



HAL
open science

Développement de nouvelles plateformes pour l'amélioration du traitement du glioblastome par thérapie photodynamique

Ludivine Larue

► **To cite this version:**

Ludivine Larue. Développement de nouvelles plateformes pour l'amélioration du traitement du glioblastome par thérapie photodynamique. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT: 2021LORR0045 . tel-03338347

HAL Id: tel-03338347

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03338347>

Submitted on 8 Sep 2021

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>

Université de Lorraine

Ecole doctorale SIMPPE (Sciences et Ingénierie des Molécules, des Produits, des Procédés et de l'Energie)

Thèse

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : « Génie des Procédés et des Produits et des Molécules »

Développement de nouvelles plateformes pour l'amélioration du traitement du glioblastome par thérapie photodynamique

Par Ludivine LARUE

Présentée et soutenue publiquement le 4 février 2021

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Muriel AMBLARD	DR CNRS, IBMM, Université de Montpellier
	Valérie HEITZ	Professeur, LSAMM, Université de Strasbourg
Examineurs :	Cédric BOURA	MdC, CRAN, Université de Lorraine
	Serge MORDON	DR INSERM, OncoThAI, Université de Lille
	Céline FROCHOT	DR CNRS, LRGP, Université de Lorraine (Directrice de thèse)
	Samir ACHERAR	MdC, LCPM, Université de Lorraine (Co-directeur de thèse)
Invités :	Sylvain MARQUE	Professeur, ICR, Université Aix Marseille
	Bertrand VILENO	CR CNRS, Laboratoire POMAM, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Laurent Falk**, directeur du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), et **Alain Durand**, directeur du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je remercie le **Pr Valérie Heitz** et le **Dr Muriel Amblard** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et également le **Pr Serge Mordon**, le **Dr Cédric Boura**, le **Pr Sylvain Marque** et le **Dr Bertrand Vileno** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse, **Céline Frochot** et mon co-directeur de thèse, **Samir Acherar**. Merci pour votre confiance et toutes les connaissances et expériences que vous avez partagées. **Céline**, merci pour ta bienveillance et ta gentillesse et surtout d'avoir cru en moi, de m'avoir aidé à surmonter les aléas de ces trois années et de m'avoir appris à canaliser mes idées. **Samir**, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres de la **PDTeam**, anciens et nouveaux, sans qui ces trois années n'auraient pas été les mêmes : **Albert, Amina, Bauyrzhan, Bibigul, Laurène, Ludo, Mathilde, Magali, Maxat, Philippe, Régis, Yasmin, Zahraa...** Merci pour votre soutien, vos conseils et tous les bons moments passés avec vous. **Philippe**, un grand merci pour ta gentillesse, pour avoir toujours été disponible pour répondre à mes « nombreuses » questions, réparer les appareils non coopératifs ou tout simplement pour discuter. **Régis**, nous n'avons eu que peu l'occasion de travailler ensemble mais j'ai apprécié toutes nos discussions et je suis reconnaissante pour l'aide que tu m'as apportée. Merci également à **Valérie Jouan Hureaux** pour tes conseils et ton aide.

Je souhaite ensuite remercier les membres du LCPM avec qui j'ai pu échanger, pour les discussions et conseils, **Djallal, Loïc, Olivier, Tristan**.

Un grand merci aux membres de mon « couloir » au LRGP, pour les pauses café, les repas, les parties de UNO ou simplement les discussions au détour d'un couloir : **Frédérique, Olivier, Pierre-Alexandre, Valérie, Yann, Yves...** et les doctorants et post-doctorants, anciens et actuels, **Aleix, Batukhan, Bilel, Duy, Hatem, Isma, Jonathan, Juan Carlos, Lucia, Maroua, Matieyendou, Nicolas, Perizat, Selima, Susu, Sylvain, Thomas, Zaki...**

Je souhaite remercier également les membres du BJC, anciens et nouveaux, pour tous les moments passés au laboratoire mais aussi pour les soirées autour d'un verre ou d'un billard.

Merci mon **antillais de l'île Saint-Laurent** et ma **Mama italienne** pour votre aide, d'avoir toujours su me remonter le moral lorsque mes expériences étaient capricieuses, pour toutes nos discussions et tout simplement pour votre bonne humeur au quotidien. Merci ma **tartif** pour ton aide et ton soutien précieux pour cette fin de thèse et tous les moments passés ensemble.

Un grand merci également à **Clément, Laetitia, Louise, Lubin, Ophélie, Sylvain et Yohann** pour toutes les repas ou soirées passés ensemble, indispensables durant ces 3 ans. **Laetitia** merci pour ta gentillesse, ton soutien et toute l'aide précieuse que tu as su m'apporter. **Louise**, tu n'étais pas ma stagiaire mais tu as toujours su m'apporter ton soutien.

Merci à mes parents et **mon frère**, d'avoir toujours cru en moi et pour votre soutien. **Maman et Papa**, merci de m'avoir toujours encouragée à atteindre mes objectifs et appris à toujours persévérer. Merci de m'avoir permis d'en être là.

Sommaire

REMERCIEMENTS	III
SOMMAIRE	V
ABREVIATIONS	XI
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XXI
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE POUR TRAITER LE CANCER.....	7
I. CANCER	9
1.1. <i>Epidémiologie</i>	9
1.2. <i>Qu'est-ce que le cancer ?</i>	9
1.3. <i>Diagnostic</i>	12
1.4. <i>Traitements</i>	14
1.4.1. La chirurgie	14
1.4.2. La radiothérapie	15
1.4.3. La chimiothérapie	15
1.4.4. L'immunothérapie.....	15
1.4.5. L'hormonothérapie.....	16
1.5. <i>Cas des tumeurs cérébrales</i>	16
1.5.1. Anatomie du cerveau	16
1.5.2. Epidémiologie	17
1.5.3. Classification des tumeurs cérébrales primitives	18
1.6. <i>Cas du glioblastome multiforme</i>	18
1.6.1. Causes et symptômes	18
1.6.2. Diagnostic et traitements	19
1.6.2.1. Diagnostic	19
1.6.2.2. Modalités de traitement classiques	19
1.6.2.3. Traitement par PDT	20
II. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)	21
II.1. <i>Découverte de l'effet photodynamique et application pour le traitement du cancer</i>	21
II.2. <i>La PDT pour le traitement du cancer</i>	23
II.3. <i>Mécanismes photophysiques</i>	23
II.3.1. Photoréactions de type I.....	25
II.3.2. Photoréactions de type II	26
II.3.3. Paramètres	26
II.4. <i>Lumière</i>	27
II.4.1. Paramètres utilisés dans le choix de la source lumineuse.....	27
II.4.2. Sources lumineuses utilisées en PDT	29
II.4.2.1. Le soleil.....	30
II.4.2.2. Lasers	30

II.4.2.3. Lampes.....	30
II.4.2.4. Diodes électroluminescentes (DELs).....	31
II.5. <i>Photosensibilisateurs (PSs) utilisés en PDT</i>	31
II.5.1. Caractéristiques d'un bon photosensibilisateur (PS).....	31
II.5.2. Première génération.....	31
II.5.3. Seconde génération.....	32
II.5.3.1. Foscan®.....	33
II.5.3.2. Acide 5-aminolévulinique (ALA) et ses dérivés.....	34
II.5.3.3. Visudyne®.....	35
II.5.3.4. Tookad®.....	36
II.5.3.5. Autres PSs de seconde génération.....	36
II.5.4. Troisième génération.....	37
II.5.5. Quatrième génération.....	37
III. LIMITES DE LA PDT.....	38
III.1. <i>Pénétration de la lumière</i>	38
III.1.1. Excitation biphotonique dans le proche infrarouge.....	38
III.1.2. Utilisation des rayons X.....	40
III.2. <i>Ciblage</i>	40
III.2.1. Ciblage passif.....	41
III.2.2. Ciblage actif.....	43
III.2.2.1. Ciblage actif direct.....	44
III.2.2.1.i. Récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF).....	44
III.2.2.1.ii. Récepteur de l'œstrogène.....	44
III.2.2.1.iii. Récepteur à l'acide folique.....	45
III.2.2.2. Ciblage actif indirect.....	45
III.2.2.2.i. Intégrine $\alpha_v\beta_3$	45
III.2.2.2.ii. Récepteur du VEGF (<i>Vascular endothelial growth factor</i>).....	46
III.2.2.2.iii. Le récepteur NRP-1.....	47
Structure et fonction de NRP-1.....	47
Rôle de NRP-1 dans le développement de tumeurs.....	48
Ciblage de NRP-1.....	49
III.3. <i>Nécessité en oxygène</i>	49
III.3.1. Stratégies pour combattre l'hypoxie.....	49
III.3.2. Utilisation d'alcoxyamines photoactivables en PDT.....	50
IV. OBJECTIFS DE LA THESE.....	52
V. REVUE.....	54

CHAPITRE II : LA PDT CIBLEE ET INDEPENDANTE DE L'OXYGENE : UNE PREUVE DE CONCEPT..... 171

I. CIBLAGE DU RECEPTEUR NRP-1 PAR DES PEPTIDES.....	173
II. LES ALCOXYAMINES PHOTOACTIVABLES.....	174
III. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	175
IV. SYNTHÈSE ET PURIFICATION DES COMPOSÉS.....	176
IV.1. <i>Synthèse peptidique en phase solide (SPPS)</i>	176

IV.1.1.	Principe.....	176
IV.1.2.	Stratégies de synthèse et résines utilisées	178
IV.1.3.	Suivi de la SPPS.....	182
IV.1.3.1.	Dosage du groupement Fmoc	182
IV.1.3.2.	Tests colorimétriques	183
IV.1.3.3.	Micro-clivage.....	183
IV.1.3.4.	Capping.....	184
IV.1.4.	Agents de couplage.....	184
IV.1.4.1.	Les carbodiimides	184
IV.1.4.2.	Sels de phosphonium.....	186
IV.1.4.3.	Sels d'uronium	187
IV.1.5.	Clivage.....	189
IV.2.	<i>Synthèse des composés</i>	189
IV.2.1.	Synthèse du composé K(Pyro-a)DKPPR (7).....	189
IV.2.2.	Synthèse de la plateforme trimodale AlCl ¹ -K(Pyro-a)DKPPR (14).....	191
IV.2.2.1.	Couplage par chimie click	191
IV.2.2.2.	Couplage par SPPS	195
IV.2.3.	Synthèse du composé AlCl ¹ -KDKPPR (16).....	196
IV.3.	<i>Purification par HPLC préparative</i>	197
IV.3.1.	Principe.....	197
IV.3.2.	Purification des composés	198
V.	DETERMINATION DES PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES	201
V.1.	<i>Absorption</i>	201
V.2.	<i>Fluorescence et production d'¹O₂</i>	203
V.3.	<i>Etudes de photoblanchiment</i>	204
VI.	HOMOLYSE DE L'ALCOXYAMINE.....	205
VI.1.	<i>Suivi par HPLC</i>	205
VI.1.1.	Illumination par rayons X.....	205
VI.1.2.	Illumination par la lumière UV	206
VI.2.	<i>Suivi par spectroscopie par Résonance Paramagnétique électronique (RPE)</i>	209
VI.2.1.	Principe.....	209
VI.2.1.1.	Moment magnétique de l'électron	209
VI.2.1.2.	L'effet Zeeman	209
VI.2.2.	RPE des radicaux nitroxydes en régime isotrope.....	211
VI.2.2.1.	Les interactions hyperfines	212
VI.2.3.	Conditions d'illumination	214
VI.2.4.	Homolyse des composés.....	214
VI.2.4.1.	Influence de la concentration.....	215
VI.2.4.2.	Influence de l'oxygénation	217
VI.2.4.3.	Influence de l'intensité lumineuse	218
VI.2.4.4.	Utilisation d'un piègeur radicalaire	219
VII.	TESTS D'AFFINITE.....	221
VIII.	ARTICLE	222
IX.	CONCLUSION	240

