé. Allémann et ses collaborateurs ont encapsulé la ZnPcF16 dans des particules d'une taille moyenne de 1 μm constituées de poly(éthylène glycol) et enrobées avec de l'acide polylactique (Allémann et al., 1996). Ils ont obtenu un taux d'encapsulation relativement faible (0,61%) et pourtant, ont observé une nette amélioration de l'activité photodynamique de cette formulation sur des cellules cancéreuses EMT-6 chez la souris par rapport à une émulsion de ZnPcF16 libre.

Moreno et ses coéquipiers ont eux aussi synthétisé des nanoparticules polymériques de 25 nm de diamètre à base de polyacrylamide (PAA) encapsulant du $\text{Ru}(\text{dpp}(\text{SO}_3)_2)_3$ (Moreno et al., 2003). Les nanoparticules obtenues présentaient un rendement quantique de production d'oxygène singulet élevé. Néanmoins, la matrice « quençait » l'émission du $^1\text{O}_2$. Ce n'est qu'après modification de la surface de ces nanoparticules par des fonctions amines (AFPAA) (pour amine-functionalized PAA) qu'ils ont

constaté que les groupements amines introduits pouvaient réagir avec les récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses.

Les nanoparticules polymériques biodégradables ont aussi fait l'objet de différents travaux dans le cadre de l'amélioration de la PDT. Parmi elles, on peut citer les nanoparticules à base de silice. L'équipe de Prasad a incorporé de manière covalente un PS hydrophobe, la HPPH dans des nanoparticules de silice ORMOSIL (pour « organically modified silica ») d'environ 20 nm (Prasad et al., 2007). Cette équipe a constaté que les molécules de PS incorporées conservaient bien leurs propriétés photophysiques et leur activité phototoxique en générant de l'oxygène singulet et que les nanoparticules étaient reconnues par les cellules tumorales. L'avantage de cette nanoformulation est le couplage covalent du PS à la nanoparticule.

III-2. Nanoparticules inorganiques

Nous avons rassemblé dans une revue en 2012 l'état des lieux sur l'utilisation de différentes nanoparticules inorganiques pour la PDT (Chouikrat et al., 2012). Cette revue est jointe ci-après.

Non Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy Applications: Recent Developments

R. Chouikrat^{1,3}, A. Seve^{1,2}, R. Vanderesse^{#,2}, H. Benachour⁴, M. Barberi-Heyob^{#,4}, S. Richeter⁵, L. Raehm⁵, J.-O. Durand⁵, M. Verelst³ and C. Frochot^{*,#,1}

¹Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, Nancy-Université, 1, rue Grandville, BP 451, 54001 Nancy Cedex, France

²Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR CNRS-INPL 7568, Nancy-Université, 1 rue Grandville, BP 451, 54001 Nancy Cedex, France

³Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales, Université de Toulouse - UPS, 29 rue Jeanne Marvig, BP 94347, 31055 Toulouse, Cedex 4, France

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy, UMR 7039, Nancy-Université, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Brabots, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

⁵Institut Charles Gerhardt Montpellier, UMR 5253 CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Equipe Chimie Moléculaire et Organisation du Solide, CC1701 Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Abstract: Photodynamic therapy has emerged as an alternative to chemotherapy and radiotherapy for cancer treatment. Nanoparticles have recently been proposed as effective carriers for photosensitizers. Depending on their chemical composition, these can be used for diagnosis and therapy due to the selective accumulation of the photosensitizer in cancer cells *in vitro* or in tumors *in vivo*. Multifunctional nanoplateforms combining several applications within the same nano-object emerge as potential important theranostic tools. This review, based on the chemical nature of the nanoparticles will discuss recent advances in the area of non polymeric nanoparticles for photodynamic therapy applications.

Keywords: Nanoparticle, photosensitizer, photodynamic therapy, reactive oxygen species, nanomedicine.

INTRODUCTION

Over the last few years, photodynamic therapy (PDT) has emerged as an alternative to chemotherapy and radiotherapy for the treatment of various diseases including cancer [1, 2]. It involves the use of light, photosensitizers (PS) and oxygen. The excitation of photosensitizers (PSs) with light of an appropriate wavelength leads to energy or electron transfer to neighboring oxygen or substrate molecules [3]. Reactive Oxygen Species (ROS) and singlet oxygen (¹O₂) which are commonly accepted to be the main cytotoxic species are formed and lead to the destruction of cancer cells by both apoptosis and necrosis. The efficacy of PDT depends on the photosensitizer's ability to produce ROS and ¹O₂, oxygen availability [4], light dose and photosensitizer concentration in the treated area.

PDT is an alternative treatment approach to cancer treatment. However, the clinical efficiency of this technique is often limited by the difficulty in administering mostly hydrophobic photosensitizers intravenously, low photodynamic yield of the hydrophobic photosensitizers due to their aggregation in solution, inadequate pharmacokinetic due to the low water solubility of the majority of the photosensitizers used, and the low selectivity towards malignant tissues.

To improve the accumulation of photosensitizers into the desired area, anticancer therapy tends towards creating hybrid molecules composed of a photo-activatable principle associated with a recognition module. Conjugation of a photosensitizer with targeting modules such as sugars [5] or folic acid [6], which have a particular affinity for the cognate receptors present in abnormally large numbers on the tumor surface, leads to a significant and selective increase in cellular incorporation, and therefore of photodynamic activity. Even if a great deal of effort has been made

in developing third generation PS with a covalently linked vector to target receptors over-expressed in cancer cells, very few have been evaluated for clinical applications mainly because their *in vivo* selectivity was not high enough [7].

New improvements concern the use of nanoparticles that can work as carrier for anti-cancer agent delivery. An indication of the level of interest in nanoparticles for therapeutic applications is illustrated by the number of reviews that have been written in the last two years on nanoparticles and citing PDT in control of oral biofilm [8] antimicrobial PDT [9] and in combination with other anti-tumor modalities [10]. They do indeed have many advantages such as good colloidal stability, effective protection of encapsulated drug against enzymes and hydrolysis, surface tailorability and multifunctionality, and relatively easy to prepare. More importantly, thanks to their size, nanoparticles allow the selective accumulation of the PS in cancer cells due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect of tumor tissues [11]. In 2010, an overview of the different methods for the synthesis of silica-based nanoparticles, from the pioneering works to the latest achievements, was provided by our team [12]. In a book chapter, we also described the main nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix for PDT applications [13]. Since then, two reviews and a book chapter have been devoted to the use of nanoplateforms to improve PDT applications [14-16].

In this review we will focus on the latest works related to nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix except quantum dots. Liposomes, micelles [17-21], low-density lipoprotein [22], polymer-based [23-29], lipid nanoparticles [30], HAS [31-34], hydrogel or nanogel [35, 36], chitosan [37-40], dendrimers [41] and pluronic [42] will not be described here.

NANOPARTICULAR SYSTEM FOR PDT

The development of nanoparticles-based photosensitizers can overcome most of the shortcomings of classic photosensitizers such as liver accumulation [43-45]. The different types of nanoparticles designed for PDT applications are shown in Fig. (1).

*Address correspondence to this author at the Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR 3349, Nancy-Université, 1, rue Grandville, BP451, 54001 Nancy Cedex, France; Tel: 33 (3) 83 17 51 15; Fax: 33 (3) 83 32 29 75; E-mail: celine.frochot@ensc.inpl-nancy.fr

#GDR 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

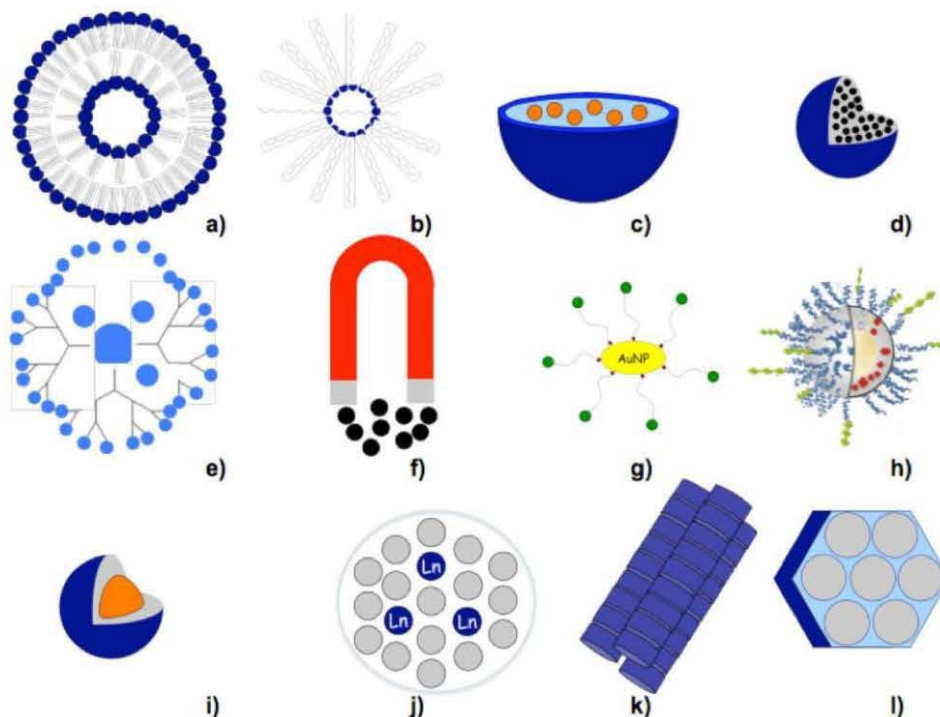


Fig. (1). Main nanodrugs used for cancer treatment and diagnosis.

Biodegradable nanoparticles

a) Liposomes – Polymeric NPs; b) polymeric, c) capsules, d) nanospheres – e) dendrimer.

Non-biodegradable nanoparticles carriers

*passive nanoparticles: f) magnetic, g) gold, h) multifunctional silica, k) nanotubes, l) zeolite

*active nanoparticles: i) quantum dot, j) up-converting NPs.

Their composition characteristics for drug delivery in cancer are: [43]

- Polymeric nanoparticles that can be made biodegradable by an appropriate choice of composition and structure.
- Their surfaces can be modified with functional groups possessing a diverse array of chemical or biochemical properties. The nanoparticles can be tailored with compositions so that they do not undergo enzymatic degradation and thus effectively protect the encapsulated probes or drugs.
- Due to their sub-cellular and nanometer size, they can penetrate deep into tissues through fine capillaries and pass through the *fenestrae* into the epithelial lining the blood vessels.

Depending on their chemical composition, they may be:

- resistant to microbial attack (for example silica nanoparticles))
- immunogenic, not eliciting any immune response when introduced in the body's circulatory system, which often leads to severe consequences by shutting off or clogging up the circulatory system (for example small nanoparticles with hydrophilic surfactant)
- produced in an optically transparent form. Therefore, light activation and optical probing can readily be accomplished.

They can have higher extinction coefficients than organic dyes.

- Nanoparticles are more photostable than organic dyes for *in vivo* applications.
- Polymeric nanoparticles provide three different structural platforms for diagnosis and therapy namely:
 - i. an interior volume in which various probes and therapeutic agents can be encapsulated;
 - ii. a surface which can be functionalized to attach targeting groups to carry the nanoparticles to cells or biological sites expressing appropriate receptors. In addition, the surface can bind to specific biological molecules for intracellular delivery (such as DNA in gene therapy). The surface can also be functionalized to introduce a hydrophilic (polar), hydrophobic (non-polar) or amphiphilic character to enable dispersibility in a variety of fluid media; and
 - iii. pores in the nanoparticles, which can be tailored to be of specific sizes to allow selective intake or release of biologically active molecules or to activate therapeutic agents. Thus the area of mesoporous polymers with controlled porosity is of intense current activity and interest.

- They can be used for different therapies (e.g. radiotherapy, hyperthermia).

A possible classification of nanoparticles used for PDT relies on their chemical composition. In this review, we will only discuss the most recent developments nanoparticles possessing a three dimensional rigid matrix in (references in bold in Table 1) which were not described in our previous reviews [12, 44] or chapter book [13]. Table 1 shows an overview of all the non polymeric nanoparticles based PDT systems except quantum dots with the type of nanoparticle, their size, the photosensitizer that has been encapsulated (E) or covalently linked and *in vitro* or *in vivo* experiments.

GOLD NANOPARTICLES

Among all the metal nanoparticles, gold NPs (AuNPs) are receiving the greatest attention mainly due to a combination of unique properties that lend themselves to multiple applications such as labeling, delivery, heating and sensing. Moreover, due to localized surface plasmon resonances, it has been recently demonstrated that the field enhancement of the incident light around gold nanoparticles could be used to increase the excitation efficacy of the photosensitizer [133]. Reum *et al.* worked on the functionalization of gold surface nanoparticles using a layer by layer technique (14.5 nm diameter) [58, 59]. Citrate-stabilized gold nanoparticles negatively charged were encapsulated with a poly(allylamine hydrochloride) (PAH) layer. A *m*THPP-polystyrene sulfonate complex (PSS/*m*THPP) was prepared and increased the solubility of *m*THPP in water. π - π interactions and hydrogen bonds were involved in the immobilization of *m*THPP as shown by docking studies. The negatively charged complex was then adsorbed on the surface of the PAH-gold nanoparticles. Five layers, three PAH and two PSS/*m*THPP were used to embed the gold nanoparticles and 1035 *m*THPP molecules by gold nanoparticle were encapsulated. Unfortunately, no PDT experiments were performed.

The team of D. Russell was the first to develop in 2002 phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles as potential delivery vehicle (Table 1). The same team studied the *in vivo* efficacy of the C11Pc phthalocyanine derivative and the corresponding AuNP-C11Pc conjugates (2-4 nm) for the PDT of amelanotic melanoma (B78H1 cells) sub-cutaneously transplanted on mice [54]. Interestingly, the AuNP-C11Pc conjugates were found to target cancer tissues more selectively and to induce a more extensive PDT response compared to the free C11Pc photosensitizer. Moreover, longer blood circulation and greater accumulation in most organs were observed with AuNP-C11Pc conjugates. Vascular damage observed by electron microscopy suggested that the PDT efficacy can be explained by an anti-angiogenic action promoted by the AuNP-C11Pc conjugates. More recently, they described the vectorization of AuNP-C11Pc conjugates for PDT of breast cancer cell lines by functionalizing the AuNPs surface with a heterobifunctional polyethylene glycol HS-PEG-COOH 3000 *via* S-Au linkage and by attaching anti-HER2 monoclonal antibodies to the PEG chain *via* an amide linkage [57]. Anti-HER2 antibodies are able to specifically target HER2 epidermal growth factor cell surface receptors overexpressed on the surface of breast cancer cells like SK-BR-3. Thus, anti-HER2 antibodies were found to enhance the selective targeting of this type of breast cancer cell and through the efficacy of the 4-component "antibody-C11Pc-PEG-AuNPs" conjugates for PDT applications.

In another study, Zaruba *et al.* synthesized and immobilized two porphyrin-brucine quaternary ammonium salts on gold nanoparticles (14.7 nm diameter) [55]. The porphyrin-brucine systems were incubated with mouse mammary carcinoma cell line 4T1. Confocal microscopy experiments demonstrated the localization of the porphyrin derivatives in the lysosomes. *In vitro*

PDT experiments showed that porphyrin-brucine alone were more effective for cancer cell death than when immobilized on gold nanoparticles. However *in vivo* experiments revealed a higher PDT efficacy of the porphyrin system bonded on the gold nanoparticles due to the interactions of plasma proteins with the nanoparticles, and an enhanced EPR effect, resulting in the potent accumulation of the nanoparticles in tumors.

PEG molecules grafted on the surface of AuNPs prevent their aggregation and non-specific binding. Cheng *et al.* used these ligands to encapsulate silicon phthalocyanine 4 (*Pc4*) photosensitizer through Van der Waals interactions. Drug release experiments showed that *Pc4* molecules were released within the first two hours, and that tumor cells accumulated the drug [51]. Moreover, *in vivo* experiments showed an enhanced accumulation of *Pc4* molecules in tumor sites of cancer-bearing mice. The AuNP-*Pc4* conjugates dramatically decreased the drug delivery time necessary for PDT from two days to two hours compared to free *Pc4* molecules. The efficacy of PDT can be deduced by observing a decrease of the tumor volume which became necrotic. Cheng *et al.* also showed that drug delivery into HeLa cancer cells, and thus PDT efficiency were strongly affected by the nature of the bond between the photosensitizer and the AuNPs [134]. Non-covalent interactions between AuNPs and *Pc4* molecules were essential for effective drug release and a significant uptake of the photosensitizer into the cells. *In vivo* biodistribution of *Pc4* in rat glioma (9 L) cancer bearing-mice confirmed this fact and showed a rapid accumulation of the photoactive drug within the tumor tissue [56]. Moreover, this study allowed the authors to determine a PDT time window from 1 to 6 hours after intravenous injection. The possible mechanism involves Au-NP-*Pc4* accumulation in tumors, the release of the drug from the nanoparticle and its transport into the cytoplasm of tumor cells by low density lipoproteins and other hydrophobic molecules. The 7-days test period also showed rapid drug and AuNPs excretion by renal clearance and the hepatobiliary system.

SILICA NANOPARTICLES

Among the variety of nanoparticles, silica-based nanomaterials have very recently emerged as promising vectors for PDT applications. Silica nanoparticles are indeed chemically inert and the silica matrix porosity is not susceptible to swell or change with a varying pH. A variety of precursors and methods are available for their synthesis allowing flexibility and thus meaning numerous PDT drugs can be encapsulated. Furthermore, particles size, shape, porosity and mono-dispersibility can be easily controlled during their preparation [12]. Moreover silica nanoparticles are especially suitable for PDT since they do not release the photosensitizer but allow O₂ and ¹O₂ to diffuse in and out through the shell of silica nanovehicles, reducing the risk of toxicity and vascular clogging caused by free PSs aggregate into clusters in blood.

Non Covalent Encapsulation of PS In Silica Nanoparticles

Following the pioneering work of Prasad and Kopelman groups [60, 61], several researchers have tried to encapsulate PS inside silica nanoparticles (Table 1). In 2003, the precursor work of Kopelman led to the encapsulation of *meta*-tetra(hydroxyphenyl) chlorin or Foscan[®] into silica nanoparticles [60]. The same group published the encapsulation of methylene blue [62] or more recently polyacrylamide-based (PAA) nanoparticles were engineered for the intracellular delivery of active agents. Qin *et al.* encapsulated two different methylene-blue derivatives PS in PAA nanoparticles *via* covalent linking, allowing the protection of the methylene derivatives from enzymes in the biological environment. After attachment of F3 peptide groups for targeting, each type of nanoparticle was tested *in vitro* for PDT with MDA-MB-435 tumor

Table 1. Three Dimensional Rigid Matrix Nanoparticles (Except Quantum Dots) for PDT Applications

Type of nanoparticles	Size (nm)	PS	C/E	Phototoxicity test. <i>In vitro</i> model	Ref.(s)
Gold	2-4	Zn Pc	C	-	[46]
	2-4	Zn Pc	C	human malignant cervical cells (Hela)	[47]
	8-25	cholinium-Purpurin-18	C	Human lung carcinoma cell, A596	[48]
	30	ALA	E	human neonatal dermal fibroblast and human fibrosarcoma (HT1080)	[49]
	5	$Pc4$	C/E	human malignant cervical cells (Hela)	[50, 51]
	L: 35 W: 9	Toluidine blue O	C	bacteria	[52]
	L: 35 W: 9	Indocyanine green	C	human lung carcinoma malignant cell line (A549)	[53]
	2-4	C11 Pc	C	C57 mice-amelanotic melanoma	[54]
	15	Porphyrin-brucine	E	PE/CA-PJ34 squamous cell carcinoma cells line	[55]
	5	$Pc4$	C/E	Rat glioma cancer cells (9 L) (overexpressing EGFR + TTR)	[56]
	4	C11 Pc	C	breast cancer cell lines (SK-BR-3 - MDA-MB-231)	[57]
	15	mTHPP	E	-	[58, 59]
	Silica	180	mTHPC	E	-
30		HPPH	E	UCI-107, human epithelial ovarian carcinoma, Hela	[61]
160		Methylene blue	E	C6 (rat glioma)	[62]
10		fullerene	C	-	[63]
30		HPPH+BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[64]
25		HPPH	E	-	[65]
20		IP	C	colon 26	[66]
130		Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[67, 68]
55-90		PpIX	C	-	[69]
25		PPIX	E	human malignant cervical cells (Hela)	[70]
30		mTHPC	E	human oesophageal cancer cells KYSE 510	[71]
25-30		$Pc4$	E	melanoma cells (A-375 and B16-F10)	[72]
60		Two-photon absorption PS	E	macrophages	[73]
105		Methylene blue	E	human malignant cervical cells (Hela) + balb/c nude mice	[74]
110		PpIX	C	human malignant cervical cells (Hela)	[75]
70-100		PdTPP	C	breast cancer cell line (MDA-MB-231), glioblastoma cells (U87-MG)	[76]
160		Anionic porphyrin	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[77]
57		hematoporphyrin	C	HO-8910 PMcells	[78]
10, 25, 60		PpIX	E	colon cancer cell line (HCT 116) and HT29, A431, LLBC37, MDA-MB-231	[79]
110		Hypocrellin A	E	human malignant cervical cells (Hela)	[21]
100		Hypocrellin B	E	breast cancer cell line (MCF-7)	[80]
50-80		Rose bengal	C	Staphylococcus aureus (MRSA) and Staphylococcus epidermis.	[81]
78-150		porphyrin	C	breast cancer cell line (MDA-MB-231)	[82]
50		TPP	E	-	[83]
10-200		PpIX	E	HCT 116 (colon cancer line)	[84]
8-14	TPC	C	MDA-MB-231 breast cancer cell line	[85]	
Silica NaYF $_6$ /Yb $^{3+}$, Er $^{3+}$	60 - 120	merocyanin	E	breast cancer cells lines (MCF-7/AZ)	[86]
	30	IPPII-BDSA	E	human malignant cervical cells (Hela)	[65]
	35-60	Zn Pc	E	bladder cancer cell lines (MB49)	[81, 87]
	30	Chlorin e6 TCPP	E	-	[88]
	30	Chlorin e6	C	Hela cells 4T1 murine	[89]

(Table 1). Contd....

Type of nanoparticles	Size (nm)	PS	C/E	Phototoxicity test. <i>In vitro</i> model	Ref.(s)
silicon	3-4	-	-	mouse fibroblasts	[90]
	2.4	-	-	-	[91]
Carbon nanotube	-	Chlorin e6	E	-	[92]
	-	Bodipy-based PS	E	-	[93]
	-	phenosafranine and Nile Blue	E	BHK-21(mouse fibroblast)	[94]
TiO ₂	300	-	-	HeLa T-24 human bladder cells	[95, 96]
	-	-	-	human LoVo cancer	[97]
	-	Chlorin e6	E	human malignant cervical cells (HeLa)	[98, 99]
	-	Chlorin e6	E	cancer murine thymic lymphoma (EL-4)	[100]
	150	-	-	MCF-7 breast cancer cell line	[101, 102]
	1	Zn <i>Pc</i>	E	HepG2, THP-1, HDFs cells, Leishmania parasites	[103, 104]
	100-175	-	C	HepG2 cancer cells	[105]
	10	-	-	human malignant cervical cells (HeLa)	[106]
	40	-	-	U251 human glioblastoma cell line	[107, 108]
6	-	-	C32 cells	[109]	
ZnO	5	<i>meso</i> -tetra (<i>o</i> -amino phenyl) porphyrin	C	human carcinoma NIH:OVCA3 cells	[110]
	3-4	TPP, H ₂ TPP(NH ₂), and ZnTPP(NH ₂) ₂	C	-	[111, 112]
	4	daunorubicin	-	SMMC 7721 cells	[83, 113, 114]
Mg-Al hydroxides	4	PpIX	E	-	[111, 115]
Ca-phosphate	100	<i>m</i> THPP Methylene Blue	E	HT29 colon cancer cells, HIG-82 synoviocytes, J774A.1 macrophages	[116]
zeolite	50	tetra-tert-butyl-substituted Si ^{IV} phthalocyanine dihydroxyle	C	E. Coli and N. Gonorrhoeae bacteria	[117]
Iron oxide + PAA or Silica	30-60	Photofrin [®]	E	MDA-MB-435 human breast cancer	[118]
	30-60	Photofrin [®]	E	9L (rat glioma)	[119]
	40	Photofrin [®]	E	MDA-MB-435 human breast cancer + 9L (rat glioma)	[120]
	30	Methylene blue	E	-	[121]
	55	Ir(III) complex	C	human malignant cervical cells (HeLa)	[122]
	33	TPHC	C	RAW 264.7 and U937 cells	[123]
	50	TPHC	C	apolipoprotein E deficient (apoE ^{-/-}) mice	[124]
	20-30	Purpurin-18	E	-	[125]
	20-30	PHPP	E	SW480 colon carcinoma cells	[126]
	25	HPPH	E	RF-1 tumor cells	[127]
	30-50	PHPP	E	-	[125]
	50	Zn <i>Pc</i>	C	human Hepatoma cells QGY-7703, HeLa cells	[128]
Polyacrylamide	13-18	MB derivatives	C	human breast cancer cells (MDA-MB-435)	[129]
Co/Fe/Mo	8	Chlorophyllin	E	gingival fibroblasts cells	[130]
Fe ²⁺ , Fe ³⁺	20	Ce6	C	MGC803 cells	[131]
nano-BMPF	136	fullerene	E	-	[132]

Size: hydrodynamic diameter in nm; PS: photosensitizer; C/E: C covalently coupled, E encapsulated; BTB: Bromothymol Blue; BCP: Bromocresol Purple; BDSA: 9,10-bis [4'-(4''-Aminostyryl)styryl]-anthracene; BMPF: bismethanophosphonate fullerene; C11Pc: Zn(II)-phthalocyanine disulphide; HPPH: 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide; IP: iodobenzylpyropheophorbide; Mo-Chl: molybdenum chlorophyllin; MSN: mesoporous silica nanoparticles; *meso*-tetra(*o*-aminophenyl) porphyrin; *m*THPPC: *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin; *m*THPP: *meso*-tetrahydroxyphenyl porphyrin; PC: phthalocyaninedihydroxyle; *Pc*4: silicon phthalocyanine 4; *Pc*19: Silicon phthalocyanine 219; PHPP: 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin; PpIX: Protoporphyrin IX; PdTPP: Pd-*meso*-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin; PHPP: 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin; TCPP: *meso*-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin; TPHC: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-2,3-dihydrochlorin; TPP: *meso*-tetraphenyl porphyrin; Zn*Pc*: Zinc(II) phthalocyanine; *:*: not specified.

cells. Both kinds of nanoparticle resulted in effective tumor cell killing and did not cause dark toxicity [129].

Thienot *et al.* also described in 2010 one pot synthesis of hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment [84]. These nanoparticles are made of PpIX silica-based nanocarriers with bilayer coating of triethoxyvinylsilane. One of the advantages of this synthetic strategy is that these nanocarriers may be tuned within the nanometer range from 10 nm to 200 nm by control of the temperature, reagents quantities and co-surfactant agent. The PpIX silica-based nanocarriers show efficient accumulation within tumors. The generation of $^1\text{O}_2$ was determined chemically by bleaching of DPBF.

Two-photon absorption (TPA)-induced excitation of photosensitizers is a promising approach for increasing light penetration [135] as well as up-conversion, in which excitation light at a longer wavelength produces emission at a shorter wavelength. This concept of photon up-converting nanoparticles (PUNPs) for PDT was first published by Zhang *et al.* [86]. $\text{NaYF}_4/\text{Yb}^{3+}$, Er^{3+} nanoparticles have been used as PUNP and coated with a PS (Merocyanine 540)-encapsulating porous thin layer of silica. Recently, the team of Zhang *et al.* described sodium yttrium fluoride up-conversion nanoparticles as a carrier for zinc(II)-phthalocyanine. Mesoporous silica was coated onto NaYF_4 nanocrystals to form a core-shell structure loaded with *ZnPc*. Upon irradiation at 980 nm, they proved that the PUNP activated the PS and showed a strong photodynamic effect on MB49 cells [81, 87]. Wang and his team published pegylated NaYF_4 PUNP loaded with a chemotherapy molecule doxorubicin physically adsorbed and targeted by folic acid. To test whether their drug loading could be applied to PDT, they incubated the PUNP with C66 and TCPP and showed a loading capacity of 8.6 % (w/w) and 7.3% (w/w) respectively [89]. More recently, they were the first team to demonstrate *in vivo* NIR-induced PDT based on PUNPs in animal experiments [89]. In this work, they loaded Ce_6 onto NaYF_4 based PUNP functionalized by polyethyleneglycol. Their main conclusion is that although $^1\text{O}_2$ formation is more effective using direct excitation of Ce_6 at 660 nm than excitation at 980 nm, the PUNP offers terrifically improved tissue penetration depth and could be preferable for the treatment of large or internal tumors.

Covalent Encapsulation of PS In Silica Nanoparticles

When physically entrapped inside the silica network, the PS may be prematurely released from the carrier which can lead to a reduced efficiency of treatment and to side-effects. Covalent coupling of the PS inside or at the surface of the nanoparticles is expected to overcome these drawbacks. Moreover, further progress in the field of silica nanoparticles for PDT was achieved when multifunctional particles were functionalized by a biomolecule able to specifically target cancer cells. Active targeting represents an obvious field for improvement for PDT. Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting-photosensitizers focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves even if anti-vascular strategies are becoming more and more important [7, 43, 136]. For reviews see [137, 138]. Our team [82] described the synthesis of Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN), which covalently incorporate original water-soluble porphyrins. PDT was performed on MDA-MB-231 breast cancer cells and all the nanoparticles showed a significant cell death after irradiation. The PDT efficiency of the nanoparticles was not only correlated with the $^1\text{O}_2$ quantum yield but also by cellular uptake and subcellular localization of the nanoparticles in the organelles. The most effective pathway consists of functionalizing the surface of the nanoparticles with α -mannose in order to promote an active endocytosis of the nanoparticles by cancer cells. We showed that the quantity of mannose on the surface should be carefully adjusted as too high an amount of mannose impairs the

phototoxicity of the nanoparticles. The data demonstrated that the optimization of the different parameters of these multifunctional nanoparticles is a relevant prerequisite before their *in vivo* PDT application.

More recently [85], we conjugated a second generation photosensitizer, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) and around four ATWLPPR peptide units to a hybrid gadolinium oxide nanoparticle that could be useful for magnetic resonance imaging (MRI) and PDT. Hydrodynamic diameter of the nanoparticles was comprised between 8 and 14 nm whereas the Gd_2O_3 core had a hydrodynamic diameter of 3.8 nm. Nanoparticles conferred photosensitivity on MDA-MB-231 breast cancer cells over-expressing neuropilin-1, providing evidence that TPC-grafted within the nanoparticle matrix can be photoactivated to yield photocytotoxic effects *in vitro*. For the first time, molecular affinity was tested for peptide-functionalized nanoparticles, and the presence of four peptides ligand per nanoparticle was seemingly found to lead to a positive cooperativity in binding of ATWLPPR to NRP-1 protein.

CARBON NANOPLATFORMS

Single (SWNTs) or multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) can be used as delivery agents for PDT photosensitizers. Carbon nanotubes present several advantages. It has been shown that they are internalized by mammalian cells [139] through endocytosis [140] even if other mechanisms can occur [141], they are excreted from the body rapidly and present no significant cytotoxicity [142], they can be modified chemically [143, 144] but non covalent associations are also possible. Since the publication of our book chapter [13] no new work has been devoted to carbon nanotubes although one study covers the use of fullerene [132]. Indeed, fullerene and its derivatives have been extensively studied in the biomedical field. Their biological activities towards various cell types have been reported, and previous results have highlighted their potential uses as photosensitizers in photodynamic therapy of tumor and photoinactivation of bacteria and viruses, antioxidative/cytoprotective reagents and carriers for drug delivery. In a recent publication, Yang *et al.* [132] described the effects of a BMPF (bismethanophosphonate fullerene) on matrix-related gene expression. Mediation of BMPF into water by DMSO leads to formation of an aqueous suspension of nanoparticles with an average size of 136.3 nm (nano-BMPF). These nanoparticles could induce a down-regulation of gene expression of matrix proteins aggrecan, type I and type II collagen and an up-regulation of gene expression of matrix metalloproteinase 3. IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist), but not IL-1 receptor 1, was transcriptionally inhibited by nano-BMPF. This data indicated a disc degeneration-inducing activity of nano-BMPF, raising concerns regarding possible adverse effects, while a fullerene-based treatment of disc diseases is employed.

TiO₂ZNO NANOPARTICLES

TiO₂ Nanoparticles

The application of TiO₂ nanoparticles in life science is attracting more and more attention since the first report of photocatalytic disinfection by Matsunaga *et al.* in 1985 [145]. In recent years, TiO₂ nanoparticles were used in the field of phototherapy of malignant cells, and have been viewed as the potential photosensitizing agents for PDT due to their unique phototoxic effect upon the irradiation [95, 146-151]. In 2010, Tessy Lopez group investigated the possible synergy of zinc phthalocyanines (*ZnPc*), supported on TiO₂ nanoparticles and probed their *in vitro* photoactivity using visible light, on cancer cells and Leishmania parasites [103, 104]. They studied the photosensitizing effect of *ZnPc*, nano-TiO₂, and *ZnPc*-TiO₂

conjugate, against a panel of tumor and normal mammalian cells and on promastigote forms of *Leishmania* parasites. As was expected, nano-TiO₂ alone under visible light irradiation was not phototoxic for the cells; in contrast, *ZnPc* treatment at the same condition was photoactive for all the studied cells and parasites. The composite *ZnPc*-TiO₂ was not found to be phototoxic for *L. Chagasi* or *L. Panamensis* promastigotes; however, it was active against tumor and nontumor mammalian cells but less than the pure *ZnPc* PS, which may be due to their lower internalization by the cells as compared to *ZnPc*. *ZnPc*-TiO₂ was internalized by the cells at a lower level than *ZnPc*. The localization of *ZnPc*-TiO₂ and *ZnPc* was observed in mitochondrial molecules. No fluorescence signal was observed in human-derived fibroblasts exposed to *ZnPc*-TiO₂.

A newly developed therapy for cancer treatment is sonodynamic/photodynamic therapy (SDT/PDT). SDT is analogous to PDT except that drug activation is achieved through ultrasound instead of light. One of the main advantages is that, unlike visible light, ultrasound can be non invasive when applied from the exterior of the body and is capable of deep penetration. Yamaguchi's group developed a novel water-dispersed TiO₂ nanoparticle modified by PEG and demonstrated its photocatalytic anti-tumor effect on a glioma cell line [107]. In a more recent publication, the same group demonstrated that the sonodynamic cytotoxicity on U251 cells was strongly enhanced and was almost proportional to the duration of US exposure. In contrast, photodynamic cytotoxicity seemed to have a threshold UV energy dose [108]. In a similar way, Harada's group [109] and Ogino's group [105] studied the effect of ultrasound combined with a TiO₂ nanoparticle on respectively melanoma cells *in vitro* and *in vivo* and HepG2 cancer cells.

Liu *et al.* [106] proposed the Pt/TiO₂ nanocomposite for cancer-cell treatment because noble metal nanoparticles are supposed to enhance the photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles. To evaluate the cancer-cell killing effect of their Pt/TiO₂ nanocomposite, TiO₂ and Au/TiO₂ nanoparticles were also introduced. The prepared Pt/TiO₂ nanocomposite was characterized with transmission electron microscopy (TEM) and UV-vis absorption spectra. Results of cell treatment showed that Pt/TiO₂ nanocomposite, as extremely stable metal-semiconductor nanomaterial, could exhibit a very high photodynamic efficiency under a mild ultraviolet radiation. Pt/TiO₂ nanocomposite was found to be more effective in cancer cell treatment than TiO₂ and Au/TiO₂ nanoparticles. As a result, the Pt/TiO₂ nanocomposite may be presumed to have a promising application as a cancer-cell treatment.

ZnO Nanoparticles

Because of its potential of non-toxicity, zinc oxide (ZnO) is also a candidate for the materials applicable for biomedicine [110, 152, 153]. Furthermore, among the PDT agents, ZnO is a material of particular interest due to its unique optical and electronic properties and has been widely used for device applications including transducers, phosphors and variators [154].

Although ZnO nanoparticles have been intensively used in the cosmetic industry for many years, they have only recently been explored as active cancer therapy drugs themselves [153]. ZnO nanomaterials are considered to be relatively biocompatible, with bulk ZnO being recognized as a GRAS (generally recognized as safe) substance by the FDA. ZnO has traditionally been used for photocatalytic oxidation of organic pollutants [153]. For nanoscale ZnO, large numbers of valence band holes and/or a conduction band are available to serve in redox reaction. The holes are powerful oxidants and can split water molecules into H⁺ and OH⁻. The conduction band electrons are good reducers and react with dissolved oxygen molecules to generate superoxide radical anions

(O₂⁻) which in turn react with H⁺ to generate HO₂⁻ radicals and others ROS.

Based on the photodynamic therapy concept, the photoactivation of ZnO nanoparticles is predicted to lead to greater levels of ROS release. Recent studies have described the ability of ZnO nanoparticles conjugated to porphyrin to synergistically induce cytotoxicity in ovarian cancer on exposure to UV-A light [114].

Energy transfer from the photoexcited ZnO particle to the conjugated porphyrin has been studied very recently by Hiromitsu [112] and results from a Förster mechanism. Similar studies have demonstrated that co-administration of ZnO nanoparticles and daunorubicin resulted in synergistic cytotoxic effects on leukemic cancer cells, which was enhanced further by UV irradiation [155]. In 2011 Zhang *et al.* [113] carried out the same kind of study by loading daunorubicin on ZnO nanorods in order to kill human hepatocarcinoma cells (SMMC-7721 cells). In this study ZnO nanorods appeared to be a good drug carrier and also an effective PDT inducer. However, there are still some drawbacks for ZnO nanostructures in the clinical use particularly the inability of UV light to penetrate deeper than 1 mm through skin.

MAGNETIC NANOPARTICLES

Magnetic nanoparticles are used extensively in the field of biomagnetics for a broad range of applications, such as drug delivery [156-159], cell labelling and sorting [160], magnetic resonance imaging, sensing [161, 162] as well as therapeutic applications [163] such as an AC magnetic field-assisted cancer therapy, i.e. hyperthermia, PDT [164]. Luminescent magnetic particles are also attractive tools for life science applications such as multimodal imaging, analyte monitoring, nanotherapeutics, and combinations thereof [165, 166].

In the field of PDT, Tedesco's group recently reported on the synthesis and characterization of molybdenum chlorophyllin (Mo-Chl) compounds associated in a complex with magnetic nanoparticles (citrate-coated cobalt ferrite), the latter prepared as a biocompatible magnetic fluid (MF). This complex material was developed for application as a synergic drug for cancer treatment using PDT and hyperthermia (HPT) [130]. Cellular viability was evaluated using gingival fibroblasts cells as a biological model. Studies performed with the complex Mo-Chl at different magnetic nanoparticle concentrations revealed a cellular viability of around 95% for the ideal magnetic material concentration of 1×10¹³ particle.mL⁻¹. This study shows that natural photosensitizers molecules Mo-Chl used in association with magnetic nanoparticles represent a promising generation of drugs developed to work synergistically in the treatment of neoplastic tissues using PDT and HPT, pointing towards its future application in clinical tests of neoplastic tissues.

More recently, Huang *et al.* designed and prepared photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles (~20 nm diameter) for gastric cancer imaging and therapy using MGC803 cells [131]. They found that the covalently incorporated Ce6 molecules retained their spectroscopic and functional properties for near infrared (NIR) fluorescence imaging and PDT, and the core magnetic nanoparticles offered the functions of magnetically guided drug delivery MRI. *In vitro* the PDT effect of Ce6-MNPs to MGC803 cells was detected by CCK-8 assay. With the increase of drug and light doses, *in vitro* cell viability gradually decreased. *In vivo*, according to the observation from NIR fluorescence imaging and MRI, 8 hours was selected as the suitable time point to implement PDT. Compared to controls, the targeting PDT treatment group (Ce6-MNPs) showed significant level of tumor regression. These results highlighted Ce6-MNPs own excellent imaging and targeting ability without compromising its photodynamic efficacy making them suitable for simultaneous targeting PDT and dual-

mode NIR fluorescence imaging and MRI of different kinds of tumor tissues *in vivo*.

In a recent study, Zheng *et al.* developed a theranostic nanoplatform based on superparamagnetic magnetite nanoparticles [128]. The magnetic nanoparticles were wrapped in a shell of silica covalently encapsulating FITC for fluorescence imaging, using the reverse microemulsion method. These nanoparticles were further embedded in a mesoporous silica shell with the photosensitizer tetra-substituted carboxyl aluminium phthalocyanine (AlC₄Pc) covalently linked in the mesoporous silica framework. The surface of the nanoplatform was grafted with folic acid to target over-expressed folate receptors of cancer cells. These nanoplatforms without the functionalization with folic acid were used as MRI contrast agents with human hepatoma cells (QGY-7703). PDT experiments performed at 660 nm with these cells led to 70% cell death at a concentration of nanoplatform of 200 µg ml⁻¹. Folate-functionalized nanoplatform showed a higher uptake than non-functionalized nano-objects with HeLa cells due to folate receptors-mediated endocytosis. Folate-functionalized nanoplatforms led to 60% HeLa cell death after performing PDT experiments.

CONCLUSION

The novel properties of nanomaterials make them an extremely promising avenue for future technological breakthroughs. In the specific field of PDT, nanoparticle development can overcome most of the shortcomings of classic photosensitizers. The potential advantages of nanoparticles are that a high "payload" can be delivered, they can transport hydrophobic drugs in the blood, their surface can be modified with functional groups and are generally taken up effectively by cells and finally that controlled release of the drug is possible. Moreover, in certain cases, it is also possible to excite the nanoparticles directly to create reactive oxygen species (up conversion nanoparticles, quantum dots, self-lighting nanoparticles).

The first nanoparticle photosensitizer adduct to obtain FDA approval in April 2000 was a liposomal formulation Verteporfin for injection, for the treatment of predominantly classic subfoveal choroidal neovascularisation due to age-related macular degeneration, pathologic myopia or presumed ocular histoplasmosis. Another promising liposomal formulation is the Foslip®, which is *m*THPC encapsulated into dipalmitoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylglycerol liposomes. Nevertheless knowledge in this field still needs to be improved. More particularly, few studies are performed *in vivo* and the question of long term effects, bioaccumulation and even toxicity of the degraded nanoparticles is still open to question. Moreover, irradiation modalities such as light doses should be taken into account as it is likely than the effect of light would be different using a nanoparticle or a lonely photosensitizer (in terms of diffusion of light for example). To conclude then, although several challenges remain before these nanoparticles can be adopted for clinical use, they probably offer a real hope for extending the reach of PDT to regions deep in the body.

ABBREVIATIONS

ALA	= 5-aminolevulinic acid
AuNPs	= gold nanoparticles
BTB	= Bromothymol Blue
BCP	= Bromocresol Purple
BDSA	= 9,10-bis [4'-(4''-aminostyryl)styryl]-anthracene
BMPF	= bismethanophosphonate fullerene
C11Pc	= Zn(II)-phthalocyanine disulphide

DMSO	= dimethylsulfoxide
DPBF	= 1,3 diphenylisobenzofuran
EPR	= enhanced permeability and retention
FDA	= Food and Drug Administration
GRAS	= generally recognized as safe
HPPH	= 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl-pyropheophorbide
IP	= iodobenzylpyropheophorbide
MF	= magnetic fluid
Mo-Chl	= molybdenum chlorophyllin
MSN	= mesoporous silica nanoparticles
MRI	= magnetic resonance imaging
MTAP	= <i>meso</i> -tetra(<i>o</i> -aminophenyl) porphyrin
<i>m</i> -THPC	= <i>meta</i> -tetra(hydroxyphenyl)chlorin
<i>m</i> THPP	= <i>meso</i> -tetrahydroxyphenyl porphyrin
MWNTs	= multiwalled carbon nanotubes
NPs	= nanoparticles
ORMOSIL	= organically modified silica
PAA	= polyacrylamide
PAH	= polyallylamine hydrochloride
PC	= phthalocyaninedihydroxyle
<i>Pc</i>	= phthalocyanine
<i>Pc</i> 4	= silicon phthalocyanine 4
<i>Pc</i> 19	= Silicon phthalocyanine 219
PCR	= polymerase chain reaction
PDT	= photodynamic therapy
PEG	= polyethylene glycol
PHPP	= 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin
PpIX	= Protoporphyrin IX
PS	= photosensitizer
PdTPP	= Pd- <i>meso</i> -tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin
PHPP	= 2,7,12,18-tetramethyl-3,8-di(1-propoxyethyl)-13,17-bis-(3-hydroxypropyl)porphyrin
PSS	= polystyrene sulfonate
PUNP	= photon up-converting nanoparticle
ROS	= Reactive Oxygen Species
SDT	= sonodynamic therapy
SWNT	= single walled carbon nanotube
TCPP	= <i>meso</i> -tetra(4-carboxyphenyl)porphin
TPC	= 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin
TPHC	= 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-2,3-dihydrochlorin
TPP	= <i>meso</i> -tetraphenyl porphyrin
TEM	= transmission electron microscopy
UV-Vis	= ultraviolet-visible
ZnPc	= Zinc(II) phthalocyanine

REFERENCES

- [1] Maich, T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: Antimicrobial photodynamic treatment. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2009**, *9*(8), 974-983.

- [2] Robertson, C.A.; Evans, D.H.; Abrahamse, H., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol., B*, **2009**, *96*(1), 1-8.
- [3] Ortel, B.; Shea, C.R.; Calzavara-Pinton, P., Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front. biosci. : a journal and virtual library*, **2009**, *14*, 4157-4172.
- [4] Verhille, M.; Couleaud, P.; Vanderesse, R.; Brault, D.; Barberi-Heyob, M.; Frochet, C., Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*(32), 3925-3943.
- [5] Di Stasio, B.; Frochet, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Müller, A.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M., The 2-aminogluconamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*(11), 1111-1122.
- [6] Gravier, J.; Schneider, R.; Frochet, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and *in vivo* delivery studies. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*(13), 3867-3877.
- [7] Taquet, J.P.; Frochet, C.; Manneville, V.; Barberi-Heyob, M., Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*(15), 1673-1687.
- [8] Soukos, N.S.; Goodson, J.M., Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol.*, **2000**, *2011*, *55*(1), 143-166.
- [9] Pagonis, T.C.; Chen, J.; Fontana, C.R.; Devalapally, H.; Ruggiero, K.; Song, X.; Foschi, F.; Dunham, J.; Skobe, Z.; Yamazaki, H.; Kent, R.; Tanner, A.C.; Amiji, M.M.; Soukos, N.S., Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J. Endod.*, **2010**, *36*(2), 322-328.
- [10] Olivo, M.; Bhuvanawari, R.; Lucky, S.S.; Dendukuri, N.; Thong, P.S.P., Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. *Pharmaceuticals*, **2010**, *3*(5), 1507-1529.
- [11] Hoffman, A.S., The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J. Controlled Release*, **2008**, *132*(3), 153-163.
- [12] Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochet, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O., Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*, **2010**, *2*(7), 1083-1095.
- [13] Vanderesse, R.; Frochet, C.; Barberi-Heyob, M.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.O. In *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*, Fundamental Biomedical Technologies A. Prokop Springer Science+Business Media B.V. ed, **2011**; Vol. 5, pp 511-565.
- [14] Cheng, Y.; Burda, C. In *Comprehensive Nanoscience and Technology*, Elsevier: London, **2010**, pp 1-28.
- [15] Nann, T., Nanoparticles in photodynamic therapy. *Nano. Biomed.*, **2011**, *3*(2), 137-143.
- [16] Paszko, E.; Ehrhardt, C.; Senge, M.O.; Kelleher, D.P.; Reynolds, J.V., Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2011**, *8*(1), 14-29.
- [17] Chen, K.; Wacker, M.; Hackbarth, S.; Ludwig, C.F.; Langer, K.; Roder, B., Photophysical evaluation of mTHPC-loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2010**, *101*(3), 340-347.
- [18] Cohen, E.M.; Ding, H.; Kessinger, C.W.; Khamtong, C.; Gao, J.; Sumer, B.D., Polymeric micelle nanoparticles for photodynamic treatment of head and neck cancer cells. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2010**, *143*(1), 109-115.
- [19] Ding, H.; Sumer, B.D.; Kessinger, C.W.; Dong, Y.; Huang, G.; Boothman, D.A.; Gao, J., Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *J. Controlled Release*, **2011**, *151*(3), 271-277.
- [20] Herlambang, S.; Kumagai, M.; Nomoto, T.; Horie, S.; Fukushima, S.; Oba, M.; Miyazaki, K.; Morimoto, Y.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J. Controlled Release*, **2011**, *155*(3), 449-457.
- [21] Zhou, L.; Wang, W.; Feng, Y.; Wei, S.; Zhou, J.; Yu, B.; Shen, J., Delivering a hydrophobic anticancer drug for photodynamic therapy by amorphous formulation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(21), 6172-6174.
- [22] Marotta, D.E.; Cao, W.; Wileto, E.P.; Li, H.; Corbin, L.; Rickter, E.; Glickson, J.D.; Chance, B.; Zheng, G.; Busch, T.M., Evaluation of bacteriochlorophyll-reconstituted low-density lipoprotein nanoparticles for photodynamic therapy efficacy *in vivo*. *Nanomedicine*, **2011**, *6*(3), 475-487.
- [23] Ehrhart, J.; Mingotaud, A.F.; Violleau, F., Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering and quasi elastic light scattering for characterization of poly(ethylenglycol-b-(open)-caprolactone) block copolymer self-assemblies used as drug carriers for photodynamic therapy. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*(27), 4249-4256.
- [24] Fadel, M.; Kassab, K.; Fadel Doa, A., Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med. Sci.*, **2010**, *25*(2), 283-272.
- [25] Grimland, J.L.; Wu, C.; Ramoutar, R.R.; Brumaghim, J.L.; McNeill, J., Photosensitizer-doped conjugated polymer nanoparticles with high cross-sections for one- and two-photon excitation. *Nanoscale*, **2011**, *3*(4), 1451-1455.
- [26] Kim, H.; Csaky, K.G., Nanoparticle-integrin antagonist C16Y peptide treatment of choroidal neovascularization in rats. *J. Controlled Release*, **2010**, *143*(2), 286-293.
- [27] Lee, Y.E.; Kopelman, R., Polymeric nanoparticles for photodynamic therapy. *Methods Mol. Biol.*, **2011**, *726*, 151-178.
- [28] Pietkiewicz, J.; Zielińska, K.; Sączko, J.; Kulbacka, J.; Majkowski, M.; Wilk, K.A., New approach to hydrophobic cyanine-type photosensitizer delivery using polymeric oil-cored nanocarriers: Hemolytic activity, *in vitro* cytotoxicity and localization in cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2010**, *39*(5), 322-335.
- [29] Shieh, M.J.; Hsu, C.Y.; Huang, L.Y.; Chen, H.Y.; Huang, F.H.; Lai, P.S., Reversal of doxorubicin-resistance by multifunctional nanoparticles in MCF-7/ADR cells. *J. Controlled Release*, **2011**, *152*(3), 418-425.
- [30] Navarro, F.P.; Bechet, D.; Delmas, T.; Couleaud, P.; Frochet, C.; Verhille, M.; Kamarulzaman, E.; Vanderesse, R.; Boisseau, P.; Texier, I.; Gravier, J.; Vinet, F.; Barberi-Heyob, M.; Couffin, A.C. In *Proc. SPIE* **2011**; Vol. 7886, pp 78860Y/78861-78860Y/78812.
- [31] Chen, J.X.; Wang, H.Y.; Li, C.; Han, K.; Zhang, X.Z.; Zhuo, R.X., Construction of surfactant-like tetra-tail amphiphilic peptide with RGD ligand for encapsulation of porphyrin for photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(6), 1676-1684.
- [32] Jeong, H.; Huh, M.; Lee So, J.; Koo, H.; Kwon Ick, C.; Jeong Seo, Y.; Kim, K., Photosensitizer-conjugated human serum albumin nanoparticles for effective photodynamic therapy. *Thrombosis*, **2011**, *1*, 230-239.
- [33] Preuß, A.; Chen, K.; Hackbarth, S.; Wacker, M.; Langer, K.; Roeder, B., Photosensitizer loaded HSA nanoparticles II: *In vitro* investigations. *Int. J. Pharm.*, **2011**, *404*(1-2), 308-316.
- [34] Wacker, M.; Chen, K.; Preuß, A.; Possemeyer, K.; Roeder, B.; Langer, K., Photosensitizer loaded HSA nanoparticles. I: Preparation and photophysical properties. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *393*(1-2), 253-262.
- [35] Bae, B.-C.; Na, K., Self-quenching polysaccharide-based nanogels of pullulan/folate-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2010**, *31*(24), 6325-6335.
- [36] Hah, H.J.; Kim, G.; Lee, Y.-E.K.; Orringer, D.A.; Sagher, O.; Philbert, M.A.; Kopelman, R., Methylene blue-conjugated hydrogel nanoparticles and tumor-cell targeted photodynamic therapy. *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*(1), 90-99.
- [37] Lee, S.J.; Koo, H.; Jeong, H.; Huh, M.S.; Choi, Y.; Jeong, S.Y.; Byun, Y.; Choi, K.; Kim, K.; Kwon, I.C., Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy. *J. Controlled Release*, **2011**, *152*(1), 21-29.
- [38] Lee, S.J.; Koo, H.; Lee, D.-E.; Min, S.; Lee, S.; Chen, X.; Choi, Y.; Leary, J.F.; Park, K.; Jeong, S.Y.; Kwon, I.C.; Kim, K.; Choi, K., Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. *Biomaterials*, **2011**, *32*(16), 4021-4029.
- [39] Schmitt, F.; Lagopoulos, L.; Käuper, P.; Rossi, N.; Busso, N.; Barge, J.; Wagnières, G.; Laue, C.; Wandrey, C.; Juillerat-Jeanneret, L., Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints. *J. Controlled Release*, **2010**, *144*(2), 242-250.
- [40] Yang, S.J.; Lin, F.H.; Tsai, H.M.; Lin, C.F.; Chin, H.C.; Wong, J.M.; Shieh, M.J., Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. *Biomaterials*, **2011**, *32*(8), 2174-2182.
- [41] Lu, H.L.; Syu, W.J.; Nishiyama, N.; Kataoka, K.; Lai, P.S., Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance *in vivo*. *J. Control Release*, **2011**, *155*(3), 458-464.
- [42] Lim, C.-K.; Shin, J.; Lee, Y.-D.; Kim, J.; Park, H.; Kwon Ick, C.; Kim, S., Heavy-atomic construction of photosensitizer nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of cancer. *Small*, **2011**, *7*(1), 112-118.
- [43] Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochet, C.; Viriot, M.L.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.*, **2008**, *26*(11), 612-621.
- [44] Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, R.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; François, A.; Frochet, C.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80*(2), 226-235.
- [45] Thomas, N.; Tiran, L.; Chatelut, E.; Plégnat, F.; Frochet, C.; Dodeller, M.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M., Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPFR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*(4), 433-441.
- [46] Hone, D.C.; Walker, P.L.; Evans-Gowing, R.; FitzGerald, S.; Beeby, A.; Chambrier, I.; Cook, M.J.; Russell, D.A., Generation of cytotoxic singlet oxygen via phthalocyanine-stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy. *Langmuir*, **2002**, *18*(8), 2985-2987.
- [47] Wieder, M.E.; Hone, D.C.; Cook, M.J.; Handsley, M.M.; Gavrilovic, J.; Russell, D.A., Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: Cancer therapy using a 'Trojan horse'. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, *5*(8), 727-734.
- [48] Demberelnyamba, D.; Ariunaa, M.; Shim, Y.K., Newly synthesized water soluble Cholinium-Purpurin photosensitizers and their stabilized gold nanoparticles as promising anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, **2008**, *9*(5), 864-871.
- [49] Oo, M.K.K.; Yang, X.; Du, H.; Wang, H., 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine*, **2008**,