CHAPITRE III : AMELIORATION DES PLATEFORMES POUR LE TRAITEMENT DU GLIOBLASTOME	241
I. CONTEXTE ET OBJECTIFS	243
II. AMELIORATION DU CIBLAGE	244
II.1. <i>Tumor-homing peptides</i>	244
II.1.1. Les peptides Lyp-1 et tLyp-1	246
II.1.2. Applications diagnostics et thérapeutique.....	247
II.1.3. Applications en PDT.....	248
II.2. <i>Purification de peptides hydrophiles</i>	249
II.2.1. La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC).....	249
II.2.2. Comparaison entre la chromatographie en phase inverse et l'HILIC sur les peptides KDKPPR et tLyp-1	250
II.3. <i>Alascan</i>	251
II.3.1. Introduction	253
II.3.2. Materials and methods	254
II.3.2.1. Molecular docking simulation.....	254
II.3.2.2. Chemicals and materials.....	255
II.3.2.3. Instruments.....	256
II.3.2.4. Synthesis	256
II.3.2.5. Biological test-binding study of the peptides on recombinant NRP-1 receptor	261
II.3.3. Results and Discussion	262
II.3.3.1. Validation of docking calculations	262
II.3.3.2. Molecular docking.....	262
II.3.3.3. Synthesis and characterization of the peptides	266
II.3.3.4. Affinity for NRP-1	266
II.3.4. Conclusion.....	267
III. AMELIORATION DE LA SOLUBILITE	269
III.1. <i>Utilisation des cyclodextrines</i>	269
III.2. <i>Couplage de la β-CD au peptide et PS</i>	271
III.2.1. Synthèse du composé β -CD-KK(Pyro-a)DKPPR (28).....	271
III.2.2. Amélioration de la solubilité	273
III.2.3. Propriétés photophysiques	273
IV. AMELIORATION DE L'ALCOXYAMINE.....	275
IV.1. <i>Choix de la structure</i>	275
IV.2. <i>Couplage d'Alc2 aux différents peptides</i>	276
IV.2.1. Synthèse du composé Fmoc-K(Alc2) (30)	276
IV.2.2. Essais de couplage de Alc2 au peptide.....	277
IV.3. <i>Homolyse</i>	280
V. CONCLUSION	283
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	285
PARTIE EXPERIMENTALE	291

I. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS DES COMPOSÉS	293
I.1. Produits chimiques	293
I.2. Instruments	293
I.3. Procédures générales	294
I.3.1. SPPS	294
I.3.2. Purification par HPLC préparative	295
I.4. Synthèse du composé ester Pyro-a-NHS (1)	295
I.5. Synthèse du composé Fmoc-K(Pyro-a) (2)	296
I.6. Caractérisation du composé K(Pyro-a)DKPPR (7)	297
I.7. Synthèse de la plateforme trimodale Alc1'-K(Pyro-a)DKPPR (14)	299
I.7.1. Essai de synthèse par chimie click	299
I.7.1.1. Synthèse du composé ester Alc1'-NHS (8)	299
I.7.1.2. Synthèse du composé Alc1'-alcyne (9)	299
I.7.1.3. Synthèse du composé azido-K(Pyro-a)DKPPR (11)	300
I.7.1.4. Synthèse du composé azido-K(Zn-Pyro-a)DKPPR (12)	300
I.7.1.5. Tentative de synthèse du composé Alc1'-click-K(Pyro-a)DKPPR (13)	301
I.7.2. Caractérisation de la plateforme 14 synthétisée par SPPS	301
I.8. Caractérisation du composé Alc1'-KDKPPR (16)	303
I.9. Synthèse du peptide t-Lyp1 et des peptides de l'Alascan	304
I.10. Synthèse du composé Mal-KK(Pyro-a)-DKPPR (27)	304
I.11. Synthèse du composé β -CD-KK(Pyro-a)-DKPPR (28)	306
I.12. Synthèse du composé ester Alc2-NHS (29)	307
I.13. Synthèse du composé Fmoc-K(Alc2) (30)	307
I.14. Essais de synthèse du composé Fmoc-K(Alc2)KDKPPR (31)	308
II. DETERMINATION DES PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES	309
II.1. Absorption	309
II.2. Emission de fluorescence et de luminescence de l^1O_2	309
II.3. Photoblanchiment	310
III. PHOTOLABILITÉ DES ALCOXYAMINES	311
III.1. Dispositifs d'illumination	311
III.1.1. Illumination de Alc1	311
III.1.1.1. Suivi par HPLC – Irradiateur	311
III.1.1.2. Suivi par HPLC – Lampe à vapeur de mercure	311
III.1.1.3. Suivi par RPE – Lampe UV	311
III.1.2. Illumination de Alc2 – Lampe AURA light	311
III.2. Préparations des échantillons	312
III.2.1. Suivi par HPLC	312
III.2.2. Suivi par RPE	312
III.3. Spectroscopie RPE	312
IV. TESTS D’AFFINITÉ LBA	312
V. MODÉLISATION MOLECULAIRE	312
VI. DETERMINATION DES LOG P	312

REFERENCES	315
ANNEXE : LISTE DES PUBLICATIONS	327
ANNEXE : LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	331

Abréviations

^{18}F FDG : [^{18}F]-2-Fluoro-Déoxy-Glucose
 $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$: Etats singulet excités de l'oxygène moléculaire
ALA : Acide 5-aminolévulinique
A : Absorbance
AA : Acide Aminé
ACN : Acétonitrile
AcOEt : Acétate d'éthyle
ACS : *American Chemical Society*
ADN : Acide DéoxyriboNucléique
AF : Acide Folique
Alloc : Allyloxycarbonyle
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
Arg, R : Arginine
Asn, N : Asparigine
Asp, D : Acide aspartique
 B_0 : Champ magnétique externe
BDE : *Bond Dissociation Energy*
Boc : tert-Butoxycarbonyle
BOP : Hexafluorophosphate de 1-H-benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino) phosphonium
Bzl : Benzyle
C : Concentration molaire
c : Vitesse de la lumière
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CD : Cyclodextrine
 CE_{50} : Concentration efficace médiane
CendR : *C-end rule*
CI : Conversion Interne
 CI_{50} : Concentration inhibitrice médiane
CIS : Conversion InterSystème
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
COSY : *COrrrelation SpectroscopY*
CRAB : Chimie Radicalaire Appliquée à la Biologie
CRAN : Centre de Recherche en Automatique de Nancy
CuAAC : Cycloaddition Azoture Alcyne catalysée par le Cuivre (I)
Cys, C : Cystéine
DCC : *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM : Dichlorométhane
Dde : 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyl
DELs : Diodes électroluminescentes
DEPMPO : 5-(diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde
DIC : *N,N*-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA : *N,N*-Diisopropyléthylamine
DMF : Diméthylformamide
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNPH : 2,4-Dinitrophénylhydrazine
DO : Densité optique

EDCI : *N*-Éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
 EDCI·HCl : Hydrochlorate de *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
 EDT : Ethanedithiol
 EGF : *Epidermal Growth Factor*
 EPR : *Enhanced Permeability Effect*
 EtOH : Ethanol
 FITC : Fluorescéine isothiocyanate
 Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyl
 FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
 FRa : Récepteur à l'acide folique
 g : Facteur de Landé
 Gln, Q : Glutamine
 Glu, E : Acide glutamique
 GP : Groupement protecteur
 h : Constante de Planck
 HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
 HATU : Hexafluorophosphate de 1-[bis(diméthylamino)méthylène]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxyde
 HBTU : Hexafluorophosphate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium
 HILIC : *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*
 His, H : Histidine
 HMPA : Hexaméthylphosphoramide
 HMPB : Acide 4-(4-Hydroxyméthyl-3-méthoxyphénoxy)butyrique
 HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole
 HOMO : *Highest Occupied Molecular Orbital*
 HP : Hématoporphyrine
 HpD : Dérivés de l'hématoporphyrine
 HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*
 HRMS : *High Resolution Mass Spectrometry*
 ICR : Institut de Chimie Radicalaire
 IEC : *Ion-exchange Chromatography*
 INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
 iPDT : Thérapie photodynamique interstitielle
 IR : Infrarouge
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
 k_d : Constante de dissociation
 LBA : *Ligand Binding Affinity*
 LC-MS : *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
 LCPM : Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
 LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
 LUMO : *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*
 Lys, K : Lysine
 MBHA : 4-Méthylbenzhydramine
 MeOH : Méthanol
 M_s : Multiplicité de spin
 MS : *Mass Spectrometry*
 MSNs : *Mesoporous Silica Nanoparticles*
*m*THPC : Chlorure 5,10,15,20-tétra(*m*-hydroxyphényl)
*m*THPP : Porphyrine 5,10,15,20-Tétrakis(mésio-hydroxyphényl)
 Mtt : 4-méthyltrityl

NHS : *N*-hydroxysuccinimide
 NIR : *Near InfraRed*
 NMP : *N*-Méthyl-2-pyrrolidone
 NPLC : *Normal Phase Liquid Chromatography*
 NPs : Nanoparticules
 NRP : Neuropiline
 NRP-1 : Récepteur de la Neuropiline-1
 NRP-2 : Récepteur de la Neuropiline-2
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 OMRI : *Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging*
 P1-COOH : Porphyrine 4-carboxyphényl
 Pbf : Pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
 PBS : *Phosphate Buffered Saline*
 PDT : Thérapie photodynamique
 PEG : Polyéthylène glycol
 Pmc : 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl
 PpIX : Protoporphyrine IX
 PS : Photosensibilisateur
 PSA : Antigène prostatique spécifique
 PyAOP : Hexafluorophosphate de (7-azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium
 PyBOP : Hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium
 PyCloP : Hexafluorophosphate de chlorotripyrrolidinophosphonium
 Pyro-a : Pyrophéophorbide a
 RBA : *Receptor Binding Affinity*
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène
 RP : *Reverse Phase*
 RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
 RPLC : *Reverse Phase Liquid Chromatography*
 RV : Relaxation Vibrationnelle
 RX : Rayons X
 S : Nombre quantique de spin
 S₀ : Etat singulet fondamental
 S₁ : Premier état singulet excité
 S_x : Etat singulet excité x
 Ser, S : Sérine
 SNC : Système Nerveux Central
 SPPS : Synthèse Peptidique en Phase Solide
 T₁ : Etat triplet
 tBu : tert-butyl
 TEM : Microscopie électronique en transmission
 TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
 TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyle
 TEMPOL : 4-hydroxy-2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-oxyle
 TEP : Tomographie par Emission de Positrons
 TFA : Acide trifluoroacétique
 TGPS-PLA : *D-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-poly(lactic acid)*
 THF : Tétrahydrofurane
 Thr, T : Thréonine
 TIPS : Triisopropylsilane