- 3(6), 777-786.
- [50] Cheng, Y.; C. Samia, A.; Meyers, J.D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C., Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(32), 10643-10647.
- [51] Cheng, Y.; Samia, A.C.; Meyers, J.D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C.; Gonzales, M.A.; Mascharak, P.K., Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy of cancer. *Chemtracts*, **2008**, *21*(9), 329-335.
- [52] Kuo, W.S.; Chang, C.N.; Chang, Y.T.; Yeh, C.S., Antimicrobial gold nanorods with dual-modality photodynamic inactivation and hyperthermia. *Chem. Commun.*, **2009**(32), 4853-4855.
- [53] 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.
- [54] Camerin, M.; Magaraggi, M.; Soncin, M.; Jori, G.; Moreno, M.; Chambrier, I.; Cook Michael, J.; Russell David, A., The *in vivo* efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur. J. Cancer*, **2010**, *46*(10), 1910-1918.
- [55] Zárba, K.; Králová, J.; Źezanka, P.; Pouřková, P.; Veverková, L.; Král, V., Modified porphyrin-brucine conjugated to gold nanoparticles and their application in photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*(14), 3202-3206.
- [56] Cheng, Y.; Meyers, J.D.; Broome, A.M.; Kenney, M.E.; Basilion, J.P.; Burda, C., Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*(8), 2583-2591.
- [57] Stuchinskaya, T.; Moreno, M.; Cook, M.J.; Edwards, D.R.; Russell, D.A., Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10*(5), 822-831.
- [58] Reum, N.; Fink-Straube, C.; Klein, T.; Hartmann, R.W.; Lehr, C.M.; Schneider, M., Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates. *Langmuir*, **2010**, *26*(22), 16901-16908.
- [59] Reum, N.; Fink-Straube, C.; Klein, T.; Hartmann, R.W.; Lehr, C.M.; Schneider, M., Erratum: Multilayer coating of gold nanoparticles with drug-polymer coadsorbates (Langmuir (2010) 26 (16901)). *Langmuir*, **2011**, *27*(2), 861.
- [60] Yan, F.; Kopelman, R., The Embedding of Meta-tetra(Hydroxyphenyl)chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties. *Photochem. Photobiol.*, **2003**, *78*(6), 587-591.
- [61] Roy, I.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Bergey, E.J.; Oseroff, A.R.; Morgan, J.; Dougherty, T.J.; Prasad, P.N., Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*(26), 7860-7865.
- [62] Tang, W.; Xu, H.; Kopelman, R.; Philbert, M.A., Photodynamic characterization and *in vitro* application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*(2), 242-249.
- [63] Davydenko, M.O.; Radchenko, E.O.; Yashchuk, V.M.; Dmitruk, I.M.; Prylutskyy, Y.I.; Mańshevska, O.P.; Golub, A.A., Sensibilization of fullerene C60 immobilized at silica nanoparticles for cancer photodynamic therapy. *J. Mol. Liq.*, **2006**, *127*(1-3), 145-147.
- [64] Gao, D.; Agayan, R.R.; Xu, H.; Philbert, M.A.; Kopelman, R., Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Lett.*, **2006**, *6*(11), 2383-2386.
- [65] Kim, S.; Ohulchanskyy, T.Y.; Pudavar, H.E.; Pandey, R.K.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*(9), 2669-2675.
- [66] Ohulchanskyy, T.Y.; Roy, I.; Goswami, L.N.; Chen, Y.; Bergey, E.J.; Pandey, R.K.; Oseroff, A.R.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Lett.*, **2007**, *7*(9), 2835-2842.
- [67] Zhou, J.; Zhou, L.; Dong, C.; Feng, Y.; Wei, S.; Shen, J.; Wang, X., Preparation and photodynamic properties of water-soluble hypochlorin A-silica nanospheres. *Mater. Lett.*, **2008**, *62*(17-18), 2910-2913.
- [68] Zhou, L.; Liu, J.H.; Zhang, J.; Wei, S.H.; Feng, Y.Y.; Zhou, J.H.; Yu, B.Y.; Shen, J., A new sol-gel silica nanovehicle preparation for photodynamic therapy *in vitro*. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *386*(1-2), 131-137.
- [69] Rossi, L.M.; Silva, P.R.; Vono, L.L.R.; Fernandes, A.U.; Tada, D.B.; Baptista, M.S., Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: Preparation, optical properties and singlet oxygen generation. *Langmuir*, **2008**, *24*(21), 12534-12538.
- [70] Qian, J.; Gharibi, A.; He, S., Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy. *Journal of biomedical optics*, **2009**, *14*(1), 014012.
- [71] Compagnin, C.; Ba, L.; Mogano, M.; Celotti, L.; Miotto, G.; Arduini, M.; Moret, F.; Fede, C.; Selvestrel, F.; Echevarria, L.M.R.; Mancini, F.; Reddi, E., The cellular uptake of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins. *Nanotechnology*, **2009**, *20*(34).
- [72] Zhao, B.; Yin, J.J.; Bilski, P.J.; Chignell, C.F.; Roberts, J.E.; He, Y. Y., Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pdt in silica nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, *241*(2), 163-172.
- [73] Velusamy, M.; Shen, J.-Y.; Lin, J.T.; Lin, Y.C.; Hsieh, C.C.; Lai, C.H.; Lai, C.W.; Ho, M.L.; Chen, Y.C.; Chou, P.T.; Hsiao, J.K., A new series of quadrupolar type two-photon absorption chromophores bearing 11, 12-dibutoxydibenz[a,c]-phenazine bridged amines; their applications in two-photon fluorescence imaging and two-photon photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*(15), 2388-2397.
- [74] He, X.; Wu, X.; Wang, K.; Shi, B.; Hai, L., Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*, **2009**, *30*(29), 5601-5609.
- [75] Tu, H.L.; Lin, Y.S.; Lin, H.Y.; Hung, Y.; Lo, L.W.; Chen, Y.F.; Mou, C.Y., *In vitro* studies of functionalized mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Adv. Mater.*, **2009**, *21*(2), 172-177.
- [76] Cheng, S.H.; Lee, C.H.; Yang, C.S.; Tseng, F.G.; Mou, C.Y.; Lo, L.W., Mesoporous silica nanoparticles functionalized with an oxygen-sensing probe for cell photodynamic therapy: Potential cancer theranostics. *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*(9), 1252-1257.
- [77] Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Looock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O., Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, **2009**(12), 1475-1477.
- [78] Zhang, R.; Wu, C.; Tong, L.; Tang, B.; Xu, Q.H., Multifunctional core-shell nanoparticles as highly efficient imaging and photosensitizing agents. *Langmuir*, **2009**, *25*(17), 10153-10158.
- [79] Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thienot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; Levy, L.; Marill, J., Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with *in vitro* tumor cell lines and *in vivo* mouse models of human cancers. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, *86*(1), 213-222.
- [80] Yang, Y.; Song, W.; Wang, A.; Zhu, P.; Fei, J.; Li, J., Lipid coated mesoporous silica nanoparticles as photosensitive drug carriers. *PCCP*, **2010**, *12*(17), 4418-4422.
- [81] Guo, H.; Qian, H.; Idris, N.M.; Zhang, Y., Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer. *Nanomedicine*, **2010**, *6*(3), 486-495.
- [82] Hocine, O.; Gary-Bobo, M.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Fontanel, S.; Raehm, L.; Richeter, S.; Looock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Charney, C.; Derrien, G.; Smañhi, M.; Sahmoune, A.; Morère, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J.O., Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *Int. J. Pharm.*, **2010**, *402*(1-2), 221-230.
- [83] Li, Z.; Wang, J.; Chen, J.; Lei, W.; Wang, X.; Zhang, B., pH-responsive silica nanoparticles for controllable ¹O₂ generation. *Nanotechnology*, **2010**, *21*(11), 115102/115101-115102/115106.
- [84] Thienot, E.; Germain, M.; Piejos, K.; Simon, V.; Darmon, A.; Marill, J.; Borghi, E.; Levy, L.; Hocquepied, J.F.; Pottier, A., One pot synthesis of new hybrid versatile nanocarrier exhibiting efficient stability in biological environment for use in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2010**, *100*(A), 1-9.
- [85] Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A.C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C., Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine*, **2011**, DOI:10.2217/NNM.11.31.
- [86] Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M., Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*(15), 4526-4527.
- [87] Qian, H.S.; Guo, H.C.; Ho, P.C.L.; Mahendran, R.; Zhang, Y., Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy. *Small*, **2009**, *5*(20), 2285-2290.
- [88] Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z., Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(4), 1110-1120.
- [89] Wang, C.; Tao, H.; Cheng, L.; Liu, Z., Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, **2011**, *32*(26), 6145-6154.
- [90] Timoshenko, V.Y.; Kudryavtsev, A.A.; Osminkina, L.A.; Vorontsov, A.S.; Ryabchikov, Y.V.; Belogorokhov, I.A.; Kovalev, D.; Kashkarov, P.K., Silicon nanocrystals as photosensitizers of active oxygen for biomedical applications. *JETP Letters*, **2006**, *83*(9), 423-426.
- [91] Rioux, D.; Laferrière, M.; Douplik, A.; Shah, D.; Lilge, L.; Kabashin, A.V.; Meunier, M.M., Silicon nanoparticles produced by femtosecond laser ablation in water as novel contamination-free photosensitizers. *J. Biomed. Optics*, **2009**, *14*(2).
- [92] Zhu, Z.; Tang, Z.; Phillips, J.A.; Yang, R.; Wang, H.; Tan, W., Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*(33), 10856-10857.
- [93] Erbas, S.; Gorgulu, A.; Kocakusakogullari, M.; Akkaya, E.U., Non-covalent functionalized SWNTs as delivery agents for novel Bodipy-based potential PDT sensitizers. *Chem. Commun.*, **2009**(33), 4956-4958.
- [94] do Nascimento, G.M.; de Oliveira, R.C.; Pradie, N.A.; Lins, P.R.G.; Worfel, P.R.; Martinez, G.R.; Di Mascio, P.; Dresselhaus, M.S.; Corio, P., Single-wall carbon nanotubes modified with organic dyes: Synthesis, characterization and potential cytotoxic effects. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2010**, *211*(2-3), 99-107.

- [95] Cai, R.; Kubota, Y.; Shuin, T.; Sakai, H.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO₂ particles. *Cancer Res.* **1992**, *52*(8), 2346-2348.
- [96] Kubota, Y.; Shuin, T.; Kawasaki, C.; Hosaka, M.; Kitamura, H.; Cai, R.; Sakai, H.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Photokilling of T-24 human bladder cancer cells with titanium dioxide. *Br. J. Cancer*, **1994**, *70*(6), 1107-1111.
- [97] Hefta, L.J.F.; Neumaier, M.; Shively, I.E., Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs. *Immunotechnology*, **1998**, *4*(1), 49-57.
- [98] Hirohara, S.; Obata, M.; Ogata, S.I.; Ohtsuki, C.; Higashida, S.; Ogura, S.I.; Okura, I.; Takenaka, M.; Ono, H.; Sugai, Y.; Mikata, Y.; Tamihara, M.; Yano, S., Cellular uptake and photocytotoxicity of glycoconjugated chlorins in HeLa cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2005**, *78*(1), 7-15.
- [99] Ogura, S.I.; Yazaki, K.; Yamaguchi, K.; Kamachi, T.; Okura, I., Localization of poly-L-lysine-photosensitizer conjugate in nucleus. *J. Controlled Release*, **2005**, *103*(1), 1-6.
- [100] Tokuoka, Y.; Yamada, M.; Kawashima, N.; Miyasaka, T., Anticancer effect of dye-sensitized TiO₂ nanocrystals by polychromatic visible light irradiation. *Chem. Lett.*, **2006**, *35*(5), 496-497.
- [101] Lei, W.; Zhou, Q.; Li, Z.; Wang, X.; Zhang, B., Photodynamic activity of ascorbic acid-modified TiO₂ nanoparticles upon visible illumination (>550nm). *Chem. Lett.*, **2009**, *38*(12), 1138-1139.
- [102] Takahashi, M.; Ueno, A.; Uda, T.; Mihara, H., Design of novel porphyrin-binding peptides based on antibody CDR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*(15), 2023-2026.
- [103] López, T.; Figueras, F.; Manjarrez, J.; Bustos, J.; Alvarez, M.; Silvestre-Albero, I.; Rodriguez-Reinoso, F.; Martínez-Ferre, A.; Martínez, E., Catalytic nanomedicine: A new field in anitumor treatment using supported platinum nanoparticles. *In vitro DNA degradation and in vivo tests with C6 animal model on Wistar rats.* *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *45*(5), 1982-1990.
- [104] López, T.; Ortiz, E.; Alvarez, M.; Navarrete, J.; Odrizola, J.A.; Martínez-Ortega, F.; Páez-Mozo, E.A.; Escobar, P.; Espinoza, K.A.; Rivero, L.A., Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO₂ for photodynamic therapy applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2010**, *6*(6), 777-785.
- [105] Ogino, C.; Shibata, N.; Sasaki, R.; Takaki, K.; Miyachi, Y.; Kuroda, S.I.; Ninomiya, K.; Shimizu, N., Construction of protein-modified TiO₂ nanoparticles for use with ultrasound irradiation in a novel cell injuring method. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(17), 5320-5325.
- [106] Liu, L.; Miao, P.; Xu, Y.; Tian, Z.; Zou, Z.; Li, G., Study of Pt/TiO₂ nanocomposite for cancer-cell treatment. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2010**, *98*(3), 207-210.
- [107] Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Narita, T.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Kubota, Y.; Terasaka, S.; Iwasaki, Y., Novel photodynamic therapy using water-dispersed TiO₂ polyethylene glycol compound: Evaluation of antitumor effect on glioma cells and spheroids *in vitro*. *Photochem. Photobiol.*, **2011**, *86*(4), 964-971.
- [108] Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Narita, T.; Kanehira, K.; Sonezaki, S.; Kudo, N.; Kubota, Y.; Terasaka, S.; Houkin, K., Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.*, **2011**, *18*(5), 1197-1204.
- [109] Harada, Y.; Ogawa, K.; Irie, Y.; Endo, H.; Feril Jr, L.B.; Uemura, T.; Tachibana, K., Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors. *J. Controlled Release*, **2011**, *149*(2), 190-195.
- [110] Liu, Y.; Zhang, Y.; Wang, S.; Pope, C.; Chen, W., Optical behaviors of ZnO-porphyrin conjugates and their potential applications for cancer treatment. *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, *92*(14).
- [111] Hiromitsu, I.; Ikeue, T.; Karino, K.; Ohno, T.; Tanaka, S.; Shiratori, H.; Morito, S.; Fujita, Y.; Handa, M., Photoinduced energy transfer in ZnO-tetraphenylporphyrin systems. *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, *474*(4-6), 315-319.
- [112] Hiromitsu, I.; Kawami, A.; Tanaka, S.; Morito, S.; Sasaki, R.; Ikeue, T.; Fujita, Y.; Handa, M., Luminescence of tetraphenylporphyrin by an energy transfer from photoexcited ZnO nanoparticle. *Chem. Phys. Lett.*, **2011**, *501*(4-6), 385-389.
- [113] Zhang, H.; Chen, B.; Jiang, H.; Wang, C.; Wang, H.; Wang, X., A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment. *Biomaterials*, **2011**, *32*(7), 1906-1914.
- [114] Zhang, Y.; Chen, W.; Wang, S.; Liu, Y.; Pope, C., Phototoxicity of zinc oxide nanoparticle conjugates in human ovarian cancer NIH: OVCAR-3 cells. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **2008**, *4*(4), 432-438.
- [115] Kantonis, G.; Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D.F., Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2007**, *185*(1), 62-66.
- [116] Epple, M.; Ganesan, K.; Heumann, R.; Klesing, J.; Kovtun, A.; Neumann, S.; Sokolova, V., Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*(1), 18-23.
- [117] Strasser, C.A.; Otter, M.; Albuquerque, R.Q.; Hone, A.; Vida, Y.; Maier, B.; De Cola, L., Photoactive hybrid nanomaterial for targeting, labeling, and killing antibiotic-resistant bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*(42), 7928-7931.
- [118] Ross, B.; Rehmetulla, A.; Koo, Y.E.L.; Reddy, R.; Kim, G.; Behrend, C.; Buck, S.; Schneider, R.J.; Philbert, M.A.; Weissleder, R.; Kopelman, R. In *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, Cartwright, A.N., Ed.; San Jose, CA, **2004**; Vol. 5331, pp 76-83.
- [119] Kopelman, R.; Lee Koo, Y.E.; Philbert, M.; Moffat, B.A.; Ramachandra Reddy, G.; McConville, P.; Hall, D.E.; Chenevert, T.L.; Bhojani, M.S.; Buck, S.M.; Rehmetulla, A.; Ross, B.D., Multifunctional nanoparticle platforms for *in vivo* MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *293*(1), 404-410.
- [120] Reddy, G.R.; Bhojani, M.S.; McConville, P.; Moody, J.; Moffat, B.A.; Hall, D.E.; Kim, G.; Koo, Y.E.L.; Woolisroff, M.J.; Sugai, J.V.; Johnson, T.D.; Philbert, M.A.; Kopelman, R.; Rehmetulla, A.; Ross, B.D., Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*(22), 6677-6686.
- [121] Tada, D.B.; Vono, L.L.R.; Duarte, E.L.; Itri, R.; Kiyohara, P.K.; Baptista, M.S.; Rossi, L.M., Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir*, **2007**, *23*(15), 8194-8199.
- [122] Lai, C.W.; Wang, Y.H.; Lai, C.H.; Yang, M.J.; Chen, C.Y.; Chou, P.T.; Chan, C.S.; Chi, Y.; Chen, Y.C.; Hsiao, J.K., Iridium-complex-functionalized Fe₃O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles: A facile three-in-one system in magnetic resonance imaging, luminescence imaging, and photodynamic therapy. *Small*, **2008**, *4*(2), 218-224.
- [123] McCarthy, J.R.; Jaffer, F.A.; Weissleder, R., A macrophage-targeted theranostic nanoparticle for biomedical applications. *Small*, **2006**, *2*(8-9), 983-987.
- [124] McCarthy, J.R.; Korngold, E.; Weissleder, R.; Jaffer, F.A., A light-activated theranostic nanoagent for targeted macrophage ablation in inflammatory atherosclerosis. *Small*, **2010**, *6*(18), 2041-2049.
- [125] Liu, F.; Zhou, X.; Ni, S.; Wang, X.; Zhou, Y.; Chen, Z., Preparation and properties of photosensitizer loaded magnetic nanocarriers. *Curr. Nanosci.*, **2009**, *5*(3), 293-296.
- [126] Chen, Z.L.; Sun, Y.; Huang, P.; Yang, X.X.; Zhou, X.P., Studies on preparation of photosensitizer loaded magnetic silica nanoparticles and their anti-tumor effects for targeting photodynamic therapy. *Nanoscale Res. Lett.*, **2009**, *4*(5), 400-408.
- [127] Kim, S.; Ohulchanskyy, T.Y.; Bharali, D.; Chen, Y.; Pandey, R.K.; Prasad, P.N., Organically modified silica nanoparticles with intraparticle heavy-atom effect on the encapsulated photosensitizer for enhanced efficacy of photodynamic therapy. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*(29), 12641-12644.
- [128] Wang, F.; Chen, X.; Zhao, Z.; Tang, S.; Huang, X.; Lin, C.; Cai, C.; Zheng, N., Synthesis of magnetic, fluorescent and mesoporous core-shell-structured nanoparticles for imaging, targeting and photodynamic therapy. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*(30), 11244-11252.
- [129] Wenger, Y.; Schneider, R.J.; Reddy, G.R.; Kopelman, R.; Joliet, O.; Philbert, M.A., Tissue distribution and pharmacokinetics of stable polyacrylamide nanoparticles following intravenous injection in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2011**, *251*(3), 181-190.
- [130] Primo, F.L.; Cordo, P.L.A.G.; Neto, A.F.; Morais, P.C.; Tedesco, A.C. In *AIP Conference Proceedings*, Rostock, **2010**; Vol. 1311, pp 293-297.
- [131] Huang, P.; Li, Z.; Lin, J.; Yang, D.; Gao, G.; Xu, C.; Bao, L.; Zhang, C.; Wang, K.; Song, H.; Hu, H.; Cui, D., Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for *in vivo* simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. *Biomaterials*, **2011**, *32*(13), 3447-3458.
- [132] Yang, X.; Wan, Y.; Qiao, X.; Arlet, V.; Li, X., Transcriptional alteration of matrix-related gene expression in cultured human disc cells by nanoparticles of a bis(methanophosphonate) fullerene. *Cell Biol. Int.*, **2010**, *34*(8), 837-844.
- [133] Bauer, B.; Chen, S.; Käll, M.; Gunnarsson, L.; Ericson, M.B. In *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, San Francisco, CA, **2011**; Vol. 7897.
- [134] Cheng, Y.; Samia, A.C.; Li, J.; Kenney, M.E.; Resnick, A.; Burda, C., Delivery and efficacy of a cancer drug as a function of the bond to the gold nanoparticle surface. *Langmuir*, **2010**, *26*(4), 2248-2255.
- [135] Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P.L.; Stéphane, O.; Levenier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C., Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2010**, *10*(7), 1216-1225.
- [136] Tirand, L.; Frochet, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Controlled Release*, **2006**, *111*(1-2), 153-164.
- [137] Benachour, H.; Frochet, C.; Vanderesse, R.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. In *Brain cancer, targeting strategies and cervical cancer*, Nova Publishers: New York, **2011**, pp 738-753.
- [138] Kamarulzaman, E.E.; Benachour, H.; Barberi-Heyob, M.; Frochet, C.; Wahab, H.A.; Guillemin, F.; Vanderesse, R. In *Advances in Cancer Therapy*, Gali-Motabash, Ed.; InTech: New York, **2011**; Vol. 3.
- [139] Pantarotto, D.; Briand, J.P.; Prato, M.; Bianco, A., Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun. (Cambridge, England)*, **2004**(1), 16-17.
- [140] Kam, N.W.S.; Jessop, T.C.; Wendt, P.A.; Dai, H., Nanotube molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(22), 6850-6851.
- [141] Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.

- Luangsilavilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J.P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A., Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology*, **2007**, *2*(2), 108-113.
- [142] Liu, Z.; Davis, C.; Cai, W.; He, L.; Chen, X.; Dai, H., Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*(5), 1410-1415.
- [143] Hirsch, A., Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*(11), 1853-1859.
- [144] Qu, L.; Martin, R.B.; Huang, W.; Fu, K.; Zweifel, D.; Lin, Y.; Sun, Y.P.; Bunker, C.E.; Harnuff, B.A.; Gord, J.R.; Allard, L.F., Interactions of functionalized carbon nanotubes with tethered pyrenes in solution. *J. Chem. Phys.*, **2002**, *117*(17), 8089-8094.
- [145] Matsunaga, T.; Tomoda, R.; Nakajima, T.; Wake, H., Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1985**, *29*(1-2), 211-214.
- [146] Cai, R.; Hashimoto, K.; Itoh, K.; Kubota, Y.; Fujishima, A., Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO₂ powder. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*(4), 1268-1273.
- [147] Fujishima, A.; Rao, T.N.; Tryk, D.A., Titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2000**, *1*(1), 1-21.
- [148] Fujishima, A.; Zhang, X., Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*, **2006**, *9*(5-6), 750-760.
- [149] Sakai, A.H.; Cai, R.X.; Yoshioka, T.; Kubota, Y.; Hashimoto, K.; Fujishima, A., Intracellular Ca²⁺ concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO₂ ultrafine particles. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, **1994**, *1201*(2), 259-265.
- [150] Wamer, W.G.; Yin, J.J.; Wei, R.R., Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, *23*(6), 851-858.
- [151] Zhang, A.P.; Sun, Y.P., Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.*, **2004**, *10*(21), 3191-3193.
- [152] Dorfman, A.; Kumar, N.; Hahn, J.I., Highly sensitive biomolecular fluorescence detection using nanoscale ZnO platforms. *Langmuir*, **2006**, *22*(11), 4890-4895.
- [153] Rasmussen, J.W.; Martinez, E.; Louka, P.; Wingett, D.G., Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010**, *7*(9), 1063-1077.
- [154] Van De Walle, C.G., Hydrogen as a cause of doping in zinc oxide. *Phys. Rev. Lett.*, **2000**, *85*(5), 1012-1015.
- [155] Guo, D.; Wu, C.; Jiang, H.; Li, Q.; Wang, X.; Chen, B., Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2008**, *92*(3), 119-126.
- [156] Kemikli, N.; Kavas, H.; Kazan, S.; Baykal, A.; Ozturk, R., Synthesis of protoporphyrin coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles via dopamine anchor. *J. Alloys Compd.*, **2010**, *502*(2), 439-444.
- [157] Sun, C.; Lee, J.S.H.; Zhang, M., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2008**, *60*(11), 1252-1265.
- [158] Veisch, O.; Gunn, J.W.; Zhang, M., Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2010**, *62*(3), 284-304.
- [159] Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zheng, R.; Liu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Xu, B., Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(32), 9938-9939.
- [160] Ito, H.; Kato, R.; Ino, K.; Honda, H., Magnetic manipulation device for the optimization of cell processing conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, **2010**, *109*(2), 182-188.
- [161] Jain, T.K.; Foy, S.P.; Erokwu, B.; Dimitrijevic, S.; Flask, C.A.; Labhasetwar, V., Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biomaterials*, **2009**, *30*(35), 6748-6756.
- [162] Yang, F.; Li, Y.; Chen, Z.; Zhang, Y.; Wu, J.; Gu, N., Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging. *Biomaterials*, **2009**, *30*(23-24), 3882-3890.
- [163] Yellen, B.B.; Forbes, Z.G.; Halverson, D.S.; Fridman, G.; Barbee, K.A.; Chorny, M.; Levy, R.; Friedman, G., Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *293*(1), 647-654.
- [164] Zhao, D.L.; Wang, X.X.; Zeng, X.W.; Xia, Q.S.; Tang, J.T., Preparation and inductive heating property of Fe₃O₄-chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia. *J. Alloys Compd.*, **2009**, *477*(1-2), 739-743.
- [165] Mislberger, G.; Klimant, I., Luminescent magnetic particles: Structures, syntheses, multimodal imaging, and analytical applications. *Bioanalytical Reviews*, **2010**, *2*(1), 61-101.
- [166] Tassa, C.; Shaw, S.Y.; Weissleder, R., Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*(10), 842-852.

IV- Nanoparticules et radiothérapie

IV-1. Rappels sur la radiothérapie

Le but de la radiothérapie est d'utiliser les radiations ionisantes afin de détruire les cellules cancéreuses. Un verrou à cette technique est que lorsque l'on irradie une tumeur, les rayons traversent des tissus sains pour atteindre la cible tumorale, ce qui provoque des dommages dans ces tissus et potentiellement des effets secondaires. Par exemple, la tolérance du tissu sain cérébral a été déterminée sur la base des effets secondaires induits par les rayonnements ionisants. Elle est généralement fixée à 60 Gy (délivrés en 30 fractions de 2 Gy). Il existe une fenêtre thérapeutique limitée (figure 67) : plus la tumeur est radiosensible, plus large sera la fenêtre thérapeutique ; plus le tissu sain est radiosensible, plus grand sera le risque de dommage permanent (Borgh et al, 2010).

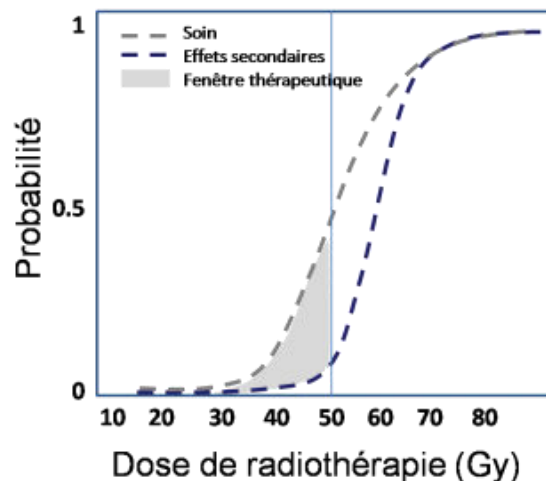


Figure 67 : Fenêtre thérapeutique en radiothérapie (Nanobiotix®).

L'enjeu actuel et futur de la radiothérapie est de parvenir à limiter l'irradiation aux seules cellules cancéreuses afin de réduire ces effets indésirables. Malgré les nombreuses techniques innovantes notamment l'utilisation du fractionnement spatial de la dose, la plupart de ces techniques actuelles présentent des limites qui restreignent la capacité des cliniciens à proposer des traitements hautement efficaces.

Les nanoparticules peuvent apporter une aide précieuse à la radiothérapie en offrant une meilleure dosimétrie. En effet, elles peuvent augmenter la génération de radicaux libres induite par les radiations à proximité des nanoparticules. Pour ces applications, des nanoscintillateurs qui sont des nanoparticules à

base d'atomes lourds tels que les métaux nobles (or, platine) ou les terres rares sont à l'étude afin d'augmenter le nombre d'électrons Auger générés par l'irradiation (Hainfeld et al., 2004) (Arviso et al., 2012) (Butterworth et al., 2012) (Maggiorella et al., 2012) (Porcel et al., 2010) (Fang et al., 2009).

L'injection de ces nanoparticules avant le traitement de radiothérapie permet de générer des quantités importantes d'électrons lors de l'exposition aux radiations ionisantes. Ceci va permettre d'amplifier la dose d'énergie létale dans la tumeur alors que la dose de RX ayant traversé les tissus sains est restée inchangée. Ainsi, la fenêtre thérapeutique sera élargie (figure 68).

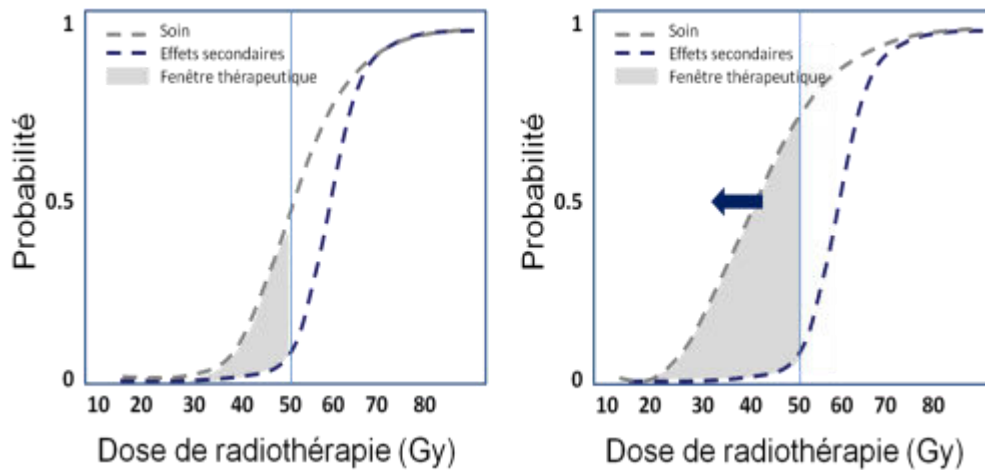


Figure 68 : Représentation schématique de l'ouverture de la fenêtre thérapeutique de la radiothérapie apportée par les nanoscintillateurs (à gauche, radiothérapie seule ; à droite, radiothérapie en présence de nanoparticules) (Nanobiotix®).

Nous avons colligé dans une revue les différents paramètres influençant la réponse de l'excitation des nanoparticules par des rayons X, pour des applications en radiothérapie et PDT (Retif et al., 2015).

Review

Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters

Paul Retif^{1,2,3}, Sophie Pinel^{2,3}, Magali Toussaint^{2,3}, Céline Frochet^{4,5,#}, Rima Chouikrat^{4,5}, Thierry Bastogne^{2,3,6,#}, Muriel Barberi-Heyob^{2,3,#}✉

1. CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy, Service de radiothérapie, 1 allée du Château, Ars-Laquenexy, 57530, France;
2. Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France;
3. CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France;
4. Université de Lorraine, LRGP, UMR 7274, 1 rue Grandville, Nancy, 54000, France;
5. CNRS, LRGP, UMR 7274, 1 rue Grandville, Nancy, 54000, France;
6. Université de Lorraine, INRIA-BIGS & CRAN, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France.

CNRS, GdR 3049 Photomed, France.

✉ Corresponding author: +33 (0)3 83 68 32 08 : muriel.barberi@univ-lorraine.fr; CRAN UMR 7039 CNRS, Département SBS, Faculté de Médecine - Bâtiment D, 1^{er} étage, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.

© 2015 Ivyspring International Publisher. Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited. See <http://ivyspring.com/terms> for terms and conditions.

Received: 2015.01.20; Accepted: 2015.03.26; Published: 2015.06.11

Abstract

This review focuses on the radiosensitization strategies that use high-Z nanoparticles. It does not establish an exhaustive list of the works in this field but rather propose constructive criticisms pointing out critical factors that could improve the nano-radiation therapy. Whereas most reviews show the chemists and/or biologists points of view, the present analysis is also seen through the prism of the medical physicist. In particular, we described and evaluated the influence of X-rays energy spectra using a numerical analysis. We observed a lack of standardization in preclinical studies that could partially explain the low number of translation to clinical applications for this innovative therapeutic strategy. Pointing out the critical parameters of high-Z nanoparticles radiosensitization, this review is expected to contribute to a larger preclinical and clinical development.

Key words: Cancer; Nanoparticles; Radiation therapy; Radiobiology; Radiosensitization; Photodynamic therapy.

Introduction

Nanomedicine is based on drug delivery using organic nanomaterials as nanocarriers [1]. Inorganic-based nanomaterials are mostly developed for other health care applications such as *in vitro* diagnosis and *in vivo* imaging. For example, magnetic nanoparticles (NP) are used for cell sorting applications in clinical diagnosis or magnetic resonance imaging (MRI) [2]. More recently, nanomaterials have been developed to play a pivotal therapeutic role by their own. A prominent illustrative example is NPs-based magnetic hyperthermia being developed for the treatment of cancer by the startup Magforce. In this

treatment, aminosilane-coated magnetic NPs are injected into the tumor and subsequently heated with a newly developed magnetic field applicator in order to induce apoptotic cell death [3].

Over the last decades, many research programs dealt with *in vitro* and *in vivo* applications of NPs in radiation therapy. Given that radiation therapy is not a selective antitumor treatment, the main challenge for radiation oncologists, medical physicists and radiobiologists is to increase its therapeutic efficacy without increasing damages dealt to the surrounding healthy tissues. Hence, the goal of combining NPs

with radiation therapy is to increase the differential effect between healthy and tumor tissues.

Different mechanisms of interaction between X-rays and NPs are expected according to NPs chemical nature. We could distinguish between (i) high atomic number Z, NPs that enhance the photoelectric and Compton effects (and thus the subsequent emissions of secondary electrons) to increase conventional radiation therapy efficacy; (ii) X-ray triggered drug-releasing NPs that, for instance, uses drug-loaded NP [4]. Under irradiation, the NP capsule is destroyed and the drug is released inside the targeted tissues. (iii) Self-lighting photodynamic NPs that are usually made of a lanthanide-doped high-Z core [5]. Once irradiated by X-rays, the scintillator core emits a visible light and activates a photosensitizer that generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) for tumor destruction. These NPs combine both photodynamic therapy (PDT) that generates reactive oxygen species (ROS) and enhanced radiation therapy (high-Z core).

The present review focuses on the radiosensitization strategies that use high-Z NPs. In this context, these NPs can intensify the production of secondary electrons and ROS that in turn enhance radiation therapy effects. The most studied NPs are gold-based NPs (GNPs) that were widely described in particular by Hainfeld *et al.* [6]. Recent studies have also reported the use of lanthanide-based NPs, titanium oxide nanotubes or cadmium selenide quantum dots [7-10]. For example, gadolinium-based NPs, besides their high-Z, offer an innovative approach due to their capacity to act as powerful contrast agents in MRI [11]. Interestingly, some authors used silver-based NPs to take advantage of its excellent surface enhanced Raman scattering and broad-spectrum antimicrobial activities [12].

There are only few NPs available on the market which is probably a consequence of the difficulties to create large-scale production with adapted characterizations and the high-cost of the whole process. In a recent review, Coulter *et al.* [13] highlight the gap between the wealth of preclinical data supporting high-Z NPs as effective radiosensitizers and the low number of clinical studies (indeed only one phase I clinical trial) and regret the lack of rigorous and systematic methodologies to evaluate NPs efficacy. In agreement with this observation, we focused on the critical parameters that could influence the radiosensitizing power of nanoparticles and methods used to assess the radiosensitizing properties of high-Z nanoparticles *in silico*, *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this review is not to establish for the first time an exhaustive list of the works in this field but rather propose constructive criticisms pointing out critical factors that could improve the

nano-radiation therapy strategies. While most reviews show the chemists and/or biologists points of view, the present analysis is also seen through the prism of the medical physicist.

We have studied 64 papers that mentioned the words *radiation therapy* (or *radiotherapy*) and *nanoparticles* during the period late 2008 - 2014. In our meta-analysis, we have distinguished on one side, the factors unrelated to nanoparticle, and on the other, parameters depending on the nanoparticle design. Notably, we have carried out a numerical analysis to assess the influence of the irradiation source by measuring the dose modifying factor on survival curves for *in vitro* studies which used clinical X-rays only (no isotopes, ions, synchrotron or electron beams). Furthermore, this paper describes the multi-scale impact of nanoparticle design, as it could determine the interaction probability with ionizing radiations (we considered X-rays only), the capacity to generate ROS and the cellular localization or tissue distribution of NPs.

How to measure the nanoparticle-mediated improvement?

In this part, following the description of recommended methods to measure *in vitro* radiation therapy efficacy, we will detail three approaches to assess the enhancement of radiation therapy efficacy by NPs: (i) the determination of the Dose Modifying Factor (DMF) based on survival curves, (ii) the determination of the Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio (NER) after a single radiation dose and (iii) the variation of the ROS production upon irradiation.

When possible, the DMF should be chosen over the NER which can be seen as a "special case" of the DMF where only one irradiation dose had been applied. The measurement of the ROS production can be done alone or in addition to the DMF/NER evaluation in order to find which lethal effects are prevailing.

In vitro assessment of radiation therapy effect

In radiation therapy, clinically relevant dose of radiation generate DNA damage that could lead to early cell death but rather result in cell death after one or more cell divisions. Hence, a cell is "radiobiologically dead" only if its reproductive integrity is lost. *In vitro*, the gold standard to evaluate the cytotoxicity of ionizing radiations is the clonogenic assay (also called CFU assay for Colony Forming Unit) as it tests every cell in the population for its ability to undergo unlimited division, thus taking into account the "cell reproductive death" [14]. Results of clonogenic assay are generally plotted as "survival curves" which represent the fraction of surviving cells as a function of

the dose (typically 0 to 10 Gy). The linear-quadratic (LQ) model is the most common representation used to fit the experimental curves and to describe cell survival. For a single fraction at a dose D [Gy], the fraction of surviving cells S is described by the LQ model as:

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

where α and β are two model parameters. The LQ model also allows the estimation of the SF2 parameter that describes the survival fraction at 2 Gy, *i.e.* a dose fractionation widely used in clinical practice for curative treatments. Even though the LQ model is widely used in radiation therapy studies, it is also still controversial [15]. Moreover, it was not proven that the LQ model could describe dose-effect relations in the presence of NPs and it should therefore be used with care.

Measurement of the DMF on survival curves

To evaluate the efficacy increase in classical radiation biology, it is customary to use the Relative Biological Effectiveness (RBE) which is defined as the ratio of a dose of standard radiation (*e.g.* photons) to a dose of any other type of ionizing particles (*i.e.* protons, neutron, *etc.*) to produce the same biological effect [16]. The RBE is clinically relevant as it could allow clinicians to adapt the delivered doses according to the performances of the new therapeutic system or strategy, in comparison to conventional treatments. For example, medical physicists and radiation oncologists would have to deliver 30 Gy with NPs instead of delivering 60 Gy, if the therapeutic strategy "X-rays with NPs" was characterized by a RBE of 2. The concept of RBE has already been discussed by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) [17] and the International Commission on Radiation Units & Measurement (ICRU) [18].

The RBE is very close to the concept of DMF that applies to radiosensitizers or radioprotectors and should be useful and relevant with NPs. As defined by the International Atomic Energy Agency (AIEA) [19], the DMF is:

$$DMF = \frac{\text{Dose to produce an effect with radiosensitizer / radioprotector}}{\text{Dose to produce the same effect without radiosensitizer / radioprotector}}$$

Typically, *in vitro* experiments yielding to survival curves and LQ model parameters are suitable and useful to determine the DMF.

For example using the results of Jain *et al.* [20] who irradiated MDA-MB-231 cells with a 6 MV accelerator, we measured a SF2 of 72.3%. Then we observed that the dose in presence of 1.9 nm GNPs, which lead to a survival fraction of 72.3%, is 1.39 Gy. Therefore the DMF calculated from this particular set of results is equal to 0.695. As the DMF is inferior to 1,

the GNPs used by Jain *et al.* have an *in vitro* radiosensitizing power at 6 MV regarding MDA-MB-231 breast cancer cells.

Measurement of the NER (mono-dose)

Even though the DMF is a relevant parameter for clinical practice, it is not systematically available in preclinical studies that evaluate and compare the radiosensitizing properties of specific NPs. Indeed, the DMF determination implies to test different doses of radiations and this approach is not always feasible, in particular in *in vivo* studies. Some authors have just compared biological effects induced by X-ray therapy in presence or absence of NPs for a single radiation dose. In these cases, only the "NP-mediated" Enhancement Ratio (NER, by similarity to the well-known oxygen enhancement ratio) is available [21].

As an illustration, Xiao *et al.* [22], evaluated the viability of HeLa cells after an exposition to multi-functional core/satellite nanotheranostics followed by an irradiation of 6 Gy. We measured that the cell viability without nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 88%. The viability for 600 $\mu\text{g/mL}$ of nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 69%. Therefore the NER for this result is 0.784.

Measurement of ROS

Although the role of ROS in the treatment of cancer is controversial, the evaluation of their production could bring new information concerning the radiosensitizing effect of the studied NPs.

Because of the high sensitivity and the simplicity in data collection, some authors [23-25] have chosen to assess the radiosensitizing power of NPs by measuring variations in the production of ROS upon irradiation. To assess that, authors have conducted experiments in solution (water or other solvent) or *in vitro* using chemical probes that fluoresce in presence of ROS. Fluorescence was commonly monitored using fluorescence spectroscopy or microscopic imaging techniques due to their high spatial resolution.

For example, Takahashi *et al.* proved the improvement of ROS generation of their CdSe NPs under irradiation using hydroethidine-dihydroethidium (DHE) which is a reagent that is converted to ethidium on reaction with ROS such as O_2^- and OH^- . Generation of ROS was observed as a function of X-rays doses in aqueous solution, and its amount depended on the concentration of NPs [9]. More recently, Townley *et al.* evaluated the formation of ROS by their titanium NPs after irradiation in water using coumarin that reacts with ROS to generate highly fluorescent 7-hydroxycoumarin. In the absence of NPs they observed no fluorescence. In the presence of NPs,

bright fluorescence indicated ROS production [26]. Few authors described results that followed the same tendency [13, 27-29].

According to the chemical probe chosen, authors have focused on different ROS. Misawa *et al.* reported the use of the chemical probe aminophenyl fluorescein (APF) to analyze the GNP-induced enhancement of $\cdot\text{OH}$ as this fluorescein derivative yield a bright green-fluorescent product when it reacts with $^1\text{O}_2$ or OH^- [24]. Similarly, Gara *et al.* [25] used phenol (PhOH), furfuryl alcohol (FFA) and histidine (HIS) as scavengers to evaluate the ROS formation of silicon NPs. They showed that the NPs are capable of enhancing the yields of $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^{\cdot}$ and OH^- in aqueous suspensions as a consequence of X-rays absorption. Moreover, $^1\text{O}_2$ is formed in irradiated solutions only in the presence of the NPs.

Among the 64 papers we analyzed, 7 papers are dealing with the *in vitro* evaluation of ROS. They all used the cell-permeable fluorogenic probe DCFH-DA, commonly known as dichlorodihydrofluorescein, supplied as the diacetate ester. It is used as an indicator of ROS. Following enzymatic or base-catalyzed cleavage of the diacetate groups, it is readily oxidized to the highly fluorescent product dichlorofluorescein (DCF).

Parameters not depending on nanoparticles design

The present paragraph focuses on nanoparticle-independent parameters that can significantly alter the radiosensitizing power of NPs, *i.e.*: (i) the biological evaluation methodologies, (ii) the energy of the incident photon beam and (iii) the irradiation setup.

Biological evaluation methodology

Consistently with classical experimental methods in radiobiology, lot of authors performed clonogenic assays to compare the cytotoxicity of radiations with or without NPs [9, 30-33]. Chang *et al.*, Liu *et al.* and Butterworth *et al.* reported radiation dose-survival curves, allowing the comparison of response profiles, while Chang *et al.*, Roa *et al.*, Rima *et al.* and Coulter *et al.* tested only one dose of radiation. Most of studies focused on results obtained after 2 Gy-irradiation as this dose is consistent with radiotherapy clinical fractionation [31, 32, 34]. To evaluate the radiosensitizing effect of NP, other biological tests such as viable cell count using Trypan blue, metabolic assays, apoptosis detection, or $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ foci detection were also reported, alone and instead of clonogenic assays, or in addition and in comparison to them. It is noteworthy that in many cases, these biological tests have been conducted before clonogenic assays and

applied to NP alone. Metabolic assays used were mainly based on the enzymatic reduction of tetrazolium dye (MTT, MTS, WST-1) but also on the resazurin sodium salt reduction (Alamar blue test) [21]. Except in Liu *et al.* study, articles concluded to a reduced cell viability rate when irradiation was combined with NP exposure [32]. When comparison was possible, results of metabolic assays and clonogenic assays were concordant [28, 31, 35, 36]. Even though the "time" was not systematically mentioned, it is noteworthy that these metabolic tests could have been performed at different time post-irradiation. According to whether they were made in short- or long-term after irradiation, the results obtained do not reflect the same mechanisms of cell loss. Indeed, Mowat *et al.* that have measured cell viability 7 days post-irradiation have included the radiation-induced mitotic cell death [37], while several works only considered the cell death occurring in the first 24h or 48h [31, 35].

Few authors have also investigated cell apoptosis to compare radiation cytotoxicity with or without NP exposure. Cell apoptosis have been detected by flow cytometry after Annexin-FITC staining [28, 38] or by identifying the sub-G1 population [13, 31]. Authors demonstrated an increase in cell apoptosis when irradiated cells were in contact with NP.

Instead of or in complement with methods to evaluate cell survival, many authors have compared the radiation-induced DNA damage in presence or absence of NP. Experiments were based on the detection of DNA double-strand breaks as they are the most lethal lesions. To do that, differential plasmid DNA migration on agarose gel electrophoresis [39, 40] and comet assays [41] have been reported. More frequently, foci of $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ and/or foci of 53BP1 which are well-known as markers of DNA double strand breaks were detected by immunofluorescence techniques. *In fine*, the interpretation of results remains difficult because of the heterogeneity of protocols used. In some studies, authors have fixed cells rapidly post-irradiation and have thus investigated the number of radiation-induced lesions while in other cases [32, 42], authors have followed the capacity of cells to repair DNA double strand breaks, assuming that only unrepaired lesions could cause cell death [43].

In vivo experiments aiming to evaluate the radiosensitizing potential of NPs have been performed using tumor xenografts in immunodeficient rodents and tumor growth or animal survival have been followed [11, 38, 44-46]. In case of NP with imaging application, orthotopic models, notably intracranial xenografts were preferred as they are more relevant than subcutaneous ones [11, 46]. According to studies, the route of NP administration differed: intratumoral

injection reported by Maggiorella *et al.* or Chattopadhyay *et al.* allowed to overcome the problems of biodistribution [42, 45]; by contrast, for intravenous or intraperitoneal administrations [38, 46] it could be necessary to optimize the drug-irradiation interval [11]. Generally, irradiation to treat tumor-bearing animals was delivered as a single dose comprised between 5 and 35 Gy [46, 47]. Only Maggiorella *et al.* have tested a fractionated schedule (2 x 4 Gy) [45].

Histological observation and immunohistochemical analysis have been carried out to illustrate treatment-induced cell death. Especially, the TUNEL assay allowing the apoptosis detection has been reported [30, 45].

The energy of the incidents X-rays (source)

In X-ray external radiation therapy, low energy beams (until 200 kV) have very few applications and are dedicated to skin treatments (< 5 mm in depth, *e.g.* melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, keloid) (Fig. 1). Medium energies 200 kV to 1 MV (orthovoltage and supervoltage X-rays) were widely used for shallow treatments since the 1930's - 1940's but became less advantageous at the advent of high-energy electrons during the 1960's - 1970's. Nowadays, high-energy beams, also called megavoltage beams, (1 to 25 MV) are by far the most commonly used as they allow the treatment of deep tumors (> 2 cm in depth).

As the impact of the beam energy on the RBE (without NPs) has already been shown [48], it is then legitimate to ask whether the beam energy would have an impact on the radiosensitizing properties of high-Z-NPs. Cell damages following interactions between X-rays and high-Z NPs mostly result from the photoelectric effect which is prevailing until the photon energy reaches 500 keV (*e.g.* for Au). As a consequence, one could conclude that the radiosensitizing effect of these NPs should be stronger for

low-energy beams. However, radiation therapy beams are poly-energetic, and high-energy spectra have a low-energy component which triggers photoelectric effects. Moreover the medium- and high-energy components should theoretically interact with matter (here in high-Z NPs and biological matter) by Compton effect, therefore releasing lower energy photons. These latter, depending on their energy, trigger in turn either photoelectric or Compton effects. That is why a substantial radiosensitizing effect of high-Z NPs can be expected for high-energy beams.

In order to assess this crucial question, we have carried a numerical analysis only based on *in vitro* results; corresponding studies have been summarized in Table 1. Indeed, among the publications that we studied, 18 evaluated the radiosensitizing effect of NPs using an analytical method or a Monte Carlo simulation algorithm (MCNP5, MCNPX, Geant4, PENELOPE or EGSnrc) often comparing kV and MV photons. We did not take them into account because Butterworth *et al.* [33] have already shown that *in vitro* experiments did not fit early physical predictions. Even though, we reported these publications in the Table 2.

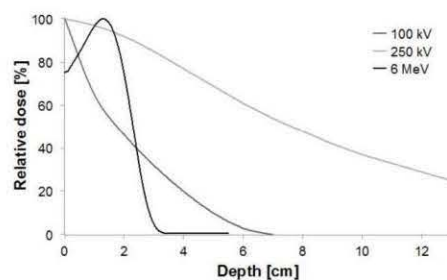


Figure 1. Depth-dose curves normalized at the depth of maximum for 100 kV, 250 kV and 6 MeV beams (kV = photons, MeV = electrons).

Table 1. *In vitro* or *in vivo* experiments dealing with the radiation therapy enhancement by nanoparticles.

REFERENCE	EXPERIMENTS	PARTICLE	SOURCE	MATERIAL	SIZE (range: nm) [nm]	DMF
[43]	<i>In vitro</i>	γ	¹²⁵ I	Au	50	
[34]	<i>In vitro</i>	Not Applicable	Not Applicable	Gd	5	
[26]	<i>In vitro</i>	X	250 kV	Ti	65	
[41]	<i>In vitro</i>	X	40 kV	Fe	10	
				Bi	30	
[46]	<i>In vivo</i>	X	100 kV	Au	10	
[42]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Au	30	0.74
	<i>In vitro</i>					
[38]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	Au	4.8-46.6	
	<i>In vitro</i>					
[45]	<i>In vitro</i>	X or γ	⁶⁰ Co	Hf	50	0.765
	<i>In vitro</i>		6 MV			
[13]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	
[11]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	50-350 keV	Gd	2	
[28]	<i>In vitro</i>	X	90 kV	Au	14	

[79]	<i>In vitro</i>	Electrons	6 MV 60 keV	Au	5-13	
[20]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	160 kV 6 MV 15 MV 6 MeV 16 MeV	Au	1.9	0.499 0.695 0.695 0.706 0.718 0.745 0.776 1.18
[21]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	50	
[37]	<i>In vitro</i>	X	660 kV 6 MV	Gd	5	
[80]	<i>In vitro</i>	X	200 kV	Au	Not Applicable	
[32]	<i>In vitro</i>	X or Protons	6.5 keV 45 kV 160 kV 6 MV 3 MeV	Au	6.1	0.354 0.411 0.496
[81]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	0.46 0.516 0.908 0.949 0.977 1 1.17 1.22
[82]	<i>In vivo</i>	X (synchrotron)	20-190 keV 80-300 keV	Au	1.9	
[83]	<i>In vitro</i>	Carbon ions	276 MeV/amu	Pt	3	
[84]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	80 kV	Au	2	
[50]	<i>In vitro</i>	X	40 kV 80 kV 120 kV	Au	37.5	
[40]	<i>In vitro</i>	X	30 kV 80 kV 100 kV 120 kV 150 kV	Au	8 20 37 74 92	0.2 0.25 0.5
[49]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	80 kV 150 kV 6 MeV 12 MeV	Au	1.9	0.1 0.221
[31]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	Au	10.8	
[85]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	La	10	
[30]	<i>In vitro</i>	X or γ	200 kV	Au	10.8	
	<i>In vivo</i>		⁶⁰ Co ¹³⁷ Cs			
[86]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	4.7	
[87]	<i>In vitro</i>	γ or carbon ions	⁶⁰ Co 62 MeV	Au	1.9	
[52]	<i>In vitro</i>	X	105 kV 220 kV 6 MV	Au	50	
[88]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	13	
[89]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	50 keV	Au	1.9	
	<i>In vivo</i>		88 keV		15	
[90]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Bi	50	
[91]	<i>In vitro</i>	X	150 kV	Au	23	0.66
	<i>In vivo</i>		175 kV			
[8]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Ti	10	0.627 0.637
[7]	<i>In vivo</i>	X	200 kV	Ti	10	
[23]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Fe	3-20	
[25]	<i>In vitro</i>	X	4 MV	Si	3	
[24]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Au	5-250	
[27]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Not Applicable	48	
[47]	<i>In vitro/In vivo</i>	X	6 MV	Au	28.9-47	
[10]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	CdSe	25	0.631
[92]	<i>In vitro</i>	X	150 kV 10 MV	Ce	7	
[9]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	CdSe	10	
[51, 61]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	30-100 keV	Au	1.9	
[61]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Au	1	

Table 2. Analytical or Monte Carlo calculations concerning the radiation therapy enhancement by nanoparticles.

REFERENCE	CODE	PARTICLE	SOURCE	MATERIAL	SIZE [nm]
[55]	GEANT4	X	150 kV 15 MV	Au	Not Applicable
[93]	MCNP5	X or γ	¹²⁵ I ¹⁶⁵ Yb ¹⁹² Ir 50 kV	Au	1.9
[94]	EGSsrc	X or γ	¹⁰⁸ Pd ¹²⁵ I ¹⁶⁵ Yb ¹⁹² Ir 50 kV 6 MV	Au	1.9
[95]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[96]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	Gd	Not Applicable
[63]	MCNP5 PENELOPE	X or γ	¹⁰⁸ Pd ¹²⁵ I ¹⁶⁵ Yb ¹⁹² Ir 6 MV	Au	1.9 5 30 100
[97]	GEANT4	X	6 MV 15 MV	Au	1.9
[58]	GEANT4	X	20 – 150 keV 160 kV	Au	1.9
[98]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	I	Not Applicable
[99]	GEANT4	Electrons	50 keV 250 keV 1 MeV 4 MeV	Au	2 50 100
[45]	PENELOPE	X	200 keV 1 MeV 6 MeV	Hf	50
[100]	Analytical calculation	X	80 – 120 kV	Au	1.9
[101]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[59]	GEANT4	X	80 kV 6 MV	Au	400
[102]	PENELOPE	X	220 kV	Au	Not Applicable
[103]	MCNPX	X or γ	50 – 120 keV ⁶⁰ Co 6 MV 18 MV	Au	30 50 100
[104]	GEANT4	X	6 MV	Au	10 100
[105]	Analytical calculation; Eclipse 8.6 @Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA	X	6 MV	Au	1.9

We divided the performed studies using medical X-rays into two categories: the first one corresponds to low and medium energies, *i.e.* comprised between 1 kV and 1 MV and the other one corresponds to high energies (*i.e.* 1 to 25 MV). When achievable, we measured the DMF in papers that contain survival curves to quantify the radiosensitizing effect of NPs. The "biological effect" was defined as the SF₂ without NPs (Fig. 2).

A plot of the calculated DMF values *versus* beam energy is illustrated on figure 3. Due to the multitude of irradiations settings and environments between experiments, the inter-study comparison of the DMF should be considered with care. Moreover, in some studies, the energy is not the only parameter that varied. Therefore, in order to analyze the source en-

ergy parameter only, we have decided to focus on the analysis of papers where the energy was the only variable (Fig. 3). Rahman *et al.* [49] reported high dose enhancement (DMF \leq 0.1) at 80 and 150 kV in the same study. Survival curves were obtained using a colorimetric method. It seems that in the presence of NPs, curves do not follow the LQ model anymore ($\alpha \rightarrow 0$ when the concentration increases). The authors concluded that their results gave an indication of some energy dependence because the source was the only parameter that was changed. Brun *et al.* [40] assessed the effect of 6 combinations energy/filtration. They could not clearly observe an energy dependence but did not directly measure the cell survival. Their conclusions were based on a plot of the dose enhancement factor *versus* the effective X-ray energy but

the enhancement factor was linked to the loss of supercoiled DNA. In another study, Brun *et al.* [50] evaluated the enhancement of X-ray-induced degradations of human centrin 2 proteins (Hscen2). Centrin is a small acidic protein, highly conserved in eukaryotes, from algae and yeast to humans. They demonstrated that X-ray-induced degradations could not lead to explicit energy dependence. However, one could regret that non-standard biological assays were used in these studies. Recently, Rahman *et al.* [51] observed the influence of the energy of synchrotron-based mono-energetic photon beams (from 30 to 100 keV) and found out that the optimal energy was 40 keV. However, no correlation was made between the source energy and the *in-vitro* radiosensitization by NPs.

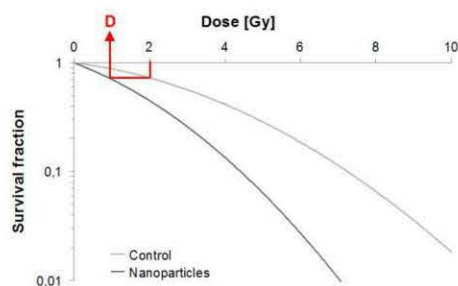


Figure 2. Survival curve example. Illustration of our DMF assessment strategy.

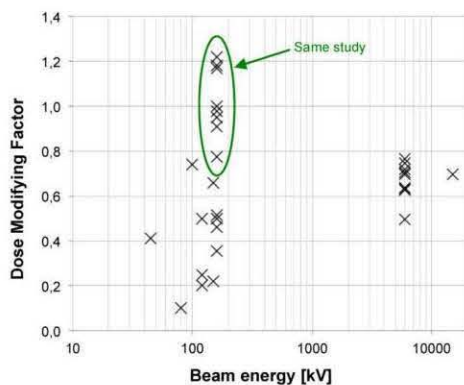


Figure 3. Plot of the calculated DMF values from publications versus beam energy. For energies up to 200 kV, we identified 21 publications dealing with *in vitro*, 2 *in vivo* and 2 with both *in vitro* and *in vivo* experiments during the period 2008-2014. In the range from 200 kV to 1 MV, 3 *in vitro* publications were studied. Upon *in vitro* experiments, the DMF varies from 0.1 to 1.2. Lower values (which are representative of a high radiosensitization) were observed for lower energies. Concerning high-energy beams, 13 publications were analyzed for *in vitro*, 1 for *in vivo* experiments and 1 for both; 1 used a 4 MV beam, 13 a 6 MV, 1 a 10 MV and 1 a 15 MV. Upon *in vitro* experiments, the DMF varies from 0.7 to 0.8 for passive GNP, 0.5 for PEG-coated GNP and 0.6 for a Photofrin® and quantum dots combination.

Two papers [20, 52] demonstrated a noteworthy influence of the energy on the radiosensitizing effect of NPs in SK-OV-3 (105 kV, 220 kV, 6 MV) and MDA-MB-231 (160 kV, 6 MV and 15 MV) cell lines. Concerning the results published by Jain *et al.* we measured, at 160 kV, DMF values of 0.499, 1.180 and 0.776 for MDA-MB-231, DU145 and L132 cell lines respectively. Thus, the cell line parameter seems highly influent. However, for the 6 MV beam, we measured DMFs of 0.695, 0.718 and 0.706 for the 3 cell lines respectively. The DMF measured for MDA-MB-231 after a 15 MV irradiation is 0.695. Surprisingly, at high energies, results do not depend on the cell lines anymore, pointing out that kV irradiations are more subject to additional variations than MV ones.

As results DMF are, to some extent, disparate for low and medium energy X-rays, they are interestingly similar for high energies (6 MV in particular). This may be due to a noteworthy diversity of low- and medium-energy spectra. Indeed the later beams differ widely from one another for the following reasons (not exhaustive list): large number of tube manufacturers, anode materials, filters, *etc* and this is certainly a major drawback for the comparison of studies. On the contrary, clinical MV spectra are remarkably similar which makes them more suited for comparisons.

Based on *in vitro* and *in vivo* studies published during 2008-2014, we found that there are evidences that the energy of the X-rays source has a major influence on the radiosensitizing power of NPs. We notably noticed that 6 MV irradiations resulted in a DMF close to 0.65 with a low variability even for different NPs designs or cell types. For example, applying a DMF of 0.65 to clinical situations means fractions of 2 Gy could be replaced by 1.3 Gy fractions with the same biological effect on tumors that contain NPs. It could be an important benefit for the patient with less side effects and a better treatment tolerance. Working at 6 MV, besides facilitating the comparisons of NPs, would allow easier transitions to clinics where high-energy X-rays are the standards. Nevertheless, as high-energy medical linear accelerators are not easily accessible, a standardization of low-energy irradiation protocols should be proposed to evaluate the radiosensitizing power of NPs in laboratory.

Irradiation setup

The irradiation methodology may drastically influence the studies results and only few authors have detailed this point. The irradiation should be reproducible, repeatable and close to the clinical situations. It is therefore recommended to comply with the following propositions. The absorbed dose should be correctly calculated: cells/tissues/tumor should be at

the electronic equilibrium (\approx surrounded by sufficient water equivalent medium). If possible, cells or animal models should be surrounded with water equivalent materials that could bring scattered photons of lower energy (which interacts by photoelectric effect).

The energy held by the scattered photon is related to the energy of the incident photon [53]. Therefore backscattered photons, which carry less energy, are interesting for X-rays-NPs interactions purposes. Then the cells/tissues/tumor should be located in a low dose gradient: after the depth of the maximum dose and inside the beam, off the penumbra region. Sufficient medium should be placed after the cells/tissues/tumor in order to generate enough scattered photons (Compton effect). Finally, cells/tissue/tumor should be at a clinical distance from the source (*e.g.* 100 cm for a high-energy medical accelerator). Advices from a medical physicist could be of great use. The figure 4 illustrates an example of an irradiation scheme for a 6 MV accelerator treating a cell well plate.

For precise inter-study comparisons, the irradiation methodology should be the same with similar beam energy spectra. That is why high-energy beams (*e.g.* 6 MV) are well suited for that purpose.

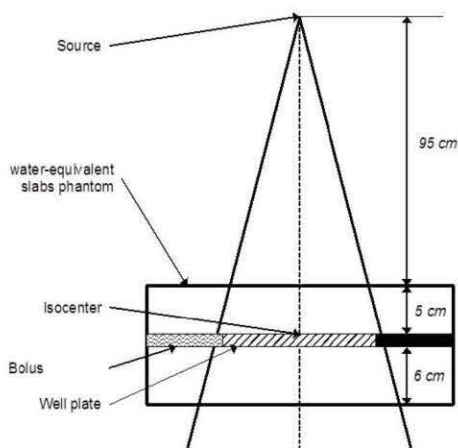


Figure 4. Example of a standard irradiation setup for a 6 MV irradiation of a cell-well plate placed at the linear accelerator's isocenter under 5 cm of water-equivalent slabs.

Influence of nanoparticles design on the radiosensitization

NPs usually have a simple structure composed of a core, a shell and a surface [54]. In the case of radiosensitizing NPs, the core is usually made of high-Z materials such as silver, lanthanides and most extensively of gold, in order to exploit the increased photon

absorption. The shell, which is chemically or physically bound to the core, acts as a base on which surface molecules (which sometimes include active agents) are anchored or bound with or without spacers. However, the high Z-elements can also be chelated by ligands present at the surface or inside the nanoparticle. The surface molecules usually consist of site-, tissue-, cell- and/or receptor-specific molecules (targeting units). In the following paragraphs we will review the influence of the NPs design on: (i) interactions between X-rays and NPs, (ii) the ROS generation upon irradiation and (iii) the biodistribution of NPs.

X-rays -nanoparticles interactions

Theoretical principles of X-rays interactions with NP have already been described [33]. X-ray interactions with matter happen mostly at low energy where the photoelectric effect is dominant (Fig. 5). The photoelectric effect occurs when the incident X-ray photon is absorbed by the atom, resulting in the ejection of an electron. This effect is prevailing until the photon energy reaches a medium energy (*e.g.* 500 keV for Au) with a cross-section varying with Z^4 or Z^5 depending on the material and is enhanced by an increased absorption by electron shells (K, L, M, etc.) at low energies. As the atom is left in an ionized state, a characteristic X-ray or an Auger-electron emission follows the ejection of a photoelectron. That is why the radiosensitizing NPs are based on high-Z materials. More theoretical proofs can be found in the literature [6, 55]. The Auger effect especially concerns low-Z atoms [56] and therefore would not be a major contributor to the dose deposited in the presence of high-Z NPs. Indeed, it is dominant for $Z < 15$ but almost equal to 0 for $Z > 60$ [57].

For medium- or high-energy beams (always poly-energetic in clinical routine), the low-energy component of the spectrum will interact with matter by photoelectric effect and the medium- and high-energy components are more likely to interact by Compton effect. Compton effect occurs when the incident X-ray ejects an electron and a photon is scattered from the atom. This effect does not depend on the Z of the targets. The scattered photon, depending on its energy, will trigger either photoelectric or Compton effects.

Compton, Photo- or Auger-electrons can induce the emission of secondary electrons (also called delta rays) that are believed to be responsible for the majority of cells damages. One should notice that for very low energies photons, the ejected photoelectron might not carry a sufficient energy to cause subsequent ionizations. Opposite information about the dose deposited by Auger or photo-electrons in the vicinity of the NPs have been published in the litera-

ture. McMahon *et al.* found that the contribution of Auger electrons was dominant [58] and Douglass *et al.* claimed that the Auger electrons contribution was insignificant [59] even though they were using the same simulation code (Geant4). Some authors described an auto-absorption phenomenon that can be amplified by the size of the NPs and the presence of other high-Z atoms in its vicinity (*e.g.* a cluster of NPs)

[58]. Low-energy secondary species would be the first to be absorbed. Therefore the design of the NPs is of utmost importance concerning the radiation therapy enhancement; high-Z components can increase the number of secondary species because of a Z^5 dependence of the photoelectric effect and bigger NPs or clusters tends to favor the auto-absorption of low energy electrons.

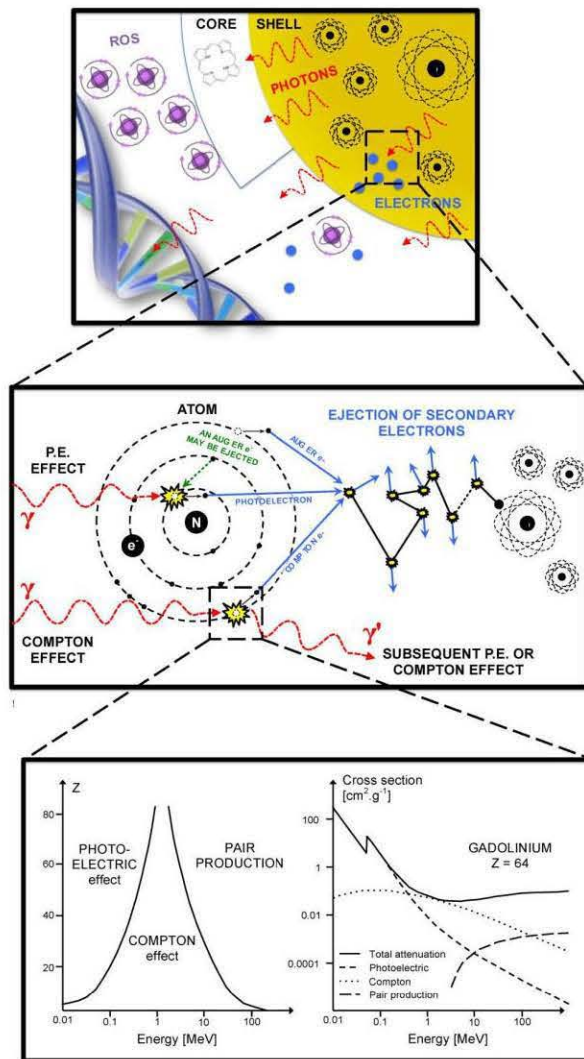


Figure 5. Interactions of X-rays with NPs result directly or indirectly in the production of secondary species: photons, electrons and later ROS. Secondary photons or electrons are mostly generated either by photoelectric or Compton effect. The photoelectric effect interaction probability varies with Z^4 or Z^5 and dominant until the incident photon energy reaches ≈ 500 keV.

Heavy metal-based NPs have also been suggested as effective tumor-targeting theranostic agents with dual functions: efficient targeted system for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [60]. Guided by tumor-targeted X-ray computed tomography imaging, their radiosensitizing effect was investigated using a clinical megavoltage photon beam. In this innovative study, BaYbF5: 2% Er³⁺ NPs could be excited by near-infrared laser and emit upconversion luminescence with greatly suppressed auto fluorescence, photo damage and toxicity, which could be ideal for cell or even tissue tracking.

ROS generation upon X-rays

The mechanisms involved in the ROS generation upon X-rays irradiation in the presence of NPs differ depending on the composition, size, and potential of these NPs. Thereby, Misawa *et al.*, using two kinds of fluorescent probe APF and DHE, compared the ROS production when GNP, from 5 to 250 nm, were subjected to X-rays irradiation and UV light in water [24]. GNP-induced enhancement of ·OH and O₂⁻ generation was confirmed. Moreover, the authors demonstrated that smaller diameter GNP with larger surface area showed a greater yield of ROS. The increase in ROS generation was also corroborated by recently published results of Klein and *al.*, which illustrates the *in vitro* formation of ROS in SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) loaded MCF-7 cells exposed to X-rays. In particular, they demonstrated that citrate-coated SPIONs may function as excellent radiosensitizers upon enhancing the impact of X-rays on the ROS generation for about 240% when compared with X-ray treated cells without internalized SPIONs. The ROS production in iron oxide NP loaded cells was explained to originate from both, the release of iron ions and the catalytically active surfaces of silica NPs with an oxidation of SiO₂ following irradiation [23-25]. Interestingly, a link was evidenced between the intracellular localization of SPIONs, and the ROS generation; functionalization with an amine function of silica NPs can significantly increase the

ROS production due to their positive surface charge, which facilitates NPs accumulation in the membranes of the endoplasmic reticulum, vesicles and especially mitochondria [61]. SPIONs presence in the membranes also induced a membrane lipid peroxidation, improving the radiosensitizing effect [61].

Influence of nanoparticles design on tumor selectivity, cellular uptake, intracellular localization and biodistribution

As organs at risks may be at the vicinity of the tumor and given that there is some evidence of an energy dependence of the radiosensitization by NPs, this observation has to be taken into consideration when prescribing NPs (Fig. 6). Therefore, it is of utmost importance that radiosensitizing NPs concentrate in the tumor and not in the healthy organs at its vicinity. That is why it has been suggested that GNP-based radiosensitizers should have targeting moieties (*e.g.* glucose, antibodies) to improve NP uptake by tumor cells. For example, Chattopadhyay *et al.* demonstrated that trastuzumab-conjugated GNPs were well-internalized into HER-2 overexpressing SK-BR-3 breast cancer, while non-targeted NPs had little or no internalization in these cells, and trastuzumab-conjugated GNP have led to 5 times more DNA double strand breaks than the non-targeted GNP. It should also be noticed that the energy spectrum of radiation therapy beams always depends on the clinical setting (depth, field size, in-field localization of NPs, *etc.*). Scarboro *et al.* calculated 6 MV energy spectra variations with treatment parameters [62]. They showed that when the depth along the central axis increased, the low-energy contribution of the spectrum increased and the high-energy part decreased. For instance, for a 10 cm x 10 cm field, at a depth of 10.0 cm the flux of particles which carry an energy of 100 keV is two times more important than at a depth of 1.6 cm. Therefore, the radiosensitizing effect of NPs may be slightly more important for deep tumors. They also noticed that off axis spectra contained dramatically more low energy components than central axis ones.

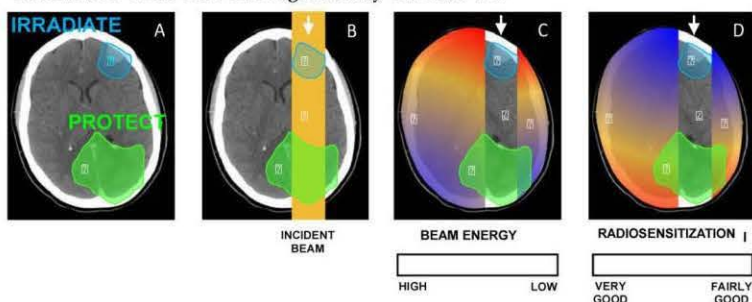


Figure 6. (A) Illustration of a clinical scenario where a volume (blue) has to be irradiated while a part of an organ (green) has to be protected. (B) A simple anterior beam is irradiating the blue volume. (C) The beam energy is maximum in the irradiation field and is reduced out of the field. (D) Given that the interaction probability is higher for low-energy photons, the radiosensitization in presence of NPs should be higher out of the irradiation field. In this case, the green volume that has to be protected would be in the most radiosensitized area.

At a cellular level, several studies aimed at estimating the diffusion abilities of secondary species induced in case of interactions between X-rays and NP and most of authors have concluded that the path of secondary electrons is very limited, from a few tens of nanometers to a few micrometers. For example, Chattopadhyay *et al.* using a 100 kVp X-ray beam and GNPs, reported that 99% of the Auger electrons were stopped before 100 nm, because of their low average energy and a very short penetration range [42, 63]. Meesungnoen *et al.*, for their part, have described a penetration range shorter than 20 μm for photoelectrons with an average energy of about 43 keV [64]. Given that the cell size was about 10-20 μm , these works suggest that lethal effects resulting from X-rays and NP interactions could only be obtained if NPs are localized into the cell. Hence, the internalization of NP into tumor cells is a pre-requisite. Cellular uptake of NPs is highly dependent on the design of the nano-object and numerous studies have demonstrated that modifications of the physicochemical properties of the NP have great consequences on the cellular entry and biological processes [65]. In a recent work, Rima *et al.* assessed the cellular internalization mechanisms for sub-5 nm gadolinium-based NPs and evidenced both passive diffusion for single particles and macropinocytosis in case of agglomerates [34]. Herein, significant radiosensitization was only found with NPs clusters.

Besides the impact on cellular uptake, NP design also determines their intracellular localization, which in turn exerts a critical impact on the induced radiosensitization. In particular, the functionalization of the NPs plays a central role in the redirection of the particle to specific cell subcompartments. For instance, Kong *et al.* demonstrated that their GNPs were mostly bound to the cell membrane, while thioglucose-GNPs were distributed in the cytoplasm, leading to a higher decrease in cell survival after X-rays irradiation [35]. However, in a recent study [66], a sub-50 nm nuclear-targeting rattle-structured upconversion core/mesoporous silica nanotheranostic system was designed to directly deliver radiosensitizing drug Mitomycin C into the nucleus for greatly enhanced damaging of the DNA with the assistance of X-ray irradiation. More importantly, the authors develop a new theranostic technique of "intranuclear radiosensitization", meaning that the radiosensitizing drug molecules released into the nucleoplasm may not only efficiently break down the intranuclear DNA, but also effectively enhance the radiotherapy efficacy due to the intranuclear chemodrug-sensitized radiation enhancement effects. Moreover, *in vitro* significant radiosensitization has been noted for GNPs localized far from the cell nucleus [49]. Consistently, according to

the recent literature in this field, it seems that the relative distance from the DNA is not a crucial factor [52, 67].

Concerning *in vivo* applications of NP-based radiosensitization, the first priority concerns the NP selectivity for tumor tissue to avoid any radiosensitization of adjacent normal tissue. To circumvent this difficulty, intratumoral injection was sometimes preferred and used [42, 45]. For systemic delivery, the engineering of NPs on the size, shape, physicochemical characteristics and targeting moieties is critical, given that these parameters strongly affect the circulation time of the NPs, their biodistribution and their availability for effective therapy [68]. As described by Dufort *et al.*, after intra-venous injection, accumulation of GNPs in the tumor tissue could be achieved passively by relying on the increased permeation and retention of the leaky vasculature of tumors (EPR effect) [65]. Nevertheless, the tumor-to-normal tissue NP ratios need to be improved in further preclinical trials. Notably, in preclinical *in vivo* studies, few experiments were conducted to optimize the time between NPs administration and irradiation, while this point appears to be critical. However, NPs have been suggested as theranostic agents for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [60].

Future applications: e.g. photodynamic-therapy combined with high-Z radiosensitizers

PDT is based on the concept that certain Photosensitizers (PS) can be localized in neoplastic tissue, and can subsequently be activated with the appropriate wavelength of light to generate active molecular species such as free radicals and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) that are toxic to tumors. The limited penetration range of light makes this therapy most appropriate for small or superficial lesions. In order to treat deep lesions, it may be possible to use X-rays as excitation source instead of light. With this novel therapeutic approach, the light penetration problem can be overcome and activation of the photosensitizer within tumors would be performed using ionizing radiation. This new modality will allow treatment of deep tumors using lower radiation dose than conventional radiotherapy.

Chen W and Zhang J described for the first time the potential of NPs to enable simultaneous radiation and photodynamic treatment in 2006 [5] and in a review in 2008 [69]. They obtained an US patent in 2007 for luminescent NPs with attached PSs such as porphyrins used as a new type of agents for PDT. Upon exposure to ionizing radiation, light would be emitted from the NPs to activate the PS; as a consequence, $^1\text{O}_2$

would be produced to increase the killing of cancer cells by ionizing radiation. No external light would be necessary to activate the PS within the tumor. Chen and Zhang described the synthesis of $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ -meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine (MTCP) NP conjugated to folic acid and investigated the energy transfer as well as the formation of $^1\text{O}_2$ following X-ray irradiation [70]. They proved that upon X-ray irradiation, the porphyrin alone is a radiosensitizer but the effect is enhanced when MTCP is coupled to $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ NPs targeted or not with folic acid. The average energy transfer rate in the MTCP conjugates is 56.7%. The same team realized also ZnO-MTAP (meso-(*o*-amino-phenyl porphine)conjugate in which the energy transfer is around 89% [70].

In 2009, Morgan *et al.* [71] tried to calculate the physical parameters required for nanoscintillators to deliver cytotoxic levels of $^1\text{O}_2$ at therapeutic radiation doses drawing on the published literature from several disparate fields. It appears that the light yield of scintillators, the efficiency of energy transfer to the PS and the cellular uptake of the NPs all need to be fairly well optimized to observe a cytotoxic effect. To calculate the required light yield for the NPs to have a PDT effect (formation of 5.6×10^7 of $^1\text{O}_2$) at therapeutic radiation doses, they assumed a non-clinical single-fraction radiation dose of 60 Gy, $\Phi_{\text{FRET}} = 0.75$, $\Phi_{\Delta} = 0.89$ and that NPs occupy a 5% volume fraction in the tissue. They estimated that the efficacy of the combination therapy would likely be restricted to X-ray energies below 300 keV.

Scaffidi *et al.* in 2011 [72], described Y_2O_3 nanoscintillator, a fragment of HIV-1 TAT peptide and psoralen. The authors used commercially available 12 nm diameter cubic-phase Y_2O_3 nanoscintillators on which they coupled TAT or psoralen-TAT. PC-3 human prostate cancer cells were used and they could observe a modest *in vitro* reduction in cell number after X-ray excitation (2 Gy at 160 or 320 kV).

Our team published very recently a paper about X-ray-induced $^1\text{O}_2$ activation with nanoscintillator-coupled porphyrins (Fig. 7) [73]. Tb_2O_3 coated with a polysiloxane layer is a biocompatible nanoscintillator that exhibits an appropriate pattern of biodistribution *in vivo* after injection. The average size of the core-shell NPs grafted with porphyrin is 9.9 nm. Using time-resolved laser spectroscopy and $^1\text{O}_2$ chemical probes, we demonstrated that after X-ray irradiation of the nano-objects, we could observe the formation of $^1\text{O}_2$ as well as a decrease of the luminescence of the core and the increase of the fluorescence of the porphyrin, proving the energy transfer between the core and the photosensitizer. By elaborating new NPs, we hope to increase the efficiency and prove the concept *in vitro* and *in vivo*.

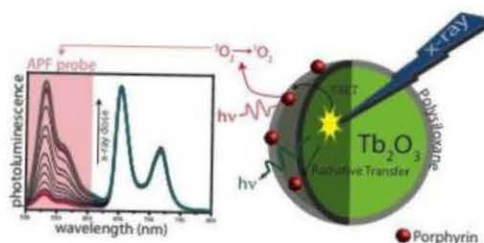


Figure 7. Luminescence of APF probe after X-rays excitation of nanoparticles composed of a Tb_2O_3 core, polysiloxane shell in which porphyrins are covalently linked.

In 2015, inspired by the complementary advantages of PDT and radiotherapy, Zhang *et al.* described the integration of a scintillator and a semiconductor as an ionizing-radiation-induced PDT agent, achieving synchronous radiotherapy and depth-insensitive PDT with diminished molecular O_2 dependence [74]. These very encouraging results are the basis of new NPs developments. Recent Monte Carlo simulations have also been used to numerically estimate the spatial energy distribution resulting from the interaction between the X-ray photon and the NP, leading to a photodynamic and radiosensitization efficiencies. These simulations demonstrated that a significant fraction of energy is deposited within the NPs despite a primary interaction occurring in the surrounding media [75].

Conclusion and future perspectives

We have reviewed parameters that influence the radiosensitizing power of NPs: the biological evaluation methodology, the X-rays energy, the irradiation setup, the X-rays-NPs interaction, the ROS generation and the biodistribution of the NPs. A numerical evaluation was performed to assess the impact of the X-rays energy spectrum on the cell survival in presence of NPs. After the analysis of 64 papers from the literature, we noted that a large number of prospective studies have been carried out on the NPs-enhanced radiation therapy. However, only a few papers were comparable because the experimental settings were different, thus leading to uncertainty as to whether some parameters were influential or not, indicating that more investigations and standardizations are needed to converge towards a conclusion. Nevertheless, the present review strengthens the approach of using NPs to improve radiation therapy. Another parameter that has just been evaluated by Jain *et al.* is the influence of the oxygen conditions [76]. They showed that the radiosensitization power of GNP is lower in hypoxic conditions. The knowledge

of these critical parameters could help investigators to design and evaluate new NPs in a more normalized approach which will be necessary for further translation to clinical applications.

Due attention needs to be paid to the recent emergence of very promising reports about the *in vitro/in vivo* synergetic therapy based on radiosensitization for instance, (i) an enhanced radiotherapy and photothermal ablation under the potential trimodal imaging guidance [22], or a simultaneous dual-mode imaging and localized therapy *via* synergetic chemo-/radiotherapy [77] or a synergetic chemo-/radio-/PDT and simultaneous magnetic/upconversion luminescent bimodal imaging [78].

Last but not least, *in silico* tests could be suggested to screen different nanoparticle designs as a first step to identify the most promising nano-objects. Indeed, a numerical model-based design could allow for quick screening of a large number of architectural configurations and finally identify the most promising formulations to enhance the dose deposition.

Abbreviations

ADPA, anthracenedipropionic acid; AIEA, International Atomic Energy Agency; APF, aminophenyl fluorescein; CFU, colony forming unit; DCFH, Dichlorodihydrofluorescein; DHE, dihydroethidium; DHF, dichlorofluorescein; DMF, Dose Modifying Factor; DNA, deoxyribonucleic acid; EPR, enhanced permeability and retention; FFA, furfuryl alcohol; GNP, gold-based nanoparticle; HIS, histidine; LQ, linear-quadratic; IAEA, International Atomic Energy Agency; ICRP, International Commission on Radiological Protection; ICRU, International Commission on Radiation Units & Measurement; MRI, magnetic resonance imaging; NER, Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio; NP, nanoparticle; PDT, photodynamic therapy; PS, photosensitizer; RBE, Relative Biological Effectiveness; ROS, reactive oxygen species; SF2, survival fraction at 2 Gy; ¹O₂, singlet oxygen; SOSG, singlet oxygen sensor green; SPION: superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

Acknowledgement

This work was supported by the research funds of the ANR P2N ANR-10-NANO-0009 PDTX and INCa "PDTX-Nano", the French Ligue Nationale Contre le Cancer and the French INCa (Institut National du Cancer) project 2011-130 entitled "PDTX-Nano".

The authors would like to thank Wael Rima for his advices and the review of the English language of this manuscript.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol.* 2006; 24: 1211-7.
- Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperth.* 2008; 24: 467-74.
- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem FK, Waldoefner N, Teichgraber U, et al. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol.* 2006; 78: 7-14.
- Starkewolff ZB, Miyachi L, Wong J, Guo T. X-ray triggered release of doxorubicin from nanoparticle drug carriers for cancer therapy. *Chem Commun.* 2013; 49: 2545-7.
- Chen W, Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6: 1159-66.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60: 977-85.
- Townley HE, Kim J, Dobson PJ. In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale.* 2012; 4: 5043-50.
- Mirjoleit C, Papa AL, Crehange G, Raguin O, Seignez C, Paul C, et al. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother Oncol.* 2013; 108: 136-42.
- Takahashi J, Misawa M. Analysis of Potential Radiosensitizing Materials for X-Ray-Induced Photodynamic Therapy. *Nanobiotechnol.* 2007; 3: 116-26.
- Yang W, Read PW, Mi J, Baisden JM, Reardon KA, Larner JM, et al. Semiconductor nanoparticles as energy mediators for photosensitizer-enhanced radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 72: 633-5.
- Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Brauer-Krisch E, Bouchet A, et al. Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS nano.* 2011; 5: 9566-74.
- Liu P, Huang Z, Chen Z, Xu R, Wu H, Zang F, et al. Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma? *Nanoscale.* 2013; 5: 11829-36.
- Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, Taggart LE, Dickson GR, McMahon SJ, et al. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2673-85.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006; 1: 2315-9.
- Kirkpatrick JP, Brenner DJ, Orton CG. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Med Phys.* 2009; 36: 3381-4.
- Agency IAE. Relative Biological Effectiveness in Ion Beam Therapy. International Atomic Energy Agency; 2008.
- Valentin J. Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (W_R). International Commission on Radiological Protection; 2003.
- ICoR Units Measurements, Quantitative Concepts and Dosimetry in Radiobiology. International Commission on Radiation Units and Measurements; 1979.
- Podgorsak EB, Agency IAE. Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students. International Atomic Energy Agency; 2005.
- Jain S, Coulter JA, Hounsell AR, Butterworth KT, McMahon SJ, Hyland WB, et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 79: 531-9.
- Sim L, Fielding A, English M, Waclawik E, Rockstroh A, Soekmadji C, et al. Enhancement of biological effectiveness of radiotherapy treatments of prostate cancer cells in vitro using gold nanoparticles. Coogee Beach, Sydney, NSW: 2011 International Nanomedicine Conference. 2011.
- Xiao Q, Zheng X, Bu W, Ge W, Zhang S, Chen F, et al. A core/satellite multifunctional nanotheranostic for in vivo imaging and tumor eradication by radiation/photothermal synergistic therapy. *J Am Chem Soc.* 2013; 135: 13041-8.
- Klein S, Sommer A, Distel LV, Neuberger W, Kryschik C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425: 393-7.
- Misawa M, Takahashi J. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV irradiations. *Nanomedicine.* 2011; 7: 604-14.
- David Gara P, Garabano N, Llansola Portoles M, Moreno MS, Dodat D, Casas O, et al. ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. *J Nanopart Res.* 2012; 14: 1-13.
- Townley HE, Rapa E, Wakefield G, Dobson PJ. Nanoparticle augmented radiation treatment decreases cancer cell proliferation. *Nanomedicine.* 2012; 8: 526-36.

27. Wang L, Yang W, Read P, Larner J, Sheng K. Tumor cell apoptosis induced by nanoparticle conjugate in combination with radiation therapy. *Nanotechnology*. 2010; 21: 475103.
28. Geng F, Song K, Xing JZ, Yuan C, Yan S, Yang Q, et al. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology*. 2011; 22: 285101.
29. Cui FB, Li RT, Liu Q, Wu PY, Hu WJ, Yue GF, et al. Enhancement of radiotherapy efficacy by docetaxel-loaded gelatinase-stimuli PEG-Pep-PCL nanoparticles in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014; 346: 53-62.
30. Chang M-Y, Shiau A-L, Chen Y-H, Chang C-J, Chen HHW, Wu C-L. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci*. 2008; 99: 1479-84.
31. Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, et al. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology*. 2009; 20: 375101.
32. Liu CJ, Wang CH, Chen ST, Chen HH, Leng WH, Chien CC, et al. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol*. 2010; 55: 931-45.
33. Butterworth KT, McMahon SJ, Currell FJ, Prise KM. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*. 2012; 4: 4830-8.
34. Rima W, Sancey L, Aloy MT, Armandy E, Alcantara GB, Epicier T, et al. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34: 181-95.
35. Kong T, Zeng J, Wang X, Yang X, Yang J, McQuarrie S, et al. Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles. *Small*. 2008; 4: 1537-43.
36. Khoshgard K, Hashemi B, Arabi A, Rasaei MJ, Soleimani M. Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cancer cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques. *Phys Med Biol*. 2014; 59: 2249-63.
37. Mowat P, Mignot A, Rima W, Lux F, Tillement O, Roulin C, et al. In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11: 7833-9.
38. Zhang XD, Wu D, Shen X, Chen J, Sun YM, Liu PX, et al. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials*. 2012; 33: 6408-19.
39. Butterworth KT, Wyer JA, Brennan-Fournet M, Latimer CJ, Shah MB, Currell FJ, et al. Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles. *Radiat Res*. 2008; 170: 381-7.
40. Brun E, Sanche L, Sicard-Roselli C. Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2009; 72: 128-34.
41. Hossain M, Luo Y, Sun Z, Wang C, Zhang M, Fu H, et al. X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2012; 38: 348-54.
42. Chattopadhyay N, Cai Z, Kwon YL, Lechtman E, Pignol JP, Reilly RM. Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 137: 81-91.
43. Ngwa W, Kordeck H, Kassisi AI, Kumar R, Sridhar S, Makrigiorgos GM, et al. In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds. *Nanomedicine*. 2013; 9: 25-7.
44. Chattopadhyay N, Fonge H, Cai Z, Scollard D, Lechtman E, Done SJ, et al. Role of antibody-mediated tumor targeting and route of administration in nanoparticle tumor accumulation in vivo. *Mol Pharm*. 2012; 9: 2168-79.
45. Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol*. 2012; 8: 1167-81.
46. Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine*. 2013; 8: 1601-9.
47. Jeong SY, Park SJ, Yoon SM, Jung J, Woo HN, Yi SL, et al. Systemic delivery and preclinical evaluation of Au nanoparticle containing beta-lapachone for radiosensitization. *J Control Release*. 2009; 139: 239-45.
48. LAB SL, et al. Biological Effectiveness of Low Linear-Energy Transfer Radiation as a Function of Energy. National Council on Radiation Protection & Measurements; Not released.
49. Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C, et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine*. 2009; 5: 136-42.
50. Brun E, Duchambon P, Blouquit Y, Keller G, Sanche L, Sicard-Roselli C. Gold nanoparticles enhance the X-ray-induced degradation of human centrin 2 protein. *Rad Phys Chem*. 2009; 78: 177-83.
51. Rahman WN, Corde S, Yagi N, Abdul Aziz SA, Annabell N, Geso M. Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 2459-67.
52. Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, van Prooijen M, Allen C, Bristow RG, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res*. 2010; 173: 719-28.
53. Mohr PJ, Taylor BN, Newell DB. CODATA recommended values of the fundamental physical constants: 2006a). *J Phys Chem Ref Data*. 2008; 37: 1187-284.
54. Fukumori Y, Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv Powder Technol*. 2006; 17: 1-28.
55. McMahon SJ, Mendenhall MH, Jain S, Currell F. Radiotherapy in the presence of contrast agents: a general figure of merit and its application to gold nanoparticles. *Phys Med Biol*. 2008; 53: 5635-51.
56. Martin JE. *Physics for Radiation Protection*. Wiley; 2013.
57. Feldman LC, Mayer JW. *Fundamentals of Surface and Thin Film Analysis*. Prentice Hall PTR; 1986.
58. McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci Rep*. 2011; 1: 18.
59. Douglass M, Bezak E, Penfold S. Monte Carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3D randomized cell model. *Med Phys*. 2013; 40: 071710.
60. Xing H, Zheng X, Ren Q, Bu W, Ge W, Xiao Q, et al. Computed tomography imaging-guided radiotherapy by targeting upconversion nanocubes with significant imaging and radiosensitization enhancements. *Sci Rep*. 2013; 3: 1751.
61. Klein S, Dell'Arciprete ML, Wegmann M, Distel LV, Neuhuber W, Gonzalez MC, et al. Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434: 217-22.
62. Scarboro SB, Followill DS, Howell RM, Kry SF. Variations in photon energy spectra of a 6 MV beam and their impact on TLD response. *Med Phys*. 2011; 38: 2619-28.
63. Lechtman E, Chattopadhyay N, Cai Z, Mashouf S, Reilly R, Pignol JP. Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 4631-47.
64. Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Filali-Mouhim A, Mankhetkorn S. Low-energy electron penetration range in liquid water. *Radiat Res*. 2002; 158: 657-60.
65. Dufort S, Sancey L, Coll JL. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv Drug Delivery Rev*. 2012; 64: 179-89.
66. Fan W, Shen B, Bu W, Zheng X, He Q, Cui Z, et al. Design of an intelligent sub-50 nm nuclear-targeting nanotheranostic system for imaging guided intranuclear radiosensitization. *Chem Sci*. 2015; 6: 1747-53.
67. Chattopadhyay N, Cai Z, Pignol JP, Keller B, Lechtman E, Bendayan R, et al. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm*. 2010; 7: 2194-206.
68. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J Drug Deliv*. 2012; 2012: 751075.
69. Chen W. Nanoparticle Self-Lighting Photodynamic Therapy for Cancer Treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 2008; 4: 369-76.
70. Liu Y, Chen W, Wang S, Joly AG. Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Appl Phys Lett*. 2008; 92.
71. Morgan NY, Kramer-Marek G, Smith PD, Camphausen K, Capala J. Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers: calculation of required physical parameters. *Radiat Res*. 2009; 171: 236-44.
72. Scaffidi JP, Gregas MK, Lauly B, Zhang Y, Vo-Dinh T. Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon X-ray excitation. *ACS nano*. 2011; 5: 4679-87.
73. Bulin A-L, Truillet C, Chouikrat R, Lux F, Frochet C, Amans D, et al. X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins. *J Phys Chem C*. 2013; 117: 21583-9.
74. Zhang C, Zhao K, Bu W, Ni D, Liu Y, Feng J, et al. Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015; 54: 1770-4.
75. Bulin AL, Vasil'ev A, Belsky A, Amans D, Ledoux G, Dujardin C. Modelling energy deposition in nanoscintillators to predict the efficiency of the X-ray-induced photodynamic effect. *Nanoscale*. 2015.
76. Jain S, Coulter JA, Butterworth KT, Hounsell AR, McMahon SJ, Hyland WB, et al. Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiother Oncol*. 2014; 110: 342-7.
77. Fan W, Shen B, Bu W, Chen F, Zhao K, Zhang S, et al. Rattle-structured multifunctional nanotheranostics for synergistic chemo-/radiotherapy and simultaneous magnetic/luminescent dual-mode imaging. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 6494-503.
78. Fan W, Shen B, Bu W, Chen F, He Q, Zhao K, et al. A smart upconversion-based mesoporous silica nanotheranostic system for synergistic chemo-/radio-/photodynamic therapy and simultaneous MR/UCL imaging. *Biomaterials*. 2014; 35: 8992-9002.
79. Xiao F, Zheng Y, Cloutier P, He Y, Hunting D, Sanche L. On the role of low-energy electrons in the radiosensitization of DNA by gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2011; 22: 465101.
80. Xing JZ, Xiaoyan Y, Jie C, Biao H, Roa W. Electronic dynamic cellular sensor used to measure gold nanoparticles enhanced radiotherapy. *Life Science Systems and Applications Workshop (LiSSA)*, 2011 IEEE/NIH. 2011: 20-3.

81. Butterworth KT, Coulter JA, Jain S, Forker J, McMahon SJ, Schettino G, et al. Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology*. 2010; 21: 295101.
82. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol*. 2010; 55: 3045-59.
83. Porcel E, Liehn S, Remita H, Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, et al. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology*. 2010; 21: 85103.
84. Rahman WN, Wong CJ, Yagi N, Davidson R, Geso M. Dosimetry And Its Enhancement Using Gold Nanoparticles In Synchrotron Based Microbeam And Stereotactic Radiosurgery. *AIP Conference Proceedings*. 2010; 1266: 107-10.
85. Withers NJ, Plumley JB, Triño ND, Sankar K, Akins BA, Rivera AC, et al. Scintillating-nanoparticle-induced enhancement of absorbed radiation dose. *SPIE Proceedings*; 2009: 718917-8.
86. Liu CJ, Wang CH, Chien CC, Yang TY, Chen ST, Leng WH, et al. Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology*. 2008; 19: 295104.
87. Kaur H, Pujari G, Senwal MK, Sarma A, Avasthi DK. In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect B*. 2013; 301: 7-11.
88. Wang C, Li X, Wang Y, Liu Z, Fu L, Hu L. Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *J Nanopart Res*. 2013; 15: 1-12.
89. Bobyk L, Edouard M, Deman P, Vautrin M, Pernet-Gallay K, Delaroché J, et al. Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. *Nanomedicine*. 2013; 9: 1089-97.
90. Alqathami M, Blencowe A, Yeo UJ, Franich R, Doran S, Qiao G, et al. Enhancement of radiation effects by bismuth oxide nanoparticles for kilovoltage x-ray beams: A dosimetric study using a novel multi-compartment 3D radiochromic dosimeter. *J Phys Conf Ser*. 2013; 444: 012025.
91. Joh DY, Sun L, Stangl M, Al Zaki A, Murty S, Santoisemma PP, et al. Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. *PLoS ONE*. 2013; 8: e62425.
92. Briggs A, Corde S, Oktaria S, Brown R, Rosenfeld A, Lerch M, et al. Cerium oxide nanoparticles: influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation. *Nanomedicine*. 2013; 9: 1098-105.
93. Cho SH, Jones BL, Krishnan S. The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources. *Phys Med Biol*. 2009; 54: 4889-905.
94. Jones BL, Krishnan S, Cho SH. Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations. *Med Phys*. 2010; 37: 3809-16.
95. Berbeco RI, Ngwa W, Makrigiorgos GM. Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage X-rays and targeted gold nanoparticles: new potential for external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011; 81: 270-6.
96. Garnica-Garza HM. Treatment planning considerations in contrast-enhanced radiotherapy: energy and beam aperture optimization. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 341-55.
97. McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2011; 100: 412-6.
98. Perez-Lopez CE, Garnica-Garza HM. Monte Carlo modeling and optimization of contrast-enhanced radiotherapy of brain tumors. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 4059-72.
99. Chow JC, Leung MK, Jaffray DA. Monte Carlo simulation on a gold nanoparticle irradiated by electron beams. *Phys Med Biol*. 2012; 57: 3323-31.
100. Ngwa W, Makrigiorgos GM, Berbeco RI. Gold nanoparticle enhancement of stereotactic radiosurgery for neovascular age-related macular degeneration. *Phys Med Biol*. 2012; 57: 6371-80.
101. Detappe A, Tsiamas P, Ngwa W, Zygmanski P, Makrigiorgos M, Berbeco R. The effect of flattening filter free delivery on endothelial dose enhancement with gold nanoparticles. *Med Phys*. 2013; 40: 031706.
102. Garnica-Garza HM. Monte Carlo modeling of converging small-field contrast-enhanced radiotherapy of prostate. *Phys Med*. 2013; 29: 493-9.
103. Mesbahi A, Jamali F, Garehaghaji N. Effect of photon beam energy, gold nanoparticle size and concentration on the dose enhancement in radiation therapy. *BI*. 2013; 3: 29-35.
104. Tsiamas P, Liu B, Cifter F, Ngwa WF, Berbeco RI, Kappas C, et al. Impact of beam quality on megavoltage radiotherapy treatment techniques utilizing gold nanoparticles for dose enhancement. *Phys Med Biol*. 2013; 58: 451-64.
105. Tu S-J, Yang P-Y, Hong J-H, Lo C-J. Quantitative dosimetric assessment for effect of gold nanoparticles as contrast media on radiotherapy planning. *Rad Phys Chem*. 2013; 88: 14-20.

VI-2. Les scintillateurs

Les matériaux scintillants ou radioluminescents sont des matériaux capables de convertir une radiation ionisante en une lumière généralement émise dans le domaine du visible ou de l'Ultra-Violet (UV), c'est-à-dire que les radiations ionisantes incidentes provoquent certains phénomènes physiques responsables d'une production de lumière. C'est cette lumière qui est connue sous le nom de scintillation ou de radioluminescence (Rodnyi et al., 1997).

Les scintillateurs peuvent être organiques ou inorganiques, comme ils peuvent être solides, liquides ou gazeux (Weber et al., 2004).

VI-2-1. Principe de la scintillation

Lorsqu'un matériau scintillateur est soumis à des irradiations, plusieurs étapes consécutives vont conduire à l'émission finale. Le processus de scintillation peut se dérouler en quatre étapes (figure 69) :

- i. l'absorption du rayonnement incident par le matériau scintillateur, ce qui conduit à la création de paires électrons-trous primaires (e-t),
- ii. la multiplication et la relaxation des paires (e-t),
- iii. le transfert d'énergie des électrons et trous excités aux centres luminescents « migration d'énergie »,
- iv. la luminescence.

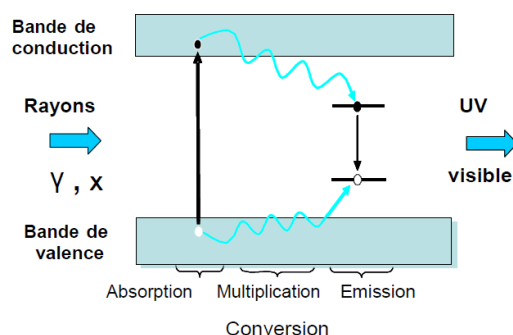


Figure 69 : Principe de la scintillation en différentes étapes (absorption des rayonnements très énergétiques, multiplication et émission dans le visible) (Thèse Rétot et al., 2009).

- i. Interaction rayonnement-matière : cette interaction est essentiellement régie par l'effet photoélectrique, l'effet Compton, et la création de paires électron-positon (figure 70).

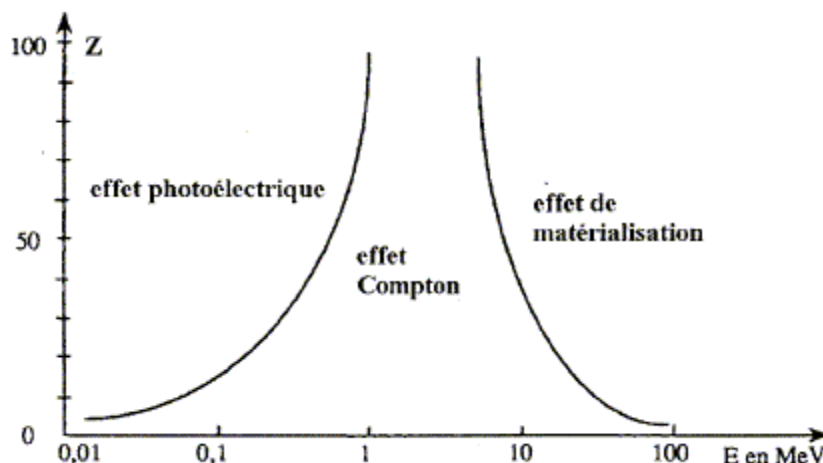


Figure 70 : Interactions entre rayonnement et matière en fonction du numéro atomique Z et de l'énergie des photons.

- Effet photoélectrique

Il s'agit du processus le plus important dans le domaine du KeV à quelques MeV (figure 71). Il est favorisé dans le cas des matériaux à Z élevé. En interagissant avec un électron, le photon lui cède toute son énergie et l'éjecte. L'énergie est donc absorbée et l'atome ionisé. Ce phénomène se produit lorsque l'énergie du photon incident est supérieure à l'énergie de l'électron. L'énergie de l'électron éjecté est ensuite transférée au milieu en provoquant des ionisations.

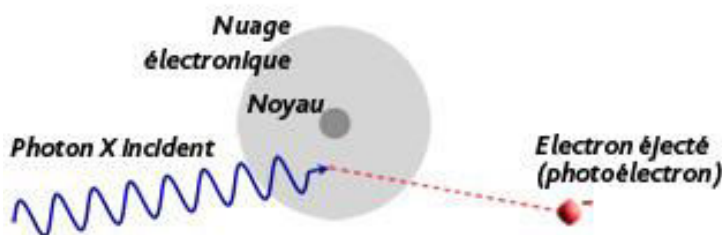


Figure 71 : Effet photoélectrique. © RayonsSanté.

- L'effet Compton

Il s'agit d'une absorption partielle de l'énergie, il est en compétition avec l'effet photoélectrique, et est à éviter car il réduit le rendement lumineux (figure 72). En effet, quand la particule possède une énergie fortement supérieure à celle des électrons, elle ne cède qu'une partie de son énergie à l'électron qu'elle rencontre. Le photoélectron est alors éjecté et l'atome ionisé. Quant à la particule, elle est déviée, et poursuit sa trajectoire avec une énergie inférieure.