TNBS : Acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique
TOCSY : TOtal Correlation SpectroscopY
TPC : Chlorine 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl
Trp, W : Tryptophane
Trt : Triphénylméthyl
Tyr, Y : Tyrosine
UCNPs : *Up-conversion nanoparticles*
UMR : Unité Mixte de Recherche
USPIONS : *Ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles*
UV : Ultraviolet
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VEGF₁₆₅ : Isoforme 165 du VEGF
VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C : Familles de ligands du VEGF
VEGFR-1 et VEGFR-2 : Récepteurs du VEGF
VTP : *Vascular Targeted Photodynamic therapy*
 β_e : Magnéton de Bohr
 ε : Coefficient d'extinction molaire
 λ : Longueur d'onde
 ν : Fréquence
 τ_f : Durée de vie de fluorescence
 τ_Δ : Durée de vie de l'oxygène singulet
 Φ_f : Rendement quantique de fluorescence
 Φ_Δ : Rendement quantique de production d'oxygène singulet

Liste des Figures

FIGURE 1 : ETAPES DU DIAGNOSTIC D'UN CANCER CONDUISANT A L'ETABLISSEMENT DU BILAN D'EXTENSION.	12
FIGURE 2 : ANATOMIE DU SNC. EXTRAITE DE ¹⁴	17
FIGURE 3 : PHOTOGRAPHIES PEROPERATOIRES DE LA CAVITE OPERATOIRE SOUS LUMIERE VISIBLE (A GAUCHE) ET SOUS LUMIERE BLEUE (A DROITE). EXTRAITE DE STUMMER ET AL. ²³	20
FIGURE 4. PHOTOGRAPHIES DE MEYER–BETZ : TROIS (GAUCHE) ET CINQ JOURS (DROITE) APRES INJECTION D'HP. ³⁵	22
FIGURE 5. PRINCIPE DU TRAITEMENT PAR PDT	23
FIGURE 6. DIAGRAMME DE PERRIN–JABLONSKI MODIFIE. CIS, CONVERSION INTERSYSTEME ; E ⁻ , ELECTRONS RV, RELAXATION VIBRATIONNELLE.....	24
FIGURE 7 : SPECTRE ELECTROMAGNETIQUE.....	28
FIGURE 8 : PENETRATION DE LA LUMIERE DANS LES TISSUS BIOLOGIQUES EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE. EXTRAITE DE ⁵⁸	29
FIGURE 9 : SPECTRE D'ABSORPTION DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES TISSUS BIOLOGIQUES. EXTRAITE DE ⁵⁹ ..	29
FIGURE 10 : STRUCTURES CHIMIQUES DE LA PORPHYRINE ET DE SES DERIVES.....	32
FIGURE 11 : SPECTRE D'ABSORPTION STANDARD UV–VISIBLE D'UNE PORPHYRINE.....	32
FIGURE 12 : STRUCTURE CHIMIQUE DU FOSCAN®.....	33
FIGURE 13 : BIOSYNTHESE DE L'HEME. PBG, PORPHOBILINOGENE ; UROLL, UROPORPHYRINOGENE ; COPROLL, COPROPORPHYRINOGENE ; PROTO IX, PROTOPORPHYRINOGENE IX. ADAPTEE DE HAMBLIN ET AL. ³⁴	34
FIGURE 14 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA VISUDYNE®	35
FIGURE 15 : STRUCTURE CHIMIQUE DU TOOKAD®.....	36
FIGURE 16 : PRINCIPE DE L'EXCITATION BIPHOTON	39
FIGURE 17 : ILLUSTRATION DU TRANSFERT D'ENERGIE DES UCNPs A UN PS. ADAPTEE DE MALLIDI ET AL. ⁸⁶	40
FIGURE 18 : ILLUSTRATION DE L'EFFET EPR. ADAPTEE DE BUGAJ. ⁹³	41
FIGURE 19 : DIFFERENTS TYPES DE NPs. ADAPTEE DE WILCZEWSKA ET AL ET GRIES ET AL. ^{94,98}	43
FIGURE 20 : ILLUSTRATION DES DEUX TYPES DE CIBLAGE ACTIF.	43
FIGURE 21 : STRUCTURE DU RECEPTEUR NRP–1. ADAPTEE DE DUMOND ET AL. ¹¹⁶	48
FIGURE 22 : OXYGENATION DES TISSUS AU COURS D'UN TRAITEMENT PDT UTILISANT L'ALA SUR LE COLON DE RAT. FIGURE EXTRAITE DE CURNOW ET AL. ¹¹⁷	49
FIGURE 23 : STRUCTURE GENERALE DES ALCOXYAMINES ET LEUR HOMOLYSE.	51
FIGURE 24 : OBJECTIFS DE LA THESE.	52
FIGURE 25 : EXEMPLES D'ALCOXYAMINES PORTANT UN CHROMOPHORE, INDIQUE EN ROUGE, (A) DIRECTEMENT LIE AU GROUPEMENT AMINOXYL ET (B) SEPRE DE GROUPEMENT AMINOXYL PAR UNE DISTANCE DEUX LIAISONS INDIQUEE PAR UNE DOUBLE FLECHE. ¹³³	175
FIGURE 26 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA PLATEFORME SYNTHETISEE (NOTEE ALC1'–K(PYRO–A)DKPPR).....	175
FIGURE 27 : PRINCIPE DE L'ELONGATION PEPTIDIQUE EN SPPS. AA _N = ACIDE AMINE AVEC N LE NOMBRE D'ACIDE AMINE, X = O OU NH, ◆ = GROUPEMENT PROTECTEUR PERMANENT, ● = RESINE. ¹³⁸	177
FIGURE 28 : MECANISME DE DEPROTECTION DU GROUPEMENT FMOC.....	182

FIGURE 29 : MECANISME DE LA REACTION D'ACTIVATION PAR LES CARBODIMIDES SUIVI DU COUPLAGE DU FMOC-ACIDE AMINE AU PEPTIDE EN ELONGATION.....	184
FIGURE 30 : MECANISMES DES REACTIONS POUVANT SE PRODUIRE LORS DE L'ACTIVATION D'UN FMOC-ACIDE AMINE PAR UN CARBODIIMIDE. (A) FORMATION DE LA N-ACYLISOUREE ET (B) RACEMISATION PAR LA FORMATION D'UNE OXAZOLONE. ¹⁵³	185
FIGURE 31 : MECANISME DE LA REACTION D'ACTIVATION PAR LES CARBODIMIDES ET L'HOBt SUIVI DU COUPLAGE DU FMOC-ACIDE AMINE AU PEPTIDE EN ELONGATION. ¹⁵⁰	186
FIGURE 32 : MECANISME DE LA REACTION D'ACTIVATION PAR LE BOP SUIVI DU COUPLAGE DU FMOC-ACIDE AMINE AU PEPTIDE EN ELONGATION. ¹⁵⁵	186
FIGURE 33 : MECANISME DE LA REACTION D'ACTIVATION PAR L'HBTU SUIVI DU COUPLAGE DU FMOC-ACIDE AMINE AU PEPTIDE EN ELONGATION (VOIE A) ET LA REACTION SECONDAIRE CONDUISANT A LA GUANIDINYLATION DE LA FONCTION AMINE N-TERMINALE DU PEPTIDE EN EXPANSION (VOIE B). ¹⁵⁵	188
FIGURE 34 : SYNTHÈSE DU COMPOSE 2. (I) NHS, EDCI, THF/DMF, 12 H, 40°C ; (II) FMOC-LYS-OH, Et ₃ N, CHCl ₃ /DMF, 12 H, T _{AMB}	190
FIGURE 35 : SYNTHÈSE DU COMPOSE 7. (I) DEPROTECTION : 20% PIPERIDINE DANS LE DMF, 4 MIN PUIS 7 MIN (SYNTHÉTISEUR) OU 4 X 15 MIN (MANUELLE), T _{AMB} , (II) COUPLAGE : FMOC-AA(GP)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 X 18 MIN, T _{AMB} , (III) COUPLAGE : 2, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 H, T _{AMB} ET (IV) CLIVAGE : TFA/TIPS/H ₂ O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 H, T _{AMB} . À PARTIR DU PEPTIDE 6 AINSI SYNTHÉTISÉ, LE COMPOSE 2 A ENSUITE ÉTÉ COUPLÉ À CE DERNIER, APRES DEPROTECTION PREALABLE DU GROUPEMENT FMOC, DANS DES CONDITIONS DE COUPLAGE SIMILAIRE A CELLES UTILISÉES POUR LA SYNTHÈSE DU PEPTIDE. APRES LA DEPROTECTION DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE, LE COMPOSE A FINALEMENT ÉTÉ CLIVÉ DU SUPPORT ET DEPROTÉGÉ SUR SES CHAINES LATÉRALES EN MILIEU ACIDE POUR OBTENIR LE COMPOSE 7 AVEC UN RENDEMENT GLOBAL DE 25% APRES PURIFICATION PAR HPLC PREPARATIVE.....	190
FIGURE 36 : SYNTHÈSE DE 1,2,3-TRIAZOLES PAR CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE D'AZOTURE ET D'ALCYNE.	192
FIGURE 37 : SYNTHÈSE DE L'ALC1' FONCTIONNALISÉE PAR UN BRAS ALCYNE, 9. (I) NHS, EDCI, AcOEt/DMF, 24 H, 35°C ET (II) PROPARGYLAMINE, Et ₃ N, CHCl ₃ /DMF, 30 H, T _{AMB}	192
FIGURE 38 : SYNTHÈSE DU COMPOSE 12 POSSEDANT UN BRAS AZOTURE. (I) COUPLAGE : ACIDE AZIDOHÉXANOÏQUE, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 H, T _{AMB} , (II) CLIVAGE : TFA/TIPS/H ₂ O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 H, T _{AMB} ET (III) Zn(OAc) ₂ , DMF, 2,5 H, 40°C.....	193
FIGURE 39 : SPECTRE D'ABSORPTION UV-VISIBLE NORMALISÉ DE LA PYRO-A ET DU COMPOSE 12 DANS LE DMF.	194
FIGURE 40 : TENTATIVE DE SYNTHÈSE DE LA PLATEFORME TRIMODALE 13. (I) CuSO ₄ , ASCORBATE DE SODIUM, DMF/H ₂ O, 24 H, T _{AMB} ET (II) TFA, 5 MIN, 0°C.	194
FIGURE 41 : TENTATIVE DE COUPLAGE DE L'ALC1' AU COMPOSE 10 PAR SPSS. (I) COUPLAGE : HBTU, NMM, NMP, DMF OU PyBOP, DIPEA, DMF, 12 H, T _{AMB} ET (II) CLIVAGE : TFA/TIPS/H ₂ O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 H, T _{AMB}	195
FIGURE 42 : CHROMATOGRAMME HPLC DU COMPOSE 14 À L'ISSU DES PREMIER ET SECOND COUPLAGES ENTRE L'ALC1' ET 10 SUIVI D'UN CLIVAGE DE LA RESINE. GRADIENT DE 10 À 100% ACÉTONITRILE (ACN) DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE À 100% ACN + 0,1% TFA PENDANT 10 MIN (DETECTION UV : 415 NM).	196