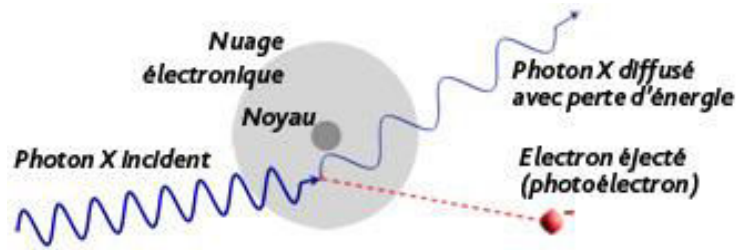


Figure 72 : Effet Compton. © RayonsSanté.

- La création de paires électron-positon

Elle devient possible dès que l'énergie du photon incident atteint deux fois l'énergie de masse au repos de la paire électron/positron soit 1,022 MeV (Rodnyi et al., 1997). Le photon peut, en passant tout près du noyau atomique, disparaître dans son champ coulombien (figure 73). L'énergie du photon se transforme alors en matière ($E=mc^2$) pour créer une paire d'électrons de signes électriques opposés (électron + positon) : c'est la création de paires, ou matérialisation.

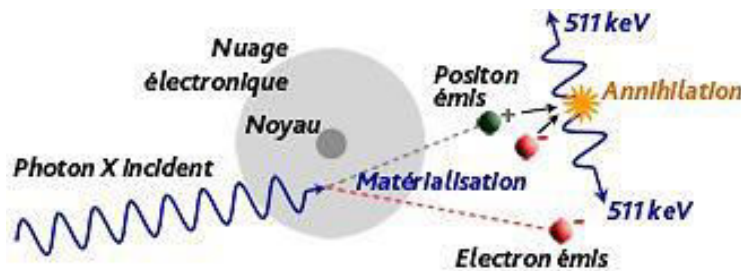


Figure 73 : Effet paire électron-positron. © RayonsSanté.

La multiplication et la thermalisation de ces paires (e-t), qui se poursuit jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'ionisation possible, est un processus qui dure quelques picosecondes. De nombreuses définitions ont été proposées pour décrire ces processus complexes qui mènent à des pertes d'énergie et plusieurs théories ont été développées pour déterminer le nombre de paires (e-t) créées par unité d'énergie absorbée pour un matériau donné. Des recherches ont lieu actuellement pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu (Viana et al., 2011). L'énergie nécessaire pour créer une paire électron-trou après absorption d'un rayonnement pourrait être de l'ordre de 2 à 3 fois l'énergie de la bande interdite (E_{vc}^*), selon la nature du matériau.

- ii. Le transfert d'énergie aux centres luminescents "migration d'énergie"

Les électrons et trous libres doivent céder leur énergie aux centres luminescents. Ce mécanisme dépend de la nature du scintillateur. Le cas le plus simple est la capture directe par le centre luminescent. Elle peut

soit favoriser la scintillation, soit entraîner une extinction de la luminescence, soit modifier complètement la cinétique du processus. Les électrons et les trous vont donc former des excitons pour transférer leur énergie aux centres luminescents ou bien perdre leur énergie de façon non radiative ou par transfert à un piège (Viana et al., 2011) (Figure 74).

Cependant, du fait de la difficulté de cette étape, il est très difficile de prédire son efficacité dont la durée peut varier entre 10^{-12} à 10^{-3} secondes. Pour les processus les plus longs, on parle alors de fluorescence retardée ou d'“afterglow” (Viana et al., 2011).

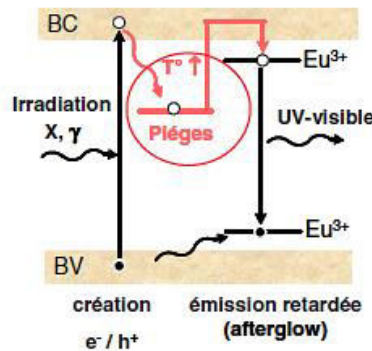


Figure 74 : Visualisation des pièges nuisibles en scintillation (pièges à électrons) (Viana, 2011).

iii. Enfin, la dernière étape est la luminescence de l'ion dopant (dans notre cas Eu(III) et Tb(III)) qui a été détaillée précédemment.

Les scintillateurs sont utilisés dans différents domaines, comme la sécurité notamment dans le contrôle des bagages, du contrôle qualité en industrie, l'exploration géophysique des hydrocarbures. Ils ont aussi un grand intérêt dans le domaine médical. Citons deux grandes techniques qui font appel à des scintillateurs : la tomographie à émission de positrons (TEP) et la scannographie X.

On rappelle que pour des irradiations de tumeurs profondes du cerveau, il a été proposé de réaliser une excitation électronique par rayons X de nanoparticules à base de métaux lourds (terres rares) sur lesquelles sont greffées des PS. L'idée est donc, entre autres choses, de former un état excité de la terre rare qui pourra, par transfert d'énergie électronique à longue distance, exciter le PS qui sera alors capable, avec l'oxygène, de produire des EROs « tueuses » des cellules cancéreuses. Pour ce faire, un transfert d'énergie électronique est nécessaire.

Pour la réalisation de notre projet, nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules à base de terres rares car ces dernières sont très connues pour leurs pouvoirs scintillant et luminescent.

IV-2-2. Les lanthanides

Les lanthanides forment une série de quinze éléments métalliques de propriétés chimiques semblables que l'on désigne sous le nom de terres rares. Contrairement à leur nomination, les terres rares sont des éléments très répandus, le cérium est même le 26^{ème} élément le plus abondant sur la terre (figure 75). L'origine du terme terre rare vient du fait que ces éléments sont généralement retrouvés sous forme d'oxydes mixtes inclus dans des minerais, ce qui nécessite divers procédés d'extraction pour pouvoir les isoler. Ne faisant pas partie de l'objet de notre étude, ces différentes techniques d'extraction ne seront pas abordées ; nous nous intéresserons surtout aux propriétés optiques, magnétiques et scintillantes des lanthanides pour des applications spécifiques, notamment médicales.

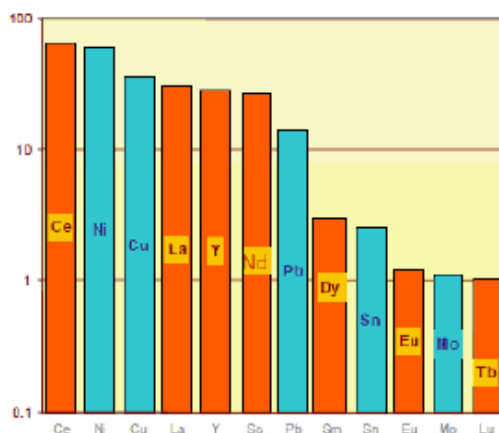


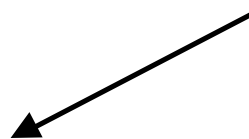
Figure 75 : Abondance relative des éléments dans l'écorce terrestre en ppm (Birraux, 2011).

IV-2-2-a. Caractéristiques électroniques des terres rares

Dans la classification périodique des éléments, les lanthanides des numéros atomiques 57 à 71, occupent avec le lanthane, une seule et même case du tableau (tableau 2) ; cette spécificité revient à leur structure électronique qui est identique pour les couches extérieures et ne diffère d'un élément au suivant que par addition d'un électron dans la couche profonde 4f (d'où le nom d'éléments 4f que leur donnent parfois les physiciens).

Tableau 2 : Position des lanthanides dans le tableau périodique des éléments

1 H			
3 Li	4 Be		
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf



58 La Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
----------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Les lanthanides ont tous les mêmes propriétés électroniques ; ils cèdent tous facilement trois électrons pour donner des ions trivalents Ln(III). Ces ions trivalents correspondent au remplissage progressif de la couche 4f qui est blindée par les couches externes $5s^2 5p^6$. La configuration électronique des éléments de la famille des lanthanides est $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10}4s^2 4p^6 4d^{10}4f^N 5s^2 5p^6$. Avec N=0 à 14 en allant du lanthane (La^{3+}) au lutécium (Lu^{3+}) (tableau 3).

Tableau 3 : Configuration électronique des ions trivalents des lanthanides

Elément	Symbole	Nombre atomique	Configuration électronique
Lanthane	La	57	[Xe] 4f ⁰ 5d ¹ 6s ²
Cérium	Ce	58	[Xe] 4f ¹ 5d ¹ 6s ²
Praséodyme	Pr	59	[Xe] 4f ³ 6s ²
Néodyme	Nd	60	[Xe] 4f ⁴ 6s ²
Prométhium	Pm	61	[Xe] 4f ⁵ 6s ²
Samarium	Sm	62	[Xe] 4f ⁶ 6s ²
Europium	Eu	63	[Xe] 4f ⁷ 6s ²
Gadolinium	Gd	64	[Xe] 4f ⁷ 5d ¹ 6s ²
Terbium	Tb	65	[Xe] 4f ⁹ 6s ²
Dysprosium	Dy	66	[Xe] 4f ¹⁰ 6s ²
Holmium	Ho	67	[Xe] 4f ¹¹ 6s ²
Erbium	Er	68	[Xe] 4f ¹² 6s ²
Thulium	Tm	69	[Xe] 4f ¹³ 6s ²
Ytterbium	Yb	70	[Xe] 4f ¹⁴ 6s ²
Lutéti	Lu	71	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²

La particularité des terres rares tient aux électrons 4f qui ont une influence sur leurs propriétés physiques et qui leur attribuent des propriétés optiques et magnétiques particulières. Certains lanthanides ont des propriétés optiques, d'autres des propriétés magnétiques. Un d'entre eux, le néodyme, a les deux propriétés.

VI-2-2-b. Propriétés optiques des terres rares

Une des propriétés les plus recherchées des lanthanides est leur luminescence très caractéristique qui est due aux transitions électroniques internes des électrons. Tous les ions lanthanides (sauf les La (III) et le Lu (III), de configurations respectives 4f⁰ et 4f¹⁴) sont luminescents. Les électrons f étant très proches du noyau et n'interagissant pas avec les orbitales moléculaires, ils sont peu affectés par l'environnement autour de l'ion. L'énergie d'émission est donc peu dépendante de la matrice hôte de l'ion. L'intensité d'émission peut en revanche en dépendre fortement. Dans le cas des atomes isolés, les transitions entre niveaux électroniques f-f faisant intervenir des orbitales de même symétrie sont interdites par la règle de Laporte. Cette interdiction est atténuée lorsque les atomes, alors sous forme d'ions, sont placés dans une matrice hôte. Des transitions optiques peuvent donc avoir lieu. Le retour à l'état fondamental des ions excités étant désavantagé, il en résulte :

- des durées de vie d'émission de luminescence des états excités très longues, de l'ordre de la milliseconde pour les ions Eu(III) et Tb(III).

- des bandes d'émission très fines, caractéristiques de chaque élément en fonction des niveaux d'énergie impliqués et un coefficient d'extinction molaire faible (entre 1 et 10 L.mol⁻¹. cm⁻¹).

Le Gadolinium dont le premier état excité est très haut en énergie et difficilement accessible en spectroscopie de luminescence classique, plusieurs ions lanthanides sont capables d'émettre à des longueurs d'onde distinctes allant de la région visible du spectre électromagnétique au proche infrarouge lorsqu'ils sont soumis à une excitation lumineuse (figure 76).

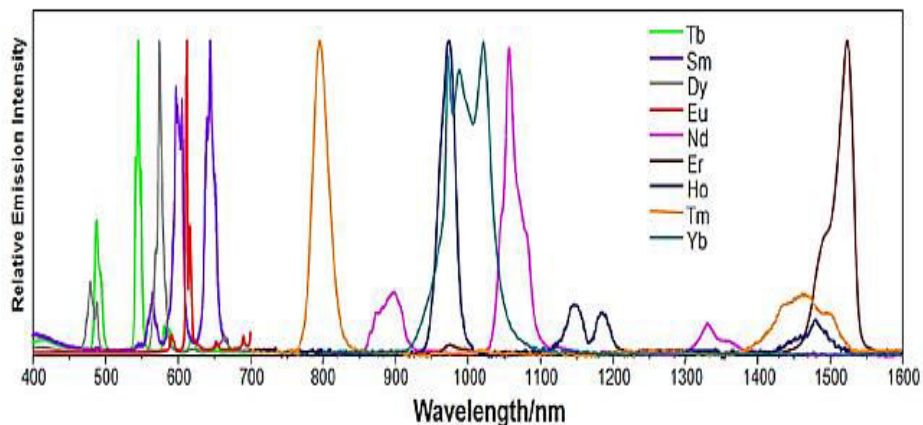


Figure 76 : Spectres d'émission normalisés des principaux ions lanthanides.

L'intensité de ces raies d'émission dépend de la différence d'énergie E entre l'état fondamental et l'état excité de l'ion lanthanide. Si la différence est faible, les processus de désactivation non radiative de l'état excité sont probables. Les ions Eu(III) et Tb(III) avec des différences ΔE de 12300 cm⁻¹ ($5d^0 7f^6$) et de 14200 cm⁻¹ ($5d^4 7f^0$), respectivement, seraient donc les plus intéressants pour des applications médicales.

L'ion europium ayant été sélectionné dans notre projet, nous l'avons pris comme exemple pour expliquer le principe des niveaux d'énergie.

L'émission de l'Eu se fait à partir du niveau $5d^0$ vers des niveaux $7f$ (figure 77). Certaines transitions à partir du niveau $5d^1$ peuvent se produire mais sont rares. Généralement, il se produit une désactivation non radiative du niveau $5d^1$ vers le niveau $5d^0$ d'où l'émission de lumière.

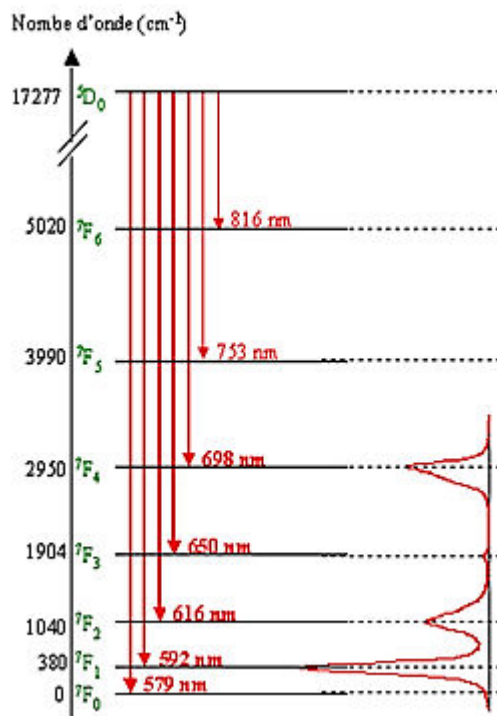


Figure 77 : Principales transitions lumineuses de l'ion Eu^{3+} .

Les principales bandes caractéristiques de l'euporium sont représentées dans le tableau 4 ainsi que les longueurs d'onde associées.

Tableau 4 : Principales bandes caractéristiques de l'Eu (III) ainsi que les longueurs d'onde associées

Transitions	Longueur d'onde (nm)
$5d^0-7f^0$	577-581
$5d^0-7f^1$	585-600
$5d^0-7f^2$	610-625
$5d^0-7f^3$	640-655
$5d^0-7f^4$	680-710
$5d^0-7f^1$	530-540

Les ions terbium (III) ($\lambda_{em} = 550$ nm dans le vert) et euporium (III) ($\lambda_{em} = 620$ nm dans le rouge), présentent des durées de vie d'émission de l'ordre de la milliseconde. Ce sont les ions lanthanides les plus utilisés notamment pour la bioanalyse et le diagnostic médical comme en confirme la commercialisation de plusieurs de ces complexes (figure 78).

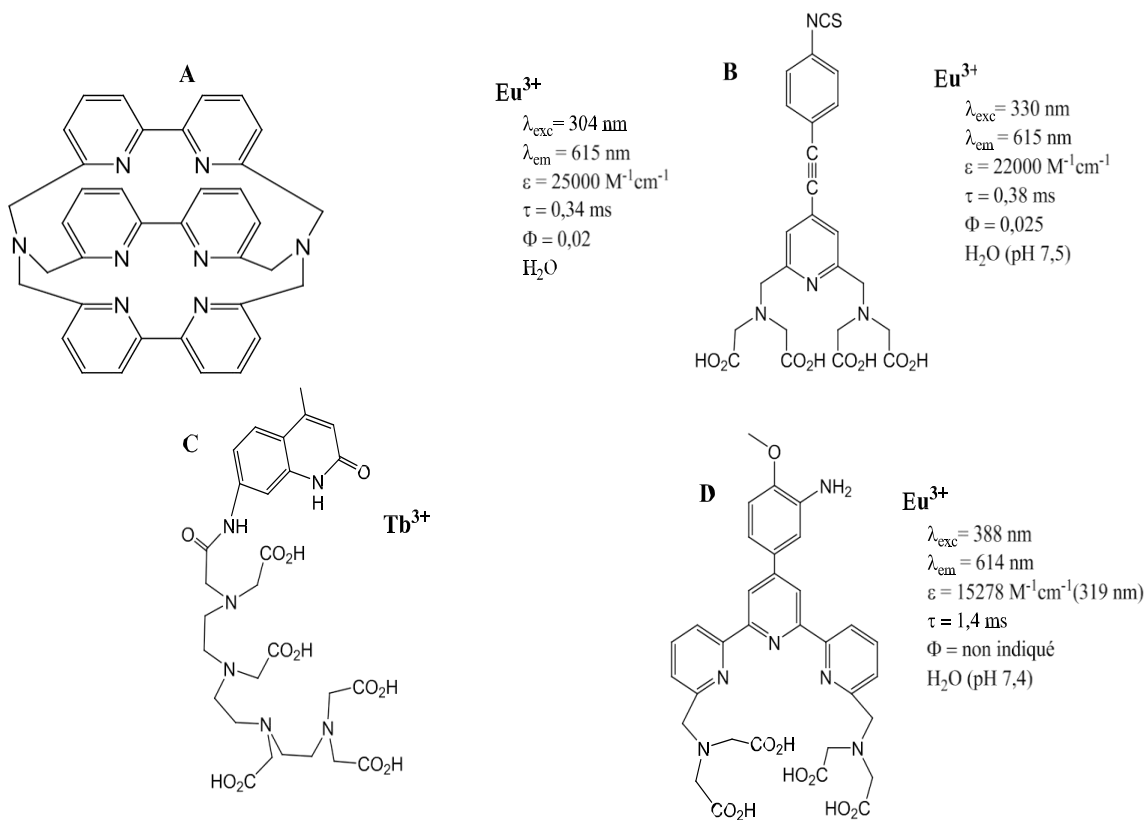


Figure 78 : Exemples complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ développés par CISBIO

International (A), Perkin Elmer Life Sciences (B), Invitrogen (C) et Amersham (D).

IV-2-2-c. Propriétés magnétiques des terres rares

Du fait de la présence d'électrons non appariés dans les orbitales 4f, tous les lanthanides sont paramagnétiques sauf le La(III) et le Lu(III) car ils des configurations respectives 4f⁰ et 4f¹⁴. Les électrons f ne sont pas engagés dans les liaisons chimiques, ils peuvent donc participer au magnétisme.

Les propriétés magnétiques des lanthanides ont été exploitées dans le domaine médical notamment dans l'élaboration d'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Les complexes de Gd(III) sont les plus utilisés. Le gadolinium, possède sept électrons non appariés, il possède donc un moment magnétique important et un temps de relaxation long (> ns). Une interaction entre le moment magnétique et le moment dipolaire des protons à proximité a lieu, ce qui va engendrer la relaxation importante des protons et donc l'amélioration du contraste.

V- Nanoparticules, PDT et radiothérapie

L'absorption de la lumière par les tissus biologiques (eau, mélanine et hémoglobine ...) peut être un facteur limitant lorsque l'on veut traiter par PDT en profondeur. La plupart des tissus biologiques possèdent une fenêtre spectrale de transparence (dite fenêtre thérapeutique optique) (Anderson, 1981), située entre le rouge et le proche infrarouge (entre 600 nm et 1.1 μm). L'absorption provient principalement de l'eau, de l'hémoglobine et de certaines protéines comme la mélanine (figure 79) (Wang et al., 2007).

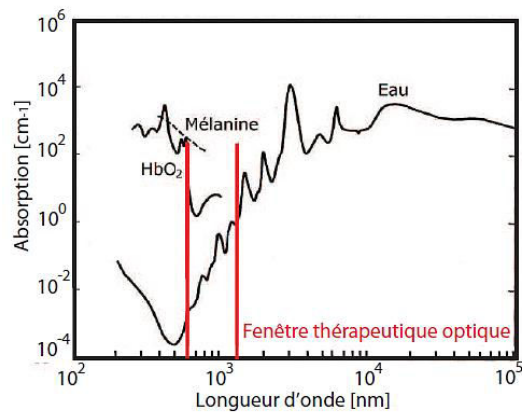


Figure 79 : Fenêtre thérapeutique optique : spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques (eau, mélanine et oxyhémoglobine HbO_2), inspiré de (Wang et al., 2007).

Il faut noter que l'absorption devient encore plus limitante en régime de diffusion. En effet, la peau étant un milieu complexe, la lumière est soumise fortement à un phénomène de diffusion optique qui conduit à de multiples modifications de trajectoires liées aux réflexions, réfractions et diffractions présentes dans tout milieu hétérogène comme les tissus vivants (figure 80). Dans le rouge et proche infrarouge, où l'absorption de la peau est relativement faible, la diffusion est le mécanisme optique dominant. Ce phénomène conduit à une plus forte pénétration de la lumière en profondeur et par conséquent à des volumes illuminés plus importants.

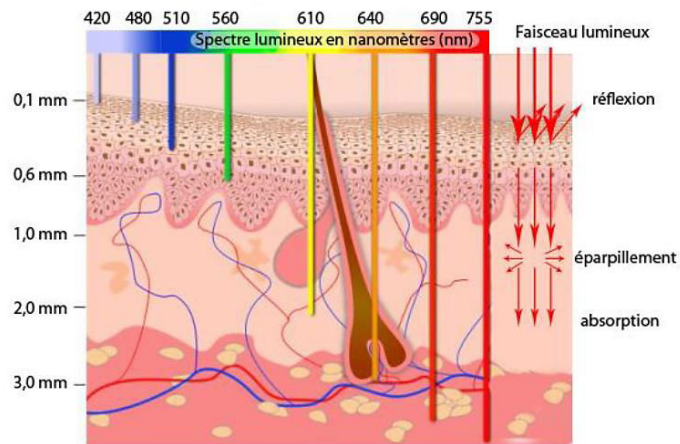


Figure 80 : Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde (Agostinis et al., 2011).

La lumière visible ne pénétrant pas suffisamment dans les tissus, il est nécessaire de trouver un moyen d'activer des PS en tissus profonds. Plusieurs équipes de recherche ont tenté d'améliorer la longueur de pénétration de la lumière. Certaines proposent d'utiliser la lumière Čerenkov émise par des radiotraceurs utilisés en imagerie médicale, comme une source de lumière interne pour activer la PDT (Ran et al., 2012) (Hartl et al., 2013) (Gonzales et al., 2014). D'autres proposent l'utilisation de matériaux dits à up-conversion, qui permettent d'atteindre des niveaux excités de haute énergie à partir d'un rayonnement infrarouge (Park et al., 2012). La PDT excitée à deux photons (figure 81) permet un traitement plus localisé grâce à l'absorption non linéaire. Starkey en couplant des triphénylaminés à des porphyrines ($\delta \approx 2000 \text{ GM}$) a réussi à faire de la PDT deux photons *in vivo* (Starkey et al., 2008). Parmi les PS deux photons en développement, on trouve des porphyrines associées au BMVC qui agit comme une antenne deux photons (Kang et al., 2008) et des complexes de ruthénium ($\delta \approx 40 \text{ GM}$) (équipe de Gilles Lemerrier (Boca et al., 2009)). Des nanoparticules hybrides de silice fonctionnalisées par des PS moléculaires présentant de fortes réponses en absorption à deux photons ont également été élaborées. Ces nano-objets ont démontré un fort potentiel en thérapie photodynamique (Gary-Bobo et al., 2011).

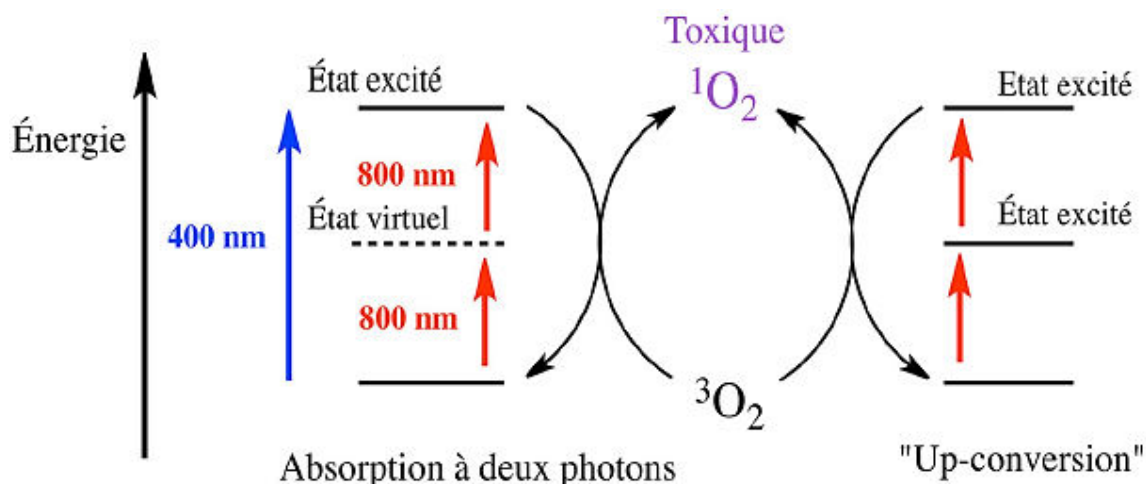


Figure 81 : Principe du phénomène d'absorption à deux photons (gauche, flèches rouges) et de l'« up-conversion » (droite).

L'absorption à deux photons repose sur l'absorption simultanée de deux photons de moindre énergie (et donc de longueur d'onde plus élevée) pour conduire à l'état excité. Dans le phénomène d'« up-conversion », les deux photons ne sont pas absorbés simultanément.

Une autre stratégie consisterait à utiliser des rayons X. La première utilisation de tels rayonnements pour la PDT remonte aux années 90 quand l'équipe de Kokotov a démontré le caractère radiosensibilisateur de dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) qui était directement activée sous irradiation X (Kokotov et al., 1994), propriété confirmée plus tard par Bistofli (Bistofli, 2000). D'autres PS tels la PpIX (Berg et al., 1995), (Takahashi et al., 2009), Hpde (Luksiene et al., 1999), ont aussi été démontrés comme radiosensibilisateurs. Le Photofrin II qui est déjà utilisé en clinique comme photosensibilisateur, est évalué comme radiosensibilisateur (Kulka et al., 2003) et (Schaffer et al., 2002).

D'autres études ont démontré que certains PS ne possèdent pas cette propriété radiosensibilisante tels que l'Indocyanine Green (Colasanti et al., 2004) et (Montazerabadi et al., 2012).

Pour augmenter le pouvoir radiosensibilisant des photosensibilisateurs, quelques années plus tard, est venue l'idée de les coupler à des nanoscintillateurs.

Grace à leur propriété d'absorption des rayonnements ionisants largement utilisés en radiothérapie, les nanoscintillateurs ont été proposés pour la première fois comme intermédiaires permettant de coupler deux thérapies dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements anti-tumoraux : la thérapie photodynamique et la radiothérapie (Chen et al., 2006). Une fois stimulés par les rayons X, les nanoscintillateurs conjugués émettent de la lumière, qui, à son tour, va activer le PS. Ce dernier, va donc

produire un effet phototoxique en générant EROs qui sont toxiques pour la tumeur. L'intérêt de cette PDT excitable par RX est que l'épaisseur des tissus n'est plus un obstacle.

Deux ans plus tard, une première étude expérimentale a pu montrer un effet PDT sous excitation X en couplant une porphyrine (MTCP) à des nanoparticules de $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ de 15 nm (figure 82) (Liu et al., 2008), (Chen et al., 2008). De l'acide folique a également été greffé comme molécule de ciblage. Le transfert d'énergie et la production d' $^1\text{O}_2$ produite par la porphyrine après irradiation au RX ont été évalués.

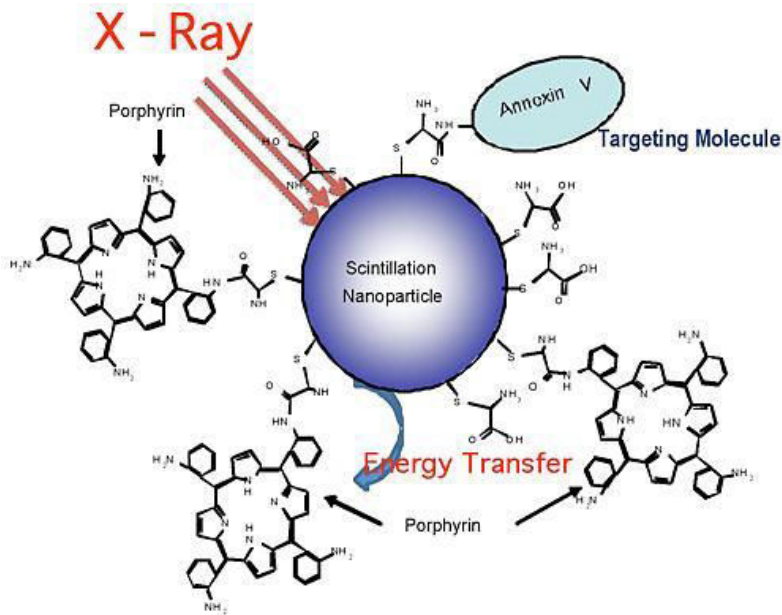


Figure 82 : Représentation d'une nanoparticule excitable par rayons X (Chen et al., 2008).

Les auteurs ont montré que l'acide folique n'a aucun effet sur le rendement quantique de production d' $^1\text{O}_2$ par la porphyrine. La formation d' $^1\text{O}_2$ a été évaluée en utilisant une sonde chimique l'ADPA (acide anthracène dipropionique). Le quenching de la fluorescence de l'ADPA, indiquant la présence d' $^1\text{O}_2$ est plus fort pour la solution de nanoparticules couplées à la porphyrine avec et sans acide folique que pour celle contenant la sonde et la porphyrine libre. Après 30 min la fluorescence de l'ADPA est totalement quenchée. Ces auteurs ont donc montré que la présence du PS sur les nanoparticules augmenterait la production d' $^1\text{O}_2$ après excitation du conjugué par RX (figure 83).

En radiothérapie classique, l'énergie utilisée est importante (de l'ordre du MeV), dans cette étude ils ont irradié avec 250 Kev, une énergie largement plus faible mais efficace.

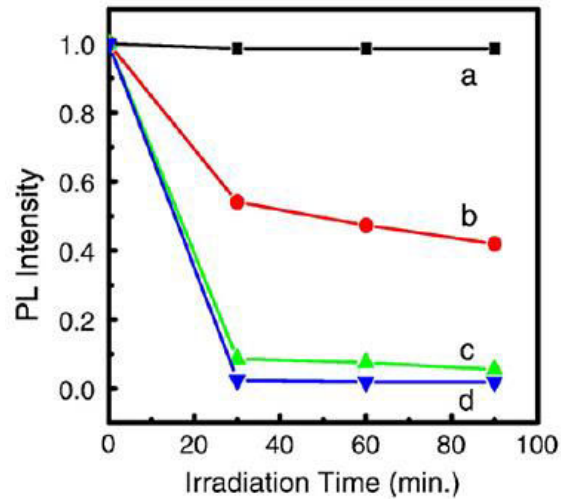


Figure 83 : Quenching de la photoluminescence du ADPA avec irradiation RX :
(a) ADPA + porphyrine - (b) ADPA + nanoparticules de LaF₃:Tb³⁺
Conjuguées à MTCP - (c) ADPA + nanoparticules de LaF₃:Tb³⁺ conjuguées à MTCP et à l'acide
folique (d) (Liu et al., 2008).

Abliz et ses collaborateurs ont étudié l'effet PDT après irradiation RX sur des cellules de glioblastome humain en présence de photofrin II libre et de particules Gd₂O₂S:Tb³⁺ d'une taille de 20 µm de diamètre. Après activation du PS par l'absorption des photons émis par les Gd₂O₂S:Tb³⁺, ils ont observé une réduction importante (90%) de la viabilité des cellules lorsqu'elles sont traitées en présence du Photofrin II et des particules (figure 84) alors qu'elle n'était que de 20 % pour les cellules traitées aux rayons X en présence ou non de Photofrin II. Aucune différence significative n'a été observée quant aux cellules traitées aux rayons X en présence des nanoparticules seules.

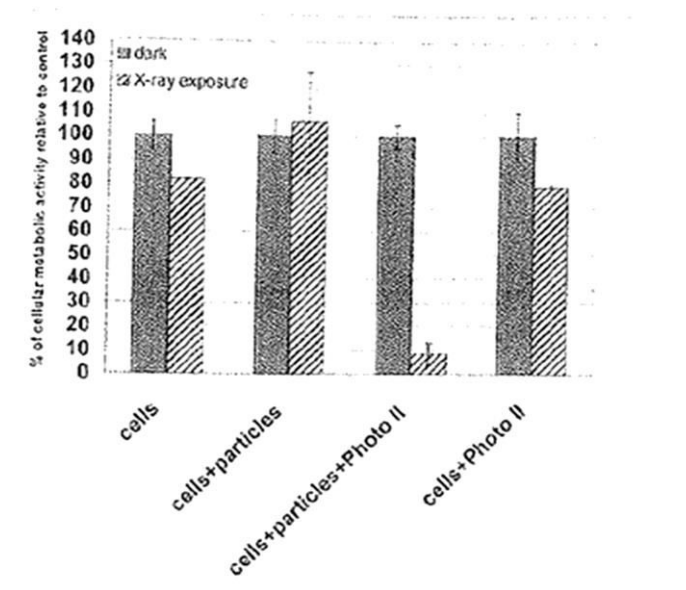


Figure 84 : Activité métabolique cellulaire du glioblastome humain normalisée à travers des mesures MTT (48 heures après exposition aux RX pendant 15 min (120 kVp, 20 mAs), [PhotofrinII]= 20 µg/mL, [Gd₂O₂S:Tb³⁺]=5mg/mL, temps d'incubation : 2 h (Abliz et al., 2011).

Une autre équipe s'est intéressée aux calculs de certains paramètres pour avoir un taux en ¹O₂ élevé en utilisant des doses thérapeutiques (Morgan et al., 2009). Ils ont combiné plusieurs informations tirées de différents travaux effectués précédemment dans différents domaines (radiothérapie, PDT et de l'imagerie) et ont obtenu des estimations quantitatives pour une meilleure efficacité. Il semble que le rendement de fluorescence des NPs, l'efficacité du transfert d'énergie aux PS et l'absorption des NPs par les cellules doivent tous être optimisés pour observer un effet cytotoxique.

Objectifs de la thèse

L'objectif général est d'améliorer l'efficacité de la PDT avec une nouvelle approche qui combine les rayons X et la PDT. Pour ce faire, plusieurs étapes sont nécessaires :

- la synthèse et l'étude physico-chimiques de nouvelles nanoparticules multifonctionnelles pouvant être excitables par des rayons X,
- l'étude des propriétés photophysiques,
- une validation biologique sur des cellules de glioblastome, en collaboration le CRAN.

Pour être efficace en tant qu'agent pour la PDT, les nanoparticules que nous développons sont composées d'un cœur scintillateur, enrobé dans une couche en polysiloxane où est greffé le photosensibilisateur (figure 85).

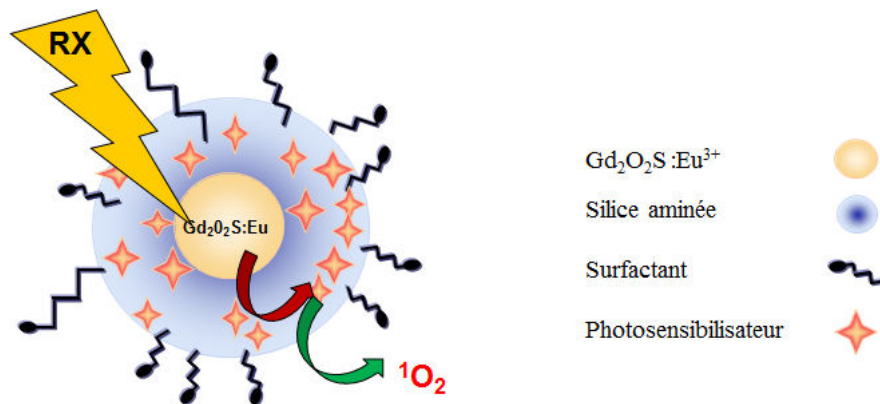


Figure 85 : Schéma des nanoparticules synthétisées

Le cahier des charges est précis :

- la nanoparticule doit être stable en milieu biologique,
- la nanoparticule doit être biocompatible grâce à une surface adéquate (e.g. PEG) qui empêchera les opsonines de s'adsorber à la surface,
- le photosensibilisateur doit être couplé de façon covalente à la nanoparticule pour une meilleure stabilité du nano-objet,
- le nanoscintillateur doit émettre après excitation aux rayons X et produire de la luminescence,

- le spectre d'émission du nanoscintillateur doit se superposer au spectre d'absorption du photosensibilisateur.

Les avantages de cette approche thérapeutique associant radiothérapie et PDT sont de pouvoir envisager la synergie de deux thérapies anti-cancéreuses efficaces, d'être applicable aux tumeurs profondes jusqu'ici non traitables par PDT, et de diminuer le risque de dommages aux tissus sains adjacents. Ceci pourra être source de ramifications considérables en matière de thérapie anti-cancéreuse.

Chapitre 3

Synthèse et caractérisation de nanoparticules multifonctionnelles

Ce chapitre sera consacré à la synthèse et l'étude photophysique des photosensibilisateurs, de nanoparticules multifonctionnelles, à l'étude des potentiels transferts d'énergie entre cœur de nanoparticules et PS sous excitation lumineuse ou RX engendrant la formation ou non d'espèces réactives de l'oxygène tel l' $^1\text{O}_2$.

I- Synthèse et caractérisation photophysique des photosensibilisateurs

Nous avons opté pour deux modes de synthèse différents : la synthèse en conditions classiques et la synthèse assistée par micro-onde dont nous avons mis au point un protocole de synthèse permettant d'obtenir les photosensibilisateurs avec de bons rendements, tout en limitant le temps de synthèse et les étapes de purification.

L'équipe PDT de Nancy est spécialisée depuis 2005 dans le ciblage de photosensibilisateurs pour la PDT. Les photosensibilisateurs principalement développés sont des porphyrines et des chlorines asymétriques carboxylées dérivant de la TPP. Le groupe acide carboxylique est nécessaire pour greffer la molécule photosensible à l'unité d'adressage (sucre, acide folique, etc.) ou des peptides. Une porphyrine, une chlorine zinguée et une phtalocyanine zinguée monocarboxyliques comme photosensibilisateurs ont été retenues en raison de leurs structures chimiques et du recouvrement spectral de leurs spectres d'absorption avec le spectre d'émission des nanoparticules de terres rares utilisées.

I-1. Synthèse des photosensibilisateurs

I-1-1. Synthèse de la porphyrine

La porphyrine monocarboxylée, notée P₁, est synthétisée par la méthode de Lindsey qui consiste à faire réagir dans du DCM quatre équivalents de pyrrole avec un équivalent de 4-carboxybenzaldéhyde et trois équivalents de benzaldéhyde, sous atmosphère inerte. L'intermédiaire porphyrinogène formé est ensuite oxydé en porphyrine par action d'un agent oxydant, le *p*-chloranil (figure 86). Le mélange est filtré une première fois sur silice afin d'éliminer les goudrons et autres polymères du pyrrole formés pendant la réaction, puis le filtrat est purifié sur Armen SPOT Prep (un système chromatographique basse pression) avec une colonne Si60 EcoPack Basic D44 (40–63 μm , 150 \times 40 mm) et doté d'un détecteur FLASH 06 DAD ($\lambda_{\text{exc}} = 415 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$) en utilisant un mélange dichlorométhane/éthanol (gradient [0:100 à 50:50] sur une période de 35 min). Le rendement de cette synthèse varie de 7 à 11 %.

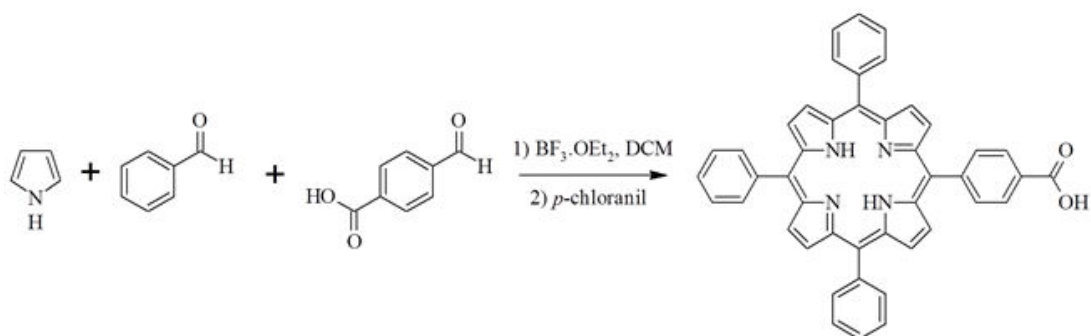


Figure 86 : Synthèse de la porphyrine notée P1.

I-1-2. Synthèse de la chlorine zinguée

La synthèse de la ZnTPC est réalisée en deux étapes :

- La première étape consiste en la synthèse de la TPC,
- La deuxième étape consiste en la métallation de la TPC en introduisant un atome de zinc.

La chlorine monocarboxylée, notée TPC est synthétisée par la méthode de Whitlock. La P1 est réduite en bactériochlorine en ajoutant 40 équivalents de *p*-TSH (*para*-toluènesulfonylhydrazine) et 80 équivalents de K_2CO_3 en portant le mélange à reflux pendant 4 heures. La bactériochlorine est ensuite ré-oxylée en chlorine par ajouts progressifs de *o*-chloranil dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) sous atmosphère inerte (figure 87). Cette dernière étape de ré-oxylation doit immédiatement être stoppée au premier état d'oxydation de la bactériochlorine, c'est-à-dire lorsque le spectre UV-visible correspond à celui de la chlorine (qui ne doit pas s'oxyder ultérieurement en porphyrine). C'est pourquoi les ajouts se font progressivement, par petites ajouts successifs d'*o*-chloranil (3,4,5,6- tétrachloro-1,2-benzoquinone) en quantité définie et préalablement dissout dans l'AcOEt ($C = 600 \text{ mg.mL}^{-1}$) toutes les 15 min, et un contrôle UV-visible est effectué avant et après chaque ajout. Le rendement obtenu de cette synthèse est de 41%.

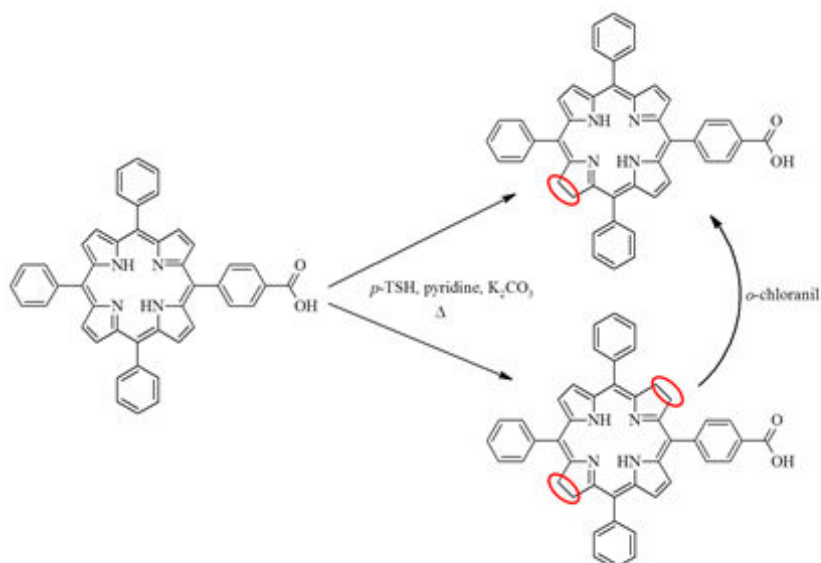


Figure 87 : Synthèse de la bactériochlorine et de la TPC.

La 5-(4-carboxyphényl) 10,15,20-tétraphénylchlorine nommée ZnTPC a été synthétisée selon la méthode mise au point au LCPM (Colombeau, 2011). 45 mg (0,065 mmol) de TPC et 3,6 équivalents d'acétate de zinc dihydrate sont dissous dans 25 mL de THF et chauffés à reflux pendant 2 h. La réaction de métallation est contrôlée par spectrométrie UV-vis entre $\lambda=350$ et 800 nm et par chromatographie sur couche mince (CH_2Cl_2 / EtOH, 97/3). A la fin de la réaction, le solvant est éliminé sous vide et le produit brut est dissous dans du CH_2Cl_2 (30 mL), lavé avec de l'eau (3 x 30 mL) puis séché sur du MgSO_4 . Après évaporation, le composé est obtenu avec un rendement de 95%.

I-1-3. Amélioration des conditions de synthèse des composés : utilisation des micro-ondes

Le développement des nouvelles méthodes pour la synthèse des molécules hétérocycliques tétrapyrroliques représente un grand challenge dans la synthèse organique et dans la chimie médicinale. En effet, la synthèse organique est confrontée ces dernières années à de nouveaux défis, il s'agit donc de mettre en œuvre des séquences chimiques en respectant des critères économiques et écologiques. Dans ce contexte, les conditions de synthèse assistée par micro-ondes de la P1, ZnP1, TPC, ZnTPC ont été décrites et comparées aux conditions classiques de synthèse en termes de temps de réaction et les rendements obtenus. Le nouveau protocole expérimental est facile à mettre en œuvre, avec l'utilisation de petites quantités de réactifs et de solvants ainsi que des temps de réaction courts et donc plus respectueux de l'environnement.

- Pour optimiser les réactions, nous avons fait varier plusieurs paramètres notamment les quantités des réactifs, la puissance et le temps.
- Tous les composés ont été caractérisés par RMN 1H, MS et techniques spectroscopiques

Le tableau suivant présente les conditions optimales déterminées pour la synthèse des différentes molécules. Nous notons (1) P1, (2) bactérochlorine, (3) TPC, (4) ZnTPC et (5) ZnP1.

Tableau 5 : Conditions utilisées pour la synthèse de P1, bactérochlorine, TPC, ZnTPC et ZnP1

Composé	Conditions classiques			Irradiation au micro-onde		
	Temps	Rendement	Température	Temps	Rendement	Température
(1)	6 h	25%	60°C	30 min	20%	120°C
(2)	24 h	nd	116°C	60 min	Nd	100°C
(3)	1 h	41%	TA	10 min	34%	90°C
(4)	2 h	95%	66°C	3 min	95%	90°C
(5)	2 h	95%	66°C	3 min	97%	90°C

nd : non déterminé car non isolé ; TA : température ambiante

La figure 88 reprend les différentes voies de synthèse.

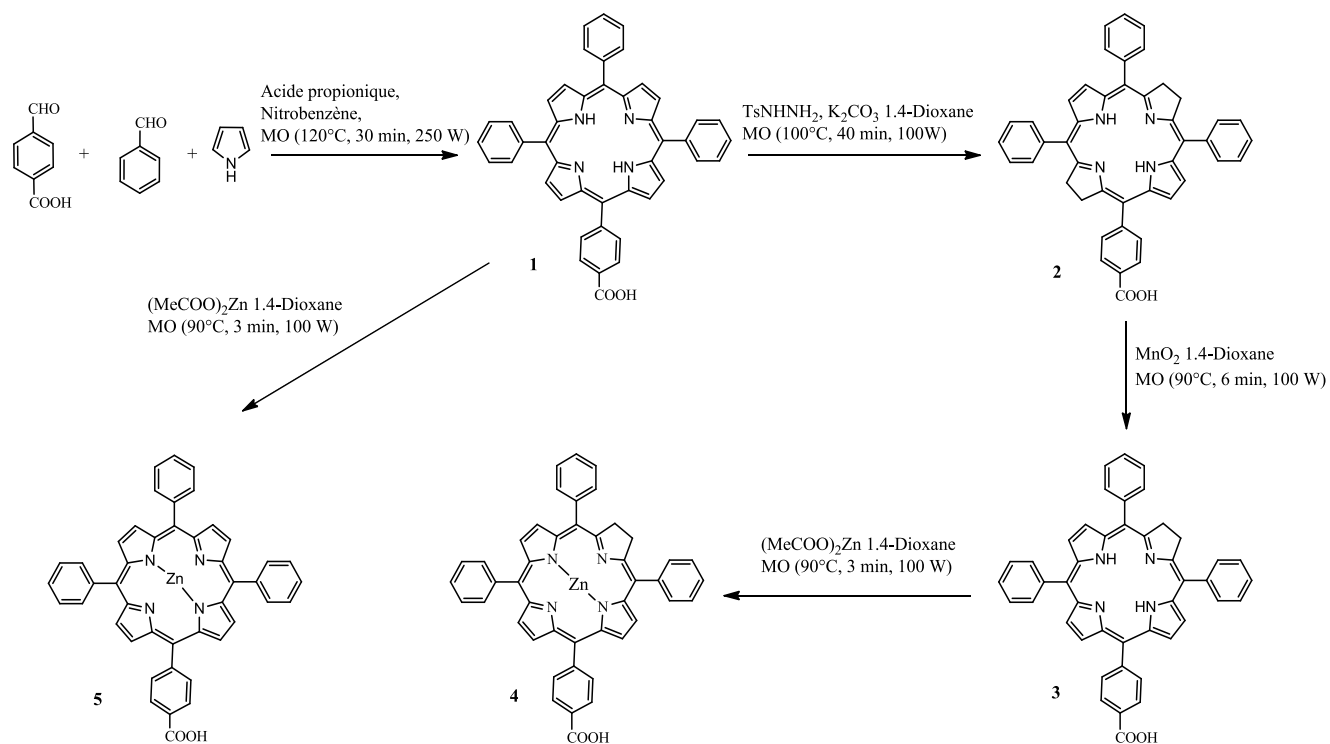


Figure 88 : réactions de synthèse aux micro-ondes

Cette nouvelle méthode de synthèse a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)*.



Microwave-assisted synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin

Rima Chouikrat^{a,b}, Aymeric Champion^{c,d}, Régis Vanderesse^{c,d,e}, Céline Frochot^{a,b,e} and Albert Moussaron^{*a,b}

^a Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy 54000, France

^b CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy 54000, France

^c Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), FRE CNRS 3564, Nancy 54000, France

^d CNRS, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), FRE CNRS 3564, Nancy 54000, France

^e GDR 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

Received 28 August 2014

Accepted 14 October 2014

ABSTRACT: The microwave-assisted synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin are described and compared to classic conditions of synthesis in terms of time of reaction and yields obtained. The new experimental protocols are easy to implement required small amounts of reagents and solvents and lead to short reaction times. All compounds have been characterized by ¹H NMR, MS and spectroscopic techniques.

KEYWORDS: porphyrin, bacteriochlorin, chlorin, microwave, MAOS, photodynamic therapy.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is an emerging non-invasive technique for the treatment of a variety of cancerous tumors. It involves the light activation of a photo-responsive molecule called a photosensitizer (PS), in the presence of oxygen [1, 2]. After light irradiation of the photosensitizer, the energy from the excited matter can be transferred to surrounding molecules. Thus, a photosensitizer is classically defined as a chemical entity that, upon absorption of light, induces a chemical or physical alteration of another chemical entity. This allows the generation of reactive oxygen species (ROS) including singlet oxygen (¹O₂), which is believed to be the major cytotoxic agent [3, 4].

The successful achievement of any PDT concept depends crucially on the nature of the photosensitizer [5].

^{*}SPP full member in good standing

*Correspondence to: Albert Moussaron, email: albert.moussaron@hotmail.fr, fax: + 33 (0)3-8337-8120

Early preparations of photosensitizers for PDT were based on a complex mixture of porphyrins called haematoporphyrin derivative (HpD). Today, Photofrin[®], a purified HpD derivative, is the most frequently PS used clinically. The benzoporphyrin derivative verteporfin (Visudyne[®]) was also recently approved for clinical use, and has been developed for the treatment of age-related macular degeneration [6].

Among chlorins, *meta*-tetrahydroxyphenylchlorin (*m*-THPC, temoporfin[®], Foscan[®]) is a second-generation photosensitizer clinically used for the treatment of human mesothelioma and for gynecological, respiratory, and head and neck cancers [7].

The main methods of the synthesis of chlorins followed a three steps procedure: synthesis of the corresponding porphyrin followed by reduction to bacteriochlorin and then re-oxidation to chlorin. The synthesis of the porphyrin is mainly realized according to the Adler and Longo method [8] or the Lindsey method [9]. Adler used propionic acid as both solvent. Lindsey reported the condensation of pyrrole and aldehyde in the

presence of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in dichloromethane. In both cases, the high dilution of the reaction mixture requires the use of a large quantity of solvent, which must be furthermore anhydrous. Therefore, the purification of reagents and solvents makes synthesis rather time consuming and expensive. The reduction of porphyrin to bacteriochlorin is usually performed in refluxing pyridine and requires several hours to several days [10]. The bacteriochlorin is re-oxidated to chlorin using an oxidant such as quinones or *o*-chloranil. As previously done, all solvents and reagents should be anhydrous and freshly distilled. To overcome this drawback, we described in this paper the syntheses of five compounds using microwaves allowing us to obtain the same quantities with significant reduction of the reaction time and of the amount of solvents.

In organic chemistry, microwave technology has been used since the mid-1980s [11, 12]. Since, microwave-assisted organic chemistry (MAOS) has gained popularity thanks to the significant decreasing of reaction times and the improvement of yields. MAOS has been used for the first time to synthesize porphyrins by Petit *et al.* in 1992. They prepared tetraphenylporphyrin within 10 min with very simplified treatment and purification [13]. Thirteen years later, Jain *et al.* have described the synthesis of metalloporphyrins using MAOS. They increased the yield of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato-manganese synthesis from 45% in conventional conditions to 83% under microwave irradiation. Also, they reduced the reaction time from 4 h to 5 min [14]. Bacteriochlorins and chlorins have been also synthesized by microwave irradiation by Nascimento *et al.* in 25 and 3 min respectively [15]. These promising works encouraged us to use MAOS

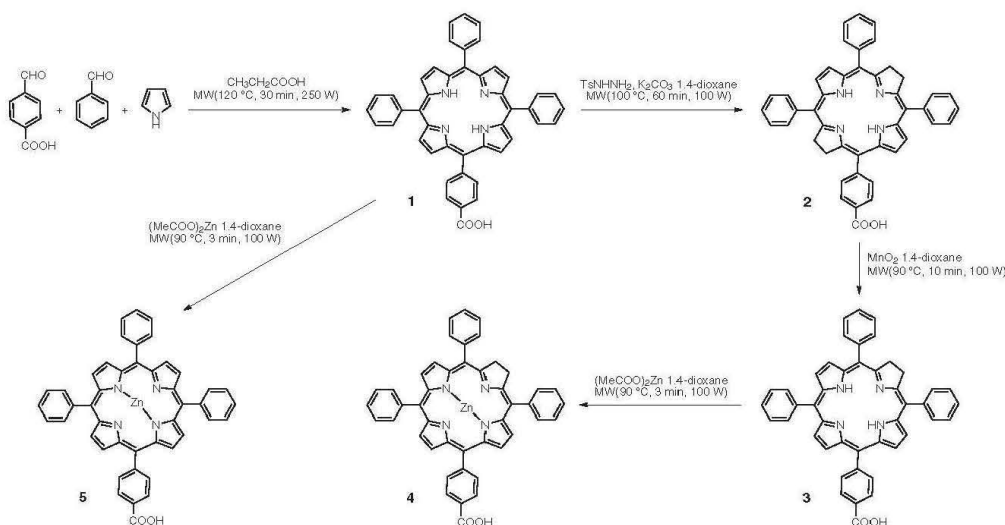
for the synthesis of our porphyrin (1), bacteriochlorin (2), chlorin (3), zinc-chlorin (4) and zinc-porphyrin (5).

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

The goal of our synthetic work was the preparation of zinc porphyrin and zinc chlorin using microwave irradiation to evaluate the potential advantages of using this protocol on the reaction time and yields. Although MAOS has already been used for the synthesis of porphyrins and chlorins, to our knowledge, it is the first time that it is employed to synthesize porphyrins and chlorins type A_3B .

As described in the literature, the synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1) according to the Adler and Longo method [8] by condensation of 4-formylbenzoic acid, benzaldehyde and pyrrole in refluxing propionic acid gives only 7% of yield [16]. The Lindsey method [9] synthesized the same compound with better yield (41%) [17] but requires very large quantities of solvents. Both Longo and Lindsey methods require respectively one night and 6 h of reaction time. Aiming to reduce the reaction time, we performed the reaction under microwave irradiation in propionic acid and nitrobenzene (Scheme 1) according to Adler and Longo method [8]. The use of nitrobenzene increases the reaction yield [18]. We found that under microwave irradiation with a power setting of 250 W at 120°C in 30 min, the same equivalents of reagents had given good results (20% of yield) (Table 1).



Scheme 1. Synthesis route to zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin

To obtain the bacteriochlorin (**2**), classical conditions require a diimide reduction of porphyrin (**1**) in refluxing freshly distilled pyridine using an excess of *p*-toluenesulfonylhydrazide and K_2CO_3 for 9 h [17]. Aiming to reduce the reaction time, we performed the reaction under microwave irradiation in 1,4-dioxane. After several essays, we found that 20 equivalents of *p*-toluenesulfonylhydrazide and K_2CO_3 at 100 °C with a microwave power of 100 W in 60 min were the optimal conditions to obtain the best yield with the less side products. The bacteriochlorin (**2**) was only slightly (17%) contaminated with the chlorin (**3**) as we can see in Fig. 1. The recovered mass was 85 mg and the ratio of yields bacteriochlorin/chlorins was 83%/17% according to 1H RMN spectra.

The contaminated bacteriochlorin was reoxidized under microwave irradiation using MnO_2 in 1,4-dioxane as shown in Scheme 1 instead of *o*-chloranil in freshly distilled ethyl acetate until the absorption peak of bacteriochlorin at 730 nm disappeared. We found that the optimal conditions to obtain the chlorin (**3**) were 5 equivalents of MnO_2 at 90 °C with a microwave power of 100 W in 10 min. The chlorin was slightly contaminated with the porphyrin. The recovered mass was 33 mg and the ratio of yields chlorin/porphyrin was 80%/20% according to 1H RMN spectra. The chlorin (**3**) was purified then by preparative HPLC. Chlorin (**3**) was obtained as a mixture of two isomers. Those isomers have very close retention times in preparative HPLC. The main advantage of using MnO_2 instead of *o*-chloranil is that it is easier to remove. Indeed, removing *o*-chloranil was performed with several aqueous phase washings at alkaline pH washings; in these pH conditions, a large amount of chlorin could be also eliminated in the aqueous phase. Moreover, with the classical method, chlorin and *o*-chloranil were in long contact during the purification allowing the oxidation of chlorin into unwanted porphyrin. On the contrary, with the new protocole, MnO_2 was removed immediately after completion by simple filtration.

As shown in Scheme 1, compounds (**1**) and (**3**) were respectively converted into (**5**) and (**4**) in quantitative yields. This conversion has been realized under

Table 1. Reaction times and synthetic yields obtained with classic conditions and under microwave irradiation

Compound	Classic conditions		Microwave irradiation	
	Time	Yield	Time	Yield
1	1 night [16]	7%	30 min	20%
2	9 h [17]	—	60 min	—
3	15–60 min [17]	41%	10 min	34%
4	2 h [17]	95%	3 min	95%
5	2 h [17]	95%	3 min	97%

microwave irradiation in 1,4-dioxane using 4 equivalents of zinc acetate at 100 °C with a microwave power of 100 W in 3 min. The classic conditions of metalation are refluxing in THF during 2 h. Microwave irradiation leads to shortening of the reaction time from 2 h to 3 min and always with very good yields. As expected, the introduction of a Zn in the porphyrin induced a blue-shift of the QI band and a decrease of the fluorescence quantum yield [17, 19, 20].

Photophysical characteristics

The absorption spectra of compounds were recorded in ethanol. As shown in Fig. 1, non-metale compounds had typical spectra of porphyrin, bacteriochlorin and chlorin with Soret bands at about 415 nm for (**1**) and (**3**) and about 370 nm for (**2**). The Soret bands of the metale compounds (**4**) and (**5**) were slightly higher than non-metale ones (**3**) and (**1**) with a shift to 422 nm (Table 2).

Fluorescence emission and 1O_2 production of the different photosensitizers were also recorded (Figs 2

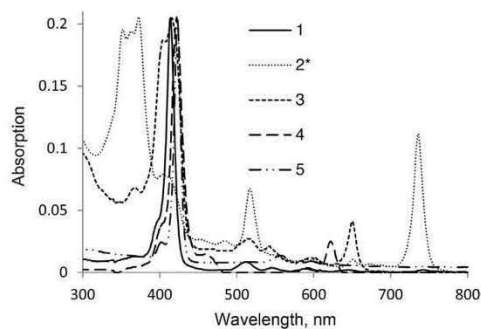


Fig. 1. Absorption spectra of porphyrin (**1**), bacteriochlorin (**2**), chlorin (**3**), zinc-chlorin (**4**) and zinc-porphyrin (**5**) in ethanol at the same DO of Soret band. *Contaminated with (**3**)

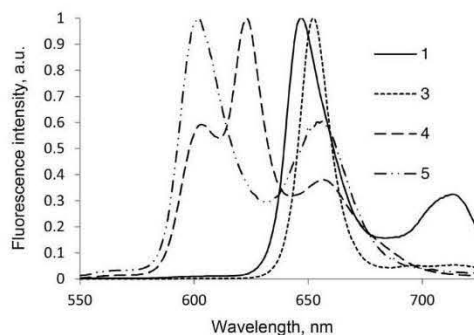


Fig. 2. Fluorescence spectra of porphyrin (**1**), chlorin (**3**), zinc-chlorin (**4**) and zinc-porphyrin (**5**) in ethanol at the same Soret band's DO (0.2)

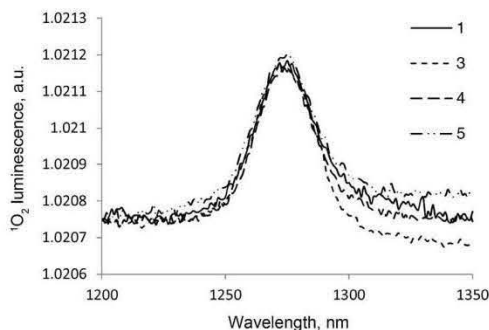


Fig. 3. Singlet oxygen emission spectra of porphyrin (1), chlorin (3), zinc-chlorin (4) and zinc-porphyrin (5) in ethanol at the same Soret band's DO (0.2) after excitation at λ_{max} of Soret band

and 3). As expected, the introduction of Zn induced a decrease of fluorescence quantum yield and a shift of the QI band from about 650 nm to 622 nm (Table 2) [21].

EXPERIMENTAL

General

Unless otherwise stated, reagents were purchased from chemical companies and used without further purification. Reagent grade solvents were used as received. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck Chimie S.A.S., Fontenay Sous Bois, France) and eluted with the appropriate solvent mixtures. The TLC spots were visualized by UV light. Chromatography columns were using Merck silica gel (40–63 μm ; 230–400 mesh ASTM).

The microwave used is a CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Model Discover. It accommodates a 10 mL vessel with septa for reactions performed at elevated temperatures and pressures.

¹H NMR and ¹³C (300 MHz) spectra were recorded on a Bruker Advance 300 machine (Bruker, Wissenschaft,

Germany). Multiplicities are reported as follows: s = singlet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Chemical shifts are reported in parts per million relative to the solvent peak or TMS. Absorption spectra were recorded on a Perkin–Elmer UV-visible spectrophotometer (Lambda EZ210, Courtabœuf, France). ES Mass spectra were recorded on a Shimadzu LCMS 2020 EV apparatus (Marné la Vallée, France).

Fluorescence spectra were recorded on a Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 (FL3-222) spectrofluorimeter equipped with a 450 W Xenon lamp, a thermostated cell compartment (25 °C), a R928 (HAMAMATSU Japan) UV-visible photomultiplier and a liquid nitrogen-cooled InGaAs infrared detector (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). The excitation spectrometer is a SPEX double grating monochromator (1200 grating/mm blazed 330 nm). The fluorescence was measured by the UV-visible detector through a SPEX double grating monochromator (1200 grating/mm blazed 500 nm). ¹O₂ production was measured by the IR detector through a SPEX double grating monochromator (600 grating/mm blazed 1 mm). All spectra were recorded using four optical faces quartz cells. Fluorescence quantum yields (Φ_{F}) were determined using a tetraphenyl porphyrin (TPP) solution in toluene as a fluorescence standard (Φ_{F} (std) = 0.11). All molecules were dissolved in ethanol ($n = 1.36$) and the fluorescence standard in toluene ($n_{\text{std}} = 1.4968$). The excitation wavelength of molecules and the standard was 415 and 422 nm. At this wavelength, the absorbance of the samples was set to around 0.2. Rose Bengal was chosen as a reference solution because of its high ¹O₂ quantum yield production in ethanol ($\Phi_{\Delta}(\text{ref}) = 0.68$). The absorbance value at the excitation wavelength (415 and 422 nm) of both the reference and the sample solutions were set to around 0.2.

Synthesis

Preparation of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1). 4-Formylbenzoic acid (238 mg; 2.5 mmol), pyrrole (0.69 mL; 10 mmol) and benzaldehyde (0.78 mL; 7.5 mmol) were added to propionic acid (3.5 mL) and nitrobenzene (1.5 mL) and thoroughly

Table 2. Electronic data and quantum yields of (1), (3), (4) and (5)^a

Compound	λ_{max} , nm (ϵ) ^b	Fluorescence λ_{max} , nm	Fluorescence quantum yield Φ_{F}	Singlet oxygen quantum yield Φ_{Δ}
1	414(300), 512(19), 545(8), 588(5), 650(3)	647 ^c	0.10 ^c	0.70 ^e
3	415(150), 514(13), 543(9), 595(4), 651(13)	652 ^c	0.21 ^c	0.69 ^e
4	422(130), 459(1), 558(1), 592(3), 622(20)	623 ^d	0.20 ^d	0.75 ^f
5	422(375), 515(4), 557(13), 595(5), 622(1.5)	602 ^d	0.08 ^d	0.74 ^f

^aAll UV-vis and fluorescence spectra were recorded in EtOH. ^bMolar extinction coefficients are expressed in $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. ^cFluorescence spectra recorded after excitation at 415 nm (± 0.02) and ^d422 nm (± 0.02). ^eSinglet oxygen spectra recorded after excitation at 415 nm (± 0.05) and ^f422 nm (± 0.02).

mixed in a 10 mL appropriate microwave vessel. The reaction vessel was then tightly sealed with a Teflon cap and the reaction mixture was magnetically stirred and heated at 120 °C for 30 min under microwave irradiation with power setting of 250 W. After cooling to room temperature, the solution was filtered off on silica and the crude mixture was purified by Armen SPOT Prep system (high pressure, preparative liquid chromatography) using a Si60 EcoPack Basic D44 (40–63 μm , 150 \times 40 mm) column. The elution gradient was from 0% to 50% of ethanol in dichloromethane over 35 min. The monitoring of the elution was realized using the fluorescent properties of (1) (emission at 600 nm after excitation at 415 nm) using a FLASH 06 DAD. 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1) was obtained as a purple solid (329 mg; 20%). TLC (dichloromethane/ethanol, 97/3): $R_f = 0.6$. (1). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} , ppm -2.61 (2H, s, NH), 7.72, 8.21 and 8.37 (19H, m, Ph), 8.80 (8H, m, pyrrole-CH). UV-vis (EtOH): λ_{max} , nm 414, 512, 545, 588, 650. MS (ES): m/z 659.6 [M + H] $^+$. $\Phi_{\text{F}} = 0.10$ (EtOH). $\Phi_{\Delta} = 0.70$ (EtOH).

Preparation of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylbacteriochlorin (2). 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1) (100 mg; 0.15 mmol), anhydrous potassium carbonate (420 mg, 20 equiv.) and *p*-toluenesulfonylhidrazide (566 mg, 20 equiv.) were added to 1,4-dioxane (4 mL) and thoroughly mixed in a 10 mL appropriate microwave vessel. The reaction vessel was then tightly sealed with a Teflon cap and the reaction mixture was magnetically stirred and heated at 100 °C for 60 min under microwave irradiation with a power setting of 100 W. After cooling to room temperature, the solvent was removed *in vacuo*. The crude mixture was then dissolved in AcOEt (10 mL). The organic phase was washed with an aqueous solution of hydrochloric acid 1 M (3 \times 15 mL) and water (3 \times 15 mL). The solution was then dried over MgSO_4 and evaporated to dryness. The crude product (85 mg) containing bacteriochlorin (2) (major product) and chlorin (minor product) as a red solid was used immediately to synthesize 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (3).

Preparation of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (3). The crude product (2) (75 mg) and activated manganese dioxide (50 mg, 5 equiv.) were added to 1,4-dioxane (4 mL) and thoroughly mixed in a 10 mL appropriate microwave vessel. The reaction vessel was then tightly sealed with a Teflon cap and the reaction mixture was magnetically stirred and heated at 90 °C for 10 min under microwave irradiation with a power setting of 100 W. After cooling to room temperature, the excess of MnO_2 was removed by filtration through a plug of Silica gel and eluting with ethanol. The filtrate was then evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by HPLC using a preparative Pursuit C18, 5 mm column (5 μm , 150 \times 21.2 mm, Varian, France). It was eluted with a mobile phase gradient of MeOH/ H_2O (0.1% trifluoroacetic acid) from 75% to 100% MeOH for

15 min and 100% MeOH for 15 min more with a flow rate of 15 mL/min. Fluorescence detection at 650 nm was realized using the fluorescence emission properties of (3) after 415 nm excitation. In these conditions, the retention time for the compound (3) was 12 min. (3) was obtained as a purple solid (26 mg; 34%). TLC (EtOH/ CH_2Cl_2 , 5/95): $R_f = 0.3$. $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): δ_{H} , ppm -1.78 and -1.76 (2H, s, NH), 4.20 (4H, m, pyrrole- CH_2), 7.77 (9H, s, Ph), 8.20 (6H, t, Ph), 8.31–8.53, (4H, d, Ph), 8.80 (6H, m, pyrrole-CH). UV-vis (EtOH): λ_{max} , nm 415, 514, 543, 595, 651. MS (ES): m/z 661.50 [M + H] $^+$. $\Phi_{\text{F}} = 0.21$ (EtOH). $\Phi_{\Delta} = 0.69$ (EtOH).

Preparation of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (4). In a 10 mL appropriate microwave vessel, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (3) (25 mg; 0.03 mmol) and zinc acetate dihydrate (34 mg, 4 equiv.) were dissolved in 1,4-dioxane (4 mL). The reaction vessel was then tightly sealed with a Teflon cap and the reaction mixture was magnetically stirred and heated at 90 °C for 3 min under microwave irradiation with a power setting of 100 W. After cooling to room temperature, the 1,4-dioxane was evaporated *in vacuo*. The crude mixture was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL), washed with water (5 \times 30 mL) and dried over MgSO_4 . After evaporation, the pure compound was obtained with 95% yield as blue green microcrystalline solid (26 mg). TLC (EtOH/ CH_2Cl_2 , 5/95): $R_f = 0.25$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ_{H} , ppm 4.20 (4H, s, pyrrole- CH_2), 7.77 (9H, s, Ph), 8.20 (6H, t, Ph), 8.31–8.53 (4H, d, Ph), 8.80 (6H, m, pyrrole-CH). UV-vis (EtOH): λ_{max} , nm 422, 459, 558, 592, 622. MS (ES): m/z 722.17 [M + H] $^+$. $\Phi_{\text{F}} = 0.20$ (EtOH). $\Phi_{\Delta} = 0.75$ (EtOH).

Preparation of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (5). In a 10 mL appropriate microwave vessel, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (1) (50 mg; 0.075 mmol) and zinc acetate dihydrate (66 mg, 4 equiv.) were dissolved in 1,4-dioxane (4 mL). The reaction vessel was then tightly sealed with a teflon cap and the reaction mixture was magnetically stirred and heated at 90 °C for 3 min under microwave irradiation with a power setting of 100 W. After cooling to room temperature, the 1,4-dioxane was evaporated *in vacuo*. The crude mixture was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL), washed with water (5 \times 30 mL) and dried over MgSO_4 . After evaporation, the pure compound was obtained with 97% yield as purple microcrystalline solid (53 mg). TLC (EtOH/ CH_2Cl_2 , 5/95): $R_f = 0.3$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} , ppm 7.72 (9H, s, Ph), 8.21 (6H, m, Ph), 8.37 (4H, d, Ph), 8.80 (8H, m, pyrrole-CH). UV-vis (EtOH): λ_{max} , nm 422, 515, 557, 595, 622. MS (ES): m/z 721.2 [M + H] $^+$. $\Phi_{\text{F}} = 0.08$ (EtOH). $\Phi(^1\text{O}_2) = 0.74$ (EtOH).

CONCLUSION

In summary, we used MAOS to prepare porphyrin, zinc-porphyrin and zinc-chlorin. Reaction times have

been shortened from several hours to less than one hour (Table 1). Using solvents without distillation for microwave irradiation in place of freshly distilled solvents like dichloromethane and pyridine let also saving time of reagents preparation for syntheses. Another interesting advantage was the use of MnO_2 instead of *o*-chloranil to reoxidize the bacteriochlorin into chlorin. Indeed, MnO_2 was removed easier and faster than *o*-chloranil at the end of the reaction minimizing the conversion of chlorin into unwanted porphyrin. This new performant strategy does not affect the photophysical properties of the compounds, especially, the singlet oxygen quantum yield. MAOS could be a powerful technique for all the researchers involved in the field of synthesis of porphyrin and/or chlorin.

REFERENCES

- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J and Peng Q. *J. Nat. Cancer Inst.* 1998; **90**: 889–905.
- MacDonald II and Dougherty TJ. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2001; **5**: 105–129.
- Weishaupt KR, Gomer CJ and Dougherty TJ. *Cancer Res.* 1976; **36**: 2326–2329.
- Mitchell JB, McPherson S, DeGraff W, Gamson J, Zabel A and Russo A. *Cancer Res.* 1985; **45**: 2008–2011.
- Ali H and Van Lier JE. *Chem. Rev.* 1999; **99**: 2379–2450.
- Azab M, Boyer David S, Bressler Neil M, Bressler Susan B, Cihelkova I, Hao Y, Immonen I, Lim Jennifer I, Menchini U, Naor J, Potter Michael J, Reaves A, Rosenfeld Philip J, Slakter Jason S, Soucek P, Strong HA, Wenkstern A, Su Xiang Y and Yang Yit C. *Arch. Ophthalmol.* 2005; **123**: 448–457.
- Atif M, Dyer PE, Paget TA, Snelling HV and Stringer MR. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2007; **4**: 106–111.
- Adler AD, Longo FR, Finarelli JD, Goldmacher J, Assour J and Korsakoff L. *J. Org. Chem.* 1967; **32**: 476.
- Lindsey JS, Schreiman IC, Hsu HC, Kearney PC and Marguerettaz AM. *J. Org. Chem.* 1987; **52**: 827–836.
- Whitlock HW, Jr., Hanauer R, Oester MY and Bower BK. *J. Am. Chem. Soc.* 1969; **91**: 7485–7489.
- Giguere RJ, Bray TL, Duncan SM and Majetich G. *Tetrahedron Lett.* 1986; **27**: 4945–4948.
- Gedye R, Smith F, Westaway K, Ali H, Baldisera L, Laberge L and Rousell J. *Tetrahedron Lett.* 1986; **27**: 279–282.
- Petit A, Loupy A, Maillard P and Momenteau M. *Synth. Commun.* 1992; **22**: 1137–1142.
- Jain N, Kumar A and Chauhan SMS. *Synth. Commun.* 2005; **35**: 1223–1230.
- Nascimento BFO, Gonsalves A and Pineiro M. *Inorg. Chem. Commun.* 2010; **13**: 395–398.
- Di Stasio B, Frochot C, Dumas D, Even P, Zwier J, Mueller A, Didelon J, Guillemin F, Viriot M-L and Barberi-Heyob M. *Eur. J. Med. Chem.* 2005; **40**: 1111–1122.
- Colombeau L, Kamarulzaman EE, Frochot C and Vanderesse R. *Trends Org. Chem.* 2011; **15**: 33–40.
- Nascimento BFO, Pineiro M, Gonsalves A, Silva MR, Beja AM and Paixao JA. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2007; **11**: 77–84.
- Harriman A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1980; **76**: 1978–1985.
- Figueiredo TLC, Johnstone RAW, Sorensen AMPS, Burget D and Jacques P. *Photochem. Photobiol.* 1999; **69**: 517–528.
- Zheng WQ, Shan N, Yu LX and Wang XQ. *Dyes Pigm.* 2008; **77**: 153–157.

I-1-4. Synthèse de la 2-(4-carboxyphényl) phtalocyanine de zinc (ZnPc)

La 2-(4-carboxyphényl) phtalocyanine de zinc nommée ZnTPC a été synthétisée selon la méthode de Kliesch (Kliesch et al., 1995). 0,72 mmol de l'acide 4-(3,4-dicyanophényloxy)benzoïque sont ajoutées à 1,08 mmol de 1,2 dicyanobenzène dans 10 mL de pentanol fraîchement distillé à reflux (140°C), sous atmosphère inerte (N₂) et sous agitation. A partir de cette étape, le ballon doit être protégé de la lumière (figure 89). 14 mmol de lithium sont ajoutées, le chauffage est maintenu pendant 15 minutes. La solution est refroidie à température ambiante avant d'ajouter 30 mL d'acide acétique glacial. Le précipité obtenu est lavé à l'eau, puis séché à l'étuve. Il est alors dissous dans la DMF avec 5 équivalents d'acétate de zinc dihydraté, puis chauffé à reflux à 80°C pendant 12 heures. La DMF est ensuite évaporée, et le résidu est lavé à l'eau. Le rendement obtenu est de 98%.

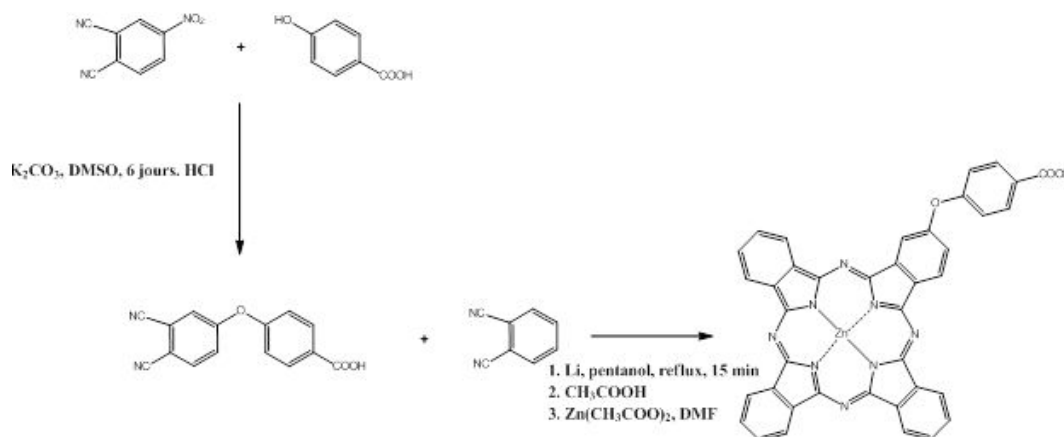


Figure 89 : Synthèse de la ZnPc.

I-2. Caractérisation photophysique des photosensibilisateurs

L'absorption, l'émission et la production de l'¹O₂ des photosensibilisateurs synthétisés ont été mesurées. Les coefficients d'absorption moléculaires aux différentes longueurs d'onde d'absorption ainsi que les rendements quantiques de fluorescence et de production d'¹O₂ singulet ont aussi été calculés. Les propriétés photophysiques pour chaque échantillon sont déterminées dans l'éthanol à 25°C. Les instruments utilisés pour les mesures sont détaillés dans la partie expérimentale.

I-2-1. Propriétés d'absorption

Tous les spectres d'absorption des molécules synthétisées sont représentés dans la figure 90.

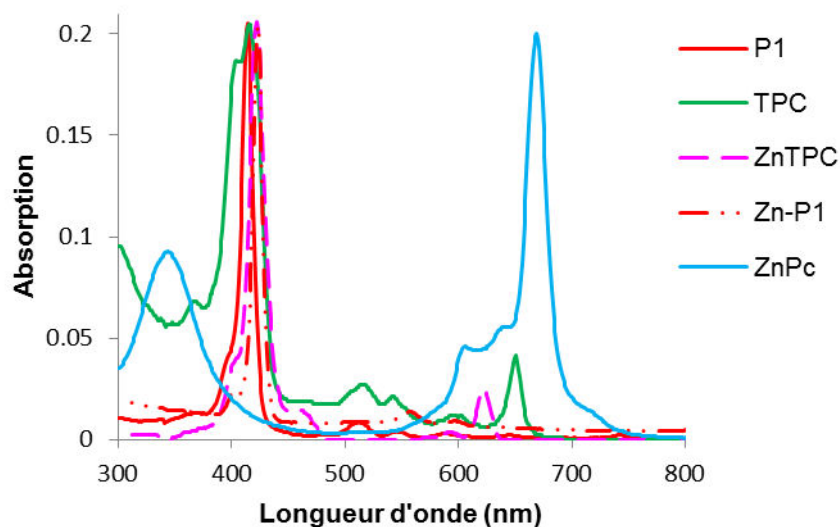


Figure 90 : Spectres d'absorption des photosensibilisateurs P1, TPC, ZnTPC, ZnPc et Zn-P1 dans l'éthanol.

P1 : le spectre d'absorption de la P₁ est caractérisé par une bande de Soret intense à 415 nm, ainsi que quatre bandes Q (deux Q_x (S₀ → S₁) et deux Q_y (S₀ → S₂)) de moindre intensité entre 512 nm et 650 nm. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 6

Tableau 6 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la P₁ dans l'éthanol

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Bande de Soret	414	300000
Q_{IV}	512	190000
Q_{III}	545	8000
Q_{II}	588	5000
Q_I	650	3000

TPC : Le spectre d'absorption de la chlorine est également caractérisé par une bande de Soret vers 419 nm dans l'éthanol, ainsi que quatre bandes Q entre 512 nm et 650 nm (figure 90). Néanmoins, par rapport à la porphyrine, la bande de Soret est plus large et moins intense, et la bande Q_I l'est beaucoup plus. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 7.

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

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
Bande de Soret	415	150000
Q_{IV}	514	13000
Q_{III}	543	9000
Q_{II}	595	4400
Q_I	651	3600

ZnTPC : Le spectre d'absorption de la chlorine zinguée dans l'éthanol est légèrement différent de celui de la TPC non zinguée ; il est caractérisé par un déplacement de la bande de Soret de 419 nm à 422 nm avec une valeur légèrement plus élevée ainsi qu'un déplacement de la bande Q_I d'environ 650 nm à 622 nm. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnTPC dans l'éthanol

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
Bande de Soret	422	130000
Q_{IV}	459	1000
Q_{III}	558	1000
Q_{II}	592	3000
Q_I	622	20000

ZnPC : Le spectre d'absorption de la phtalocyanine zinguée est complètement différent de celui des PS précédents. En effet, il présente un maximum d'absorption aux alentours de 669 nm dans l'éthanol, une bande à 603 nm et une bande de Soret à 341 nm. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnPc dans l'éthanol

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
Bande de Soret	341	68793
Q_I	603	31003
Q_{II}	668	147627

ZnP1 : Le spectre d'absorption de la porphyrine zinguée dans l'éthanol est légèrement différent de celui de la P1 non zinguée ; il est caractérisé par un déplacement de la bande de Soret de 414 nm à 422 nm avec une valeur légèrement plus élevée ainsi qu'un déplacement de la bande Q_I d'environ 650 nm à 622 nm. Les coefficients d'extinction molaire ϵ de chaque bande sont donnés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Coefficients d'absorption molaire des différentes bandes d'absorption de la ZnP1 dans l'éthanol.

Bande d'absorption	λ (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ . cm ⁻¹)
Bande de Soret	422	375000
Q_{IV}	515	4000
Q_{III}	557	13000
Q_{II}	595	5000
Q_I	622	1500

I-2-2. Propriétés d'émission de fluorescence

Tous les spectres de fluorescence des photosensibilisateurs synthétisés sont représentés dans la figure 91.

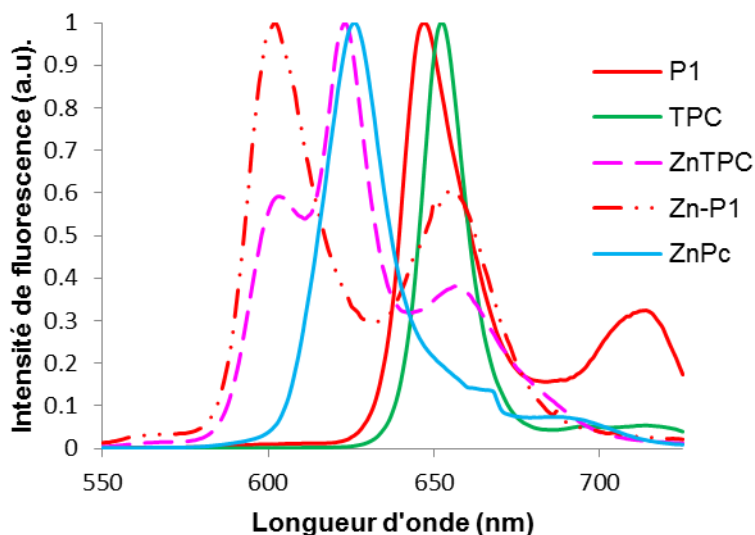


Figure 91 : Spectres d'émission des photosensibilisateurs P1, TPC, ZnTPC, ZnPC et Zn-P1 dans l'éthanol.

Les spectres de fluorescence permettent de calculer les rendements quantiques de fluorescence grâce à l'utilisation d'une référence dont le rendement quantique est connu. L'équation 3.1 permet ainsi de déterminer ce rendement quantique en utilisant comme référence la TPP dans le toluène.

$$\Phi_f = \Phi_{f0} \cdot \frac{I_f}{I_{f0}} \cdot \frac{A_0}{A} \cdot \left(\frac{n}{n_0} \right)^2 \quad (3.1)$$

Cette équation fait intervenir le rendement quantique, l'intensité de fluorescence, l'absorption et l'indice de réfraction du solvant de la référence (signalée avec un « 0 ») et de l'échantillon à analyser. Le rendement quantique de fluorescence de la TPP est de 0,11 dans le toluène (Figueiredo et al, 1999), les intensités de fluorescence sont prises comme étant l'aire sous les courbes des spectres obtenus et les indices de réfractons sont : $n_{\text{EtOH}} = 1,360$ et $n_{\text{toluène}} = 1,496$.

Le tableau 11 représente les longueurs d'onde maximales d'émission et les rendements quantiques de fluorescence des différents photosensibilisateurs synthétisés.

Tableau 11 : Longueur d'onde maximale d'émission et rendement quantique de fluorescence des photosensibilisateurs

Composé	λ_{\max} (nm)	$\Phi_F \pm 0,02$
P1	650/720	0,10
TPC	650	0,21
ZnTPC	600/622/657	0,20
ZnPc	674	0,12
ZnP1	602	0,08

Tous les composés synthétisés fluorescent avec des rendements variables ne dépassant pas 21%.

I-2-3. Propriétés de production d' $^1\text{O}_2$

La formation d' $^1\text{O}_2$ est détectée par enregistrement de sa luminescence, dont le maximum est vers 1275 nm, par un détecteur proche-infrarouge. Les spectres de luminescence de l'oxygène singulet de tous les photosensibilisateurs synthétisés sont représentés dans la figure 92.

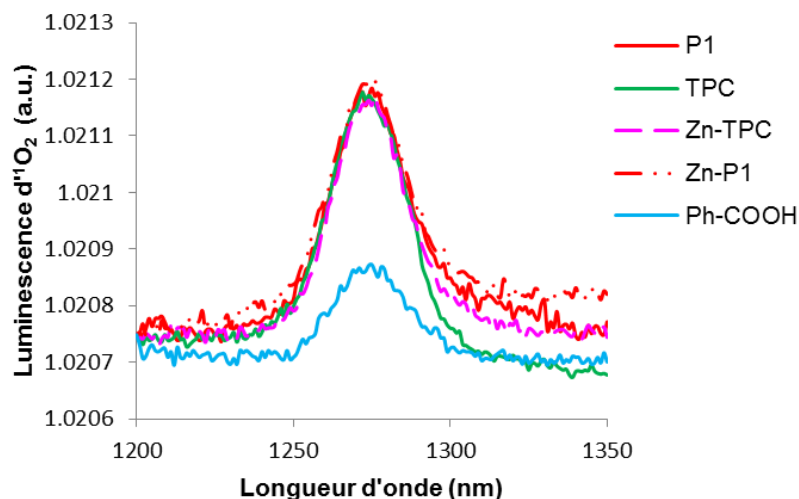


Figure 92 : Spectres d'émission de $^1\text{O}_2$ après excitation des photosensibilisateurs P1, TPC, ZnTPC, ZnPc et Zn-P1 dans l'éthanol à la même concentration.

L'équation 3.1 est également utilisée pour évaluer les rendements quantiques de production d'oxygène singulet en prenant le rose de Bengale dans l'éthanol comme référence, dont le rendement

quantique de production d'oxygène singlet Φ_{Δ} est de $0,68 \pm 0,05$ (Redmond et al., 1999). Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : rendements quantiques de production d' $^1\text{O}_2$ des différents photosensibilisateurs synthétisés

Composé	$\Phi_{\Delta} \pm 0,05$
P1	0,70
TPC	0,69
ZnTPC	0,75
ZnPc	0,34
ZnP1	0,74

Tous les composés synthétisés forment de $^1\text{O}_2$ avec des rendements variables. La porphyrine et les chlorines libre ou zinguée présentent des rendements très élevés respectivement 70%, 69% et 75%. La phthalocyanine zinguée possède un rendement quantique d'oxygène singlet modeste de 34%.

II- Greffage de la porphyrine sur une nanoparticule de Tb_2O_3 excitable par Rayons X

Une étude a été réalisée en coopération avec l'équipe FENNEC, de l'Institut Lumière Matière de Lyon, dirigé par O. Tillement.

Les chimistes de Lyon ont développé une nanoparticule de Tb_2O_3 revêtue d'une couche de polysiloxane qui est un nanoscintillateur biocompatible, présentant une bonne biodistribution après injection *in vivo* (pas de rétention par le système réticulo-endothélial). Nous avons élaboré une porphyrine dont le groupement carboxylique est activé par un groupement *N*-Hydroxy-succinimide (NHS) qui peut être couplée aux nanoparticules de façon covalente.

Les propriétés photophysiques du photosensibilisateur en solution ou couplé aux nanoparticules ont été comparées par notre équipe. Le couplage ne modifie pas les propriétés d'absorption, d'émission de fluorescence et de formation d'oxygène singlet de la porphyrine, après excitation à 650 nm.

En utilisant la spectroscopie résolue dans le temps, l'équipe FENNEC a mis en évidence qu'il existait un transfert d'énergie entre Tb_2O_3 et la porphyrine, après excitation lumineuse ou par rayons X du sesquioxyde de terbium. Afin d'évaluer si la porphyrine était capable de produire de $^1\text{O}_2$ après excitation du Tb_2O_3 , la détection directe de $^1\text{O}_2$ n'a pas été possible du fait de la complexité du montage expérimental (excitation par rayons X suivi d'une détection de $^1\text{O}_2$ par luminescence). Aussi, notre

équipe a mis au point un protocole utilisant deux types de sondes chimiques détectant la présence d'oxygène singulet, à savoir l'APF (3'-(*p*-aminophényl) fluorescéine) et le SOSG (*Singlet Oxygen Sensor Green*).

Ces travaux ont été publiés dans « J. Phys. Chem » et la publication incluse ci-après.

X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins

Anne-Laure Bulin,^{†,⊥} Charles Truillet,^{†,⊥} Rima Chouikrat,[‡] François Lux,[†] Céline Frochot,[‡] David Amans,[†] Gilles Ledoux,[†] Olivier Tillement,[†] Pascal Perriat,[§] Muriel Barberi-Heyob,^{||} and Christophe Dujardin^{*,†}

[†]Institut Lumière Matière, UMR5306 Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 10 rue Ada Byron, 69622 Villeurbanne cedex, France

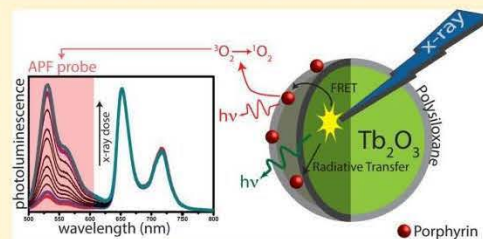
[‡]LRGP, UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

[§]MATEIS, INSA-Lyon, Université de Lyon, UMR CNRS 5510, 7 Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne cedex, France

^{||}CRAN, UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine Site CRAN/Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Supporting Information

ABSTRACT: Tb_2O_3 coated with a polysiloxane layer is a biocompatible nanoscintillator that exhibits an appropriate pattern of biodistribution after injection. In this contribution, we combine this nanosystem with porphyrin molecules that are able to generate singlet oxygen, a major cytotoxic agent for photodynamic therapy application. Using time-resolved laser spectroscopy and singlet oxygen probes, we demonstrate this combination is suitable for singlet oxygen generation induced by X-ray and provide a physical study of the energy transfer observed between the nanoscintillator and the porphyrin. Combined with a radiotherapy protocol, the proposed nanohybrid system presents a combination of physical, chemical, and biological properties that make it a good candidate for photodynamic effects in deep tissues.



INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a noninvasive technique mainly used for the treatment of carcinoma. It involves a photosensitizer (PS) that is ideally concentrated within the tumor tissues and is photoactivated under irradiation with a suitable energy (typically in the near-infrared range).^{1,2} Energy transfer from the excited PS to the surrounding substrate or oxygen molecules generates reactive oxygen species (ROS), including singlet oxygen (1O_2), which is believed to be the major cytotoxic agent.^{3,4} The energy-transfer reactions related to 1O_2 generation are described in refs 5 and 6. Despite its well-recognized efficiency to treat particular cancers, the short penetration length of visible light in human tissues limits the effectiveness of PDT. For instance, the penetration length of light at 600 nm is about 2 to 3 mm and increases to 5 to 6 mm for 700–800 nm wavelengths.⁶ Therefore, the treatment of deep tumors with this protocol is still a major issue. Some alternative solutions have recently been investigated to excite the PS such as the use of Cherenkov radiation⁷ or some anti-Stokes fluorophores exhibiting upconversion processes.⁸

To overcome the small penetration depth of light, X-rays can also be used⁹ to excite the PS coupled to a nanoparticle (NP) able to emit light under ionizing radiation: a nanoscintillator.^{10,11} The concept was illustrated with $LaF_3:Tb^{3+}$ as well as

with semiconductor quantum dots^{12,13} and described by Juzenas.¹⁴ This treatment can be considered as a potential complement to the radiotherapy currently used to treat deep carcinoma. This approach requires the selection of a material composition exhibiting appropriate physical and biological properties: high density for a good ionizing radiation stopping power, high scintillation quantum yield, and efficient energy transfer toward the PS as well as biocompatibility and adapted biodistribution. In this contribution, we experimentally demonstrate the concept with a nanoscintillator known to exhibit an appropriate pattern of biodistribution after injection. We also describe in detail the energy transfer occurring between the core of the NP and the PS leading to singlet oxygen formation under X-ray excitation.

Tb_2O_3 scintillating NPs (core diameter about 3 nm) covered by a polysiloxane layer ($Tb_2O_3@SiO_2$) conjugated with a porphyrin as PS were studied. The porphyrin was selected because of its current use as a PS in cancer treatment by PDT. Indeed, Photofrin is clinically applied worldwide.¹⁵ We developed a 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin

Received: August 2, 2013

Revised: September 6, 2013

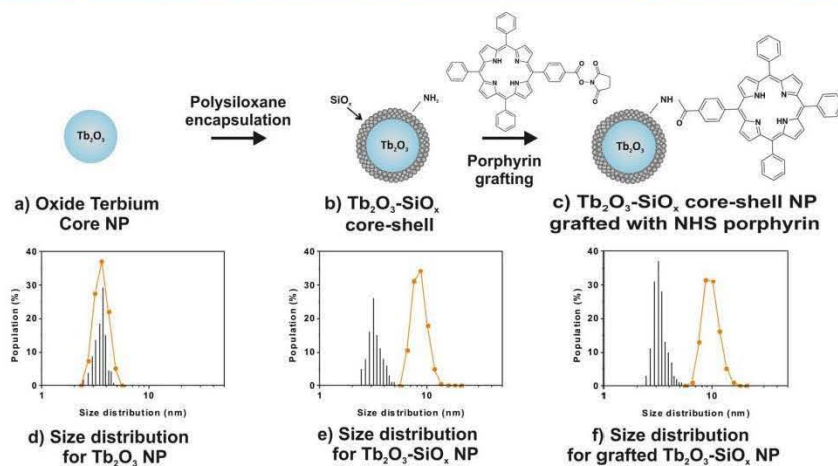


Figure 1. Schematic illustration of the nanoparticle synthesis with (a) the terbium oxide core NPs, (b) $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_x$ core-shell NPs for two silica per one terbium atom, and (c) the core-shell NPs grafted with P-NHS. (d–f) Respective size distribution obtained by TEM image analysis (black bars) and PCS analysis (orange curves). Note that the observed crystalline domain size distribution does not significantly change while the main hydrodynamic radius increases after encapsulation as expected. Details of experiments are given in the Supporting Informations (SI1).

capable of being attached covalently to the amino group of the APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane) into the polysiloxane layer of the NPs. Tb^{3+} luminescent ions are well known to exhibit an efficient green luminescence well adapted to the absorption band of the porphyrin previously described. Compared with $\text{Gd}_2\text{O}_3/\text{Tb}$, Tb_2O_3 exhibits a higher density ($8.230 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ against $7.901 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) while preserving the luminescent quantum yield.¹⁶ It was demonstrated that concentration quenching does not occur with such small particle sizes.^{16,17}

■ SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION

The synthesis of the activated PS was done in two steps following the Whitlock¹⁸ protocol also described by Di Stasio.¹⁹ In the first step, we synthesized the tetraphenylmonocarboxylic porphyrin. In the second step, the carboxylic group was activated with a succinimide ester group to allow the grafting of the PS to the amino group of the NPs. More details of the synthesis protocol are given in the Experimental Section.

Terbium oxide NPs embedded in a polysiloxane shell were obtained as well by a two-step route. First, terbium oxide Tb_2O_3 was formed in diethylene glycol (DEG)²⁰ according to the reaction: $2\text{TbCl}_3 + 6\text{NaOH} \rightarrow \text{Tb}_2\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + 6\text{NaCl}$. Then, the polysiloxane shell growth was induced by hydrolysis–condensation of appropriate silane precursors. Details of the preparations are given in the Experimental Section. The same NP synthesis route was already applied to a similar compound (gadolinium oxide core) for biomedical applications.²¹ It was demonstrated that their encapsulation in fluorescent and PEGylated polysiloxane shell renders them suitable as probes for optical imaging and magnetic resonance imaging (MRI).²² The attractive biodistribution of the particles was demonstrated by *in vivo* experiments, the pharmacokinetics parameters being highly dependent on the length and the nature of the PEGylated chains. The potential of the gadolinium oxide cores for MRI was also confirmed by a

research group of Linköping University with another coating.^{23,24} After the polysiloxane coating, we expect the terbium oxide core to exhibit the same pattern of biodistribution because of the similar morphology between gadolinium and terbium particles. To prepare the grafting between PS and NPs, we prepared a solution of porphyrin NHS (P-NHS): 11.34 mg of P-NHS was dispersed in 1.5 mL of anhydrous DMSO. The NP solution was then added to the P-NHS for covalent grafting. A ratio of 1 P-NHS per 50 terbium atoms was thus obtained. The mixture was stirred for 48 h under an inert atmosphere at room temperature, permitting an almost complete reaction between the NHS group and the free amine in the silica surface (>99%) to occur.

Morphological states of the nanostructures are presented in Figure 1. The average size of the Tb_2O_3 core measured by photon correlation spectroscopy (PCS) is 3.6 nm (mean standard deviation: (MSD) 0.6 nm), confirmed by measurements performed on transmission electron microscopy (TEM) images. The average size of the core–shell particles, measured by PCS, is 9.8 nm (MSD 1.7 nm). For the core–shell NPs grafted with porphyrin, the mean hydrodynamic diameter measured by PCS is 9.9 nm (MSD 1.6 nm). The presence of the polysiloxane shell does not lead to alteration of the core size and crystallinity, which was confirmed by TEM images. Note that because of the high density of the Tb_2O_3 core the size distribution deduced from TEM corresponds only to the core size distribution. The terbium concentration of those colloidal solutions stayed equal to $\sim 15 \text{ mM}$. By calculations combining the density, the molar mass, and the mean radius of Tb_2O_3 NPs, we deduced that each core contained about 650 terbium atoms. Thus, we estimated that ~ 13 porphyrin molecules were grafted around one NP. As demonstrated by our team, two to six photosensitizers per NP are enough to initiate the *in vitro* photodynamic effect.^{24,25} On TEM images (see Supporting Informations SI1), only the particle's crystalline core can be seen. The oxide core was not affected by the sol–gel reaction and the porphyrin grafting processes. We do not observe either

dissolution or destruction of its structure. Three samples were studied in the frame of this work. All were initially stabilized in DEG. The first one contained 10 mM of $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$, the second one contained 0.2 mM of porphyrin, and the third one contained 10 mM of $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ conjugated with 0.2 mM of porphyrin. Measurements were performed on solutions diluted in absolute ethanol with a dilution ratio of 1:5. This solvent was chosen because the particles were stable enough to perform the experiments, and it contained oxygen likely to become singlet oxygen.

Photophysical properties were measured on both porphyrins (before grafting (P-NHS) and conjugated with NPs (P@NP)), as detailed in the Supporting Informations (S12), and are given in Table 1. Figure 2 compares the emission spectrum measured

Table 1. Molar Extinction Coefficients (expressed in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Determined at Different Maximum Wavelengths (ϵ_λ) (see inset Figure 3b), Fluorescence Quantum Yield (Φ_f , $\pm 2\%$), Fluorescence Lifetime (τ expressed in ns, ± 0.1 ns measured with $\lambda_{\text{exc}} = 408$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm), and Singlet Oxygen Quantum Yield (Φ_Δ , $\pm 5\%$) Are Presented for Nongrafted Porphyrin (P-NHS) and for Coupled Porphyrin (P@NP)

	P-NHS	P@NP
Soret (ϵ_{414})	355 763	353 127
Q_{IV} (ϵ_{512})	17 028	17 222
Q_{III} (ϵ_{545})	7446	7730
Q_{II} (ϵ_{588})	4406	4411
Q_{I} (ϵ_{650})	2810	2902
Φ_f	0.10	0.10
τ (ns)	10.1	10.1
Φ_Δ	0.70	0.78

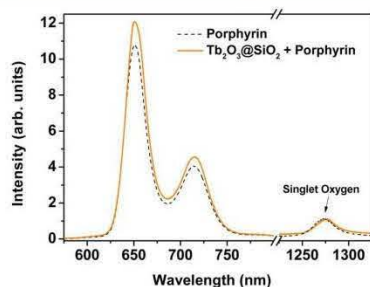


Figure 2. Emission spectra measured under a 405 nm diode excitation for porphyrin (0.02 mM in ethanol) and for porphyrin grafted on NPs (0.02 mM of porphyrin conjugated with 1 mM of $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ in ethanol). Emission was measured in visible and infrared range. Intensities are equal for both samples.

on ungrafted porphyrin and on porphyrin conjugated with the $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$. Absorption measurements were performed to check the porphyrin concentration in each sample. The emission spectra were recorded under the same experimental conditions under 405 nm excitation (Soret band). Two emission bands are distinguishable: one in the visible range and one in the infrared due to the generated singlet oxygen characterized by its emission at 1270 nm.²⁶ The emission spectra and their intensities are identical. In addition, the measured fluorescence quantum yields (Φ_f) and singlet oxygen

quantum yields (Φ_Δ) for P-NHS and P@NP (Table 1) confirm that even when conjugated porphyrin keeps its properties of PS and its ability to produce singlet oxygen with a comparable efficiency.

RESULTS AND DISCUSSION

Energy-Transfer Analysis. Optical excitation analysis was performed to determine the NP-PS energy-transfer efficiency. Measurements presented here are optical absorption, emission, and radioluminescence spectra for $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ NPs (Figure 3a) and optical absorption and emission spectra for porphyrin (Figure 3b). The absorption spectrum of $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ NPs

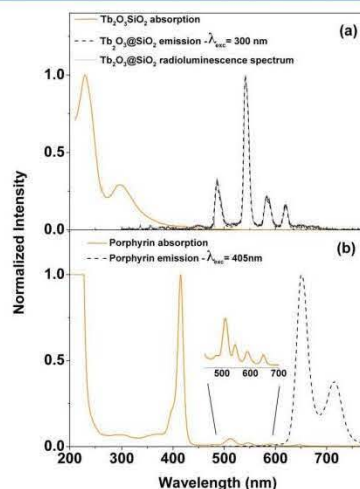


Figure 3. Absorption and time-resolved emission spectra measured for scintillating NPs and for porphyrin dispersed in absolute ethanol. $\text{Tb}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ NPs were excited by a pulsed laser at 300 nm. The emission spectrum was recorded after a 500 ns delay after the laser pulse and with a gate width of 1 ms. The radioluminescence spectrum was measured under a continue X-ray irradiation. (See Supporting Information S13.) Porphyrin emission was measured under a 405 nm excitation (Soret band).

exhibits two broad bands peaking at 225 and 300 nm. These bands correspond, respectively, to the exciton-like absorption correlated to the direct excitation of the lattice ($\text{VB} \rightarrow \text{CB}$) and to the electric dipole allowed transition of $\text{Tb}^{3+} 4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$.²⁷ The emission spectrum measured for a direct excitation of terbium (300 nm) corresponds to the well-known green emission consisting of four peaks centered at 488 nm (intraconfigurational transition $4f^6 - 4f^6 5D_4 \rightarrow 7F_6$), 545 nm ($5D_4 \rightarrow 7F_3$), 588 nm ($5D_4 \rightarrow 7F_4$), and 625 nm ($5D_4 \rightarrow 7F_3$).^{17,27} We recorded the terbium emission spectrum with a large time gate in agreement with the well-known millisecond fluorescence decay time of Tb^{3+} . The same spectrum is obtained under X-ray excitation (Figure 3a) and under 226 nm excitation. (See Supporting Informations S15.)

The porphyrin absorption spectrum exhibits an intense peak centered at 410 nm known as the Soret band and four less intense peaks: the Q-bands centered at 512 (Q_{IV}), 545 (Q_{III}), 588 (Q_{II}), and 650 nm (Q_{I}). The absorption spectrum shows a saturation at wavelengths shorter than 240 nm. This band is not

C

dx.doi.org/10.1021/jp4077189 | J. Phys. Chem. C XXXX, XXX, XXX–XXX

yet assigned but is not due to the solvent used. The porphyrin emission spectrum obtained under excitation in the Soret band (excitation wavelength centered at 405 nm) exhibits the typical porphyrin visible emission peaking at 650 and 715 nm (as for any other excitation such as 300 nm). Its fluorescence decay time was measured to be ~ 10 ns, which is in good agreement with results found in the literature.⁵

It is generally admitted that efficient energy transfer between two species may occur if a significant overlap exists between the emission of the donor and the absorption of the acceptor. The energy transfer can be either a Förster resonant energy transfer (FRET)²⁸ or a radiative transfer. FRET can be identified by studying the fluorescence decay curves.