FIGURE 43 : SYNTHÈSE DU COMPOSE 16. (I) DEPROTECTION : 20% PIPERIDINE DANS LE DMF, 7 MIN PUIS 14 MIN (SYNTHÉTISEUR) OU 4 X 15 MIN (MANUELLE), T_{AMB} , (II) COUPLAGE : Fmoc-AA(GP)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 X 18 MIN, T_{AMB} , (III) COUPLAGE : ALC1', PyBOP, DIPEA, DMF, 12 H, T_{AMB} ET (IV) CLIVAGE : TFA/TIPS/H ₂ O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 H, T_{AMB}	196
FIGURE 44 : CHROMATOGRAMME HPLC A 260 NM DU COMPOSE 16 A L'ISSU DU COUPLAGE DE L'ALC1'. GRADIENT DE 10 A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% TFA PENDANT 10 MIN (DETECTION UV : 260 NM).....	197
FIGURE 45 : CHROMATOGRAMMES HPLC OBTENUS POUR LES COMPOSES 7, 16 ET 14 PURIFIES. GRADIENT DE 10 A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% TFA PENDANT 10 MIN (DETECTION UV : 260 NM POUR 16 ET 415 NM POUR 7 ET 14.....	198
FIGURE 46 : CHROMATOGRAMME HPLC DE PLUSIEURS ESSAIS DE PURIFICATION DU COMPOSE 14. A, 7 ET B, 14 (DETECTION UV : 415 NM).....	200
FIGURE 47 : SPECTRES D'ABSORPTION UV-VISIBLE NORMALISEES ET COEFFICIENT D'EXTINCTION MOLAIRES DES COMPOSES PYRO-A, 7 ET 14 DANS DIFFERENTS SOLVANTS.....	202
FIGURE 48 : EVOLUTION DU Φ_f AU COURS DU TEMPS POUR LES COMPOSES PYRO-A, 7 ET 14 ILLUMINES A 668 NM (10 MW.CM ⁻²) DANS LE MeOH.....	204
FIGURE 49 : HOMOLYSE DE L'ALCOXYAMINE BENZOPHENONE-SG1' SOUS EXCITATION LUMINEUSE.....	205
FIGURE 50 : CHROMATOGRAMMES HPLC DE L'ALC1' SOUS EXCITATION PAR RAYONS X A DES DOSES DE 0 ET 20 GY. GRADIENT 10 A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% TFA (DETECTION UV : 260 NM).....	206
FIGURE 51 : CHROMATOGRAMMES HPLC DE ALC1' AVANT ET APRES 10 MIN D'ILLUMINATION UV. GRADIENT DE 10 A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% TFA PENDANT 10 MIN (DETECTION UV : 260 NM). 1, TEMPO, 2, ALC1' ET 3, PRODUIT D'HOMOLYSE D'ALC1'.	207
FIGURE 52 : CHROMATOGRAMMES HPLC DES COMPOSES (A) 16 AVANT ET APRES 5 MIN D'ILLUMINATION UV ET (B) 14 AVANT ET APRES 25 MIN D'ILLUMINATION UV. GRADIENT DE 10 A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1% TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% TFA PENDANT 10 MIN (DETECTION UV : 260 NM POUR 16 ET 415 NM POUR LE COMPOSE 14. 1, TEMPO ; 2, COMPOSE 16 ; 3, PRODUIT D'HOMOLYSE DU COMPOSE 16 ; 4, COMPOSE 14 ET 5, PRODUIT D'HOMOLYSE DU COMPOSE 14.....	208
FIGURE 53 : LEVEE DE DEGENERESCENCE DES NIVEAUX D'ENERGIE DE SPIN ELECTRONIQUE $S = \frac{1}{2}$ SOUS L'ACTION D'UN CHAMP MAGNETIQUE B ET ILLUSTRATION DE LA CONDITION DE RESONANCE. ADAPTEE DE SAHLI. ¹⁷³	210
FIGURE 54 : FORMES MESOMERES DU NITROXYDE.....	211
FIGURE 55 : NIVEAUX D'ENERGIE POUR UN NITROXYDE EN REGIME ISOTROPE AINSI QUE LE SPECTRE RPE RESULTANT EN FONCTION DU CHAMP MAGNETIQUE. LES FLECHES REPRESENTENT LES TRANSITIONS AUTORISEES EN RPE. ADAPTEE DE LE BRETON. ¹⁷⁴	213
FIGURE 56 : DISPOSITIF D'ILLUMINATION UV ADAPTEE A LA GEOMETRIE CYLINDRIQUE DES TUBES ET CAPILLAIRES.....	214
FIGURE 57 : HOMOLYSE DE L'ALC1 SOUS EXCITATION LUMINEUSE.....	215
FIGURE 58 : INTENSITE RPE DU RADICAL GENERE AU COURS DE L'ILLUMINATION A TEMPERATURE AMBIANTE POUR LES COMPOSES (A) ALC1, (B) 16 ET (C) 14 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DANS LE MeOH. ENCADRE : SPECTRES RPE, NORMALISES PAR LEUR INTENSITE DE PIC A PIC, DU RADICAL SG1 DANS LA SOLUTION A 75 μ M	

<p>AU DEBUT DU PLATEAU (BLEU) ET A LA FIN DU PLATEAU (ROUGE). (▲) 300 μM, (●) 150 μM ET (▼) 75 μM. (D) TAUX DE PRODUCTION INITIAL (K) DU RADICAL ET TEMPS D'EXPOSITION A LA LUMIERE UV JUSQU'A ATTEINDRE LE TURNOVER (T_{TURNOVER}) POUR LES COMPOSES ALC1, 16 ET 14 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DANS LE MEOH.</p>	216
<p>FIGURE 59 : INTENSITE RPE DU RADICAL GENERE AU COURS DE L'ILLUMINATION POUR LES COMPOSES (A) ALC1, (B) 16 ET (C) 14 A 300 μM DANS DU MEOH AVEC (◆) OU SANS (▲) OXYGENE.....</p>	218
<p>FIGURE 60 : INTENSITE RPE DU RADICAL GENERE AU COURS DE L'ILLUMINATION POUR LES COMPOSES (A) ALC1, (B) 16 ET (C) 14 A 300 μM DANS DU MEOH AVEC (◆) INTENSITE LUMINEUSE DE REFERENCE OU (▲) INTENSITE LUMINEUSE DIMINUE D'UN FACTEUR 2.....</p>	219
<p>FIGURE 61 : SCHEMA DE PRINCIPE DU PIEGEAGE DE SPIN ENTRE LE DEPMPO ET UN RADICAL R[•].....</p>	220
<p>FIGURE 62 : (A) GAUCHE : SPECTRES RPE DE SIMULATION (ROUGE) ET EXPERIMENTAL (NOIR) D'ALC1 EN PRESENCE DE 10 mM DE DEPMPO APRES 960 S D'IRRADIATION. A DROITE : SIMULATION DES SPECTRES RPE DE SG1, RAD1, RAD2 ET RAD3. (B) ET (C) EVOLUTION DE LA GENERATION DE RADICAUX AU COURS DE L'ILLUMINATION DES COMPOSES ALC1, 16 ET 14 DANS LE TEMPS EN SOLUTION DANS DU MEOH A 300 μM EN PRESENCE DE 10 mM DE DEPMPO DANS LA SOLUTION OXYGENEE (B) ET LA SOLUTION DEGAZEE (C). RADICAUX FORMES PAR L'ILLUMINATION DES COMPOSES : (◆) ALC1, (●) 16 ET (▲) 14.....</p>	221
<p>FIGURE 63 : NOUVELLES PLATEFORMES QUADRIMODALES ENVISAGEES.</p>	244
<p>FIGURE 64 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE D'INTERNALISATION DU CENDR. LA PENETRATION D'UN PEPTIDE, POSSEDANT UN MOTIF CENDR, DANS LES CELLULES TUMORALES SE PRODUIT EN 3 ETAPES, (i) LA LIAISON DU PEPTIDE A UN RECEPTEUR PRIMAIRE SUR L'ENDOTHELIUM DE LA TUMEUR, (ii) LE CLIVAGE DU PEPTIDE PAR DES PROTEASES EXPOSANT AINSI LE MOTIF CENDR A L'EXTREMITÉ C-TERMINALE ET (iii) LA LIAISON A NRP-1 MEDIEE PAR LE MOTIF CENDR, CONDUISANT A LA PERMEABILITE VASCULAIRE ET TISSULAIRE. X, DES ACIDES AMINES ALEATOIRES. LES RONDS NOIRS CORRESPONDENT AUX MOLECULES POUVANT ETRE TRANSPORTES PAR L'INTERMEDIAIRE DU MOTIF CENDR. EXTRAITE DE RUOSLAHTI.¹⁸³.....</p>	245
<p>FIGURE 65 : FIXATION DU PEPTIDE LYP-1 A LA PROTEINE P32 SUIVI DE SON INTERNALISATION A TRAVERS NRP-1. EXTRAITE DE SONG ET AL.¹⁸⁴.....</p>	246
<p>FIGURE 66 : COMPARAISON DE LA CHROMATOGRAPHIE HILIC AVEC LES AUTRES METHODES HPLC. ADAPTEE DE ¹⁹⁶.....</p>	250
<p>FIGURE 67: LIGAND-PROTEIN COMPLEX OF PEPTIDE CGNKATR. LIGANDS ARE SHOWN IN YELLOW WHILE HYDROGEN BONDS ARE SHOWN IN GREEN.</p>	263
<p>FIGURE 68: 2D DIAGRAM OF LIGAND-PROTEIN COMPLEX OF PEPTIDE CGNKRTR (tLYP-1), 17.....</p>	264
<p>FIGURE 69: 2D DIAGRAM OF LIGAND-PROTEIN COMPLEX OF PEPTIDE CGNKATR, 20.....</p>	265
<p>FIGURE 70 : NRP-1 BINDING OF PEPTIDES OBTAINED USING A COMPETITIVE BINDING ASSAY.</p>	267
<p>FIGURE 71 : STRUCTURES CHIMIQUES DES CDs NATURELLES.....</p>	269
<p>FIGURE 72 : VIABILITE CELLULAIRE DE CELLULES U87 TRAITEE AVEC LES COMPLEXES D'INCLUSION FORME AVEC M-THPP (A) ET LA P1-COOH (B) ET LE CONJUGUE (C). EXTRAITE DE BEN MIHOUB ET AL.²⁰⁸.....</p>	271
<p>FIGURE 73 : SYNTHÈSE DU COMPOSE 28. (i) COUPLAGE : FMOC-LYS(BOC)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 H, TA (ii) DEPROTECTION : 20% PIPERIDINE DANS LE DMF, 4 x 15 MIN, T_{AMB}, (iii) COUPLAGE : ACIDE 6-MALEIMIDOHEXANOÏQUE, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 H, T_{AMB}, (iv) TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5), 2 H, T_{AMB} ET (v) B-CD-SH, PBS, DMF, 24 H, 40°C.....</p>	272