In the case of $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ and porphyrin, Tb emissions at 545 and 588 nm, respectively, match porphyrin Q_{III} and Q_{II} absorption bands. One expects, therefore, an efficient energy transfer between these two components. Because emission processes in $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ and in porphyrin exhibit different timing behaviors, we performed time-resolved spectroscopy under UV excitation to study the energy transfer. Experimental conditions such as exposure time, excitation and emission collection conditions, and laser power were kept identical for all measurements to ensure reliability of a fluorescence intensity comparison. A summary of the results obtained under a 300 nm excitation is presented in Figures 4 and 5. The laser excitation

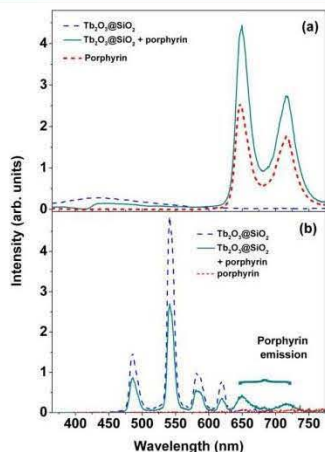


Figure 4. Time-resolved spectroscopy performed under a 300 nm excitation. Short times mean $t_0 = 0$ ns and $\Delta t = 100$ ns and long times mean $t_0 = 500$ ns and $\Delta t = 1$ ms. Fluorescence spectra measured at short times (a) and at long times (b). Experimental details are given in the Supporting Information (SI3).

wavelength was fixed at 300 nm corresponding to the excitation from $4f^8$ to the $4f^7-5d^1$ band of $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ NPs. Two kinds of time-resolved spectra were recorded: at “short times” and at “long times”. “Short times” means $t_0 = 0$ ns and $\Delta t = 100$ ns (where t_0 is the delay after the laser pulse and Δt is the time gate width) and “long times” corresponds to $t_0 = 500$ ns and $\Delta t = 1$ ms (Figure 4a,b). Fluorescence decay curves were recorded at 545 nm (strongest emission peak of Tb^{3+}) and at 650 nm (emission peak of porphyrin) (Figure 5).

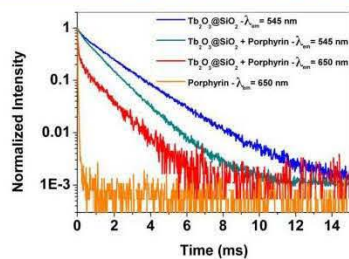


Figure 5. Fluorescence decay curve measured on the porphyrin sample at 650 nm exhibits a fast component. The fluorescence decay curve measured on the grafted sample at 650 nm presents the same fast component and the same slow component that measured at 545 nm. Tb^{3+} fluorescence decay curves measured for a 300 nm excitation show an acceleration of the terbium decay when it is conjugated with porphyrin. Experimental details are given in the Supporting Information SI3.

Figure 4a represents the short times emission spectra measured for all samples under a 300 nm excitation. As expected, because of its long fluorescence decay time, no Tb^{3+} emission was detected in this short temporal range. On the contrary, because of its fast decay time, the porphyrin emission between 625 and 725 nm was detected. The emission of the porphyrin solution corresponds to a direct excitation from the laser: the porphyrin absorption is weak at 300 nm but is not zero.

When porphyrin is coupled to NPs, its emission intensity is twice enhanced compared with porphyrin in solution. Another unexpected broad emission appeared with a maximum at ~ 425 nm for samples containing NPs. This emission is strongly affected by the presence of porphyrin in the grafted sample. The absorption spectrum of the porphyrin shows that this broad emission band matches the strong absorption Soret band of the porphyrin. The increase in porphyrin emission and the absorption of the broad emission point out a transfer between NPs and porphyrin at short times. The emission band peaking at ~ 425 nm is assigned to the polysiloxane layer covering the NPs. Indeed, we performed experiments on Gd_2O_3 , $\text{Gd}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$, and $\text{Lu}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$, which are optically inactive in this spectral range, and the same broad emission was observed only for NPs coated with polysiloxane layer. The spectra are presented in the Supporting Information (SI4). The energy transfer at short times between the polysiloxane layer and the NPs seems rather efficient. Nevertheless, polysiloxane emission was not observed under X-ray excitation. (See Figure 3.) We thus do not expect a contribution to the porphyrin excitation process under X-ray excitation. Contrary to the short times case, for long time measurements (Figure 4b), the emission spectrum of the porphyrin solution is almost zero, while the spectrum measured on the grafted sample presents both the emission of Tb^{3+} and porphyrin with the characteristic peaks at 650 and 725 nm. A transfer from Tb^{3+} excited ions to porphyrin occurs, leading to the delayed red emission of porphyrin. This result is confirmed by the fluorescence decay time measurements recorded for the porphyrin emission at 650 nm (Figure 5). Indeed, when grafted on $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$, the porphyrin fluorescence decay curve exhibits two components. The fast one corresponds to a direct excitation of the porphyrin by the laser light and is identical to the fluorescence decay

D

dx.doi.org/10.1021/jp4077189 | J. Phys. Chem. C XXXX, XXX, XXX–XXX

measured on porphyrin in solution, that is to say ~ 10 ns. The slow one has nearly the same decay time, 1.19 ms, as that of Tb^{3+} in the grafted sample. To identify the nature of the energy transfer involved (radiative or FRET), we studied the fluorescence decay measurements of the terbium emission (at 545 nm). An acceleration of the Tb^{3+} emission for the grafted sample (decay time decreases from 1.91 ms down to 1.28 ms) is observed, confirming the presence of a Förster resonance energy transfer because radiative transfer does not modify the population of the Tb^{3+} excited state. In addition to a direct excitation of porphyrin, a 300 nm excitation of NPs conjugated with porphyrin induces either a $\text{Tb}^{3+} 4f^8 \rightarrow 4f^7 5d^1$ transition or a polysiloxane excitation able to induce, via energy transfer, an enhancement of the porphyrin emission at short times. If terbium is excited, it relaxes by nonradiative transitions down to the $^5\text{D}_4$ level. From this level, some intraconfigurational radiative recombination may occur (see Figure 3a) as well as an energy transfer by FRET toward the S_1 level of porphyrin. Radiative transfer (reabsorption) from Tb^{3+} emission to the porphyrin is also possible but cannot be clearly identified because the typical emission of porphyrin $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_0$ would also be detected with the Tb^{3+} timing regime. Note that no modification of the Tb^{3+} emission spectrum was observed, indicating no or weak radiative transfer from NPs to PS. The same behaviors were observed for excitation at 226 nm, and the results are given in the Supporting Informations (SI5). We point out here that excitations at short wavelengths above the gap are of prior importance for scintillation analysis. Indeed, under X-ray excitation, the relaxation of free electrons and holes generated by the primary interaction leads to relaxed electron and hole pairs in the bottom of the conduction band and the top of the valence band, respectively. Those pairs then led to an energy transfer toward the emitting centers giving rise to the expected luminescence. Excitation at 226 nm can therefore be considered as a selective excitation in the last relaxation stage of the scintillation mechanisms before luminescence. Figure 6 is a schematic of all of the transfers.

X-ray-Induced $^1\text{O}_2$ Demonstration. After having shown energy transfer between the nanoscintillator and the porphyrin, this last section focuses on the demonstration of X-ray-induced singlet oxygen generation. We used two commercial probes: the singlet oxygen sensor green (SOSG) and the 3'-*p*-(aminophenyl)fluorescein (APF). These probes are designed to be quickly oxidized into fluorescent molecules in the presence of singlet oxygen and of singlet oxygen or hydroxyl radical $\cdot\text{OH}$, respectively.^{29,30} Because APF is sensitive to both $^1\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$, we used NaN_3 , known to quench $^1\text{O}_2$, to differentiate the contribution of both species.³⁰ By studying the evolution of the APF emission intensity as a function of the X-ray dose, we demonstrate $^1\text{O}_2$ generation. Emission spectra were recorded under 490 nm excitation after successive X-ray irradiation periods. To discard the possibility of APF generation due to optical excitation,³⁰ we compared the probe signal with the signal of an identical sample without X-ray irradiation. The effect of X-ray irradiation on porphyrin coupled to NPs and uncoupled porphyrin in the presence of SOSG and APF is presented in Figures 7 and 8, respectively. Experimental details are given in the Supporting Informations (SI6). Because sensor green is sensitive only to $^1\text{O}_2$, the signal increase observed in Figure 7, when the X-ray dose increases, is directly related to an enhancement of the amount of formed $^1\text{O}_2$ in solution. We normalized the spectra to the direct porphyrin emission (650 nm) to correct for variations of measurement conditions. For

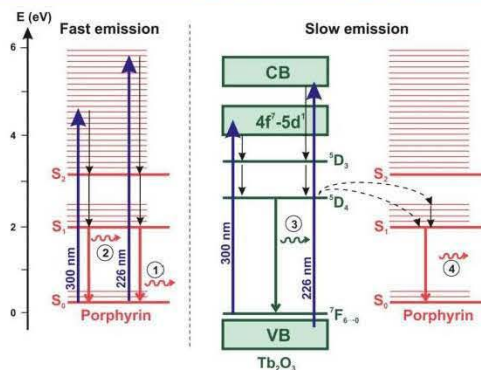


Figure 6. Energy transfers. The left side of the scheme represents direct excitation of porphyrin by 226 or 300 nm pulsed laser radiation. For both excitations, porphyrin is excited in highly energetic vibrational levels and relaxes in a nonradiative way to the S_2 and then the S_1 level. From S_1 to S_0 , a radiative de-excitation leads to visible emission (1) and (2). The right part of the Figure represents the transfer between $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ and porphyrin. Under a 300 nm radiation, Tb is excited from $4f^8$ to $4f^7-5d^1$ band. It relaxes nonradiatively to the $^5\text{D}_4$ level. From this level, Tb can either relax radiatively, emitting visible light (3), or transfer energy to porphyrin, leading to a red emission (4).

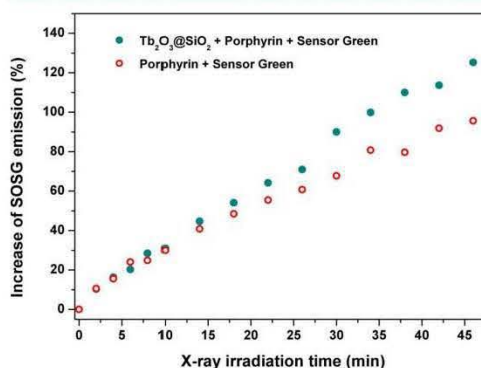


Figure 7. Evolution of the probe emission intensity measured under a 490 nm diode excitation as a function of the X-ray absorbed dose. To point out the NP effect, the measurements were performed on $\text{Tb}_2\text{O}_3@/\text{SiO}_2$ NPs grafted with porphyrin + SOSG, and free porphyrin in solution + SOSG.

the solution of porphyrin mixed with APF, the increase in the signal is due to radiosensitization effect of porphyrin. We performed some measurements without X-ray irradiation, and the signal did in fact not increase significantly. These results indicate that porphyrin itself acts as a radiosensitizer as well. Other PSs acting as radiosensitizers were already reported.^{31–34} Besides the radiosensitization property of the porphyrin, the increase in the SOSG emission is significantly stronger when porphyrins are grafted on NPs. To corroborate these results, we performed similar experiments with APF. Emission spectra are presented on the Figure 8. Each spectrum was again normalized to the porphyrin emission to overcome the slightly random

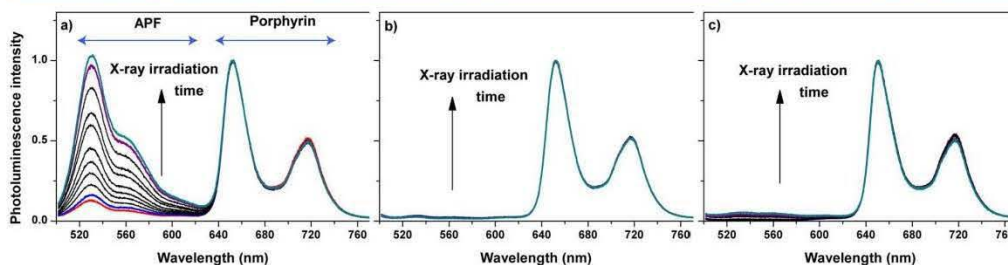


Figure 8. Emission spectra measured under a 490 nm diode excitation after increasing X-ray irradiation time. For each spectrum, the red curve corresponds to a measure recorded before irradiation and the blue curve corresponds to measurements performed after 2 min of X-ray irradiation. The purple and dark cyan curves correspond to measurements recorded after 26 and 30 min of X-ray irradiation, respectively. The measurements were performed on several samples: (a) $\text{Tb}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ NPs grafted with porphyrin + APF, (b) $\text{Tb}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ NPs grafted with porphyrin + APF + NaN_3 , and (c) porphyrin + APF.

intensity fluctuations from one measurement to the next. The sample containing NPs grafted with porphyrin (Figure 8a) is clearly more efficient for generating a species likely to oxidize APF under X-ray irradiation than the sample with porphyrin in solution (Figure 8c). Although the increase is very weak for porphyrin in solution, it is not zero, which corroborates the previous results: porphyrin also acts as a radiosensitizer. To differentiate between OH^\bullet and $^1\text{O}_2$ for NPs grafted with porphyrin, the same experiments were performed with an excess of NaN_3 , and the spectra are presented in Figure 8b. The probe luminescence is completely quenched in comparison with the sample without NaN_3 . This leads us to conclude that the enhancement of the probe emission is due to singlet oxygen. This is in good agreement with the Φ_Δ value that was evaluated for grafted porphyrin ($\Phi_\Delta = 0.78$). Results obtained with both probes, SOSG and APF, corroborate a generation of singlet oxygen under X-ray irradiation for the system scintillating NPs grafted with porphyrin.

CONCLUSIONS

We have presented a biocompatible nanohybrid system including a nanoscintillator (Tb_2O_3) and a PS (porphyrin). The energy transfer between the nanoscintillator and the porphyrin was demonstrated under UV excitation, and the generation of singlet oxygen under penetrating radiation such as X-rays was pointed out. Combining the effects of PDT and probably radiosensitization, this system can be considered as a good candidate for a significant improvement of radiotherapy efficiency.

EXPERIMENTAL SECTION

Photosensitizer Synthesis. *Synthesis of 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl Porphyrin.* In a round-bottomed flask isolated from light and under an inert atmosphere, 4-carboxybenzaldehyde (238 mg, 2.5 mmol) and freshly distilled pyrrole (0.69 mL, 10 mmol) and benzaldehyde (0.78 mL, 7.5 mmol) were dissolved in 700 mL of dichloromethane and stirred for 15 min. Trifluoroborate etherate ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, 185 μL) was then added and the solution was stirred another 2 h. Then *p*-chloranil (1.845 g, 7.5 mmol) was added and the solution was stirred 2 h at dichloromethane reflux. The solution was filtered off on silica, and the crude mixture was purified by Armen SPOT Prep system (high pressure, preparative liquid chromatography) on a Si60 EcoPack Basic D44 (40–63 μm , 150 \times 40 mm) column

using a gradient (dichloromethane/ethanol [0:100 to 50:50] over 35 min), monitored by a FLASH 06 DAD ($\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm) detector, to give 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin 1 (115 mg; 0.175 mmol; 7%) as a purple solid ($R_f = 0.4$ (dichloromethane/ethanol [97:3])). (1): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ -2.61 (s, 2 H); 7.72 (s, 9 H); 8.21 (m, 6 H); 8.37 (d, 4 H, $J = 8.2$ Hz); 8.80 (m, 8 H). MS (ESI) m/z calculated 658.7, found 659.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthesis of 5-(4-Carboxyphenyl succinimide ester)-10,15,20-triphenyl Porphyrin. In a round-bottomed flask isolated from light and under an inert atmosphere, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl porphyrin (70 mg; 0.11 mmol), dicyclohexylcarbodiimide (24.7 mg; 0.12 mmol), and *N*-hydroxysuccinimide (13.8 mg; 0.12 mmol) were dissolved in 10 mL of dichloromethane and stirred at room temperature for 4 h. The crude mixture was concentrated and purified by column chromatography (dichloromethane/ethanol [97:3]) to give a red solid ($R_f = 0.9$; 65 mg; 0.086 mmol; 78%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ -2.61 (s, 2 H); 2.93 (s, 4 H); 4.10 (s, 4 H); 7.63 (s, 9 H); 8.01 (s, 6 H); 8.34 (m, 4 H); 8.42 (m, 6 H). MS (ESI) m/z calculated 759.8, found 760.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$\text{Tb}_2\text{O}_3@\text{SiO}_2$ NPs Synthesis. To prepare the terbium oxide core, we prepared a solution by dissolving 1.12 g of $[\text{TbCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ in 100 mL of DEG at room temperature. This led to a terbium concentration of 30 mM. A second solution was prepared by adding 0.99 mL of a NaOH aqueous solution (10 M) in 100 mL of DEG. This corresponds to a 110% excess of NaOH compared with the lanthanide. The second solution was progressively added to the first one, at room temperature, for 24 h. A transparent colloid of terbium oxide NPs in DEG was obtained. The terbium concentration of the colloidal solution was 15 mM. Polysiloxane shells were grown around the terbium cores, by a sol-gel route, using two silane precursors: APTES and TEOS in a 60/40 molar ratio. The reaction was performed in DEG at 40 $^\circ\text{C}$ by several consecutive additions of APTES and TEOS and was catalyzed by TEA. 210 μL of APTES and 134 μL of TEOS were added to the 200 mL of terbium oxide solution under stirring at 40 $^\circ\text{C}$. After 1 h, 510 μL of a DEG solution (0.1 M of triethylamine, 10 M of water) was added. The whole coating procedure was repeated three more times, every 24 h. The final mixture was stirred for 48 h at 40 $^\circ\text{C}$. The obtained solutions could be stored at room temperature for weeks without alteration.

■ ASSOCIATED CONTENT**■ Supporting Information**

Details of PCS size measurements, transmission electron microscopy, porphyrin photophysical properties; vis-UV absorption spectra, fluorescence decay curves, time-resolved spectroscopy, fluorescence and scintillation spectra, short time emission spectra, time-resolved spectroscopy measurements, sample preparation, and measurements. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION**Corresponding Author**

*E-mail: christophe.dujardin@univ-lyon1.fr.

Author Contributions

¹A.-L.B. and C.T. contributed equally to this paper

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The "Agence Nationale de la Recherche" (ANR) is thanked for its support of the PDTX program (ANR-10-NANO-0009).

■ REFERENCES

- (1) Dougherty, T.; Gomer, C.; Henderson, B.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905.
- (2) MacDonald, L.; Dougherty, T. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105–129.
- (3) Weishaupt, K.; Gomer, C.; Dougherty, T. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326–2329.
- (4) Mitchell, J.; McPherson, S.; Degraff, W.; Gamson, J.; Zabell, A.; Russo, A. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 2008–2011.
- (5) DeRosa, M.; Crutchley, R. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233*, 351–371.
- (6) Hasan, T.; Ortel, B.; Moor, A.; Pogue, B. In *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th ed.; BC Decker: London, 2003; Chapter 40, pp 605–622.
- (7) Ran, C.; Zhang, Z.; Hooker, J.; Moore, A. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14*, 156–162.
- (8) Park, Y. L.; et al. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5755–61.
- (9) Chen, W.; Zhang, J. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 1159–1166.
- (10) Dujardin, C.; Amans, D.; Belsky, A.; Chaput, F.; Ledoux, G.; Pillonnet, A. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **2010**, *57*, 1348–1354.
- (11) Barta, J.; Cuba, V.; Pospisil, M.; Jary, V.; Nikl, M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 16590–16597.
- (12) Liu, Y.; Chen, W.; Wang, S.; Joly, A. G. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*.
- (13) Samia, A.; Dayal, S.; Burda, C. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 617–625.
- (14) Juzenas, P.; Chen, W.; Sun, Y. P.; Neto Coelho, M. A.; Generalov, R.; Generalova, N.; Christensen, I. L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1600–1614.
- (15) Agostinis, P.; et al. *Ca-Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250–281.
- (16) Mutelet, B.; Perriat, P.; Ledoux, G.; Amans, D.; Lux, F.; Tillement, O.; Billotey, C.; Janier, M.; Villiers, C.; Bazzi, R.; Roux, S.; Lu, G.; Gong, Q.; Martini, M. *J. Appl. Phys.* **2011**, *110*.
- (17) Flores-Gonzalez, M.; Ledoux, G.; Roux, S.; Lebbou, K.; Perriat, P.; Tillement, O. *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 989–997.
- (18) Whitlock, H.; Hanauer, R.; Oester, M.; Bower, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7485–8.
- (19) Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Muller, A.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Viriot, M.; Barberi-Heyob, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1111–1122.
- (20) Louis, C.; Bazzi, R.; Marquette, C.; Bridot, J.; Roux, S.; Ledoux, G.; Mercier, B.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1673–1682.
- (21) Faure, A. C.; Dufort, S.; Josserand, V.; Perriat, P.; Coll, J. L.; Roux, S.; Tillement, O. *Small* **2009**, *5*, 2565–2575.
- (22) Bridot, J. L.; Faure, A. C.; Laurent, S.; Riviere, C.; Billotey, C.; Hiba, B.; Janier, M.; Josserand, V.; Coll, J. L.; Vander Elst, L.; Muller, R.; Roux, S.; Perriat, P.; Tillement, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5076–5084.
- (23) Engstrom, M.; Klasson, A.; Pedersen, H.; Vahlberg, C.; Kall, P. O.; Uvdal, K. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2006**, *19*, 180–186.
- (24) Benachour, H.; Bastogne, T.; Toussaint, M.; Chemli, Y.; Seve, A.; Frochot, C.; Lux, F.; Tillement, O.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyrob, M. *Theranostics* **2012**, *2*, 889–904.
- (25) Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyrob, M.; Faure, A. C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 995–1009.
- (26) Niedre, M.; Patterson, M.; Wilson, B. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 382–391.
- (27) Blasse, G.; Dirksen, G.; Meyerink, A.; Terrell, D.; Neyens, L. *Mater. Chem. Phys.* **1988**, *19*, 547–556.
- (28) Forster, T. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- (29) Flors, C.; Fryer, M. J.; Waring, J.; Reeder, B.; Bechtold, U.; Mullineaux, P. M.; Nonell, S.; Wilson, M. T.; Baker, N. R. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1725–1734.
- (30) Price, M.; Reiners, J. J.; Santiago, A. M.; Kessel, D. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1177–1181.
- (31) Daida, H.; et al. *J. Atheroscler. Thromb.* **2009**, *16*, 799–806.
- (32) Berg, K.; Luksiene, Z.; Moan, J.; Ma, L. *Radiat. Res.* **1995**, *142*, 340–346.
- (33) Kokotov, S.; Lewis, A.; Neumann, R.; Amrusi, S. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 385–387.
- (34) Luksiene, Z.; Kalvelyte, A.; Supino, R. *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *52*, 35–42.
- (35) Seybold, P.; Gouterma, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1969**, *31*, 1–13.
- (36) Redmond, R.; Gamlin, J. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391–475.

III- Synthèse de nouvelles nanoparticules $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ excitables par rayons X

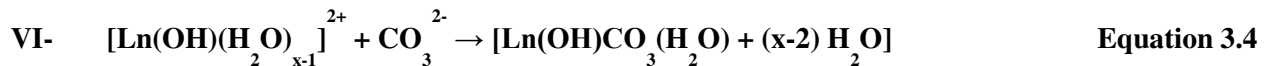
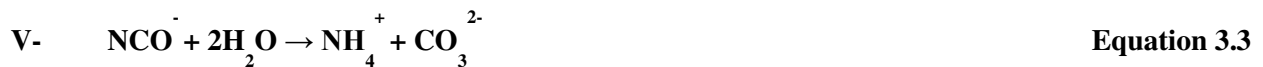
Les modes opératoires et les détails de synthèse sont donnés dans la publication en cours d'écriture qui clôture ce chapitre

La méthode de synthèse suivie est similaire à celle décrite par l'équipe de Matijevic (Matijevic, 1987), basée sur la synthèse d'oxydes de lanthanides par précipitation homogène d'hydroxycarbonates. Elle a été utilisée pour la première fois dans l'équipe du CEMES par Lechevallier pour la synthèse d'oxydes de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ de diamètre de 160 nm (Lechevallier, 2010). Elle a ensuite été améliorée par Osseni en 2013, notamment pour obtenir des nanoparticules de taille plus petite pour une application en imagerie médicale. Des nanoparticules de $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ d'un diamètre d'environ 70 nm ont été obtenues (Thèse de Osseni, 2013).

La synthèse des cœurs de nanoparticules est réalisée en 3 étapes : synthèse des hydroxycarbonates, synthèse des oxydes, synthèse des oxysulfures.

III-1. Synthèse $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ (5%)

Les hydroxycarbonates de gadolinium dopés à l'euporium (5%) sont obtenus par précipitation homogène en utilisant la décomposition en température de l'urée comme source d'ions carbonates. En effet, l'agent précipitant (l'urée), se décompose en formant des cyanates d'ammonium (équation (3.2)). Puis en solution neutre, les ions cyanates sont convertis en carbonates d'ammonium (équation (3.3)). Parallèlement, les nitrates de lanthanide sont lentement hydrolysés en milieu aqueux. On peut alors y observer la précipitation de l'hydroxycarbonate de gadolinium (équation (3.4)).



Le rôle de l'éthanol est de changer la polarité de la solution et ralentir la décomposition de l'urée, en empêchant ainsi une croissance rapide des particules et l'obtention de nanoparticules de petite taille. Au final un rendement de 5 à 80% molaire est atteint. Ce rendement est d'autant meilleur que les particules synthétisées présentent une taille importante. En effet, obtenir de petites nanoparticules nécessite d'arrêter la réaction en refroidissant rapidement le mélange réactionnel. Ainsi, pour des particules de 70 nm de diamètre synthétisée pour ce travail le rendement que nous obtenons est de 5 %.

La poudre d'hydroxycarbonates est ensuite transformée en oxyde $Gd_2O_3:Eu^{3+}$ par calcination à $900^\circ C$ sous air pendant 4 h, puis en oxysulfures pour donner au matériau une bande d'absorption large et efficace dans le proche UV ou par excitation X. Le produit obtenu présente une structure cristalline en feuillets, constitués d'une alternance de couches de terre rare et d'oxygène et de couches d'atomes de soufre (figure 93).

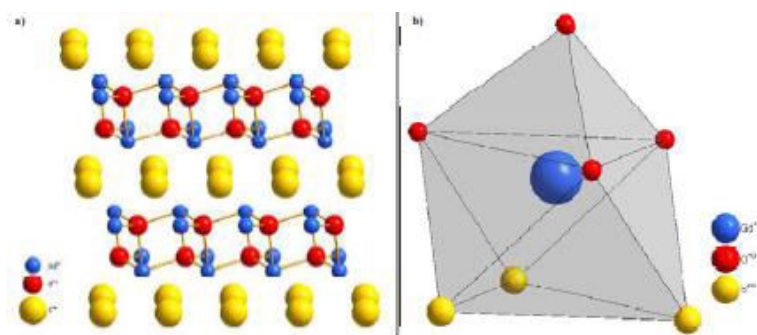


Figure 93 : représentation de : (a) la structure Gd_2O_2S et (b) des polyèdres de coordination présents dans cette structure.

III-2. Fonctionnalisation des nanoparticules de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$

La fonctionnalisation des nanoparticules obtenues est indispensable pour permettre le greffage des photosensibilisateurs et du surfactant PEG 250.

La modification de surfaces de NPs par des aminosilanes a beaucoup été étudiée en raison des nombreuses possibilités de conjugaison de biomolécules qu'elle permet. Les groupes hydroxyles présents sur la surface des particules réagissent avec les groupements hydroxyles de l'aminosilane pour former des liaisons éther covalentes. La silanisation peut être réalisée dans différents solvants tels que l'éthanol, le mélange méthanol/eau, le toluène, le DMF à température ambiante ou à des températures plus élevées.

Nous avons réalisé une silanisation en milieu organique anhydre en n'utilisant que le DETA (*N*-(3-Triméthoxysilylpropyl) diéthylènetriamine) dont la formule est représentée dans la figure 94 qui contient 2 amines secondaires de plus que l'APTES classiquement utilisé et augmente donc la charge positive en surface des nanoparticules, ce qui améliore sensiblement leur dispersion en milieu aqueux.

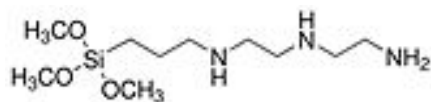


Figure 94 : N-(3-Triméthoxysilylpropyl) diéthylènetriamine).

Estimation du nombres de fonctions amine libres

Le nombre d'amines libres accessibles pour le greffage ultérieur du PS et du PEG est estimé en utilisant un chloroformiate, le Fmoc-Cl, utilisé en synthèse organique pour introduire des groupes protecteurs Fmoc sur les amines (Carpino L.A. et al., 1972). Ce composé absorbe en UV à 301 nm, il est donc possible de le doser par absorbance.

III-3. Pegylation des nanoparticules Gd₂O₃:Eu³⁺-DETA

Le recouvrement de nanoparticules par du polyéthylèneglycol dicarboxylique HOOC-PEG₂₅₀-COOH permet d'obtenir une couche protectrice limitant les phénomènes d'agrégation des nanoparticules. Les molécules de PEG sont également très utilisées pour limiter *in vivo* la capture des NPs par le système réticulo-endothéliale (Young et al., 2009). Il permettra également avec sa terminaison COOH de coupler un peptide pour un éventuel ciblage thérapeutique.

III-4. Couplage du photosensibilisateur sur les nanoparticules Gd₂O₃:Eu³⁺-DETA-PEG250

De la même manière que le PEG₂₅₀, les PS sont greffés sur la surface des nanoparticules par liaison peptidique entre les fonctions COOH des PS et les fonctions NH₂ des NPs.

Les photosensibilisateurs sont quantifiés grâce à un étalonnage par spectroscopie de fluorescence.

III.5. Caractérisation des nanoparticules Gd₂O₃:Eu³⁺-DETA-PEG250

Les NPs ont été caractérisées par Microscopie Electronique à Transmission (MET), Diffraction aux Rayons X (DRX), Méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET), Infrarouge (IR) et potentiel zêta.

Des caractérisations photophysiques avant et après greffage sont également réalisées. Une étude photophysique par spectroscopie en temps résolu est également réalisée afin d'essayer de mettre en évidence le transfert entre l'euporium présent dans la nanoparticule et le PS.

La publication suivante, décrit les modes opératoires et les détails de synthèse, elle est en cours de rédaction.

Photosensitizer-conjugated lanthanide nanoparticles for photodynamic therapy by X-ray excitation

Rima Chouikrat^{a,b}, Francis Baros^{a,b}, Jean-Claude André^{a,b}, Régis Vanderesse^{c,d}, Bruno Viana^e, Anne-Laure Bulin^f, Philippe Arnoux^{a,b}, Marc Verelst^g, Céline Frochot^{a,b,*}

^a Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy 54000, France ; ^b CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, Nancy 54000, France ; ^c Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR CNRS 7375 Nancy 54000, France ; ^d CNRS, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR CNRS 7375, Nancy 54000, France ; ^e IRCP Chimie ParisTech, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France ; ^f Institut Lumière Matière, UMR5306, Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 10 rue Ada Byron, 69622 Villeurbanne cedex, France ; ^g Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales, Université de Toulouse - UPS, 29 rue Jeanne Marvig, BP 94347, 31055 Toulouse, Cedex 4, France.

Abstract: We report the design of europium doped gadolinium oxysulfide nanoparticles $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ that could be excited by X-ray for photodynamic therapy applications. A layer of *N*-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamine (DETA) allowed the covalent grafting of two different photosensitizers a zinc chlorin (ZnTPC) and a Zinc phthalocyanine (ZnPc). The synthesized monodispersed nanoparticles of ~70 nm of diameter were pegylated to be stable in aqueous suspension. The grafted photosensitizers retained their photophysical properties and could generate cytotoxic singlet oxygen upon photo-irradiation. Nevertheless, no energy transfer could be observed between the core of the nanoparticles and the photosensitizer after photo-irradiation or X-rays irradiation of the nanoparticles.

Keywords: Photodynamic therapy, nanoparticles, $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$, photosensitizer, X-Rays, energy transfer

1. INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive treatment approach that is used to treat several diseases cancers. PDT is based on the activation by light of photosensitive molecules, called photosensitizers (PS), which are non-toxic in the dark. After light excitation and in the presence of oxygen, the photosensitizers generate reactive oxygen species (ROS) including singlet oxygen, which lead to photo-oxidation reactions and cell death. PDT causes both apoptotic and necrotic responses within treated tumors and produces microvascular injury leading to inflammation and hypoxia [1]

Light penetration depends on its wavelength but cannot be higher than few millimeters. In order to treat deep tumors, another concept emerged with excitation by X-rays instead of light. Advances in nanobiotechnology have improved the prospects of treatment delivery to tumours. NPs, as vectors, are able to overcome some of the problems experienced with conventional methods. The use of the Cherenkov light emitted by radioactive tracers is already applied in medical imaging as an internal light source [2-4]. Due to their high penetration depth power, X-rays can be employed in PDT. Some PSs have already been proved to be activated under X-ray irradiation such as hematoporphyrine derivative [5, 6],

PpIX [7, 8] and 5-ALA [9], Photofrin II [10, 11], HPde [12]. On the contrary, others molecules described to be photosensitizers such as indocyanine green [13] and psoralen [14] are not radiosensitive.

A novel therapeutic strategy that can combine both the principles of PDT and radiation therapy with nanoparticles has been described by few authors and Chen and Zhang were the pioneers in this field [15]. They described the synthesis of $LaF_3:Tb^{3+}$ -meso-tetra(*p*-carboxyphenyl)porphyrin NP conjugates and investigated the energy transfer as well as the formation of singlet oxygen following X-ray irradiation. The same team elaborated also ZnO-meso-tetra(*o*-aminophenyl)porphyrin conjugates in which the energy transfer was almost 90%. Scaffidi et al. described Y_2O_3 nanoscintillator, a fragment of HIV-1 TAT peptide and psoralen. They used commercially available 12 nm diameter cubic-phase Y_2O_3 nanoscintillators on which they coupled TAT or psoralen-TAT [16]. They could observe a modest *in vitro* reduction in PC-3 human prostate cancer cell number after X-ray excitation. Abliz et al. described the excitation of photofrin II into gadolinium oxysulfide particles (20 micron dimension) doped with terbium $Gd_2O_2S:Tb^{3+}$ [17]. According to this concept, persistent luminescent nanoparticles with grafted photosensitizers excited by

ionizing radiation X-ray light can emit luminescence able to activate the photosensitizers; as a consequence, $^1\text{O}_2$ is produced which will strengthen the radio effect [18-20]. Zou et al. showed that $\text{LaF}_3:\text{Ce}^{3+}/\text{DMSO}/\text{PPIX}/\text{PLGA}$ microsphere can be excited by X-rays and destroy prostate cancer cells. The encapsulation into PLGA allows a good energy transfer between the NPs and PPIX [21]. The idea is that the synergetic effect of conventional radiation therapy with PDT will enable the use of lower doses of radiation for the same efficiency. Our team recently published [22] the design of Tb_2O_3 core nanoparticles coated with a polysiloxane layer in which is grafted a porphyrin. The average size of the Tb_2O_3 core-shell NPs grafted with porphyrin measured by photon correlation spectroscopy was about 10 nm. Using time-resolved laser spectroscopy and singlet oxygen chemical probes, we demonstrated that after X-ray irradiation of the nanoobjects we could observe the formation of singlet oxygen as well as a decrease of the luminescence of the core and the increase of the fluorescence of the porphyrin, proving the energy transfer between the core and the photosensitizer. We also wrote a review concerning the key parameters for radiation therapy enhancement using nanoparticles [23].

This work aims at developing other types of luminescent nanoparticles excitable by X-rays for PDT applications without external visible light. To serve as PDT agents, scintillating nanoparticles selected for photosensitizer enhancement need the following requirements: (1) the scintillating nanoparticle should strongly absorb X-rays and must produce luminescence as a result of excitation by radiation the nanoparticle; (2) emission spectrum must overlap the photosensitizer's absorption spectrum, guarantying an efficient activation of the photosensitizer and thus a high production of $^1\text{O}_2$; (3) the distance between the nanoparticle's core and the photosensitizer compatible for an efficient energy transfer.

We develop new nanoplatfoms, based on $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ nano-core. It has been proved already that these oxysulfure NPs are scintillator which strongly absorbs X-ray and re-emits red light with a high quantum yield [24, 25]. Another advantage of gadolinium NPs is the high content of Gd^{3+} ions which is well-known to be a strong contrast agent for MRI [26, 27]. We describe the synthesis of these nanoparticles as well as their physico-chemical and photophysical properties of the photosensitizers grafted to the nanoparticles compared to the one of the photosensitizer in solution. We report an evaluation of energy transfer between the oxysulfure core.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials

Reagents and solvents were commercially available and used as supplied without further purification unless otherwise stated. Europium and gadolinium nitrates (99.99%) were stock solutions from Rhodia. Urea (98%) was purchased from Sigma Aldrich. *N*-(3-

Trimethoxysilylpropyl) diethylenetriamine (DETA) (99%), triethylamine (TEA), piperidine PEG-250 (bis carboxylate-terminated poly(ethylene glycol)250), ethanol, ($\geq 99.5\%$) and DMF were also purchased from Sigma Aldrich. HBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate) was purchased from Iris Biotech GmbH and Fmoc-Cl from Novabiochem.

2.2. Synthesis of the nanoparticles

2.2.1. Synthesis of the precursors: hydroxycarbonates

Europium-doped gadolinium hydroxycarbonates were synthesized as previously described [25, 27]. Briefly, gadolinium hydroxycarbonates were synthesized from nitrate precursors in water and ethanol, following a procedure based on urea decomposition at temperature above 80°C . The optimum concentrations determined in this work were $[\text{Gd}^{3+}] = 5.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ and 0.5 M for urea. Europium doping concentration expressed in $[\text{Eu}]/([\text{Gd}] + [\text{Eu}])$ (mol%) was 5. We used a mixture of 80% water and 20% ethanol. Gadolinium, europium nitrates and urea were dissolved in the mixture, the solution was placed in a big beaker and stirred at 85°C until it became slightly opalescent, indicating that the size of particles is close to $70 \approx 80$ nanometers (It is the size where nanoparticles begin to diffuse light). We centrifuged the suspension for 30 min at 4500 rpm. After removing the supernatant, the solid was re-suspended phase in water, washed 3 times with water and dried in an oven at 80°C overnight.

2.2.2. Synthesis of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ nanoparticles

Monodisperse $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs were synthesized according to a procedure reported in previous papers [25, 27]. The sulfuration of hydroxycarbonates was carried out by solid-gas reaction. The dried europium-doped gadolinium hydroxycarbonates were kept into a quartz tube at 750°C under an $\text{Ar}-\text{H}_2\text{S}$ atmosphere (83:17 v:v) 90 min later we stopped the H_2S gas flow to replace it by an argon flow. The nanoparticles were annealed at 850°C for 4 h and then cooled to room temperature

2.2.3. Surface modification of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ nanoparticles

200 mg of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs (0.53 mmol of Gd) were dispersed in 237 mL of dimethylformamide (DMF) and sonicated for 1 h. 100 μL (0.39 mmol) of *N*-(3-Trimethoxysilylpropyl)diethylenetriamine (DETA) was added to the suspension and the stirred for 12 h at room temperature. 3 centrifugations were performed to eliminate the excess of APTES. The final nanoparticles were dispersed in DMF for the following use. The quantity of primary amines on the surface of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -APTES or $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs was estimated using a standard Fmoc UV assay. Briefly, 15 mg $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs were suspended in 30 mL of anhydrous DMF and sonicated for more than 30 min. 54 mg (0.2 mmol) of Fmoc-Cl were added and reacted for 12 h under N_2 at RT. The particles were centrifuged and washed with DMF several times. 2.5 mL of piperidine was added to release the Fmoc. After

sonicating for 20 min, the cleavage mixture was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The quantity of primary amino groups was measured by measuring the UV absorbance of the supernatant Fmoc solution at 300 nm, at which wavelength the extinction coefficient of Fmoc is $7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ [28].

2.2.4. Pegylation of the hybrid $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -APTES nanoparticles

150 mg of hybrid $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs were dispersed in DMF and sonicated for 1h. The grafting of PEG250 *via* its carboxylic function was achieved by using PEG 250 ($5.03 \cdot 10^{-4}$ mmoles, 0.125 mg, 0.25 PEG/ NH_2), activated by HBTU (0.5 mg, 10^{-3} mmol) and triethylamine (10 μL , $2 \cdot 10^{-4}$ mmol) The mixture was stirred overnight at room temperature. The pegylated $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 were washed with DMF several times to remove the excess of reactant. The final hybrid $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 NPs were dispersed in DMF for the following use.

2.2.5. Grafting of the photosensitizers

Zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (ZnTPC) was synthesized as described by our group [29]. Zinc-phthalocyanin was synthesized as described by Kliesch *et al.* [30]. 100 mg of hybrid $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 NPs were dispersed in DMF and sonicated for 1 h. The suspension was mixed with 5 mg of ZnTPC ($6.9 \cdot 10^{-3}$ mmol) or 5 mg of ZnPc ($6.9 \cdot 10^{-3}$ mmol). The COOH of photosensitizers was activated using 4 mg of HBTU ($1.03 \cdot 10^{-2}$ mmol) and 15 μL of triethylamine ($3 \cdot 10^{-4}$ mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. The multifunctional $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC were washed several times with DMF to remove the excess of free photosensitizer.

2.3. Technical characterization

Particles shape and size were examined *via* Transmission Electron Microscopy (TEM) using Philips Model CM20 and CM30 microscopes. The X-ray diffraction XRD pattern of the powder was collected on an XRD 300TT SEIFERT diffractometer using Cu-K α radiation with a curved graphite monochromator. The samples were scanned in a $\theta / 2\theta$ geometry. The Zeta potentials of NPs dispersed in deionized water (pH=6.9) were measured using a Zetasizer NanoZ (Malvern Instrument) equipped with laser He-Ne (633 nm) or green laser (532 nm). The NPs were dispersed at a concentration of 0.1 mg/mL in 20 mM NaCl. Specific surface area (SSA) of the dry powder of nanoparticles was determined from N_2 adsorption isotherm at -196°C using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) theory. Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker Tensor 27 over 256 scans.

Absorption spectra were recorded on a UV-3600 Shimadzu spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermo-stated cell compartment (25°C), using a 450 W Xenon lamp. 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 a tetraphenyl porphyrin solution as a fluorescence standard ($\Phi_f = 0.11$, in toluene, taking into account solvent refractive index and absorption efficiencies) [31]. For the direct determination of singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ): excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a SPEX 1680, 0.22 μm double monochromator. The detection at 1270 nm was carried out through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific Co, OH, USA). Rose Bengal was chosen as a reference solution due to its high $^1\text{O}_2$ quantum yield in EtOH ($\Phi_\Delta = 0.68$) [32]. The absorbance value at the excitation wavelength (422 nm, 668 nm) of both the reference (Rose Bengal) and the sample solutions (ZnTPC, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC NPs, ZnPc, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc) were set to approximately 0.2 by dilution.

The quantum yield of fluorescence is determined thanks to equation (1):

$$\phi_f = \phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \quad (1)$$

where Φ_f and Φ_{f_0} , I_f and I_{f_0} , DO and DO_0 , n and n_0 are the quantum yields, the intensities, the optical densities and the refraction indices of the sample and of the reference respectively.

The quantum yield of singlet oxygen production is determined thanks to equation (2):

$$\phi_\Delta = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO} \quad (2)$$

where Φ_Δ and Φ_{Δ_0} , I and I_0 , DO and DO_0 are the luminescence quantum yields of singlet oxygen, the luminescence intensities, the optical densities of the sample and of the reference respectively.

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 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-Marquand algorithm. Phosphorescence lifetime measurements have been performed on a Fluorolog FL3-22 spectrofluorimeter (HORIBA Jobin Yvon, LONGJUMEAU, France) equipped with 450 W Xenon lamp, a xenon flash lamp, a thermo-stated cell compartment (25°C) and a UV-visible photomultiplier R928 (HAMAMATSU Japon). The system was monitored by a single photon counting controller FluoroHub-B. The software FluorEssence (HORIBA Jobin Yvon) was employed for emission spectra; the software DataStation and DAS6 (HORIBA Jobin Yvon) were employed for phosphorescence lifetime measurements. Time resolved spectroscopy measurements were recorded under pulsed laser excitation (OPO laser, EKSPLA NT342, repetition rate: 10 Hz, pulse duration: 7 ns, laser power: 4.8 mW at 226 nm and 4.5 mW at 300 nm) and the spectra were recorded using a Instaspec V i-CCD (OrieldH520L) mounted on a monochromator (grating 400 lines/mm blazed at 350nm).

The X-ray excitation was performed using a Diffractis 601 X-ray generator from accelerated electrons (20mA-40kV) bombarding molybdenum anode.

3. RESULTS

3.1. Characterization of the nanoparticles

The goals of this study were to synthesize, characterize and evaluate the potential of multifunctional NPs to induce a photodynamic reaction after X-rays excitation. The concept is to use the scintillator included in the nanoparticle's core which, excited by X-rays, can emit photons, which, in turn, can be re-absorbed by the photosensitizer itself conjugated to the nanoparticles. Therefore, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc nanoparticles were designed. NPs have been synthesized following several steps: 1) Nanoparticles synthesis; 2) Photosensitizer synthesis; 3) surface modification of the nanoparticles; 4) Photosensitizer coupling to the modified surface nanoparticles.

Quasi-monodisperse $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs were synthesized according to the procedure reported by Osseni et al. [26]. Transmission electron microscopy (TEM) of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs revealed that the nanoparticles are spherical and monodispersed with a mean diameter of 70 nm (Fig. 1).

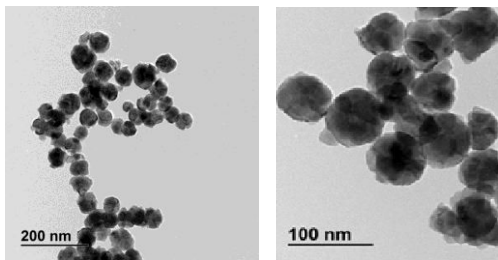


Fig. (1). TEM images of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs

As shown in Fig. 2, the diffraction patterns of the powder exhibit well-developed peaks, which are characteristic of gadolinium oxysulfide. All peaks are indexed following the ICDD data in the hexagonal phase, of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$ (File card n° 26-1422). No extra peak coming from any impurity could be detected.

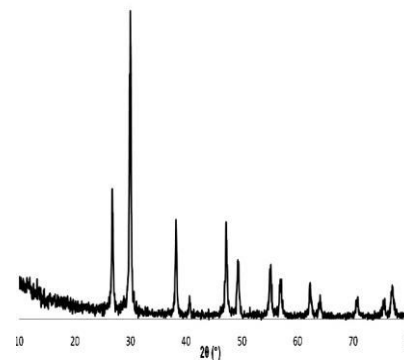


Fig. (2). XRD patterns of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs

The N_2 adsorption/desorption isotherms of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ are shown in Fig. 3. The $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs exhibit typical II-typed isotherms, which suggests a typical non-porous or macroporous material. The BET surface area of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ is $19.1 \text{ m}^2/\text{g}$, a value that is characteristic of non-porous or macroporous samples.

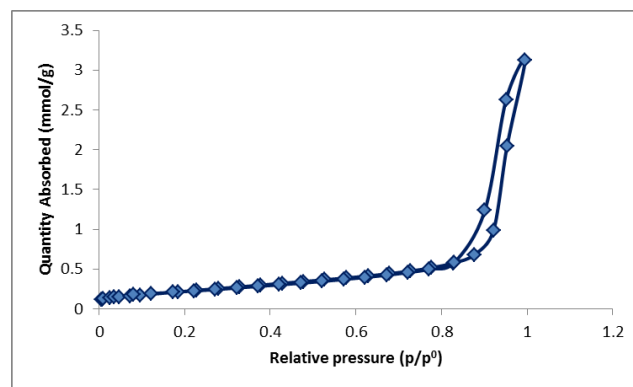


Fig. (3). BET surface volume of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs

The $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs reacted with DETA. The ζ -potential for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs at pH 6.9 is +44 mV, indicating the positively charged amine groups on the surface of NPs resulting of the presence of free amino groups at the surface (Fig. 4).

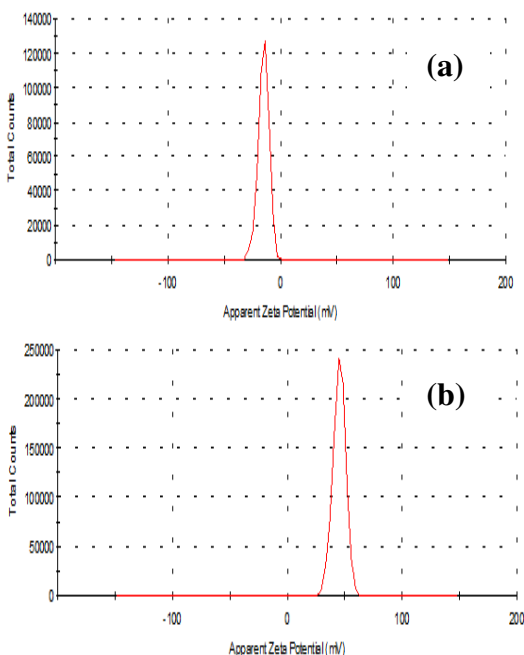


Fig. (4). ζ -potential of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs **(a)** and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs **(b)** (pH 6.9)

The successful amino-silanisation of the NPs of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs was also well-established by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum before and after surface modification as shown in figure 5. The FTIR spectra of the surface modified nanoparticles are shown along with unmodified oxysulfide. The spectra recorded on these coated samples exhibit one broad composite band centered at 1150 cm^{-1} and a narrower one at 800 cm^{-1} all coming from the vibrations of the Si-O-Si network. The shoulder observed at 980 cm^{-1} (Si-OH vibrations) can also be seen. Very weak features appear clearly in the ranges $2700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ and $1400\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs, due to the C-H vibrations of the aminosiloxane groups (Fig. 5).

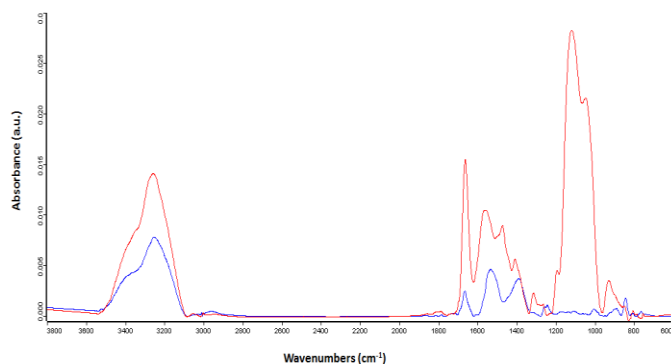


Fig. (5) FTIR spectra for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ NPs (blue) and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA NPs (red).

By means of a standard Fmoc quantification protocol, amino groups on the surfaces of NPs were approximately estimated to be $4 \times 10^{-5}\text{ mol/g}$ for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA, corresponding to 10 500 conjugated primary amine per particle (2.08 amine/nm^2).

Pegylation of nanoparticles was performed using classical coupling agent HBTU with triethylamine. In order to assess if PEGylation of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 was successful, potential zeta measurement for NPs before and after PEGylation were performed. The ζ -potential of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA is +44 mV whereas it is +30 mV for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 (pH 6.9), indicating the presence of PEG250 at the surface (Fig. 6). Thanks to the standard Fmoc quantification protocol we could evaluate the number of free amine ($10\ 500/\text{NP}$). We decide to couple 2650 PEG250 to the 10500 amine (25%). That is the reason why, even if the ζ -potential of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 is lower than that of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA, it is still positive.

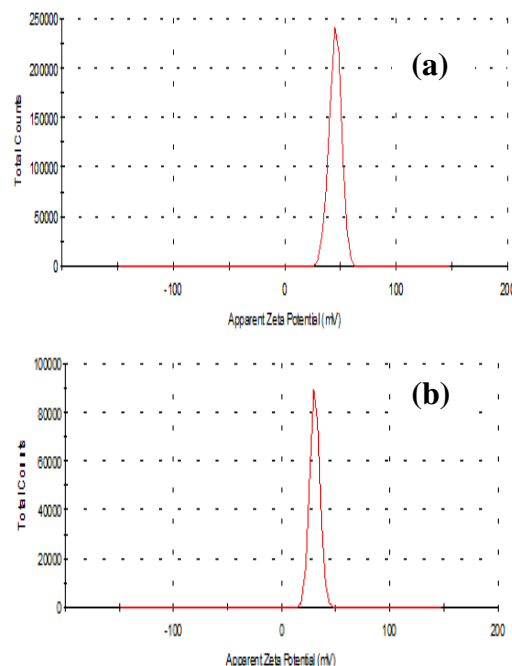


Fig. (6). ζ -potential of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA **(a)** and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 NPs **(b)** (pH 6.9)

The functionalization of the $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 NPs with photosensitizers was rendered possible thanks to the free amine function of DETA. The photosensitizers (ZnTPC or ZnPc) were conjugated to DETA with HBTU and triethylamine. In order to check if the photosensitizers were grafted and to evaluate the number of coupled photosensitizers, absorption and fluorescence spectra were recorded. As shown in Fig. 7, the absorption spectra of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc revealed the presence of photosensitizers. No significant change in the absorption

spectra could be observed between free photosensitizers and grafted ZnTPC or ZnPc. Indeed, UV-visible spectra remained unchanged with a maximum corresponding to the band at 422 nm for ZnTPC or 668 nm for ZnPc in ethanol.