FIGURE 74 : SPECTRES D'ABSORPTION UV-VISIBLE NORMALISEES DES COMPOSES PYRO-A ET 28 DANS LE D ₂ O.	274
FIGURE 75 : STRUCTURE CHIMIQUE DE ALC2.....	276
FIGURE 76 : SPECTRE D'ABSORPTION UV-VISIBLE NORMALISEE DE ALC2 DANS LE DCM.....	276
FIGURE 77 : COUPLAGE DE ALC2 A LA LYSINE. (I) NHS, EDCI, DCM/DMF, 12 H, 40°C ET (II) FMOC-LYS-OH, ET ₃ N, CHCl ₃ /DMF, 12 H, T _{AMB}	277
FIGURE 78 : COUPLAGE DU COMPOSE 30 AU PEPTIDE 17. (I) PYBOP, DIPEA, DMF, 12 H, T _{AMB} ET (II) HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 H, T _{AMB}	278
FIGURE 79 : CHROMATOGRAMME HPLC OBTENU, SELON UN GRADIENT DE 10 A 100% DE ACN DANS L'EAU + 0,1% HCOOH EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 100% ACN + 0,1% HCOOH PENDANT 10 MIN A UN DEBIT DE 0,8 mL.MIN ⁻¹ , A L'ISSU DES ESSAIS DE COUPLAGE DU COMPOSE 30 AU PEPTIDE KDKPPR EN PRESENCE DE (A) PYBOP, DIPEA, DMF OU (B) HBTU, NMM, NMP, DMF. 1, [M+H] ⁺ = 1420 DA ; 2, [M+H] ⁺ = 1518 DA ; 3, [M+H] ⁺ = 1601 DA (PRODUIT ATTENDU) ET 4, PRODUIT NON IONISE EN MASSE.	278
FIGURE 80 : MECANISME DE L'HYDROLYSE DU COMPOSE 31, DEPROTEGE SUR SES CHAINES LATERALES ET CLIVE DE LA RESINE, DURANT LE CLIVAGE. ADAPTEE DE KALIA ET AL. ²¹¹	280
FIGURE 81 : HOMOLYSE DE ALC2 SOUS EXCITATION LUMINEUSE.....	281
FIGURE 82 : SIGNAL RPE OBTENUE APRES 1H45 D'ILLUMINATION A 475 NM (22 MW.CM ⁻²) D'ALC2 EN SOLUTION DANS LE MEOH A 480 μM.....	281
FIGURE 83 : (A) EVOLUTION DE L'INTENSITE RPE DU 4-CARBOXY-TEMPO AU COURS DE L'ILLUMINATION A 475 NM DANS LE DMSO A 3 mM ET (B) SIGNAL RPE DU NITROXYDE GENERE APRES UNE HEURE D'ILLUMINATION.	282
FIGURE 84 : (A) EVOLUTION DE L'INTENSITE RPE DU 4-CARBOXY-TEMPO AU COURS DE L'ILLUMINATION A 360 NM DANS LE DMSO A 3 mM ET (B) SIGNAL RPE DU NITROXYDE GENERE APRES UNE HEURE D'ILLUMINATION.	283
FIGURE 85 : NOUVELLE STRATEGIE DE SYNTHESE ENVISAGEE.....	290

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DE QUELQUES TECHNIQUES D'IMAGERIE UTILISEES CLINIQUEMENT. ¹⁰	14
TABLEAU 2 : PRINCIPALES PHOTOREACTIONS DE TYPE I. ^{52,54}	25
TABLEAU 3 : LISTE NON EXHAUSTIVE DES PSS DE SECONDE GENERATION AYANT REÇU L'AMM OU EN PHASE CLINIQUE. ^{76,77}	37
TABLEAU 4 : RENDEMENTS QUANTIQUES DE FLUORESCENCE (Φ_F) ET D'OXYGENE SINGULET (Φ_Δ) DE LA PYRO-A DANS DIFFERENTS SOLVANTS. ¹³⁶	176
TABLEAU 5 : COMPARAISON ENTRE LES DEUX PRINCIPALES STRATEGIES UTILISEES EN SPPS. ADAPTE DE ¹³⁸	179
TABLEAU 6 : TYPES DE RESINES POLYSTYRENE UTILISEES EN SPPS. ADAPTE DE PALOMO ET AL. ¹³⁹	180
TABLEAU 7 : LISTE DES ACIDES AMINES PROTEINOGENES NECESSITANT UNE PROTECTION « PERMANENTE » SUR LEUR CHAINE LATERALE ET DES GROUPEMENTS PROTECTEURS ACIDO-LABILE ASSOCIES. ADAPTE D'AMBLARD ET AL. ¹⁴³	180
TABLEAU 8 : EXEMPLES DE CARBODIIMIDES UTILISES EN SPPS.	185
TABLEAU 9 : LISTE DE SELS DE PHOSPHONIUM UTILISES EN SPPS.	187
TABLEAU 10 : EXEMPLE DE SELS D'URONIUM UTILISES EN SPPS.	188
TABLEAU 11 : ESSAIS DE PURIFICATION HPLC DU COMPOSE 14 SUR COLONNE C18.	199
TABLEAU 12 : RECAPITULATIF DES RENDEMENTS ET PURETES OBTENUS POUR LES DIFFERENTS COMPOSES SYNTHETISES.....	200
TABLEAU 13 : RENDEMENTS QUANTIQUES DE FLUORESCENCE (Φ_F) ET D' ¹ O ₂ (Φ_Δ) MESURES APRES EXCITATION A 410 NM ET DUREE DE VIE DE FLUORESCENCE (T_F), APRES EXCITATION A 407 NM ET D' ¹ O ₂ (T_Δ), APRES EXCITATION A 415 NM DES COMPOSES PYRO-A, 7 ET 14 DANS DIFFERENTS SOLVANTS.	203
TABLEAU 14 : AFFINITE ENVERS NRP-1 DES COMPOSES ESTIMEES A PARTIR DES COURBES D'AFFINITE.	222
TABLEAU 15 : COMPARAISON DES TEMPS DE RETENTION OBTENUS POUR LES PEPTIDES KDKPPR ET tLYP-1 SUR UNE COLONNE C18 EN RPLC UTILISANT UN GRADIENT DE 5% A 100% ACN DANS L'EAU + 0,1 % TFA EN 25 MIN ET SUR UNE COLONNE TSK GEL-AMIDE 80 EN HILIC UTILISANT UN GRADIENT DE 95% A 55% ACN DANS L'EAU + 0,1 % TFA EN 15 MIN SUIVI D'UN ISOCRATIQUE A 55% ACN DANS L'EAU + 0,1 % TFA PENDANT 10 MIN.....	251
TABLEAU 16 : FEB, PREDICTED KI AND NUMBER OF HYDROGEN BONDS OF ALL LIGANDS TESTED.....	262
TABLEAU 17 : RECAPITULATIF DES PROPRIETES DE SOLUBILITE DANS L'EAU DES COMPOSES PYRO-A ET B-CD-KK(PYRO-A)DKPPR.....	273
TABLEAU 18 : COEFFICIENTS D'EXTINCTION MOLAIRE E, RENDEMENTS QUANTIQUES DE FLUORESCENCE (Φ_F) ET D' ¹ O ₂ (Φ_Δ) DES COMPOSES PYRO-A ET 28, MESURES APRES EXCITATION A 388 NM ET DUREE DE VIE DE FLUORESCENCE (T_F) MESUREE A 407 NM ET D' ¹ O ₂ (T_Δ) MESUREE A 415 NM MESURES DANS LE D ₂ O.....	274

INTRODUCTION GENERALE

La thérapie photodynamique (PDT) est une modalité de traitement pour lutter contre de nombreux cancers. Elle repose sur la combinaison de trois entités à savoir l'oxygène, la lumière et une molécule photoactivable appelée photosensibilisateur (PS). Ce traitement consiste en l'administration du PS puis, après un certain délai appelé « intervalle drogue–lumière », à l'illumination de la zone à traiter par la lumière visible conduisant à la destruction des cellules cancéreuses. Le principe de la PDT est basé sur la photoexcitation du PS à une longueur d'onde appropriée lui permettant d'atteindre un état excité. A partir de cet état, le PS va transférer son énergie à l'oxygène environnant et ainsi entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que l'oxygène singulet (1O_2) ou le radical hydroxyle ($HO\cdot$), induisant ainsi un stress oxydant et par conséquent la destruction des cellules cancéreuses.

La PDT présente de nombreux avantages à savoir, être une technique 1) peu invasive reposant sur l'utilisation d'une source lumineuse et d'un PS qui n'ont pas d'action toxique lorsqu'ils sont pris séparément et 2) sélective du fait d'une action des ROS limitée au site de génération. Cette sélectivité peut être apportée par une illumination localisée ou bien par une accumulation sélective du PS au niveau de la zone à traiter. En revanche, deux inconvénients peuvent limiter son efficacité tels que la nécessité en oxygène pour être efficace et le manque de sélectivité de la majorité des PSs commerciaux.

De nombreuses stratégies ont été décrites pour combattre l'hypoxie des tumeurs et notamment l'utilisation de molécules photoactivables. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur des composés dont le potentiel en tant qu'agents thérapeutiques a déjà été prouvé, les alcoxyamines. Ces composés sont capables, notamment sous l'effet de la température, de s'homolyser et générer des radicaux alkyles cytotoxiques. Un nouveau concept d'alcoxyamines homolysables par la lumière a été développé plus récemment mais leur utilisation dans le traitement antitumoral n'a jamais été étudié. Ces composés photoactivables représentent, par conséquent, une piste innovante pour des applications PDT.

Le ciblage tumoral consiste en l'adressage de PSs par conjugaison avec des vecteurs ayant une affinité pour des récepteurs membranaires surexprimés au niveau des cellules ou des néovaisseaux. Il existe plusieurs stratégies de ciblage dont l'une, appelée ciblage actif indirect, qui consiste en l'adressage du PS vers des récepteurs surexprimés au niveau des néovaisseaux tumoraux. Parmi eux, le récepteur neuropiline-1 (NRP-1), co-récepteur du récepteur au VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) est étudié depuis plusieurs

années par les équipes impliquées dans cette thèse. Plusieurs peptides ciblant NRP-1 ont déjà été identifiés dont KDKPPR.

Cette thèse consiste au *design* de nouvelles plateformes PDT spécifiques des néovaisseaux tumoraux et efficaces à la fois en milieux hypoxique et normoxique. Pour cela, il a été choisi de combiner trois entités à savoir 1) un PS pour une PDT dépendante de l'oxygène, 2) une alcoxyamine pour une activité indépendante de l'oxygène et 3) un peptide pour un ciblage des néovaisseaux tumoraux.