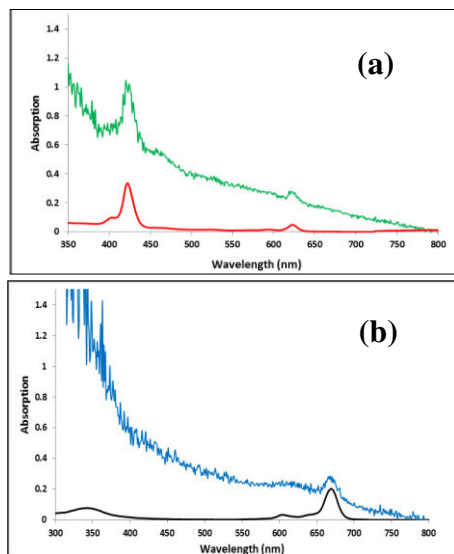


Figure 7: (a) UV-visible spectra of free ZnTPC (red) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnTPC (green) (b) UV-visible spectra of free ZnPc (black) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc (blue) in ethanol

To evaluate the number of photosensitizers grafted onto the nanoparticles, we used the fluorescence emission properties of the photosensitizers. A calibration curve of free photosensitizers allowed us to evaluate the number of grafted PSs. Fig. 8 present the fluorescence emission spectra of both free photosensitizers and both nanoparticles.

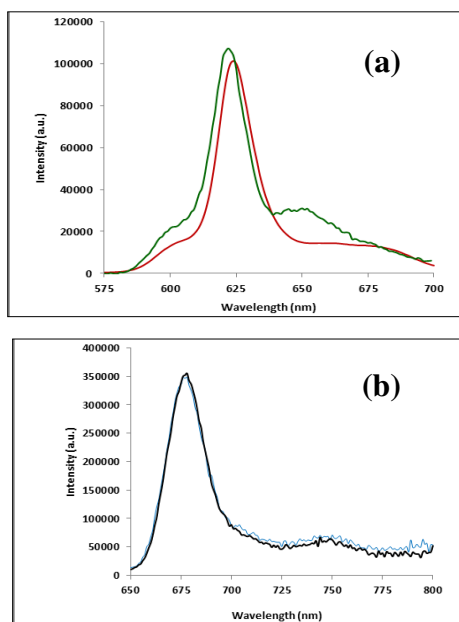


Fig. (8) (a) Fluorescence emission spectra of free ZnTPC (red) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnTPC (green) (λ_{exc}

= 422 nm) (b) Fluorescence emission spectra of free ZnPc (black) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc (blue) in ethanol (λ_{exc} = 345 nm).

No significant change in the emission spectra could be observed between free photosensitizers and grafted ZnTPC or ZnPc.

We evaluate that we coupled respectively 1100 ZnPc and 900 ZnTPC per nanoparticle of Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 instead of 7950 that should have been theoretically grafted.

Fluorescence lifetimes were evaluated and the fluorescence decays presented in Fig. 9. No difference could be observed between free photosensitizers and the ones coupled into the nanoparticles. We found 3.6 ns for free ZnPc and 3.3 ns for coupled ZnPc, 1.8 ns for free ZnTPC and 1.6 ns for coupled ZnTPC.

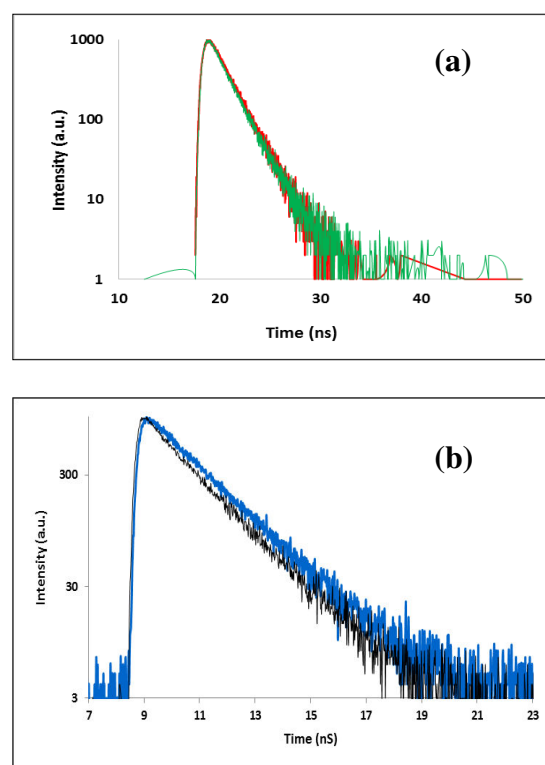


Fig. (9) (a) Fluorescence decay of free ZnTPC (red) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnTPC (green) (λ_{exc} = 405 nm) (b) Fluorescence decay of free ZnPc (black) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc (blue) in ethanol (λ_{exc} = 405 nm).

¹O₂ formation was evaluated after excitation of the photosensitizers and its emission recorded at 1270 nm. The ¹O₂ luminescence spectra are presented in Fig. 10.

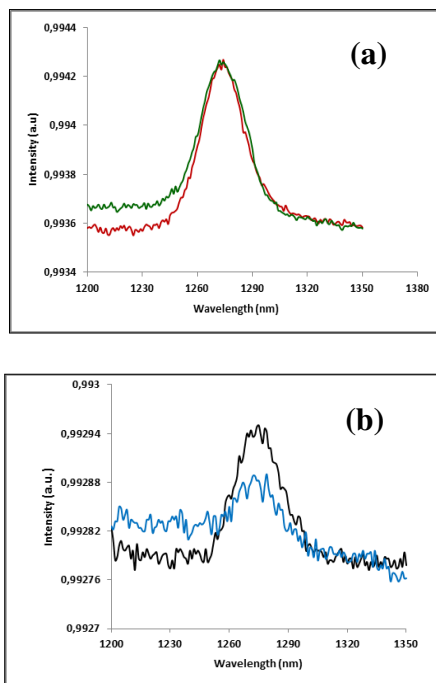


Figure 10: (a) $^1\text{O}_2$ luminescence spectra of free ZnTPC (red) and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC (green) ($\lambda_{\text{exc}} = 422$ nm) (b) Fluorescence decay of free ZnPc (black) and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc (blue) in ethanol ($\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm).

We evaluated the fluorescence and $^1\text{O}_2$ quantum yields reported in Table 1.

Table 1: fluorescence and $^1\text{O}_2$ quantum yields, fluorescence lifetime of PS and grafted PS.

compound	Φ_f	Φ_Δ	τ_ϕ
ZnTPC	0.20	0.75	1.8
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC	0.24	0.70	1.6
ZnPc	0.12	0.34	3.6
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc	0.12	0.14	3.3

The coupling of ZnTPC to the nanoparticles did not modify its photophysical properties (fluorescence and $^1\text{O}_2$ quantum yields). As illustrated in Table 1, fluorescence quantum yield and lifetime of free and coupled ZnTPC remain unchanged after functionalization, meaning that the nanoparticles does not influence the photophysical properties of ZnTPC. Similar observations were made concerning singlet oxygen production which was found to be not significantly changed 0.75 for free and 0.70 coupled ZnTPC. Concerning ZnPc, we could observe a decrease of $^1\text{O}_2$ quantum yield of ZnPc after coupling to NPs-PEG (0.34 for free ZnPc and 0.14 for

coupled ZnPc). This might be due to a too large amount of ZnPc grafted leading too a quenching of $^1\text{O}_2$ formation.

3.2. Study of the energy transfer by time-resolved spectroscopy

It is generally admitted that efficient energy transfer between two species may occur if a significant overlap exists between the emission of the donor and the absorption of the acceptor. The energy transfer can be either a Förster resonant energy transfer (FRET) or a radiative transfer. In order to estimate if energy transfer is possible between the core and the photosensitizers, and since emission processes in $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}$ -PEG and in ZnTPC or ZnPc exhibit different timing behaviors, we performed time-resolved spectroscopy under UV excitation to study the energy transfer. Experimental conditions such as exposure time, excitation and emission collection conditions, and laser power were kept identical for all measurements to ensure reliability of a fluorescence intensity comparison. Fluorescence emission of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG NPs ($\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm) is presented in Fig. 11.

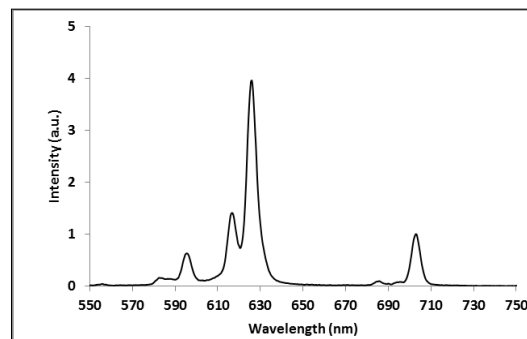


Fig. (11) Fluorescence emission of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 NPs ($\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm)

The emission spectrum was measured after excitation at 335 nm. Between 390 and 270 nm, the excitation is due to the charge transfer state $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$ centered at 350 nm. The spectrum corresponds to the well-known red emission consisting of the peak centered at 625 nm. We recorded the europium emission spectrum with a large time gate in agreement with the well-known millisecond fluorescence decay time of Eu^{3+} (0.5 ms). Both photosensitizers ZnTPC and ZnPc absorption spectra exhibit a Q1 peak around 625 nm (Fig. 8) that match with the emission spectrum of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG NPs. One supposes, therefore, a possible energy transfer between these two components.

Two kinds of time-resolved spectra were recorded: at “short times” and at “long times”. “Short times” means $t_0 = 0$ ns and $\Delta t = 100$ ns (where t_0 is the delay after the laser pulse and Δt is the time gate width) and “long times” corresponds to $t_0 = 500$ ns and $\Delta t = 1$ ms. The emission obtained under a 335 nm excitation is presented in Fig. 12 for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnTPC and in Fig.

13 for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc.

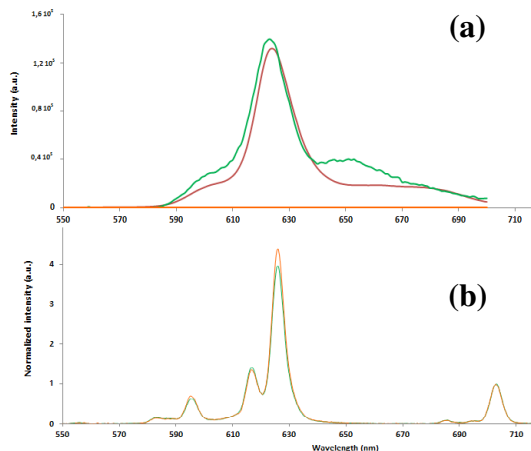


Figure 12: Time-resolved spectroscopy performed under a 335 nm excitation. (Short times mean $t_0 = 0$ ns and $\Delta t = 100$ ns and long times mean $t_0 = 500$ ns and $\Delta t = 1$ ms. Fluorescence spectra measured at short time (a) and long time (b) for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 (orange), $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc (green) and ZnPc (red).

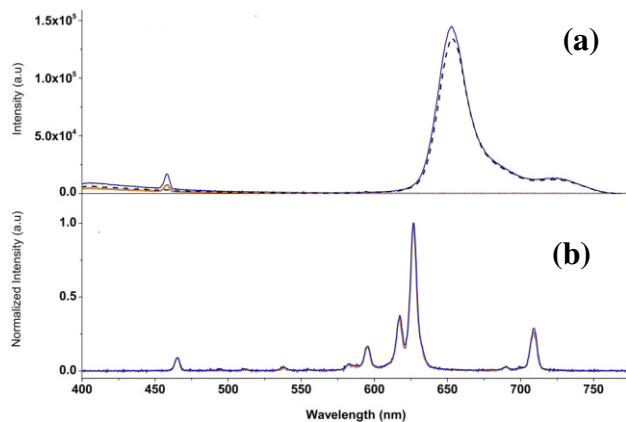


Fig. (13) Time-resolved spectroscopy performed under a 335 nm excitation. (Short times mean $t_0 = 0$ ns and $\Delta t = 100$ ns and long times mean $t_0 = 500$ ns and $\Delta t = 1$ ms. Fluorescence spectra measured at short times (a) and long times (b) for $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG (orange), $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG-ZnPc (blue) and ZnPc (black);

As expected, because of its long fluorescence decay time, no Eu^{3+} emission was detected in this short temporal range. On the contrary, because of its fast decay time, the ZnPc and ZnTPC emissions were detected. Unfortunately, no difference could be observed between the fluorescence spectra of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -

DETA-PEG250-PS, whatever PS. It seems that no transfer from Eu^{3+} excited ions to ZnTPC or ZnPc occurs.

FRET can be also identified by analyzing the fluorescence decay curves. Phosphorescence lifetime of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc at 625 nm ((strongest emission peak of Eu^{3+}) after excitation at 335 nm is shown in Fig. 14 (a) and phosphorescence lifetime of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc at 625 nm after excitation at 335 nm is shown in Fig. 14 (b).

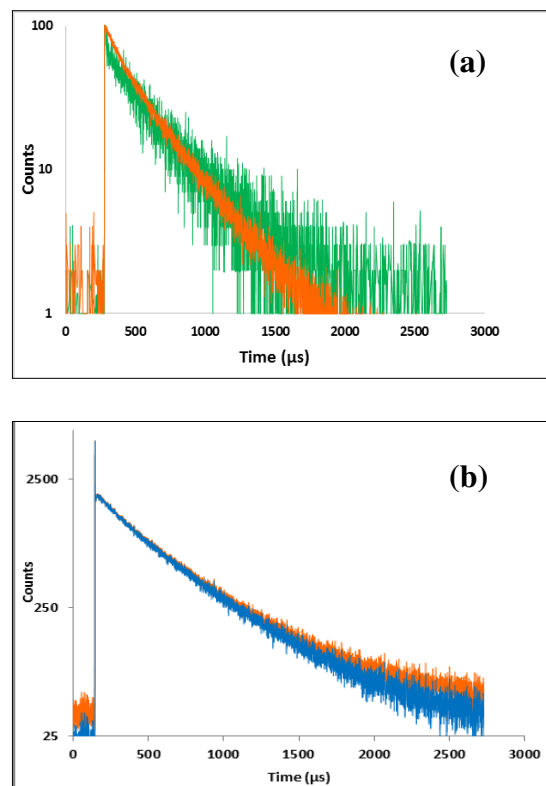


Fig. (14) Phosphorescence lifetime of (a) $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 (orange) and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc (green) at 625 nm after excitation at 335 nm (b) $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 (orange) and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-ZnPc (blue) at 625 nm after excitation at 335 nm

No difference could be observed between the fluorescence decay of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250 and $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250-PS (300 μs), whatever PS. This result is in adequation with the data obtained in static fluorescence.

3.3. X-rays excitation

X-rays excitation was performed onto the nanoparticles and the results are presented in Fig. 15 (a) for ZnPc, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA-PEG250, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Eu}^{3+}$ -DETA250-

PEG-ZnTPC and in Fig. 15 (b) for ZnPc, Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250, Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc.

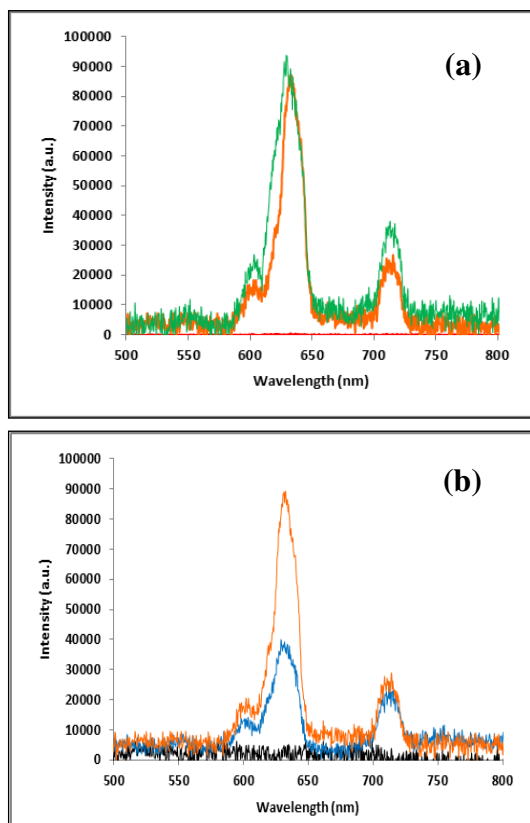


Fig.15 Fluorescence emission of (a) ZnTPC, Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 (orange) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc (green) (same concentration in Eu³⁺) after X-rays excitation and (b) ZnPc (black), Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 (orange) and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc (blue) (same concentration in Eu³⁺) after X-rays excitation

ZnTPC and ZnPc are not sensible to X-rays and no luminescence can be detected. There are not radiosensitive. Concerning Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc no difference could be observe between the luminescence spectrum meaning that not energy transfer occur between Eu³⁺ and ZnTPC into the NPs since emission of Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 and ZnTPC present a large overlap. Concerning Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250 and Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-PEG250-ZnPc, a decrease of the luminescence is shown in Fig. 14(b) suggesting an energy transfer between Eu³⁺ and ZnPc. Unfortunately, no ZnPc luminescence could be detected even if the fluorescence of Eu³⁺ at 710 nm is not affected by ZnPc which does not absorb in this domain.

We coupled 1100 ZnPc and 900 ZnTPC in a nanoparticle of about 70 nm of diameter. It is difficult to compare our data with the ones in the literature since the systems are quite different. Abliz et al. since elaborated particules are larger

(20 micron size Gd₂O₂S:Tb³⁺, 5mg/mL) and photofrin II (20 µg/mL) is added in solution and not grafted onto the NPs. Zhou et al. also encapsulate PPIX and LaF₃:Ce³⁺ into large PLGA microsphere (diameter of about 2 µm). In our previous work [22], we elaborate Tb₂O₃ scintillating NPs with a core diameter of about 3 nm; the core-shell NPs had a size of 9.9 nm and around ~ 13 porphyrin molecules were grafted into one NP. It was then possible to observe ¹O₂ formation after X-ray excitation. The reasons why we do not observe any fluorescence of ZnPc in our case might be due to several reasons. Photons are deeply absorbed by nanoparticles and are mostly diffused; the photosensitizers can form dimers which do not fluoresce (auto-quenching); the size of nanoparticles is too important to allow an energy transfer between bulk europium and the PS; there is an incompatibility between dipole moments of europium and the photosensitizers. New nanoparticles will be designed by changing the size and the number of grafted ZnPc.

LIST OF ABBREVIATIONS

BET = Brunauer-Emmett-Teller
 DMF = dimethylformamide
 DMSO = Dimethylsulfoxide
 DO = optical density
 FRET = Förster resonant energy transfer
 FT-IR = Fourier transform infrared
 HBTU = (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
 HPDE = Haematoporphyrin dimethyl ether
 IR = Infrared spectra
 PS = photosensitizers
 PEG250 = bis carboxylate-terminated poly(ethylene glycol)250
 PLGA = poly(D,L-lactide-co-glycolide)
 PPIX = protoporphyrin IX
 Φ_{Δ} = ¹O₂ quantum yield
 Φ_f = Fluorescence quantum yields
 TAT = trans-activating protein
 TCSPC = Time-Correlated Single Photon Counting
 TEM = Transmission Electron Microscopy
 TPC = 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin
 NP = nanoparticle
 UV = UltraViolet
 ZnTPC = Zn 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

LRGP thanks the Région Lorraine to provide financial support to buy a spectrophotometer.

REFERENCES

- [1] Weishaupt, K.R.; Gomer, C.J.; Dougherty, T.J., Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor. *Cancer Res.*, **1976**, *36*, (7 Part 1), 2326-2329.
- [2] Gonzales, J.; Wang, F.; Zamora, G.; Trinadad, A.; Marcu, L.; Cherry, S.; Hirschberg, H. In *Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics*, **2014**; Vol. 8928.
- [3] Hartl, B.A.; Hirschberg, H.; Marcu, L.; Cherry, S.R., Characterizing low fluence thresholds for in vitro photodynamic therapy. *Biomedical Optics Express*, **2015**, *6*, (3), 770-779.
- [4] Ran, C.Z.; Zhang, Z.D.; Hooker, J.; Moore, A., In Vivo Photoactivation Without "Light": Use of Cherenkov Radiation to Overcome the Penetration Limit of Light. *Mol. Imag. Biol.*, **2012**, *14*, (2), 156-162.
- [5] Bistolfi, F., Red radioluminescence and radiochemiluminescence: premises for a photodynamic tumour therapy with X-rays and haematoporphyrin derivatives - A working hypothesis. *Panminerva Med.*, **2000**, *42*, (1), 69-75.
- [6] Kokotov, S.; Lewis, A.; Neumann, R.; Amrusi, S., X-Ray-Induced Visible Luminescence of Porphyrins. *Photochem. Photobiol.*, **1994**, *59*, (3), 385-387.
- [7] Berg, K.; Luksiene, Z.; Moan, J.H.; Ma, L.W., Combined Treatment of Ionizing-Radiation and Photosensitization by 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-IX. *Radiat. Res.*, **1995**, *142*, (3), 340-346.
- [8] Takahashi, J.; Misawa, M., Characterization of reactive oxygen species generated by protoporphyrin IX under X-ray irradiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **2009**, *78*, (11), 889-898.
- [9] Allman, R.; Cowburn, P.; Mason, M., Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Br. J. Cancer*, **2000**, *83*, (5), 655-661.
- [10] Kulka, U.; Schaffer, M.; Siefert, A.; Schaffer, P.M.; Olsner, A.; Kasseb, K.; Hofstetter, A.; Duhmke, E.; Jori, G., Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *311*, (1), 98-103.
- [11] Schaffer, M.; Schaffer, P.M.; Corti, L.; Sotti, G.; Hofstetter, A.; Jori, G.; Duhmke, E., Photofrin II as an efficient radiosensitizing agent in an experimental tumor. *Onkologie*, **2001**, *24*, (5), 482-485.
- [12] Luksiene, Z.; Kalvelyte, A.; Supino, R., On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **1999**, *52*, (1-3), 35-42.
- [13] 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.
- [14] 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. B Biol.*, **2012**, *109*, 42-49.
- [15] Chen, W.; Zhang, J., Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2006**, *6*, (4), 1159-1166.
- [16] Scaffidi, J.P.; Gregas, M.K.; Lauly, B.; Zhang, Y.; Vo-Dinh, T., Activity of Psoralen-Functionalized Nanoscintillators against Cancer Cells upon X-ray Excitation. *ACS Nano*, **2011**, *5*, (6), 4679-4687.
- [17] Abliz, E.; Collins, J.E.; Bell, H.; Tata, D.B., Novel applications of diagnostic X-rays in activating a clinical photodynamic drug: Photofrin II through X-ray induced visible luminescence from "rare-earth" formulated particles. *J. Xray Sci. Technol.*, **2011**, *19*, (4), 521-530.
- [18] Chen, H.M.; Wang, G.D.; Chuang, Y.J.; Zhen, Z.P.; Chen, X.Y.; Biddinger, P.; Hao, Z.L.; Liu, F.; Shen, B.Z.; Pan, Z.W.; Xie, J., Nanoscintillator-Mediated X-ray Inducible Photodynamic Therapy for In Vivo Cancer Treatment. *Nano Lett.*, **2012**, *15*, (4), 2249-2256.
- [19] Liu, Y.F.; Chen, W.; Wang, S.P.; Joly, A.G., Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Appl. Phys. Lett.*, **2008**, *92*, (4), 043901.
- [20] Morgan, N.Y.; Kramer-Marek, G.; Smith, P.D.; Camphausen, K.; Capala, J., Nanoscintillator Conjugates as Photodynamic Therapy-Based Radiosensitizers: Calculation of Required Physical Parameters. *Radiat. Res.*, **2009**, *171*, (2), 236-244.
- [21] Zou, X.J.; Yao, M.Z.; Ma, L.; Hossu, M.; Han, X.M.; Juzenas, P.; Chen, W., X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine*, **2014**, *9*, (15), 2339-2351.
- [22] Bulin, A.L.; Truillett, 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.
- [23] Retif, P.; Pinel, S.; Toussaint, M.; Frochot, C.; Chouikrat, R.; Bastogne, T.; Barberi-Heyob, M., Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics*, **2015**, *5*, (9), 1030-1045.
- [24] Michail, C.M.; Fountos, G.P.; Liaparinos, P.F.; Kalyvas, N.E.; Valais, I.; Kandarakis, I.S.; Panayiotakis, G.S., Light emission efficiency and imaging performance of Gd₂O₃:Eu powder scintillator under x-ray radiography conditions. *Med. Phys.*, **2010**, *37*, (7), 3694-3703.
- [25] Osseni, S.A.; Lechevallier, S.; Verelst, M.; Dujardin, C.; Dexpert-Ghys, J.; Neumeyer, D.; Leclercq, M.; Baaziz, H.; Cussac, D.; Santran, V.; Mauricot, R., New nanoplatform based on Gd₂O₃:Eu³⁺ core: synthesis, characterization and use for in vitro bio-labelling. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, (45), 18365-18372.
- [26] Bechet, D.; Auger, F.; Couleaud, P.; Marty, E.; Ravasi, L.; Durieux, N.; Bonnet, C.; Plenat, F.; Frochot, C.; Mordon, S.; Tillement, O.; Vanderesse, R.; Lux, F.; Perriat, P.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., Multifunctional ultrasmall nanoplatforms for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors guided by real-time MRI. *Nanomed-Nanotech. Biol. Med.*, **2015**, *11*, (3), 657-670.
- [27] Osseni, S.A.; Lechevallier, S.; Verelst, M.; Perriat, P.; Dexpert-Ghys, J.; Neumeyer, D.; Garcia, R.; Mayer, F.; Djanashvili, K.; Peters, J.A.; Magdeleine, E.; Gros-Dagnac, H.; Celsis, P.; Mauricot, R., Gadolinium oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T-2-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence. *Nanoscale*, **2014**, *6*, (1), 555-564.
- [28] Zhang, Y.; Chen, Y., Fmoc-Cl fluorescent determination for amino groups of nanomaterial science. *IET Nanobiotechnol.*, **2012**, *6*, (2), 76-80.
- [29] Chouikrat, R.; Champion, A.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Moussaron, A., Microwave-assisted synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2015**, *19*, (4), 595-600.
- [30] Kliesch, H.; Weitemeyer, A.; Muller, S.; Wohrle, D., Synthesis of Phthalocyanines with One Sulfonic-Acid, Carboxylic-Acid, or Amino Group. *Liebigs Annalen*, **1995**, (7), 1269-1273.
- [31] Figueiredo, T.L.C.; Johnstone, R.A.W.; Sorensen, A.; Burget, D.; Jacques, P., Determination of fluorescence yields, singlet lifetimes and singlet oxygen yields of water-insoluble porphyrins and metalloporphyrins in organic solvents and in aqueous media. *Photochem. Photobiol.*, **1999**, *69*, (5), 517-528.
- [32] DeRosa, M.C.; Crutchley, R.J., Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *233*, 351-371.

Received:

Revised:

Accepted:

IV- Etude du transfert d'énergie entre les nanoparticules de Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA ou Gd(OH)CO₃: Tb³⁺-DETA-PEG250 avec la ZnTPC, ZnPc et une porphyrine

Afin d'évaluer l'influence du type de lanthanide et du type de photosensibilisateur, des nanoparticules Gd(OH)CO₃ Tb³⁺-DETA ont été synthétisées suivant la même méthode que celle utilisée pour la synthèse des nanoparticules dopées à l'euporium. Nous avons estimé le taux de greffage de la porphyrine à 900 porphyrines par nanoparticule. L'objet de cette étude est d'évaluer si un transfert d'énergie est possible entre deux types de nanoparticules Gd(OH)CO₃:Tb³⁺-DETA et Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA et trois types de PS (porphyrine P1, chlorine zinguée ZnTPC et phtalocyanine zinguée ZnPc). Rappelons que deux types de transfert peuvent s'effectuer entre le lanthanide et le photosensibilisateur, un transfert non radiatif de type FRET et un transfert de type radiatif. Les deux types de transfert nécessitent un recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. Le FRET ne nécessite pas que le donneur et l'inhibiteur soient en contact. Cependant, la distance R entre les deux molécules est un paramètre crucial puisque l'efficacité de ce phénomène est proportionnelle à R⁻⁶.

IV-1. Calcul du rayon de Förster et estimation théorique du transfert

Nous avons évalué les valeurs de R₀ des trois systèmes et les valeurs sont reportées dans le tableau 13.

Tableau 13 : Valeurs des R₀ dans les trois systèmes

Couple	R ₀ (nm)	Diamètre de la NP (nm)
Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA-P1	2,77	120
Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA-ZnTPC	2,07	70
Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺ -DETA-ZnPc	2,80	70

En se basant sur les images observées au Microscope Electronique à Transmission (MET) qui montrent que les nanoparticules sont monodisperses et sphériques, de rayon R et que les PS sont greffées de manière uniforme sur la surface, si l'on définit une distance R₁ (2*R₀) à partir de laquelle on peut considérer que le transfert d'énergie est peu probable, on peut estimer le rendement approximatif ρ de transfert comme égal à

$$\rho = R_1^3/4/R^3$$

formule déduite à partir du volume de l'intersection de deux sphères.

Pour les NPs Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA-ZnPc, ce rendement de transfert estimé est très faible, de l'ordre de 6. 10⁻⁴. En effet, si la probabilité de transfert est ρ à la distance R₀, elle n'est que de ρ/64 pour 2R₀, et donc pratiquement nulle au-delà. Dans ces conditions, tout ce qui se passe au-delà de cette distance peut être

négligé. Le calcul simplifié est réalisé, avec comme hypothèse un grand rayon de la nanoparticule relativement à $2R_0$ (figure 95).

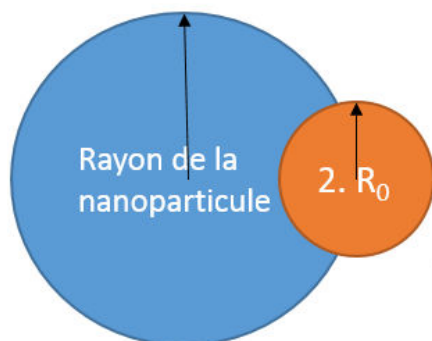


Figure 95 : Base de calcul de la probabilité maximale de transfert lié à la présence d'accepteur à une distance du donneur présent en surface de $2.R_0$ ($R \gg R_0$).

Seul ce qui se passe entre 0 et $2R_0$ peut donc intervenir dans le transfert et il s'agit donc de calculer de manière approchée, mais maximale, le nombre relatif d'accepteurs présents entre 0 et cette distance critique, relativement à l'ensemble des accepteurs présents sur l'ensemble de la nanoparticule (pour lesquels la probabilité de transfert d'énergie peut être considérée comme négligeable). Ainsi, seuls les accepteurs présents à la surface de la nanoparticule (dans la zone rouge) sont pris en considération.

IV-2. Etude du transfert énergétique entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs dans l'éthanol

IV-2-1. Cas du couple $Gd(OH)CO_3:Tb^{3+}$ et porphyrine P1

Nous avons évalué l'influence de la concentration de la porphyrine P1, dans l'éthanol, sur la luminescence du terbium dans la nanoparticule $Gd(OH)CO_3:Tb^{3+}$. La figure 96 représente la décroissance de l'émission des nanoparticules $Gd(OH)CO_3:Tb^{3+}$, de 120 nm de diamètre moyen, mesurée à 545 nm après excitation à 310 nm, en fonction de la concentration en porphyrine ajoutée dans la solution.

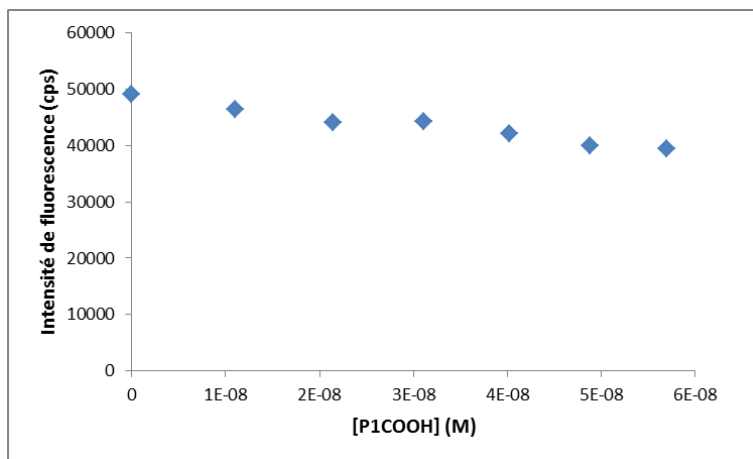
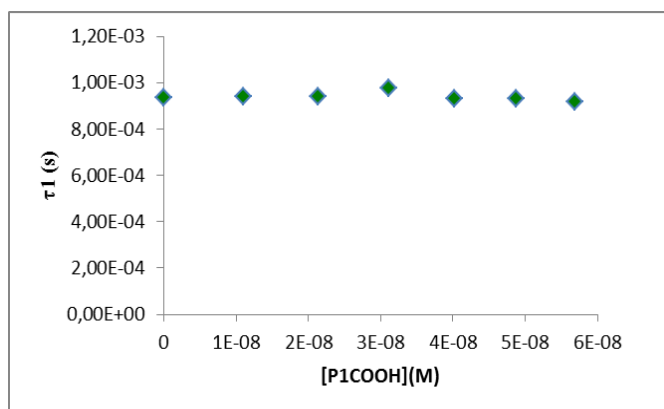


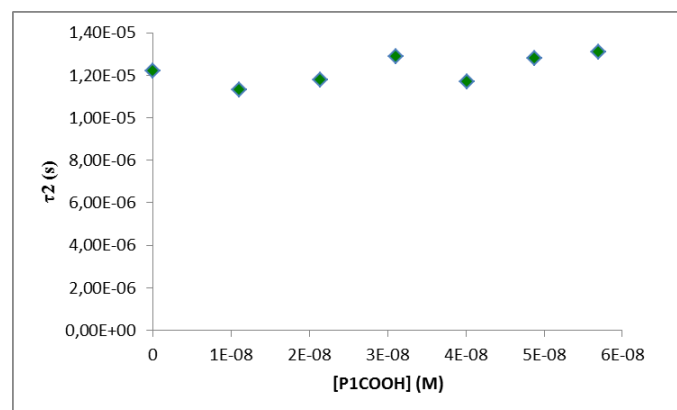
Figure 96 : Influence de la concentration de la P1 sur la luminescence du terbium à $\lambda_{em}=545$ dans l'éthanol ($\lambda_{exc}=310$ nm)

Une légère décroissance de l'émission est observée. A partir du coefficient d'extinction moléculaire de la porphyrine à 545 nm, soit $\epsilon = 7,8 \cdot 10^3 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$, il est possible d'estimer la part attribuable à l'absorption de la luminescence de la terre rare par le PS.

Afin de compléter ces résultats, nous avons mesuré les durées de vie de luminescence du terbium en fonction de la concentration de la porphyrine P1 en solution (Figures 97 (a) et (b)).



(a)



(b)

Figure 97 a et b : Influence de la concentration de P1 en solution sur τ_1 et τ_2 du terbium à $\lambda_{em} = 545$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 310$ nm).

L'analyse des figures 3 (a) et (b) montre que les deux durées de vie τ_1 et τ_2 du terbium ne sont pas affectées par la présence de porphyrine P1 en solution et sont égales à $9 \cdot 10^{-4}$ s et $1,2 \cdot 10^{-5}$ respectivement.

Il serait possible de conclure que le transfert, s'il se fait, ne peut se réaliser que pour des PS fixés sur les nanoparticules.

Le tableau 14 rassemble les valeurs de durée de vie du terbium sans greffage et avec greffage de la porphyrine de 889 porphyrines/nanoparticule.

Tableau 14 : Durées de vie du terbium dans les NPs $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ -DETA et $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ -DETA-P1

Nanoparticules	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ -DETA	946	12
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ -DETA-P1	995	25

Le fait que les durées de vie du terbium en présence de P1 greffée soient légèrement supérieures à celles sans P1 n'est pas explicable en dehors de possibles incertitudes.

En résumé :

- l'émission de Tb^{3+} diminue quand la concentration de la P1 augmente en solution,
- la durée de vie de Tb^{3+} ne change pas en présence de P1 en solution,
- la durée de vie de Tb^{3+} ne change pas en présence de P1 couplée à la nanoparticule.

Ceci serait en accord avec un transfert d'énergie de type radiatif.

Quand les photosensibilisateurs sont introduits dans la solution contenant des nanoparticules, il est possible qu'ils viennent s'adsorber sur ces dernières. Pour tenter de valider ce comportement, nous avons mesuré les durées de vie de la terre rare seule sans PS, en présence de PS en solution puis en éliminant les PS présents dans la solution par centrifugation. De plus, la présence des amines fixées en surface sur les nanoparticules, qui pourraient avoir une influence sur l'adsorption des PS a été évaluée. Le tableau 15 rassemble les données concernant les $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$.

Tableau 15 : durée de vie de Tb^{3+} dans différentes nanoparticules

Nanoparticules	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$	13,2	941
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ / P1	13,1	871
$\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ (centrifugé) / P1	14,2	836

Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA	14	959
Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA/P1	14	814
Gd(OH)CO ₃ :Tb ³⁺ -DETA (centrifugé)/P1	13,4	847

Les durées de vie obtenues dans les nanoparticules centrifugées sont semblables à celles obtenues dans un mélange nanoparticules – photosensibilisateurs en solution. Si le « lavage » des nanoparticules était parfait, les durées de vie auraient du être semblable à celles des nanoparticules seules en solution, isolées des PS.

IV-2-2. Cas du couple Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA et ZnPc

Les mêmes mesures ont été réalisées sur le couple Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA et ZnPc en utilisant des nanoparticules Gd₂O₂S:Eu³⁺-DETA de 70 nm de diamètre moyen. La figure 98 représente l'évolution de l'émission de l'euporium en fonction de la concentration en ZnPc.

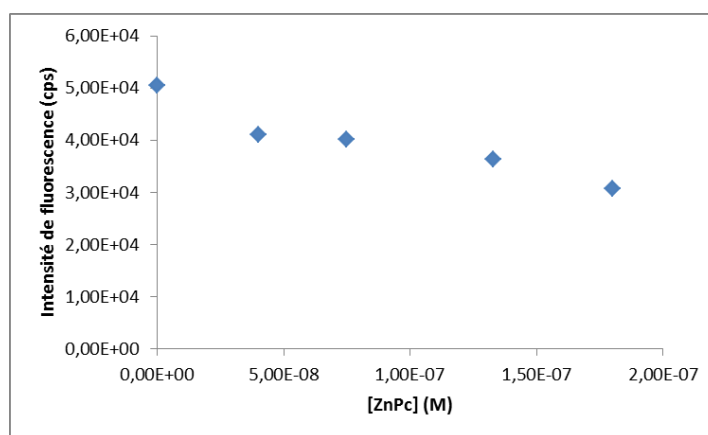
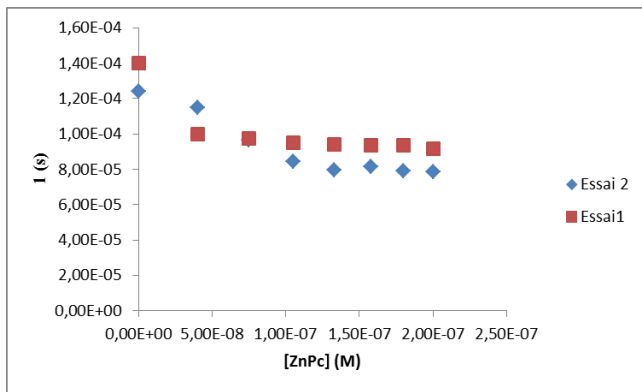
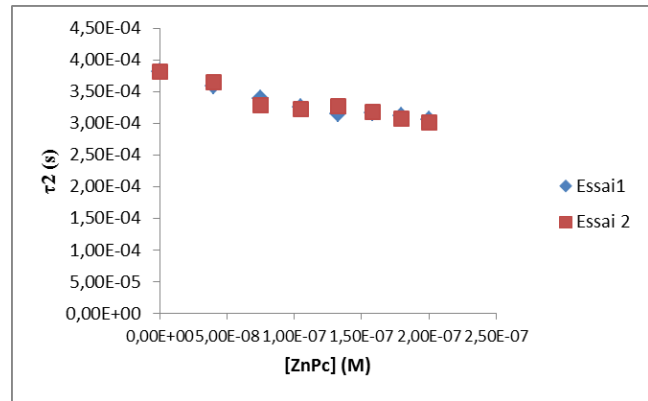


Figure 98 : Influence de la concentration de la ZnPc sur la luminescence de l'Eu³⁺ à $\lambda_{em} = 625$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 467$ nm).

Comme pour le couple Gd(OH)CO₃:Tb³⁺-DETA et P1, la luminescence de la terre rare est affectée par la présence de la ZnPc en solution. Le coefficient d'extinction moléculaire de la phtalocyanine à $\lambda = 626$ nm est alors de $8 \cdot 10^3 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nous avons également enregistré la durée de vie du terbium en fonction de la concentration en ZnPc. Les résultats sont représentés dans les figures 99 (a) et (b).



(a)



(b)

Figure 99 : Influence de la concentration de la ZnPc en solution sur τ_1 et τ_2 de l'euporium à $\lambda_{em} = 626 \text{ nm}$ dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 467 \text{ nm}$)

A l'inverse du le couple $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 : \text{Tb}^{3+}$ -DETA et P1, les durées de vie du terbium sont influencées par la porphyrine en solution. Plus la concentration augmente, plus les durées de vie diminuent.

Le tableau 15 rassemble les valeurs de durée de vie de l'euporium dans les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-ZnPc avec 1107 ZnPc/nanoparticule

Tableau 16 : Durées de vie de l'euporium dans les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-ZnPc

Nanoparticules	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA	124-140	382
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA-ZnPc	74	282

En résumé,

- l'émission de Eu^{3+} diminue quand la concentration de la ZnPc augmente,
- la durée de vie de Eu^{3+} diminue quand la concentration de la ZnPc augmente,
- la durée de vie de Eu^{3+} diminue quand la ZnPc est greffée dans la nanoparticule.

Ceci est en accord avec un transfert d'énergie de type non radiatif FRET. Le tableau 17 reprend les durée de vie de Eu^{3+} dans des nanoparticules couplées ou non au DETA, centrifugées ou non, possédant du PS ou non.

Tableau 17 : durée de vie de Eu^{3+} dans différentes nanoparticules

Nanoparticules	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$	128	358
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+} / \text{ZnPc}$	88,5	27
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ (centrifugés) / ZnPc	89,1	282
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA	132	375
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA / ZnPc	98,4	34
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA (centrifugés) / ZnPc	99,8	402

IV-2-3. Cas du couple $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA et ZnTPC

Les mêmes mesures ont été réalisées sur le couple $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA et ZnTPC en utilisant des nanoparticules de 70 nm de diamètre moyen. La figure 100 représente l'évolution de l'émission de l'euporium en fonction de la concentration en ZnTPC.

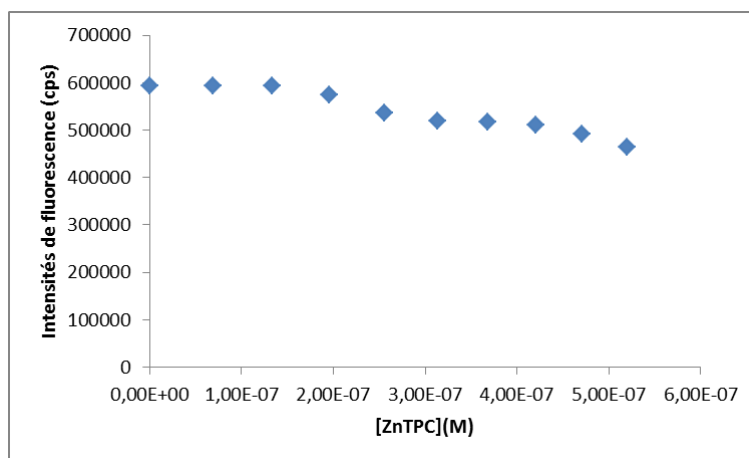
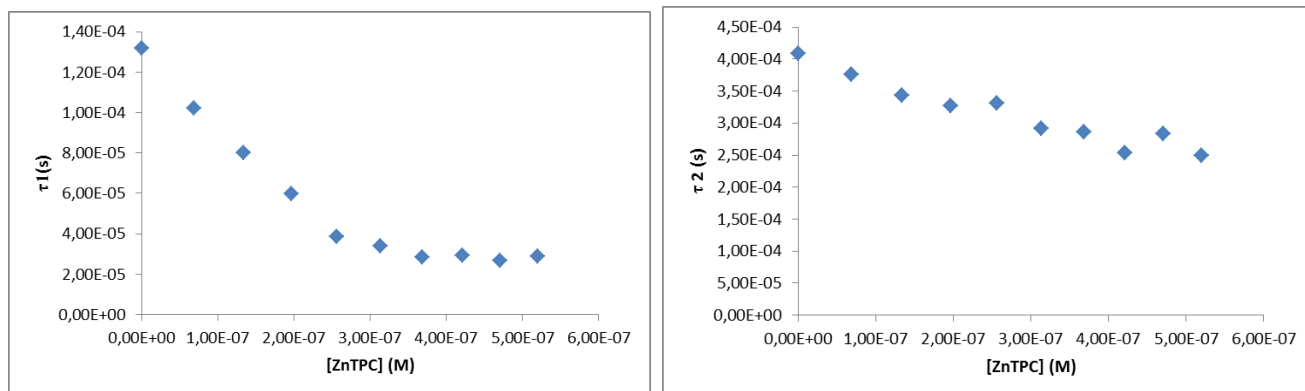


Figure 100 : Influence de la concentration de ZnTPC sur la luminescence de l'euporium à $\lambda_{\text{em}} = 710$ nm pour $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm.

Comme pour les couples $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot \text{Tb}^{3+}$ -DETA/P1 et $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA/ ZnPc , la luminescence de la terre rare est affectée par la présence de la ZnPc en solution. Le coefficient d'extinction moléculaire de la phtalocyanine à $\lambda = 626$ nm est alors de $8 \cdot 10^3 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nous avons également enregistré la durée de vie du terbium en fonction de la concentration en ZnPc. Les résultats sont représentés dans les figures 101 (a) et (b).



(a)

(b)

Figure 101 : Influence de la concentration en ZnTPC sur τ_1 et τ_2 de l'euporium à $\lambda_{em} = 710$ nm dans l'éthanol ($\lambda_{exc} = 365$ nm).

Le tableau 18 rassemble les valeurs de durée de vie de l'euporium dans les NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA et $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA-TPC avec çà- TPC/nanoparticule ;

Tableau 18 : Durées de vie de l'euporium dans les NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA et $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA-TPC

Condition	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA	132	408
$Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA-ZnTPC	18	378

En résumé, que

- l'émission de Eu^{3+} diminue quand la concentration de la TPC augmente,
- la durée de vie de Eu^{3+} diminue quand la concentration de la TPC augmente,
- la durée de vie de Eu^{3+} diminue quand la TPC est greffée dans la nanoparticule.

Ceci est en accord avec un transfert d'énergie de type non radiatif FRET, comme pour le couple $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA/ZnPc. Le tableau 19 reprend les durées de l' Eu^{3+} obtenues pour différentes nanoparticules.

Tableau 19: durée de vie de Eu^{3+} dans différentes nanoparticules

Nanoparticules	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$	13,2	358
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ / TPC	83,8	236
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ (centrifugées) / TPC	88,2	279
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA	13,2	375
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA / TPC	99,8	320
$\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA (centrifugés) / TPC	91,3	378

IV-3. Estimation de la part de transfert d'énergie radiatif

IV-3-1. Cas du couple $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ et porphyrine P1

La figure 102 représente les variations de l'inverse de l'intensité de fluorescence relative en fonction de la concentration en porphyrine.

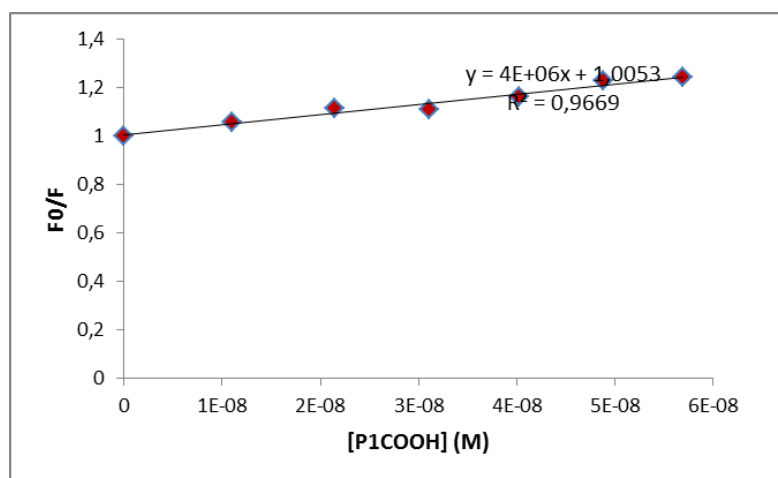


Figure 102 : Relation de type Stern-Volmer entre les nanoparticules $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3:\text{Tb}^{3+}$ et la P1.

Cette courbe met en évidence une relation linéaire expérimentale de type Stern-Volmer conduisant à une constante de Stern-Volmer K_{SV} de $4 \cdot 10^6 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l}$.

IV-3-2. Cas du couple $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA et ZnPc

IV-3-2-a. Evaluation des constantes de quenching

La figure 103 représente les variations de l'inverse de l'intensité de fluorescence relative en fonction de la concentration en ZnPc.

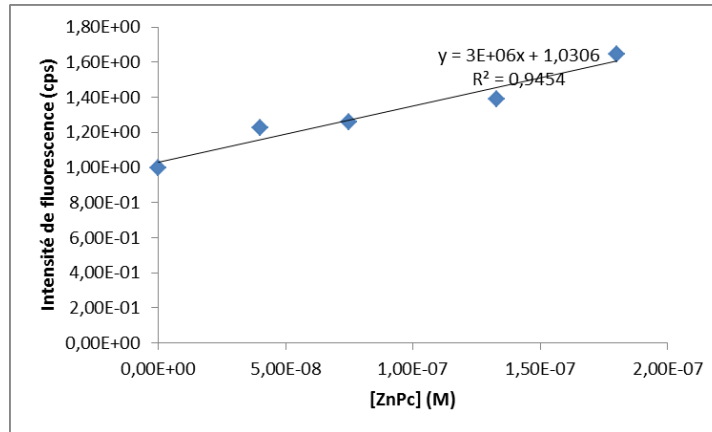


Figure 103 : Relation de type Stern-Volmer entre les nanoparticules $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ -DETA et la ZnPc.

Cette courbe met en évidence une relation linéaire expérimentale de type Stern-Volmer conduisant à une constante de Stern-Volmer K_{SV} de $3.1.10^6 \text{ mole}^{-1}.L$. Il est également possible de représenter les variations de $1/\tau$ en fonction de la concentration en ZnPc pour les deux durées de vie. Les deux figures 104 (a) et (b) illustrent l'existence d'une droite de Stern-Volmer de type :

$$1/\tau = 1/\tau_0 + K_{sv}.(PS) \text{ ou } \tau_0/\tau = 1 + k_q.\tau_0.(PS).$$

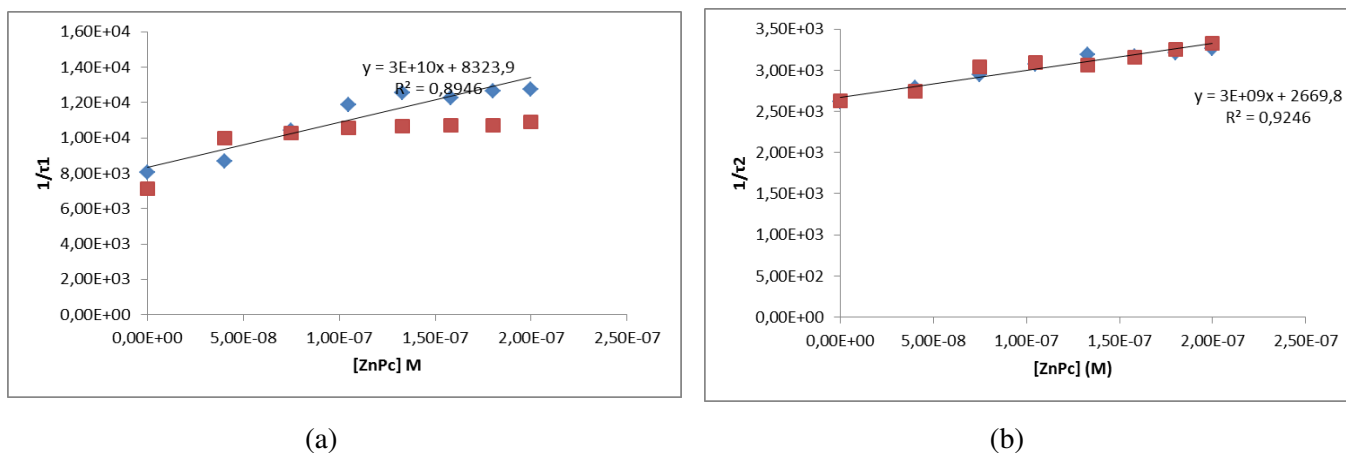


Figure 104 : Variations de $1/\tau_1$ et de $1/\tau_2$ en fonction de la concentration en ZnPc

Pour la durée de vie courte, nous obtenons $K_{SV} = 2,6.106 \text{ mole}^{-1}.\text{L}$ (durée de vie sans PS de 125 μs) et pour l'autre de $K_{SV} = 1,35.106 \text{ mole}^{-1}.\text{L}$ (durée de vie sans PS de 382 μs).

IV-3-2-b. Modèle

Les valeurs calculées des constantes de vitesse des transferts à longue distance qui s'exprime par $k_q = 1/\tau_D \cdot (R_0/R)^6$ où R_0 est le rayon de Förster (2 nm pour ce couple) et τ_D la durée de vie du donneur. Si on cherche le nombre de PS qui se trouvent à $2R_0$ de l'euporium, on obtiendrait pour une concentration de $10^{-7} \text{ mole}.\text{L}^{-1}$ un nombre approximatif de PS de l'ordre de 10^{-5} , soit pratiquement 0. Par ailleurs, la valeur de la constante de vitesse pour $R = R_0$ serait de l'ordre de $8.10^{-3}.\text{s}^{-1}$, valeur très faible pour permettre d'explicitier un transfert d'énergie par un mécanisme de type Foester (et en admettant que tous les atomes d'euporium se situent sur la surface de la nanoparticule).

Pour poursuivre sur l'approche quantitative, il est possible de pratiquer une intégration de la décroissance $D(t)$ de l'émission de l'euporium définie par :

$$D(t) = A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)$$

conduisant à l'intensité de luminescence intégrée définie par :

$$I_L = \int D(t) \cdot dt = A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2$$

La figure 105 représente l'intensité de luminescence intégrée en fonction de la concentration en PS.

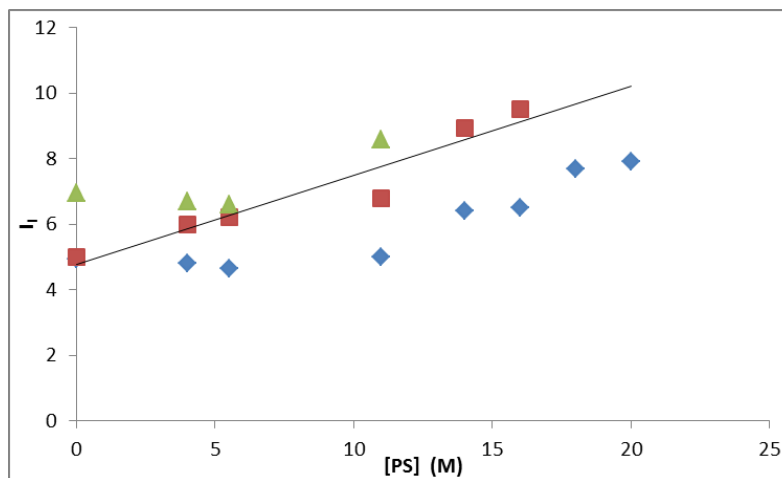


Figure 105 : Intensité de luminescence intégrée en fonction de la concentration en ZnPc.

En associant des erreurs de mesures les unes aux autres, la précision du calcul s'en ressent notablement, mais, comme le montre la figure 13, une relation de type Stern-Volmer reste compatible avec les résultats expérimentaux. Dans les conditions expérimentales, K_{SV} est alors de $3.6 \cdot 10^6 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L}$, du même ordre de grandeur que les valeurs calculées soit par fluorescence en excitation continue, soit en excitation pulsée. On obtient entre excitation continue et pulsée la même valeur de K_{SV} (à la précision des mesures prêt), ce qui pourrait laisser penser que les aspects de transfert radiatif ne sont pas prédominants. Les interactions entre terre rare et PS impose de considérer pour qu'un transfert d'énergie ait lieu, que la terre rare est située sur la surface de la nanoparticule.

IV-3-3. Cas du couple $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ -DETA et ZnTPC

La variation de l'intensité de fluorescence mesurée à 626 nm est présentée Figure 106. Comme la ZnTPC absorbe et émet à cette longueur d'onde, nous ne pouvons déterminer un K_{SV} .

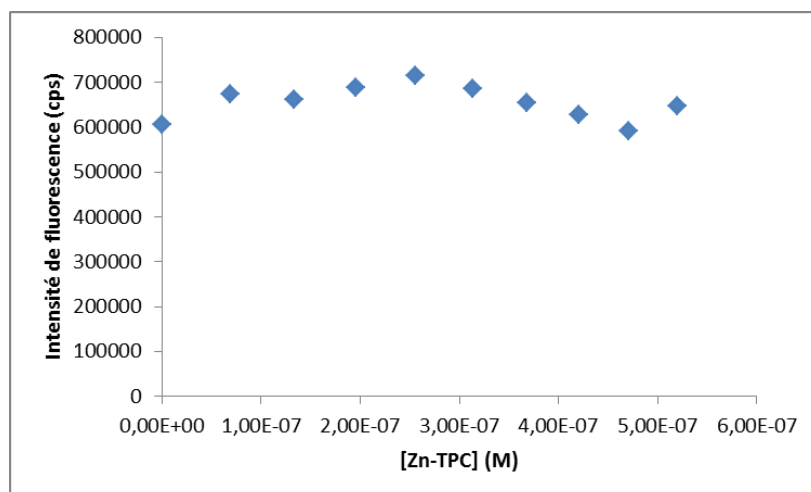


Figure 106 : Variation de l'intensité de fluorescence mesurée à 626 nm (PS absorbe et émet à cette longueur d'onde).

On met ici en évidence une difficulté des mesures en excitation continue quand il y a recouvrement partiel entre émission de la terre rare et absorption/émission du photosensibilisateur. Ce constat induit une nécessaire modestie dans un débat quantitatif sur les valeurs de K_{SV} .

Plutôt que de calculer les valeurs de K_{SV} pour chacune des durées de vie comme cela a été pratiqué précédemment, il a été possible de calculer l'intensité de fluorescence à partir des durées de vie et des coefficients pré-exponentiels (comme pour la figure 106). Les résultats dans une représentation de Stern-Volmer sont présentés figure 107. Comme dans les cas précédents, on atteint une représentation compatible avec une droite de Stern-Volmer avec une valeur de K_{SV} de $1.14 \cdot 10^6 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{L}$.

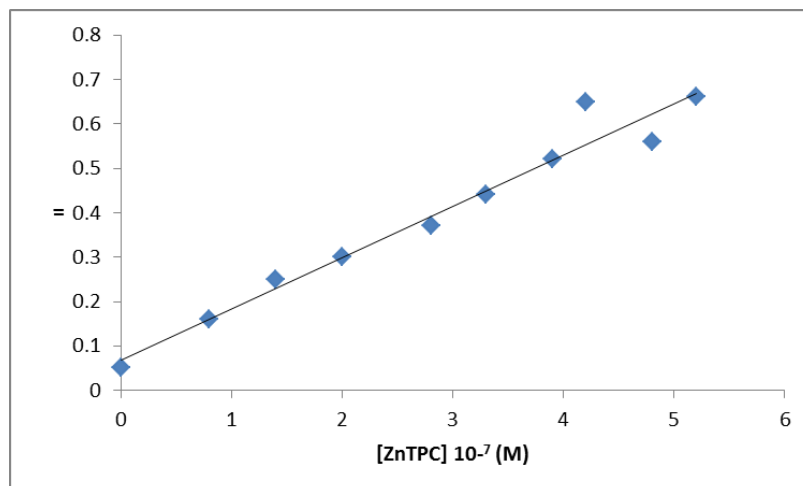


Figure 107 : Intensité de luminescence intégrée en fonction de la concentration en TPC.

On retrouve donc, encore une fois une inhibition de la luminescence de la terre rare par le photosensibilisateur. Dans les trois cas étudiés, les constantes de Stern-Volmer sont du même ordre de grandeur.

Conclusion

Si l'on peut affirmer que les molécules de photosensibilisateur, présentes au voisinage de la surface des nanoparticules sont responsables de l'inhibition de la luminescence de l'europlum, les spectres de fluorescence des photosensibilisateurs n'illustrent cependant pas une possible émission de leur part. Il n'a pas été possible de mettre en évidence les émissions de la phtalocyanine ou de la chlorine en temps résolu. Ce résultat semble indiquer que le processus d'adsorption du PS sur les nanoparticules pourrait être associé à la formation de complexes entre PS, complexes non fluorescents. S'il en est effectivement ainsi, cette étude montre certains éléments positifs, plutôt non attendus :

- Transfert d'énergie à longue distance entre la terre rare et le photosensibilisateur,
- Transfert radiatif peu probable.

Des éléments négatifs pour la PDT ont aussi été démontrés, en particulier l'absence de preuve d'une population d'un état excité du photosensibilisateur (phtalocyanine et chlorine) et, par suite, possibilité d'un transfert d'énergie pour la production recherchée d'oxygène singulet.

Compte tenu du nombre moyen de molécules de photosensibilisateur greffées sur les nanoparticules, qui est de l'ordre de 1000, il est possible de calculer la distance moyenne entre deux molécules de PS, qui est de l'ordre de 3,2 nm. Si ces molécules étaient espacées de manière sensiblement aléatoire, il serait possible de les considérer comme indépendantes les unes des autres et donc d'en attendre des émissions de

fluorescence. L'absence d'émission met donc en cause ce principe et conduit à soutenir l'existence de complexes dans l'état fondamental ou dans l'état excité, et en tout état de cause, en des greffages qui ne sont pas produits de manière aléatoire car, s'il en avait été ainsi les fluorescences des PS auraient dû être observées.

De plus, les expériences complémentaires s'appuyant sur des lavages des nanoparticules mises en interaction avec des photosensibilisateurs en solution montre que les molécules de PS restent « attachées » aux nanoparticules, ce qui renforce les possibilités de transfert d'énergie électronique entre la terre rare excitée électroniquement et les PS (par surconcentration locale), mais également, par création d'un couplage entre PS entre eux et d'une forme de supra-molécule, de processus d'inhibition de la fluorescence possible des PS comme cela avait déjà été démontré (Couleaud, 2011).

En conclusion, ces travaux apportent des informations substantielles sur les interactions entre terres rares placées dans des nanoparticules de grande taille (supérieures à 50 nm de diamètre) et photosensibilisateurs greffés ou non sur lesdites nanoparticules.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail était l'élaboration d'un nouveau type de nano-objets multifonctionnels pour améliorer l'efficacité de la PDT avec une nouvelle approche qui combine la radiothérapie et la PDT.

Pour être efficace en tant qu'agent pour la PDT, les nanoparticules que nous développons sont composées d'un cœur scintillateur et d'une couche de polysiloxane dans laquelle des photosensibilisateurs sont greffés.

Au cours de cette thèse, nous avons réussi à :

- Synthétiser des photosensibilisateurs en optimisant le rendement de réaction grâce à l'utilisation des micro-ondes ;
- Synthétiser des nanoparticules et les caractériser par diverses techniques physicochimiques (TEM, BET, DRX, potentiel zêta et IR) ;
- Greffer le photosensibilisateur et le surfactant sur les nanoparticules ;
- Effectuer la caractérisation photophysique des nanoparticules greffées. Le transfert d'énergie entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs a été également étudié.

Le développement du matériau a été consommateur de temps dans ce travail. Si le cœur de la nanoparticule a toujours été $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ divers essais ont été nécessaires pour l'obtention d'une couche en polysiloxane stable, pas trop épaisse et présentant un nombre d'amines suffisant pour coupler les photosensibilisateurs. Après de nombreux essais, notre choix s'est arrêté sur l'amine *N*-(3-Triméthoxysilylpropyl)diéthylènetriamine (DETA). Les fonctions amines nous ont permis de greffer la ZnTPC et la ZnPc et un surfactant (PEG250) pour améliorer leur dispersion en milieu aqueux.

La caractérisation photophysique des nanoparticules greffées était nécessaire et impérative pour montrer que les photosensibilisateurs conservent leurs propriétés de fluorescence et de production d' $^1\text{O}_2$ une fois greffées sur les nanoparticules. Une étude du transfert d'énergie par spectroscopie en temps résolu, sous excitation par la lumière visible a été menée, pour mieux comprendre le transfert d'énergie entre le cœur et le PS, sous excitation lumineuse ou RX. Cette étude n'a, malheureusement, pas permis de mettre en évidence un transfert.

Ceci peut être dû à une forte diffusion des nanoparticules, qui ne permet d'exciter que les ions d'euporium proches de la surface. Au vu de ce résultat négatif, des expériences supplémentaires d'étude de l'inhibition de l'émission de l'euporium par les deux PS ont été réalisées en solution. L'objectif de ces expériences était de démontrer que l'euporium était capable de transmettre son énergie au

photosensibilisateur. Un transfert non radiatif a ainsi pu être mis en évidence, même si son efficacité reste faible. Bien entendu, ces conclusions ne s'appliquent qu'à des solutions homogènes assez diluées et sous excitation par la lumière UV-VIS, où la diffusion de la lumière par les nanoparticules est très importante et empêche une bonne absorption de la lumière par les nanoparticules. Ceci ne reflète pas exactement le comportement des nanoparticules et des PS sous excitation aux RX et en milieu biologique. Il est possible qu'un transfert plus important soit obtenu après excitation RX, connus pour leur forte pénétration de la lumière. Ceci justifie la poursuite des études *in vitro* sous irradiation RX, en cours de réalisation au CRAN.

L'existence d'un transfert non radiatif entre la nanoparticule et le PS, même si son efficacité reste faible, justifie la poursuite de l'étude avec en particulier, la modification de la taille des nanoparticules. Ce travail a uniquement porté sur des composés de type Gd_2O_3 dopés à l' Eu^{3+} d'une taille moyenne de 60 et 80 nm. Il serait souhaitable de synthétiser des particules plus petites, avec comme objectif des tailles comprises entre 10 et 20 nm afin de diminuer le phénomène de diffusion, de permettre une meilleure stabilité des suspensions colloïdales, de diminuer la distance entre le cœur et les PS et donc d'obtenir un transfert plus efficace. D'autres dopants sont également à explorer. Une optimisation de la concentration en dopants et en PS devrait aussi permettre d'augmenter le rendement de transfert d'énergie

Le ciblage des particules est bien entendu un des enjeux de cette technologie. L'addition de motifs de reconnaissance (peptides, sucres....) est tout à fait envisageable. Il a déjà été envisagé de greffer le peptide DKPPR sur la fonction carboxylique du surfactant greffé. Ce peptide sert à cibler la neuropiline-1 (NRP-1), protéine membranaire des cellules épithéliales intervenant dans la néo-angiogenèse.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abels, C. (2004). Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 3, 765-771.
- Abliz, E., Collins, E.J., Bell, H., Tata, D.B. (2011). Novel applications of diagnostic X-rays in activating a clinical photodynamic drug: Photofrin II through X-ray induced visible luminescence from “rare-earth” formulated particles. *J Xray Sci Technol.* 19 (4), 521-530.
- Adler, D.A., Frederick, R., Longo, Finarelli, D.J., Goldmacher, J., Assour, J., Korsakoff, L. (1967). A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *J Org Chem.* 32, 476-476.
- Agarwal, M.L., Larkin, H.E., Zaidi, S.I., Mukhtar, H., Oleinick, N.L. (1993). Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 53, 5897-5902.
- Aghahosseini, F., Arbabi-Kalati, F., Fashtami, L.A., Fateh, M., Djavid, G.E. (2006). Treatment of oral lichen planus with photodynamic therapy mediated methylene blue: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Buca.* 11, 126-129.
- Agostinis, P., Berg, K., Keith, A., Cengel, M.D., Foster, T.H., Girotti, A.W., Gollnick, S.O., Hahn, S.M., Hamblin, M.R., Kessel, A.J.D., Korblick, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B.C., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: Cancer J Clin* 4, 250–281.
- Allémann, E., Rousseau, J., Brasseur, N., Kudrevich, S.V., Lewis, K., van Lier, J.E. (1996). Photodynamic therapy of tumours with hexadecafluoro zinc phthalocyanine formulated in PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles. *Int J Cancer.* 66, 821-824.
- Anderson, R., Parrish, J.A. (1981). The optics of Human Skin. *J Invest Dermatol.* 77, 13-19.
- Arsenault, G.P., Bullock, E., MacDonald, S.F. (1960). Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom. *J Am Chem Soc.* 82, 4384-4389.
- Arvizo, R.R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R.A., Giri, K., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chem Soc Rev.* 41, 2943-2970.
- Azzouzi, A.R., Barret, E., Moore, C.M., Villers, A., Allen, C., Scherz, A., Muir, G., de Wildt, M., Barber, N.J., Lebdai, S., Emberton, M. (2013). TOOKAD(®) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer. *BJU Int.* 112, 766-774.
- Ball, R.H., Dorough, G.D., Calvin, M. (1946). A further study of the porphine-like products of the reaction of benzaldehyde and pyrrole. *J Am Chem Soc.* 68, 2278-2281.
- Bellavance, M.A., Blanchette, M., Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS Journal.* 10, 166-177.

Berg, K., Bommer, J.C., Moan, J. (1989). Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.* 44, 7-15.

Berg, K., Luksiene, Z., Moan, J.H., Ma, L.W. (1995). Combined Treatment of Ionizing-Radiation and Photosensitization by 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin-I. *Radiat Res.* 3, 340-346.

Birraux, C., Kert, C. (2011). Les enjeux des métaux stratégiques : le cas des terres rares. Rapport du Sénat. N° 782.

Bistolfi, F. (2000). Red radioluminescence and radiochemiluminescence: premises for a photodynamic tumour therapy with X-rays and haematoporphyrin derivatives. A working hypothesis. *Panminerva Med.* 42, 69-75.

Boca, S.C., Four, M., Bonne, A., Van der Sanden, B., Astilean, S., Baldeck, P.L., Lemerrier, G. (2009). An ethylene-glycol decorated ruthenium(II) complex for two-photon photodynamic therapy. *Chem Commun.* 30, 4590-4592.

Boisbrun, M., Vanderesse, R., Engrand, P., Olie, A., Hupont, S., Regnouf de Vains, J.B., Frochot, C. (2008). Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins. *Tetrahedron Lett.* 64, 3494-3504.

Boisselier, E., Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 38, 1759-1782.

Borghini, E., Saïd, P., Pottier, A., Levy, L. (2010). Les nanoparticules thérapeutiques : une voie novatrice pour la radiothérapie appliquée à la cancérologie. *ESKA.* 39-47.

Brückner, C., Dolphin, D. (1995). 2,3-vic-Dihydroxy-meso-tetraphenylchlorins from the Osmium Tetroxide Oxidation of meso-Tetraphenylporphyrin. *Tet Lett.* 36, 3295-3298.

Bulin, A.L., Truillett, C., Chouikrat, R., Lux, F., Frochot, C., Amans, D., Ledoux, G., Tillement, O., Perriat, P., Barberi-Heyob, M., Dujardin, C. (2013). X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins. *J Phys Chem C.* 117 (41), 21583-21589.

Butterworth, K.T., McMahon, S.J., Currell, F.J., Prise, K.M. (2012). Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale.* 4, 4830-4838.

Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res.* 8, 9-21.

Cai, W., Shin, D.W., Chen, K., Gheysens, O., Cao, Q., Wang, S.X., Gambhir, S.S., Chen, X. (2006). Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* 6, 669-676.

Casas, A., Di Venosa, G., Vanzulli, S., Perotti, C., Mamome, L., Rodriguez, L., Simian, M., Juarranz, A., Pontiggia, O., Hasan, T., Batlle, A. (2008). Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. *Cancer Lett.* 271, 342-351.

- Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2, 91-106.
- Chaleix, V., Sol, V., Guilloton, M., Granet, R., Krausz, P. (2004). Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide–porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tet Lett.* 45, 5295-5299.
- Chaleix, V., Sol, V., Huang, Y.M., Guilloton, M., Granet, R., Blais, J.C., Krausz, P. (2003). RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy. *Eur J Org Chem.* 8, 1486-1493.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical, *Trends Biotechnol.* 11, 580-588.
- Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J., Greenstock, C.L. (1973). Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro, *Rad Res.* 56, 291-306.
- Chen, W., Zhang, J. (2006). Using Nanoparticles to Enable Simultaneous radiation and Photodynamic Therapies for Cancer Treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 6, 1159-1166.
- Chen, B., Pogue, B.W., Luna, J.M., Hardman, R.L., Hoopes, P.J., Hasan, T. (2006). Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 12, 917-923.
- Chen, W. (2008). Nanoparticle Self-Lighting Photodynamic Therapy for Cancer Treatment. *J Biomed Nanotechnol.* 8, 369-376.
- Chennoufi, R., Bougherara, H., Gagey-Eilstein, N., Dumat, B., Henry, E., Subra, F., Mahuteau-Betzer, F., Tauc, P., Teulade-Fichou, M.P., Deprez, E. (2015). Differential behaviour of cationic triphenylamine derivatives in fixed and living cells: triggering and imaging cell death. *Chem. Commun.* 51, 14881-14884.
- Cheon, J., Lee, J.H. (2008). Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Acc Chem Res.* 41, 1630-1640.
- Chouikrat, R., Champion, A., Vanderesse, R., Frochot, C., Moussaron, A. (2015). Microwave-assisted synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin. *J P P.* 19, 595-600.
- Chouikrat, R., Seve, A., Vanderesse, R., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Richeter, S., Raehm, L., Durand, J.O., Verelst, M., Frochot, C. (2012). Non polymeric nanoparticles for photodynamic therapy applications: recent developments. *Curr Med Chem.* 19, 781-792.
- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D., Golomb, G.A. (2009). New double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Control Release.* 19, 90-95.
- Colasanti, A., Kisslinger, A., Quarto, M., Riccio, P. (2004). Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an in vitro human prostate model. *Acta Biochim Pol.* 5, 1039-1046.

Cosimelli, B., Roncucci, G., Dei, D., Fantetti, L., Ferroni, F., Ricci, M., Spinelli, D. (2003). Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines. *Tet Lett.* 59, 10025-10030.

Couleaud, P. (2011). Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour de la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1. Doctorat.

Cui, F.B., Liu, Q., Li, R.T., Shen, J., Wu, P.Y., Yu, L.X., Hu, W.J., Wu, F.L., Jiang, C.P., Yue, G.F., Qian, X.P., Jiang, X.Q., Liu, B.R. (2014). Enhancement of radiotherapy efficacy by miR-200c-loaded gelatinase-stimuli PEG-Pep-PCL nanoparticles in gastric cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 13, 2345-2358.

Dennis, E.J., Dolmans, G.J., Fukumura, D., Jain, R.K. (2003). Photodynamic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 3, 380-387.

DeRosa, M.C., Crutchley, R.J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev.* 351-371.

Di Stasio, B., Frochot, C., Dumas, D., Even, P., Zwier, J., Muller, A., Didelon, J., Guillemin, F., Viriot, M.L., Barberi-Heyob, M. (2005). The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem.* 40, 1111-1122.

Dixon, H.B.F. (1987). Drawing a porphyrin formula. *Biochem Educ.* 15, 208-208.

Dougherty, T.J. (2002). An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 20, 3-7.

Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, P.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst.* 90, 889-905.

Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., Goldfarb A., Weishaupt, K.R., Boyle, D., Mittleman, A. (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 38, 2628-2635.

Drager, D.S., O'Brien, D.F. (2000). Novel synthesis of liquid crystalline phthalocyanines. *J Org Chem.* 65, 2257-2260.

Dumat, B. (2015). Sondes fluorescentes vinyl-triphénylaminés optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire. Doctorat.

Durand, C. (2014). Effet des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sur l'hypersensibilité viscérale chronique dans un modèle d'ulcération colique radio-induite chez le rat. Doctorat.

Fang, C., Bhattarai, N., Sun, C., Zhang, M. (2009). Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media. *Small.* 14, 1637-1641.

Fang, Z., Zhang, X., Hing La, Y., Liu, B. (2009). Bridged triphenylamine-based dendrimers: tuning enhanced two-photon absorption performance with locked molecular planarity. *Org Lett.* 11, 1-4.

- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 49, 1374-1403.
- Ficheux, H. (2009). Photodynamic therapy: principles and therapeutic indications. *Ann Pharm Fr*. 67, 32-40.
- Figge, F.H., Weiland, G.S., Manganiello, O. (1948). Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med*. 68, 640-641.
- Fischer, H., Ebersberger, J. (1934). Mesorhodin and its transformations to chlorophylloporphyrins as well as its oxidation to Phylloerythins. *Justus Liebigs Ann Chem. Annal*, 509-519.
- Fischer, H., Orth, H., Stern, A. (1934). *Die Chemie des Pyrrols*. Vol,I-III. Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft.
- Foote, C.S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*. 54, 659-659.
- Frochot, C., Di Stasio, B., Barberi-Heyob, M., Carre, M.C., Zwier, J.M., Guillemin, F., Viriot, M.L. (2009). New glycosylated porphyrins for PDT applications. *Oftalmologia*. 56, 62-66.
- Frochot, C., Di Stasio, B., Vanderesse, R., Belgy, M.J., Dodeller, M., Guillemin, F., Viriot, M.L., Barberi-Heyob, M. (2007). Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg Chem*. 35, 205-520.
- G.G. Zhai, R. Malhotra, M. Delaney, D. Latham, U. Nestler, M. Zhang, N. Mukherjee, Q. Song, P. Robe, A. Chakravarti. (2006). Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J neurooncol*. 76. 227-237.
- Garrier, J. (2011). Optimisation de la dosimétrie appliquée en thérapie photodynamique pour l'évaluation et la prédiction de l'efficacité du traitement de tumeurs. Thèse de Doctorat.
- Gary-Bobo, M., Mir Y, Rouxel, C., Brevet., D, Basile, I.M, Maynadier, M., Vaillant, O., Mongin, O., Blanchard-Desce, M., Morère, A., Garcia, M., Durand, J.O., Raehm, L. (2011). Mannose-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient two-photon photodynamic therapy of solid tumors. *Angew Chem Int Ed Engl*. 50, 11425-11429.
- Gedye, R.N., Smith, F.E., Wesaway, K.C., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J. (1986). The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tet Lett*. 27, 279-282.
- Giguere, R.J., Bray, T.L., Duncan, S., Majetich. G. (1986). Application of Commerical Microwave Ovens to Organic Synthesis. *Tet Lett*. 25, 4995-4998.
- Gillespie, F.C. (1981). A phantom for assessing the resolution at depth of a gamma camera system. *Br J Radiol*. 54, 255-257.

- Gomer, C.J., Ferrario, A., Murphree, A.L. (1987). The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. *Br J Cancer*. 56, 27-32.
- Gonzales, J., Wang, F., Zamora, G., Trinidad, A., Marcu, L., Cherry, S., Hirschberg, H. (2014). *Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics*. Vol 8928. SPIE.
- Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., Didelon, J., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M. (2008). Improvement of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. *J Med Chem*. 51, 3867-3877.
- Green, D.R., Chipuk, J.E. (2006). P53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell*. 126, 30-32.
- Gregoriadis, G. (1976). The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N Engl J Med*. 295, 704-710.
- Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Smilowitz, H.M. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol*. 49, 309-315.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*. 141, 312–322.
- Hartl, B.A., Hirschberg, H., Marcu, L., Cherry, S.R. (2015). Characterizing low fluence thresholds for in vitro photodynamic therapy. *Biomed Opt Express*. 3, 770-779.
- Head, C.S., Luu, Q., Sercarz, J., Saxton, R. (2006). Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 4, 87-97.
- Henderson, B.W. Dougherty T.J. (1992). How does photodynamic therapy work?. *Photochem Photobiol*. 55, 145-157.
- Heron, J.F. (2010). «Histoire de la radiothérapie». Site internet, Oncoprof.net. http://www.oncoprof.net/Generale2000/g08_Radiotherapie/Index/g08_idx02.php.
- Hillaireau, H., Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 66, 2873-2896.
- Hsieh, Y.J., Wu, C.C., Chang, C.J., Yu, J.S. (2003). Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol*. 194, 363-375.
- Huang, H.C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S.K., Rege, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *J Control Release*. 155, 344-357.
- Huang, L., Huang, Y.Y., Mroz, P., Tegos, G.P., Zhiyentayev, T., Sharma, S.K., Lu, Z., Balasubramanian, T., Krayner, M., Ruzié, C., Yang, E., Kee, H.L., Kirmaier, C., Diers, J.R., Bocian, D.F., Holten, D., Lindsey, J.S., Hamblin, M.R. (2010). Stable Synthetic Cationic Bacteriochlorins As Selective Antimicrobial Photosensitizers. *Antimicrob Agents Chemother*. 54, 3834–3841.

Inca, Institut National du Cancer, Les cancers en France, édition 2014.

IRSA, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. 2012. « La radioactivité et ses effets ».

Site internet, <http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/effet-sur-homme/effets-rayonnements-ionisants/Pages/2-differents-rayonnements-ionisants.aspx?dId=b58d9f9a-7224-425b-a349-1eccb3166958#.Vgwk4Pntmko>

Jain, N., Kumara, A., Chauhan, S.M.S. (2005). Synthesis of Transition Metal Porphyrins from Free Base 5,10,15,20-Tetraarylporphyrins Under Microwave Irradiation in Ionic Liquids. *Int J Rap Commun Synth Org Chem.* 35, 1223-1230.

Jentzen, W., Ma, J.G., Shelnutt, J.A. (1998). Conservation of the conformation of the porphyrin macrocycle in hemoproteins. *Biophys J.* 74, 753-763.

Jeon, S.I., Lee, J.H., Andrade, J.D., De Gennes, P.G. (1991). Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. simplified theory. *J Colloid Interface Sci.* 142,149-158.

Joule, J.A., Mills, K. (2010). Introduction to the chemistry of pyrrole. *Heterocyclic Chemistry*, Oxford.

Kabanov, A.V., Alakhov, V.Y. (2002). Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 19, 1-72.

Kadish, K.M., Smith, K.M., Guillard, R. (2010). *Handbook of Porphyrin Science: with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine (volume 2)*. World Scientific.

Kalkanis, S.N., Kondziolka, D., Gaspar, L.E., Burri, S.H., Asher, A.L., Cobbs, C.S., Ammirati, M., Robinson, P.D., Andrews, D.W., Loeffler, J.S., McDermott, M., Mehta, M.P., Mikkelsen, T., Olson, J.J., Paleologos, N.A., Patchell, R.A., Ryken, T.C., Linskey, M.E. (2010). The role of surgical resection in the management of newly diagnosed brain metastases: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol.* 96, 33-43.

Kamarulzaman, E.E., Mohd Gazzali, A., Acherar, S., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., Boura, C., Chaimbault, P., Sibille, E., Wahab, H.A., Vanderesse, R. (2015). New Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1 for Anti-Vascular Targeted Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci* 16, 24059-24080.

Kang, C.C., Chen, C.T., Cho, C.C., Lin, Y.C., Chang, C.C., Chang, T.C. (2008). A dual selective antitumor agent and fluorescence probe: the binary BMVC-porphyrin photosensitizer. *Chem Med Chem.* 3, 725-728.

Kataoka, K., Matsumoto, T., Tokohama, M., Okano, T., Sakurai, Y. (2000). Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(b-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J Control Release.* 64, 143-153.

Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release.* 120, 18-26.

Kokotov, S., Lewi, A., Neumann, R., Amrusi, S. (1994). X-ray induced visible luminescence of porphyrins. *Photochem Photobiol.* 59, 385-387.

- Konan, Y.N., Gurny, R., Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 66, 89-106.
- Koo, H., Huh, M.S., Sun, I.C., Yuk, S.H., Choi, K., Kim, K., Kwon, I.C. (2011). In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. *Acc Chem Res*. 44, 1018-1028.
- Korbelik, M., Cecic, I. (1999). Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Lett*. 137, 91-98.
- Korbelik, M., Parkins, C.S., Shibuya, H., Cecic, I., Stratford, M.R.L., Chaplin, D.J. (2000). Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 82, 1835-1843.
- Krosli, G., Korbelik, M., Dougherty, G.J. (1995). Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 71, 549-555.
- Kulk, U., Schaffer, M., Siefert, A., Schaffer, P.M., Olsner, A., Kasseb, K., Hofstetter, A., Duhmke, E., Jori, G. (2003). Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay. *Biochem Biophys Res Commun*. 311, 98-103.
- Kumar, P.S., Ramakrishna, S., Saini, T.R., Diwan, P.V. Influence of microencapsulation method and peptide loading on formulation of poly(lactide-co-glycolide) insulin nanoparticles. *Pharmazie*. 61, 613-617.
- Lebard, L. (1902). L. Action de la lumière sur la toxicité de l'Eosine et de quelques autres substances pour les paramécies, *Ann Inst Pasteur*. 16, 587-594.
- Lechevallier, S. (2010). Synthèse et caractérisation de nanoparticules luminescentes à base de lanthanides : vers de nouveaux bio-marqueurs. Doctorat.
- Lee, H.C., Li, F., Iwamoto, K., Dadok, J., Bothnerby, A.A., Lindsey, J.S. (1995). Synthetic Approaches to Regioisomerically Pure Porphyrins Bearing Four Different meso-substituents. *Tet Lett*. 51, 11645-11672.
- Letchford, K., Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 65, 259-269.
- Leznoff, C., Marcuccio, S.M., Greenberg, S., Lever, A.B.P., Tomer, B. (1985). Metallophthalocyanine Dimers Incorporating Five Atom Covalent Bridges. *C Can J Chem*. 63, 623-632.
- Leznoff, C.C., Svirskaya, P.I. (1978). The Synthesis of Unsymmetrical Tetraarylporphyrins on Solid Phases. *Angew Chem Int Ed Engl*. 17, 947-947.
- Li, Y., Hu, M., Qi, B., Wang, X., Du, Y. (2011). Preparation and Characterization of Biocompatible Quaternized Chitosan Nanoparticles Encapsulating CdS Quantum Dots. *J Biotechnol Biomaterial*. 1, 1000108-1000114;
- Lindsey, J. (1999). Synthesis of meso-substituted porphyrins. *The Porphyrins Handbook*.

- Lindsey, J.S. (1989). Synthetic approaches to molecular devices (Molecular Electronic- Science and Technology), 221, A Aviram, Engeneering Foundation.
- Lindsey, J.S. (1994). The Synthesis of Meso-Substituted Porphyrins. *Metporphy Cata Oxi.* 17, 49-86.
- Lindsey, J.S., Hsu, H.C., Schreiman, I.C. (1986). Synthesis of Tetraphenylporphyrins Under Very Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* 27, 4969-4970.
- Lindsey, J.S., Schreiman, I.C., Hsu, H.C., Kearney, P.C., Marguerettaz, A.M. (1987). Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins Under Equilibrium Conditions. *J Org Chem.* 52, 827-836.
- Lipson, R.L., Baldes, E.J. (1960). The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol.* 82, 508-516.
- Lipson, R.L., Baldes, E.J., Olsen, A.M. (1964). Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Dis Chest.* 46, 676-679.
- Liu, Y., Chen, W., Wang, S., Joly, AG. (2008). Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Appl Phys Lett.* 92, 043901-043903.
- Luksiene, Z., Kalvelyte, A., Supino, R. (1999). On the combination of photodynamic therapy with ionizing radiation. *J Photochem Photobiol B.* 52, 5235-5242.
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer.* 5, 161-171.
- Madani, I., De Neve, W., Mareel, M. (2008). Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bull cancer.* 95, 292-300.
- Maggiorella, L., Barouch, G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch, E., Bourhis, J., Borghi, E., Levy, L. (2012). Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol.* 8, 1167-1181.
- Mathai, S., Smith, T.A., Ghiggino, K.P. (2007). Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 6, 995-1002.
- Metcalf, D., Robinson, C., Devine, D., Wood, S. (2006). Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 58, 190-192.
- Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Dose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S. (2005). Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science.* 307, 538-544.
- Milanesi, C., Zhou, C., Biolo, R., Jori, G. (1990). Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis. *Br J Cancer.* 61, 846-50.
- Mittal, V.V., Patel, S.J., Sheth, S.K. (2010). Development and characterization of folate targeted nanoparticle drug delivery system. *IJPBS.* 1, 1-12.

- Montazerabadi, A.R., Sazgarnia, A., Bahreyni-Toosi, M.H., Ahmadi, A., Aledavood, A. (2012). The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. *J Photochem Photobiol B: Bio.* 109, 42-49
- Montierth, J.M., Duran, A.G., Leung, S.H., Smith, K.M., Schore, N.E. (2000). The polymer-supported MacDonald-type porphyrin synthesis: coupling of two dissimilar dipyrromethanes. *Tet Lett.* 41, 7423-7426.
- Moreno, M.J., Monson, E., Reddy, R.G., Rehemtulla, A., Ross, B.D., Philbert, M., Schneider, R.J., Kopelman, R. (2003). Production of singlet oxygen by Ru(dpp(SO₃)₂)₃ incorporated in polyacrylamide PEBBLES. *Sens Actuator B-Chem.* 90, 82–89.
- Morgan, N.Y., Kramer-Marek, G., Smith, P.D., Camphausen, K., Capala, J. (2009). Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers: calculation of required physical parameters. *Radiat Res.* 171, 236-244.
- Nascimento, B.F.O., d'A Rocha Gonsalves, A.M., Pineiro, M. (2010). MnO₂ instead of quinones as selective oxidant of tetrapyrrolic macrocycles. *Inorg Chem Commun.* 13, 395-398.
- Neuwelt, E.A., Hamilton, B.E., Varallyay, C.G., Rooney, W.R., Edelman, R.D., Jacobs, P.M., Watnick, S.G. (2009). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int.* 75, 465-474.
- Nicolas, J., Couvreur, P. (2009). Synthesis of poly (alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 1, 111-127.
- Oh, J.K., Siegwart, D.J., Lee, H.I., Sherwood, G., Peteanu, L., Hollinger, J.O., Kataoka, K., Matyjaszewski, K. (2007). Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *J Am Chem Soc.* 129, 5939-5945.
- Oliver, S.W., Thomas, D.S. (1987). Oligomeric cyclization of dinitriles in the synthesis of phthalocyanines and related compounds: the role of the alkoxide anion. 2, 1579-1582.
- Onconano. 2013. «Nanotechnologie au service de la lutte contre le cancer». Site internet, <http://onconano2.webnode.fr/traitement-du-cancer/vectorisation/les-liposomes/>
- Osseni, S.A., Lechevallier, S., Verelst, M., Perriat, P., Dexpert-Ghys, J., Neumeyer, D., Garcia, R., Mayer, F., Djanashvili, K., Peters J.A., Magdeleine, E., Gros-Dagnac, H., Celsis, P., Mauricot, R. (2014). Gadolinium oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T2-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence. *Nanoscale.* 6(1), 555-564.
- Osseni, S.A., Lechevallier, S., Verelst, M., Dujardin C., Dexpert-Ghys, J., Neumeyer, D., Leclercq, M., Baaziz, H., Cussac, D., Santran, V., Mauricot, R. (2011). New nanoplatfrom based on Gd₂O₂S:Eu³⁺ core: synthesis, characterization and use for in vitro bio-labelling. *J Mater Chem.* 21, 18365-18372.
- Pansare, V., Hejazi, S., Faenza, W., Prud'homme, R.K. (2012). Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores and Multifunctional Nano Carriers. *Chem mater.* 24, 812-827.

Park, C.M., Park, M.J., Kwak, H.J., Lee, H.C., Kim, M.S., Lee, S.H., Park, I.C., Rhee, C.H., Hong, S.I. (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/ epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer res.* 66, 8511-8519.

Park, Y., Min Kim, H., Hyun Kim, J., Chul Moon, K. , Yoo, B., Lee, K.T., Lee, N., Choi, Y., Park, W., Ling, D., Na, K., Moon, W.K., Choi, S.H. , Park, H.S., Yoon, S.Y., Suh, Y.D., Lee, S.H., Hyeon, T. (2012). Theranostic Probe Based on Lanthanide-Doped Nanoparticles for Simultaneous In Vivo Dual-Modal Imaging and Photodynamic Therapy. *Adv Mater.* 24, 5755–5761.

Patchell, R.A., Tibbs, P.A., Regine, P.W., Dempsey, R.J., Mohiuddin, M., Kryscio, R.J., Markesbery, W.R., Foon, K.A., Young, B. (1998). Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA.* 280, 1485-1489.

Peng, Q., Nesland, J.M., Moan, J., Evensen, J.F., Kongshaug, M., Rimington, C. (1990). Localization of fluorescent Photofrin II and aluminum phthalocyanine tetrasulfonate in transplanted human malignant tumor LOX and normal tissues of nude mice using highly light-sensitive video intensification microscopy. *Int J Cancer.* 45, 972-979.

Perutz, M.F. (1979). Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu Rev Biochem.* 48, 327-386.

Petit, A., Loup, A., Maillard, P., Momenteau, M. (1992). *Synth Commun.* 22, 1137-1142.

Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P. (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents.* 13, 155-168.

Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 24, 259-268.

Podlogar, F., Gasperlin, M., Tomsic, M., Jamnik, A., Rogac, MB. (2004). Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm.* 276, 115-128.

Policard, A. (1924). Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C R Soc Biol.* 91, 1423-1424.

Porcel, E., Liehn, S., Remita, H., Usami, N., Kobayashi, K., Furusawa, Y., Le Sech, C., Lacombe, S. (2010). Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy. *Nanotechnology.* 21, 85103-85110.

Raab, O. (1900). Über die Wirkung, fluorescirender Stoffe auf infusorien. *Z. Biol.* 39, 524-546.

Ran, C.Z., Zhang, Z.D., Hooker, J., Moore, A. (2012). In Vivo Photoactivation Without "Light": Use of Cherenkov Radiation to Overcome the Penetration Limit of Light. *Mol Imaging Biol.* 2, 156-162.

Rayons Santé, 2013 « Les rayonnements et la traversée de la matière ». Site internet, <http://rayons-sante.com/rayonnements-sante/les-rayonnements-et-la-traversee/article/que-font-les-rayons-x-en>

- Rétif, P., Pinel, S., Toussaint, M., Frochot, C., Chouikrat, R., Bastogne, T., Barberi-Heyob, M. (2015). Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics*. 5, 1030-1044.
- Rodnyi, P.A. (2007). *Physical Processes in Inorganic Scintillators (Laser & Optical Science & Technology)*. CRC Press.
- Roeder, B., Naether, D., Lewald, T., Braune, M., Nowak, C., Freyer, W. (1990). Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. *Biophys Chem*. 35, 303-312.
- Roots, R., Okada, S. (1975). Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res*. 64, 306-320.
- Rothmund, P., Menotti, A.R. (1941). Porphyrin Studies. IV. 1 The Synthesis of α , β , γ , δ -Tetraphenylporphine. *J Am Chem Soc*. 63, 267-327.
- Roy, I., Ohulchansky, T.Y., Pudavar, H.E., Bergey, E.J., Oseroff, A.R., Morgan, J., Dougherty, T.J., Prasad, P.N. (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water insoluble photosensitizing anticancer drugs : a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc*. 125, 7860-7765.
- Sahoo, S.K., Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*. 8, 1112-1120.
- Schaffer, M., Schaffer, P.M., Corti, L., Gardiman, M., Sotti, G., Hofstetter, A., Jori, G., Dühmke, E. (2002). Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model. *J Photochem Photobiol B*. 66, 157-164.
- Schreiber, S., Gross, S., Brandis, A., Harmelin, A., Rosenbach-Belkin, V., Scherz, A., Salomon, Y. (2002). Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *Int J Cancer*. 99, 279-285.
- Schwartz, S., Absolon, K., Vermund, H. (1955). Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. *Bull Minn Univ School Med*. 27, 7-13.
- Seki, J., Sonoke, S., Saheki, A., Fukui, H., Sasaki, H., Mayumi, T. (2004). A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting. *Int J Pharm*. 273, 75-83.
- Sharman, V.M., Allen, C.M., van Lier, J.E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 4, 507-517.
- Silver, H. (1937). Psoriasis vulgaris treated with hematoporphyrin. *Arch Dermatol Syphilol*. 36, 1118-1119.
- Sobolev, A.S., Jans, D.A., Rosenkranz, A.A. (2000). Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Prog Biophys Mol Biol*. 73, 51-90.
- Sommerauer, M., Rager, C., Hanack, M. (1996). Separation of 2(3),9(10),16(17),23(24)-Tetrasubstituted Phthalocyanines with Newly Developed HPLC Phases. *J Am Chem Soc*. 118, 10085-10093.

Stallivieri, A. (2015). Synthèse de systèmes à base de photosensibilisateurs pour l'amélioration de la sélectivité tumorale en thérapie photodynamique. Thèse de doctorat.

Starkey, J.R., Rebane, A.K., Drobizhev, M.A., Meng, F., Gong, A., Elliott, A., McInnerney, K., Spangler, C.W. (2008). New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clin Cancer Res.* 14, 6564-6573.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 108, 303-318.

Takahashi, H., Nakajima, S., Asano, R., Nakae, Y., Sakata, I., Iizuka, H. (2009). Photodynamic therapy using a novel photosensitizer, EC036, is more effective compared with ATX-S10(Na) photodynamic therapy. *J Dermatol Sci.* 55, 130-132.

Tardivo, J.P., Del Giglio, A., de Oliveira, C.S., Gabrielli, D.S., Junqueira, H.C., Tada, D.B., Severino, D., de Fátima Turchiello, R., Baptista, M.S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2, 175-191.

Torres, T. (2000). Perspectives in the selective synthesis of phthalocyanines and related compounds. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 4, 325-330.

Tozer, G.M., Bicknell, R. (2004). Therapeutic targeting of the tumor vasculature. *Semin Radiat Oncol.* 14, 222-232.

Tozer, G.M., Kanthou, C., Baguley, B.C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer.* 5, 423-435.

U. Boas, P.M. (2004). Heegaard, Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev.* 33, 43-63.

Vauthier, C., Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res.* 26, 1025-1058.

Vauthier, C., Cabane, B., Labarre, D. (2008). How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation?, *Eur J Pharm Biopharm.* 69, 466-475.

Vauthier, C., Labarre, D., Ponchel, G. (2007). Design aspects of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *J Drug Target.* 15, 641-663.

Verhille, M. (2012). Conception, élaboration et caractérisation photophysiques et biochimiques de molécules photoactivables pour la thérapie. Thèse de Doctorat.

Viana, B. (2011). Cristaux et céramiques transparentes comme matériaux scintillateurs pour l'imagerie médicale. EDP Sciences. UVX-2010 colloque, 153-159.

Vinogradov, S.V., Bronich, T.K., Kabanov, A.V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 54, 135-147.

Von Braun, A., Tcherniak, J. (1907). *Ber Dtsch Chem Ges.* 40, 2709-2714.

- Von Tappeiner, H., Jesionek, H. (1903). Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Munch Med Wochenschr.* 47, 2042-2044.
- Von Tappeiner, H., Jodlbauer, A. (1904). Uber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Dtsch Arch Klin Med.* 80, 427-487.
- Vonarx, V., Eleouet, S., Carre, J., Ioss, P., Gouyette, A., Leray, A.M., Merle, C., Lajat, Y., Patrice, T. (1997). Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid bioadhesive gel formulation for the photodynamic treatment of lesions of the gastrointestinal tract in mice. *J Pharm Pharmacol.* 49, 652-656.
- Wan, Y. (2012). Développement de nanovecteurs polymériques et lipidiques fonctionnalisés par des anticorps pour cibler des cellules cancéreuses. Doctorat
- Weber, M.J. (2004). Scintillation: mechanisms and new crystals. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A.* 52, 9-14.
- Whitlock, H.W., Hanauer, R., Oester, M.Y., Bower, B.K. (1969). Diimide reduction of porphyrins. *J Am Chem Soc.* 91, 7485-7489.
- Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Li, Y., Wu X.Y. (2007). Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 59, 491-504.
- Woodward, R.B. (1960). Total synthesis of chlorophylls. *Angew Chem.* 72, 651-662.
- Wyld, L., Reed, M.W., Brown, N.J. (2001). Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer.* 84, 1384-1386.
- Xia, W., Low, P.S. (2010), Folate-targeted therapies for cancer. *J Med Chem.* 53, 6811-6824.
- Yamamoto, N., Homma, S., Sery, T.W., Donoso, L.A., Hooper, J.K. (1991). Photodynamic immunopotential: in vitro activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light. *Eur J Cancer.* 27, 467-471.
- Yaseen, M., Mukhtar, A., NajeebUllah, M., Munawar, M.A., Khokhar, I. (2009). Microwave-assisted synthesis, metallation, and duff formylation of porphyrins. *J Heterocycl Chem.* 46, 251-255.
- Zhang, Y., Chen, Y. (2012). Fmoc-Cl fluorescent determination for amino groups of nanomaterial science. *IET Nanobiotechnol.* 6, 76-80.

Liste des publications et des communications

Chouikrat R., Baros F., André J.C, Vanderesse R., Viana B., Bulin A.L., Arnoux P., Verelst M., Frochot C. *Photosensitizer-conjugated lanthanide nanoparticles for photodynamic therapy by X-ray excitation*. (2015) (En cours de rédaction).

Chouikrat R., Champion A., Vanderesse R., Frochot C., Moussaron A. *Microwave-assisted synthesis of zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin and zinc 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin*, JPP., 19, 595–600 (2015).

Retif P., Pinel S., Frochot C., Toussaint M., Chouikrat R., Bastogne T., Barberi-Heyob M. *Nanoparticles for radiation therapy enhancement: the key parameters*, Theranostics., 5(9), 1030-1044 (2015).

Chouikrat R., Sève 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., 19(6), 781-92 (2012).

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., 117(41), 21583-21589 (2013)

Djefal-Kerrar A., Ouallouche Abdoune K., Chouikrat R., Guendouz Y.E., Nacer Khodja A., Mahlous M. *Study of Bacterium Fixation Stability on Gamma Radiation Synthesized Carriers to Improve Degradation*, J. Bioremed. Biodeg., 2(2), 1000117 (2011)

Communication orale, internationale

Chouikrat R., Truillet C., Bulin A.L., Vanderesse R., Verelst M., Lux F., Dujardin C., Tillement O., Barberi-Heyob M., Frochot C., *Multifunctional nanoparticles excitable in X-rays for applications in photodynamic therapy*, 10th international Symposium on “photodynamic therapy and Photodiagnosis in Clinical Practise”, Brixen, Italie, 16-20 octobre 2012.

Communication orale, nationale

Chouikrat R., Seve A., Vanderesse R., Arnoux P., Osseni S.A., Verelst M., Barberi-Heyob M., Frochot C., *Nanoparticules multifonctionnelles excitables en rayons X pour des applications en thérapie photodynamique*, Nanohybrides, Come, 20-24 mai 2012.

Communications par poster, nationales

Chouikrat R., Vanderesse R., Verelst M., Barberi-Heyob M., Frochot C., *Nanoparticules multifonctionnelles excitables par rayons X pour des applications en thérapie photodynamique*, Nanohybrides, Porquerolles, 12-16 mai 2013.

Chouikrat R., Sève A., Vanderesse R., Arnoux P., Baros F., Verelst M., Frochot C., *Nanoparticules multifonctionnelles excitables en rayons X pour des applications en thérapie photodynamique anticancéreuse*, Séminaire école doctorale, 20 Janvier 2012.

Résumé

La Thérapie Photodynamique ou PDT est une méthode de traitement principalement anti-cancéreux. Elle est basée sur l'activation par la lumière de molécules photosensibles, appelés photosensibilisateurs, non toxiques à l'obscurité. Après excitation lumineuse et en présence d'oxygène, elles génèrent des espèces réactives de l'oxygène dont l'oxygène singulet, qui engendrent des réactions de photo-oxydation entraînant la mort cellulaire. Cette méthode est cliniquement appliquée en France et dans plusieurs pays du monde mais présente toutefois certaines limites comme la faible profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus. Elle ne peut donc s'appliquer qu'aux tumeurs de surface telles que les kératoses actiniques et aux tumeurs de petite taille accessibles à la lumière.

Pour traiter les tumeurs profondes par PDT, nous proposons une stratégie innovante basée sur l'utilisation de rayons X, très connus pour leur pouvoir pénétrant. Comme la plupart des photosensibilisateurs ne sont pas radiosensibles, ils ne peuvent être excités directement par les rayons X. Les récentes avancées en nanotechnologie nous ont amené à envisager une stratégie thérapeutique novatrice pouvant combiner les principes de la PDT et la radiothérapie *via* l'élaboration de scintillateurs nanoparticulaires excitables par rayons X. Le concept consiste à utiliser des nanoparticules contenant dans leur cœur un scintillateur qui, excité par des rayons X, peut émettre des photons, qui, à leur tour, sont réabsorbés par le photosensibilisateur lui-même conjugué à la nanoparticule. C'est dans ce contexte que nous avons développé des nanoparticules $Gd_2O_2S : Eu^{3+}$, possédant dans leur cœur du gadolinium (agent permettant le rehaussement positif du signal IRM) dopé avec de l'euporium ou du terbium (pour une l'absorption des RX) et conjugués à des photosensibilisateurs (porphyrine, chlorine zinguée et phtalocyanine zinguée). D'autres nanoparticules TbO_3 , de plus petite taille, possédant dans leur cœur de l'oxyde de terbium, enrobé d'une couche de polysiloxane dans laquelle est incorporée de la porphyrine ont aussi été synthétisées et étudiées. Ces nanoparticules offrent à la fois une possibilité d'effet radiothérapie, d'effet PDT, tout en offrant la possibilité de visualiser les tumeurs par IRM.

Nous avons mis au point un protocole de synthèse permettant d'obtenir la porphyrine avec de bons rendements tout en limitant le temps de synthèse et les étapes de purification. Les synthèses et purifications des nanoparticules ont été optimisées. Les caractérisations physico-chimiques et photophysiques des nanoparticules ont été réalisées, en particulier leur capacité à produire de l'oxygène singulet. L'efficacité du transfert d'énergie entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs dans le but d'obtenir un effet PDT a été évaluée et des essais préliminaires sous excitation par rayons X ont été entrepris.

Mots clés : Thérapie photodynamique, radiothérapie, nanoparticules, $Gd_2O_2S : Eu^{3+}$ (5%), rayons X, photosensibilisateurs.

Abstract

PDT or photodynamic therapy is a method mainly used against cancer. PDT is based on the activation by light of photosensitive molecules, called photosensitizers, non-toxic in the dark. After excitation by light in the presence of oxygen, the photosensitizers generate reactive oxygen species including singlet oxygen, which lead to photo-oxidation reactions and cell death. This method is clinically applied in France and in several countries of the world but still has some limitations such as the low depth of light penetration in tissues. It therefore can be applied only to surface tumors such as actinic keratoses and small tumors accessible to laser light.

To treat deep tumors by PDT, we propose an innovative strategy based on the use of X-rays known for their penetrating power. Since most photosensitizers are not radiosensitive, they cannot be excited by X-rays. Recent advances in nanotechnology have led us to consider a novel therapeutic strategy that can combine both the principles of PDT and radiotherapy through the development of scintillator containing nanoparticles excitable by X-rays. The concept is to use the scintillator included in the nanoparticle's core which, excited by X-rays, can emit photons, which, in turn, can be re-absorbed by the photosensitizer itself conjugated to the nanoparticles. It is in this context that we developed nanoparticles of $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$, with in their core gadolinium (which is a MRI positive enhancement agent) doped with europium or terbium (for RX absorption) and coupled with photosensitizers (porphyrin, zinc chlorin and zinc phthalocyanine).

We have developed a synthesis protocol for obtaining the porphyrin in good yields while limiting the time of synthesis and purification steps. The syntheses and purifications of nanoparticles were optimized. The physicochemical and photophysical characterization of the nanoparticles were performed, in particular their ability to produce singlet oxygen. Other Tb_2O_3 nanoparticles of smaller size, coated with a polysiloxane layer coupled to porphyrin have also been synthesized and studied. These nanoparticles offer both an opportunity for radiotherapy effect of PDT effect, while providing the ability to be detected by MRI. The efficiency of energy transfer between the nanoparticles and the photosensitizers in order to obtain a PDT effects was assessed and preliminary tests under X-ray excitation were undertaken.

Keywords : Photodynamic therapy, radiation therapy, nanoparticles, $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S} : \text{Eu}^{3+}$ (5%), X rays, photosensitizers.