Cette thèse repose sur une approche pluridisciplinaire et a été réalisée en collaboration avec plusieurs laboratoires :

- Le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS, Université de Lorraine, sous la supervision du Dr Céline Frochet. La fonctionnalisation des PSs ainsi que les purifications des composés et les mesures photophysiques ont été effectuées au sein de ce laboratoire.
- Le Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, CNRS, Université de Lorraine, sous la supervision du Dr Samir Acherar. La synthèse peptidique sur support solide ainsi que les caractérisations des composés ont été effectuées au sein de ce laboratoire.
- Le Centre de Recherche en Automatique (CRAN), UMR 7039, CNRS, Université de Lorraine, sous la supervision du Dr Cédric Boura. Les études biologiques ont été effectuées au sein de ce laboratoire.
- L'équipe Chimie Radicalaire Appliquée à la Biologie (CRAB) du Pr Gérard Audran et du Pr Sylvain Marque de l'Institut de Chimie Radicalaire (ICR), UMR 7273, à Marseille. Le développement et la synthèse des alcoxyamines photoactivables ainsi que les premières analyses par RPE ont été effectués au sein de cette équipe.
- L'Institut de Chimie, UMR 7177, à Strasbourg, sous l'encadrement des Dr Bertrand Vileno et Dr Nolwenn Le Breton. Les illuminations ainsi que le suivi par spectroscopie RPE des alcoxyamines ont été réalisés au sein de ce laboratoire.
- La « *School of Pharmaceutical Sciences* » de l'Universiti Sains Malaysia en Malaisie, sous la supervision du Dr Amirah Mohd-Gazzali. Les études de docking moléculaire ont été effectuées au sein de cette équipe.

Le premier chapitre de cette thèse, divisé en trois parties, présente le contexte bibliographique. Dans une première partie, les mécanismes du cancer ainsi que les principaux outils diagnostic et thérapeutique utilisés sont présentés. La seconde partie consiste en la description du principe de la PDT ainsi que de ses constituants essentiels à

savoir 1) l'oxygène, en présentant les mécanismes photophysiques impliqués lors du processus photodynamique, 2) la lumière par description des paramètres pris en compte dans le choix des sources lumineuses utilisées et 3) les PSs. La dernière partie décrit les principales limites de la PDT et les techniques utilisées pour les contourner, à savoir la faible pénétration de la lumière dans les tissus, la faible sélectivité des PSs commerciaux et le besoin en oxygène pour un effet photodynamique efficace. Les objectifs de la thèse sont présentés à la fin de ce chapitre.

Le second chapitre de cette thèse décrit une preuve de concept avec la synthèse d'une plateforme trimodale combinant la pyrophosphorbide a (Pyro-a), une alcoxyamine de type benzophénone-SG1 et le peptide KDKPPR. Les possibles interactions des différentes unités les unes avec les autres sont déterminées par étude des propriétés photophysiques de la Pyro-a, de la photolabilité de l'alcoxyamine et de l'affinité du peptide envers NRP-1.

Le troisième chapitre présente l'amélioration de la plateforme synthétisée pour permettre des études *in vitro*. La stratégie d'amélioration s'est focalisée sur trois aspects : 1) l'amélioration du ciblage par comparaison du peptide KDKPPR avec un *tumor-homing* peptide, le tLyp-1 qui se fixe aussi sur le récepteur NRP-1 et qui est ensuite internalisé, 2) l'amélioration de la solubilité par utilisation de β -cyclodextrine et 3) le développement d'une l'alcoxyamine homolysable à une longueur d'onde UV-visible compatible avec des applications PDT.

CHAPITRE I : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE POUR TRAITER LE CANCER

I. Cancer

I.1. Epidémiologie

Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde.¹ Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), en 2018, plus de 9 millions de décès liés aux cancers ont été recensés avec une incidence de plus de 18 millions de nouveaux cas dans le monde avec une prévalence à 5 ans de 574,4/100 000 cas.² Les principaux types de cancer recensés chez l'homme étaient ceux du poumon (1 386 524 cas), de la prostate (1 276 106 cas), colorectal (1 026 215 cas), de l'estomac (683 754 cas) et du foie (596 574 cas) alors que chez la femme, les plus représentés étaient ceux du sein (2 088 849 cas), colorectal (823 303 cas), du poumon (725 352 cas), du col de l'utérus (569 847 cas) et de la thyroïde (436 344 cas).

I.2. Qu'est-ce que le cancer ?

Le cancer se traduit par la multiplication incontrôlée et rapide de cellules anormales envahissant certaines parties de l'organisme se trouvant à proximité. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme causes du cancer tels que les prédispositions génétiques ou des facteurs extérieurs (tabac, rayonnement UV, radiations, alcool...). Ces facteurs peuvent être à l'origine d'altérations de l'ADN déclenchant l'apoptose de la cellule.³

En effet, le corps humain est composé de milliards de cellules ayant chacune une fonction et une mort programmée. Deux mécanismes contrôlent la vie cellulaire : le cycle cellulaire (création de nouvelles cellules) et l'apoptose (mort cellulaire). Ce cycle de division cellulaire est composé de cinq phases : la phase de repos (G0), la première phase de croissance (G1), la phase de synthèse de l'ADN (S), la seconde phase de croissance (G2) et la mitose (M). Les cellules dans la phase G0 reçoivent un signal de reproduction qui va les faire passer dans la phase G1 où elles vont fabriquer des protéines et de l'ARN en vue de leur future division. Pendant la phase S, la synthèse d'ADN a lieu (reproduction à l'identique) et la phase G2 est, quant à elle, similaire à la phase G1. Ce n'est qu'au moment de la phase M que la division cellulaire se produit et donne lieu à la création de deux cellules filles identiques à partir de la cellule mère. A l'issue de cette phase, deux phénomènes peuvent se produire : soit la cellule reste dans le cycle cellulaire et passe à la phase G0, soit elle le quitte pour se développer jusqu'à sa maturation puis sa mort.³

Il existe des points de contrôle entre ces phases afin de vérifier que le cycle cellulaire se déroule normalement. En cas d'anomalies (mutations génétiques), l'organisme peut

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

déclencher une action de corrections ou l'autodestruction de la cellule (apoptose). Lorsque ces anomalies ne sont pas réparées, il se produit une accumulation de celles-ci au cours des cycles cellulaires étant à l'origine du cancer.³ Ces mutations ont lieu lors de la réplication de l'ADN et peuvent être de plusieurs types dont les principales sont^{4,5} :

- Les mutations ponctuelles, les plus fréquentes et correspondant à des substitutions nucléotidiques, c'est-à-dire au remplacement d'une base (nucléotide) de l'ADN par une autre ;
- Les insertions ou délétions de nucléotides qui sont des mutations de petites tailles ;
- Les modifications structurales du gène entraînant un réarrangement du gène, par exemple, par délétion de la totalité ou d'une partie du gène.

En ce qui concerne les gènes pouvant être mutés, il en existe trois catégories^{3,6} :

- Les gènes proto-oncogènes, régulateurs positifs de la prolifération cellulaire qui, une fois mutés, deviennent oncogènes entraînant une hyperactivation de la croissance cellulaire et par conséquent une prolifération cellulaire désordonnée et anormale ;
- Les gènes suppresseurs de tumeurs, régulateurs négatifs dont le rôle est contrôleur de la prolifération cellulaire qui, une fois mutés, perdent leur activité conduisant ainsi à une prolifération cellulaire incontrôlée ;
- Les gènes de réparation de l'ADN, réparateurs des erreurs pouvant se produire lors de la réplication de l'ADN qui, une fois mutés, deviennent incapables de réparer l'ADN endommagé et jouent ainsi un rôle important dans le développement du cancer.

Une fois l'ADN d'une cellule lésé, celle-ci va se transformer, se développer puis proliférer pour former un groupe de cellules identiques et finalement acquérir les propriétés d'une cellule cancéreuse. Il s'écoule généralement plusieurs années avant que ce processus soit finalisé. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par leur :

- Immortalité, bien que dérivées d'une cellule normale, elles n'assurent pas la fonction de ces cellules ;
- Capacité à se nourrir en développant leur propre réseau de vaisseaux sanguins ;
- Capacité à bloquer l'attaque des défenses immunitaires de l'organisme.⁷

Les cellules cancéreuses, alors développées, sont capables de former leur propre réseau vasculaire afin d'alimenter la tumeur en oxygène et nutriments par un phénomène appelé angiogenèse. Elles possèdent également la capacité d'envahir les tissus environnants et

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

de former des métastases par migration au sein de l'organisme. D'autre part, elles peuvent se servir des cellules environnantes en altérant leurs propriétés, entraînant la formation de tumeurs composées à la fois de cellules saines et cancéreuses. Deux types de cellules cancéreuses peuvent être distinguées en fonction de leur appartenance :

- « Différenciées », qui présentent peu de différence avec les cellules dont elles sont issues ;
- « Indifférenciées », qui ont perdu leurs caractéristiques d'origine rendant impossible l'identification de leur origine.

Sans traitement, le cancer va évoluer spontanément dans l'organisme sur plusieurs années et de façon propre à chaque type de cancer. L'apparition de lésions précancéreuses, contenant des cellules malades, traduit le début de la maladie. Celles-ci vont évoluer en cellules cancéreuses qui vont se multiplier pour former localement (tissu d'origine) une tumeur de petite taille (stade 1) qui va ensuite grossir et occuper un volume plus important (stade 2) pour ensuite envahir les tissus environnants (stade 3), notamment les ganglions lymphatiques pour finalement s'étendre plus largement et former des métastases dans l'ensemble de l'organisme (stade 4).³

Il existe différents types de tumeurs en fonction du tissu dont elles sont issues⁷ :

- Les carcinomes issus de l'épithélium (tissu recouvrant les surfaces internes et externes de l'organisme) ;
- Les adénocarcinomes issus des glandes ou des muqueuses ;
- Les sarcomes issus majoritairement des os et des muscles (tissu de soutien) ;
- Les lymphomes issus des ganglions et vaisseaux lymphatiques ;
- Les leucémies issues des cellules de la moelle osseuse.

Pour ralentir et/ou stopper l'évolution du cancer, il est nécessaire de le dépister le plus tôt possible et de vérifier l'étendu de celui-ci par des méthodes de diagnostic.

I.3. Diagnostic

Le diagnostic d'un cancer se fait en plusieurs étapes récapitulées dans la Figure 1.

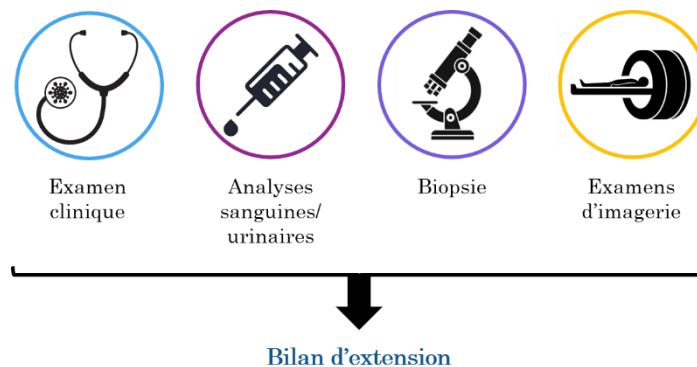


Figure 1 : Etapes du diagnostic d'un cancer conduisant à l'établissement du bilan d'extension.

La première étape du diagnostic consiste en un examen clinique réalisé par le médecin, à savoir un entretien et un examen spécifique de la zone potentiellement atteinte. Il est ensuite suivi par des examens biologiques (bilan sanguin et/ou urinaire) pour doser des marqueurs (molécules) présents en faible quantité dans les cellules saines et plus fortement produites par les cellules tumorales (exemple : l'antigène prostatique spécifique (PSA), marqueur dans le cas du cancer de la prostate). Ces anomalies peuvent également être dues à d'autres maladies que le cancer, il est donc nécessaire de compléter ce diagnostic par d'autres examens.^{6,8}

La biopsie constitue une étape indispensable dans le diagnostic d'un cancer. En effet, elle permet de définir la nature de la lésion cancéreuse par prélèvement d'un échantillon analysé par un examen anatomopathologique au microscope. Elle peut être réalisée par ponction ou par endoscopie mais également lors d'une intervention chirurgicale.

Des examens d'imagerie médicale sont également effectués pour confirmer la présence d'une tumeur et la caractériser (taille, localisation, forme, activité métabolique). Il est possible de regrouper ces examens d'imagerie en deux catégories^{8,9} :

- « Structurale » qui permettent de renseigner sur la localisation, la forme et la taille de la tumeur et regroupent :
 - La radiographie qui permet d'obtenir des images de certains organes ou structures du corps par l'utilisation de rayons X ;
 - L'échographie qui utilise les ultrasons qui sont envoyés au niveau de l'organe analysé puis réfléchis par les tissus pour revenir à la source d'émission et convertis en signaux électrique permettant d'obtenir une image de la zone examinée. Cette technique présente une bonne résolution

et une excellente sensibilité mais est limitée par la pénétration des ultrasons dans les tissus ;

- Le scanner qui repose sur l'utilisation de rayons X et permet d'obtenir une image anatomique en trois dimensions. La source de rayons X tourne autour du patient afin d'obtenir des images en coupe. Un agent de contraste iodé peut être utilisé afin d'améliorer la résolution spatiale. Elle présente une haute résolution spatiale ainsi qu'une pénétration des rayons X dans les tissus, non limitée mais elle a une faible sensibilité et utilise des radiations ionisantes.
- L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) qui est une technique d'imagerie utilisant les ondes radiofréquences utilisées pour la visualisation de la structure interne et la différenciation des tissus selon leur morphologie. Elle repose sur l'utilisation d'un champ magnétique et sur un principe similaire à la Résonance Paramagnétique Nucléaire (RMN). Elle présente plusieurs avantages : une pénétration des ondes radiofréquences dans les tissus non limitée, l'utilisation d'une radiation non ionisante et une très bonne résolution spatiale. En revanche, elle présente une faible sensibilité qui peut être améliorée par l'utilisation d'agents de contraste (chélates de gadolinium par exemple).
- « Fonctionnelle » qui permettent d'étudier l'activité métabolique de la zone examinée et regroupent notamment :
 - L'IRM fonctionnelle qui permet d'obtenir des informations supplémentaires par rapport à l'IRM classique telles que les caractéristiques physiologiques de la vascularisation ou l'oxygénation des tissus.
 - La tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP) qui sont des techniques d'imagerie nucléaire reposant sur l'administration d'un composé radiomarqué et permettant d'étudier les évolutions biologiques des tumeurs et d'étudier le fonctionnement des organes. La TEMP repose sur l'utilisation de radionucléides émetteurs de rayonnements γ (^{99m}Tc ou ^{123}I) alors que la TEP repose sur l'utilisation de radionucléides émetteurs de positrons (rayonnement β^+ , ^{18}F). Les agents radiomarqués utilisés permettent d'étudier une activité précise des cellules, telle que l'accumulation du glucose (^{18}FDG , [^{18}F]-2-fluoro-déoxy-glucose), plus élevée dans les cellules cancéreuses. Ces techniques présentent une excellente sensibilité et

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

permettent une quantification mais reposent sur l'utilisation de rayonnements ionisants et ont une résolution spatiale limitée.

Le Tableau 1 récapitule les principales caractéristiques des techniques d'imagerie les plus utilisées en clinique.

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques techniques d'imagerie utilisées cliniquement.¹⁰

Technique d'imagerie	Temps d'acquisition	Résolution spatiale	Pénétration des tissus	Sensibilité	Coût
Scanner	Minutes	50–200 μm (préclinique) 0,5–1 mm (clinique)	Sans limite		\$\$
IRM	Minutes à heures	25–100 μm (préclinique) ~1 mm (clinique)	Sans limite	10^{-3} à 10^{-5} M	\$\$\$
Echographie	Secondes à minutes	0,01–0,1 mm pour des applications superficielles 1–2 mm pour des applications plus profondes	mm–cm	Excellente utilisée avec microbulles (10^{-12} M)	\$
TEP	Secondes à minutes	1–2 mm (préclinique) 5–7 mm (clinique)	Sans limite	10^{-11} à 10^{-12} M	\$\$\$
TEMP	Minutes	1–2 mm (préclinique) 8–10 mm (clinique)	Sans limite	10^{-10} à 10^{-11} M	\$\$

Ce sont l'ensemble de ces examens qui conduisent à l'établissement du bilan d'extension. Ce dernier permet de déterminer le stade de la tumeur à savoir 1) l'extension locale de la tumeur (classée de T1 à T4), 2) son éventuel envahissement des ganglions lymphatiques proches (classé de N0 à N3) et 3) la présence (m0) ou non (m1) de métastases. Ces paramètres ainsi déterminés conduisent à l'élaboration de la stratégie thérapeutique la plus appropriée.

I.4. Traitements

Une stratégie thérapeutique adaptée et une prise en charge précoce du cancer permettent d'augmenter les chances de guérison du patient. Il n'est pas possible de guérir tous les cancers, mais les traitements peuvent ralentir leur évolution tout en améliorant la qualité de vie du patient. Il existe ainsi plusieurs modalités de traitements, qui peuvent être combinées ou utilisées seules.^{11,12} Les principales sont décrites ci-dessous.

I.4.1. La chirurgie

La chirurgie représente l'une des modalités majeures pour le traitement des tumeurs solides puisque son utilisation est préconisée dans plus de 80% des cas.¹² Elle consiste en un traitement local par la résection la plus totale possible de la tumeur. La chirurgie peut également avoir différentes finalités dont les principales sont^{11,12} :

- Une visée diagnostique, plus communément appelée biopsie (§ I.3) ;

- Une visée curative, qui consiste à retirer la totalité de la tumeur par résection d'une marge périphérique entourant la tumeur, supposée saine afin d'être certain du succès de la résection. L'analyse de cette marge permet de vérifier l'éventuelle extension de la tumeur. Suivant sa localisation et son extension, une ablation totale ou partielle de l'organe ou la zone touchée peut être effectuée.

La radiothérapie et la chimiothérapie sont le plus souvent utilisées en complément de la chirurgie, avant (traitements néo–adjuvants) la chirurgie pour réduire la tumeur ou après la chirurgie (traitements adjuvants).

I.4.2. La radiothérapie

La radiothérapie repose sur l'utilisation de radiations ionisantes pour détruire les cellules cancéreuses et concerne plus de 60% des patients atteints d'un cancer. Elle entraîne des lésions létales pour les cellules par des cassures au niveau des doubles brins d'ADN.¹³ Il existe deux types de radiothérapie, i) la radiothérapie externe pour laquelle une source externe d'irradiation (rayons X) est utilisée et ii) la curiethérapie pour laquelle une source radioactive (rayons γ) est injectée au sein du patient. L'inconvénient majeur de la radiothérapie est la destruction des cellules en contact avec les rayonnements sans distinction entre les cellules saines et cancéreuses.¹¹

I.4.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie repose sur l'administration au patient de molécules cytotoxiques qui vont entraîner la destruction des cellules cancéreuses et empêcher leur multiplication. Lors d'un traitement par chimiothérapie, plusieurs médicaments sont généralement associés et administrés (par injection ou voie orale) en plusieurs cures d'un ou plusieurs jours. En revanche, cette technique présente de nombreux effets secondaires (chute de cheveux, vomissements...) dus au fait que les molécules utilisées détruisent les cellules en forte prolifération donc pas seulement les cellules cancéreuses.

I.4.4. L'immunothérapie

L'immunothérapie consiste à renforcer le système immunitaire du patient, soit par une modulation de son activité globale, soit par « vaccination thérapeutique » consistant à faire reconnaître les cellules cancéreuses par le système immunitaire et ainsi entraîner leur destruction.

I.4.5. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée dans le cas de cancers hormonodépendants (croissance dépendante d'hormones sexuelles, telles que l'œstrogène ou la progestérone par exemple) Cette technique consiste à empêcher la synthèse de ces hormones.

Il existe également d'autres modalités reposant sur le ciblage spécifique des cellules cancéreuses appelées thérapies ciblées permettant notamment d'éviter certains effets secondaires dus à d'autres traitements (destruction des cellules saines en prolifération par la chimiothérapie, chirurgie parfois invasive...). Une modalité appelée thérapie photodynamique (PDT) est aussi utilisée et sera décrite dans le § II.

I.5. Cas des tumeurs cérébrales

I.5.1. Anatomie du cerveau

Le système nerveux constitue un des plus importants systèmes de communication de l'organisme et joue plusieurs rôles essentiels dans son fonctionnement normal tels que la gestion des informations sensorielles, le contrôle des mouvements et du fonctionnement des organes.^{14,15} Deux parties distinctes constituent ce système :

- Le système nerveux central (SNC) composé de la moelle épinière et de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) ;
- Le système nerveux périphérique composé des nerfs essentiels pour la transmission de signaux entre la moelle épinière, le cerveau et les parties périphériques du corps (organes, jambes, bras...).

Les nerfs permettent soit d'envoyer des informations au SNC, soit d'envoyer des ordres transmis par ce dernier aux parties périphériques.

Le cerveau est enveloppé par la boîte crânienne et les méninges, qui constituent une barrière de protection (Figure 2). Le cerveau est divisé en deux parties distinctes, les hémisphères droit et gauche, reliées par le corps calleux. Chaque hémisphère est responsable des fonctionnements sensitifs et moteurs de la partie du corps opposé.

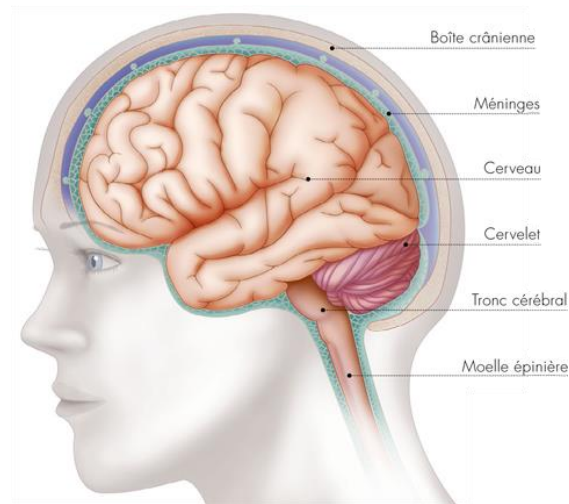


Figure 2 : Anatomie du SNC. Extraite de ¹⁴.

Le système nerveux est constitué de milliards de cellules. Nous pouvons distinguer^{14,15} :

- Les neurones qui reçoivent, intègrent et transmettent les informations. Ils sont constitués d'un corps cellulaire et de fibres nerveuses : les axones (prolongement des neurones qui envoient des messages par impulsions électriques) et les dendrites (extensions recevant les impulsions) ;
- Les cellules gliales qui entourent les neurones sont différenciées en plusieurs types : les astrocytes qui sont impliqués dans la nutrition des neurones, les épendymocytes qui constituent une paroi délimitant les cavités du SNC, les oligodendrocytes responsables de la formation de la myéline entourant les axones et la microglie qui est composée de macrophages jouant un rôle dans le système immunitaire.

I.5.2. Epidémiologie

Les tumeurs cérébrales sont plutôt rares puisqu'elles ne représentent qu'1% des cancers dans le monde avec 296 851 nouveaux cas en 2018 et une incidence de 3,5/100 000 cas. Ces tumeurs sont, en revanche, très agressives puisqu'elles sont responsables de plus de 241 037 décès par an et une survie à 5 ans de 10,1/100 000 cas.¹⁶

Il existe différents types de tumeurs cérébrales qui sont caractérisées par leur localisation, leur taille et leur degré d'agressivité. Deux types peuvent être distingués selon leur origine^{14,17} :

- Les tumeurs primitives qui se développent à l'intérieur du crâne et peuvent être bénignes ou malignes. Elles représentent 6 000 nouveaux cas chez l'adulte par an

en France. Les tumeurs cérébrales représentent le deuxième type de cancer le plus répandu chez l'enfant (20%) ;

- Les métastases cérébrales, également appelées tumeurs secondaires, sont développées à partir d'un cancer déjà existant dans une autre partie du corps et représentent plus de 50% des tumeurs cérébrales.

I.5.3. Classification des tumeurs cérébrales primitives

En 2016, l'OMS a établi un nouveau classement des tumeurs cérébrales primitives en fonction de leur cellule d'origine, la présence d'anomalies au niveau des cellules tumorales et leur grade.¹⁸ Les différents types de tumeurs cérébrales primitives sont les suivants¹⁴ :

- Les gliomes, les plus fréquents (80% des tumeurs cérébrales primitives malignes)¹⁹, développés à partir des cellules gliales du cerveau. Ils peuvent être de plusieurs grades : le grade I correspond aux formes bénignes, le grade II concerne les tumeurs qui se développent lentement pour conduire à une forme maligne, le grade III également appelé gliome anaplasique et le grade IV aussi appelé glioblastome multiforme. Ce dernier grade représente 60% des tumeurs cérébrales chez l'adulte¹⁹ ;
- Les méningiomes, issus des cellules des méninges et se développant par conséquent à la surface du cerveau. Ils sont le plus souvent bénins ;
- Les médulloblastomes se développant dans le cervelet.

I.6. Cas du glioblastome multiforme

Le glioblastome multiforme représente la forme la plus agressive et la plus fréquente de tumeurs cérébrales chez l'adulte. La survie moyenne après le diagnostic est de 14–15 mois.¹⁹

I.6.1. Causes et symptômes

L'origine du développement d'une tumeur cérébrale est difficile à déterminer et peu de facteurs de risques ont été identifiés. Le seul facteur de risque identifié et confirmé est l'exposition à des radiations ionisantes lors de traitements par radiothérapie par exemple.¹⁹

Suivant la vitesse à laquelle se développe la tumeur, l'apparition des symptômes peut se faire différemment (rapide ou progressif). Les symptômes les plus fréquents sont les céphalées traduisant une augmentation de la pression intracrânienne, les crises

d'épilepsie et des troubles fonctionnels dépendant de la localisation de la tumeur (troubles de l'élocution ou de la vision).¹⁹

I.6.2. Diagnostic et traitements

I.6.2.1. Diagnostic

Le premier outil pour diagnostiquer une tumeur cérébrale est l'imagerie par une IRM avec ou sans agent de contraste permettant d'obtenir sa localisation exacte et son envahissement éventuel dans d'autres parties du système nerveux. Le scanner peut également être utilisé, mais en raison de sa moins bonne résolution spatiale et de l'utilisation de rayons X, son utilisation est surtout préconisée chez les patients pour lesquels la réalisation d'une IRM n'est pas possible (pacemakers). Les techniques d'imagerie nucléaire telles que la TEP ou la TEMP peuvent également être envisagées.²⁰

Une biopsie est également effectuée pour réaliser un examen anatomopathologique de la tumeur.¹⁷

I.6.2.2. Modalités de traitement classiques

Le traitement standard du glioblastome consiste en la résection chirurgicale de la tumeur la plus complète possible, sans engendrer de dommages neurologiques, en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie. La résection chirurgicale consiste en l'ablation de la tumeur et le succès de celle-ci dépend des caractéristiques de la tumeur telles que sa localisation et son éventuelle infiltration des tissus environnants. En effet, une résection supérieure à 90% permet d'augmenter la survie des patients à 1 an.²¹ Le gain de survie associée à ce traitement est en moyenne de 6 à 10 mois.²²

Afin d'améliorer le succès de la chirurgie, des techniques ont été développées telles que la chirurgie guidée par fluorescence. Celle-ci consiste en l'administration d'un agent fluorescent spécifique de la tumeur, administré au patient avant la chirurgie. Au cours de l'opération du patient, la zone est illuminée à une longueur d'onde appropriée et la résection des zones émettant de la fluorescence peut alors être effectuée.²¹ Un des premiers agents utilisées pour démontrer l'intérêt de cette approche en chirurgie est le précurseur ALA (acide 5-Aminolévulinique) conduisant à la formation de la PpIX (protoporphyrine IX) fluorescente (Figure 3).²³

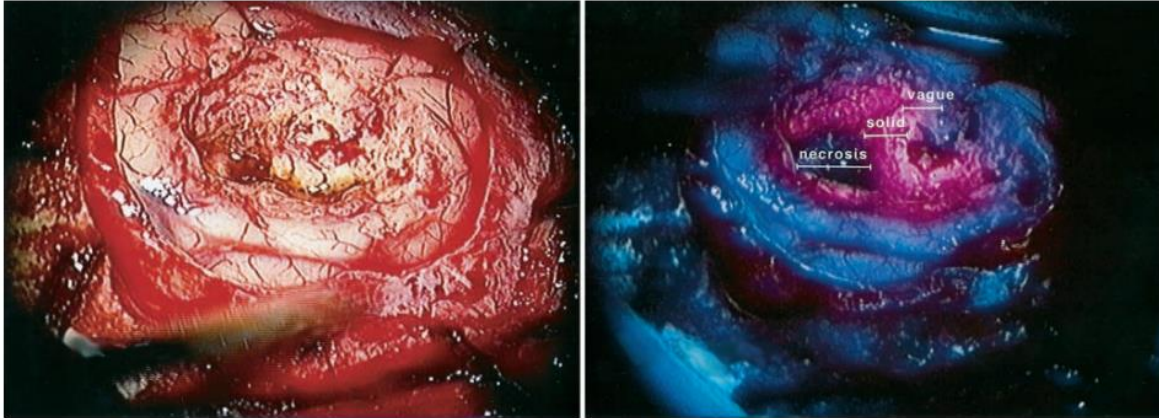


Figure 3 : Photographies peropératoires de la cavité opératoire sous lumière visible (à gauche) et sous lumière bleue (à droite). Extraite de Stummer *et al.*²³

La radiothérapie du glioblastome consiste, classiquement, en l'administration au patient d'une dose de rayons X de 50–60 Gy répartie en plusieurs sessions sur 6 semaines. Son utilisation après la chirurgie conduit à une survie de 12 mois en moyenne. La chimiothérapie est effectuée en parallèle de la radiothérapie avec l'administration de témozolomide. Son association à la chirurgie et à la radiothérapie conduit à une augmentation de la survie moyenne à 14,6 mois.²²

En revanche, ces traitements restent insuffisants compte tenu de la survie médiane après diagnostic de la tumeur et il apparaît souvent une récurrence de la tumeur.

I.6.2.3. Traitement par PDT

De nombreuses études cliniques reposant sur l'utilisation de la PDT pour le traitement de tumeurs cérébrales ont été effectuées.^{24–28} Par exemple, en 2013, Johansson *et al.*²⁶ ont réalisé une étude clinique sur 5 patients reposant sur l'utilisation de la PpIX exogène pour le traitement de glioblastomes récurrents non résécables. Ils ont étudié l'accumulation du PS dans la tumeur par fluorescence ainsi que son photoblanchiment après traitement par PDT interstitielle (iPDT). Après administration du PS et avant traitement par iPDT, des biopsies ont été effectuées afin d'évaluer l'accumulation du PS. Des concentrations importantes (entre 1,4 et 3 μM) ont été relevées dans les biopsies de 3 patients. Ces concentrations corrèlent avec les meilleures réponses au traitement, par rapport aux biopsies où une faible concentration de PS a été détectée, avec aucune progression de la tumeur après 29, 30 et 36 mois.

Un essai clinique (projet INDYGO)²⁸ est actuellement en cours à Lille pour le traitement du glioblastome nouvellement diagnostiqué. Il repose sur l'inclusion du traitement iPDT, utilisant le ALA, dans le protocole thérapeutique classique. Pour cela,

après une résection chirurgicale la plus complète possible, une chirurgie guidée par fluorescence émise par le PS sous lumière bleue est effectuée afin d'éliminer les zones cancéreuses non observables sans fluorescence. Le traitement par iPDT est administré à la fin de la résection par illumination, grâce à un ballonnet, spécifique de la cavité opératoire sous lumière rouge. Le traitement est ensuite complété par la radiothérapie et la chimiothérapie.

L'ensemble de ces études démontrent l'intérêt d'utiliser la PDT pour le traitement du glioblastome.

II. La thérapie photodynamique (PDT)

II.1. Découverte de l'effet photodynamique et application pour le traitement du cancer

La PDT repose sur le phénomène « d'effet photodynamique » issu de la combinaison de la lumière, d'une molécule photosensible (PS) et de l'oxygène moléculaire pour induire des photoréactions. Ce phénomène fut défini pour la première fois par von Tappeiner et Jesionek en 1904.²⁹

En 1900,³⁰ Oscar Raab fut le premier à observer un effet cytotoxique sur une espèce de paramécie (organisme unicellulaire) après traitement avec l'acridine en combinaison avec la lumière du jour. En l'absence de lumière, une survie des paramécies fut observée. Ceci fut suivi, en 1903,³¹ par diverses applications dermatologiques (traitement de carcinomes basocellulaires) avec des PSs, telle que l'éosine, effectuées par von Tappeiner et Jesionek qui mirent alors en évidence l'implication de l'oxygène dans ce phénomène. Le terme « thérapie photodynamique » est né en 1912,³² un important effet photodynamique fut démontré sur des souris avec l'utilisation de l'hématoporphyrine (HP) par le laboratoire de recherche d'Hans Fischer. En 1913,³³ Meyer-Betz s'administra 200 mg d'HP et n'observa aucun effet durant les deux premiers jours. Lors du troisième jour plus ensoleillé, les parties de son corps exposées au soleil développèrent des érythèmes et œdèmes, signes d'une photoréaction, plus importants sur le côté droit de son visage plus exposé. Cinq jours après l'injection, une réduction du gonflement fut observée même si une photosensibilité (due à la présence de l'HP) persista pendant plusieurs semaines jusqu'à l'élimination complète du PS de l'organisme (Figure 4). Cette expérience démontra avec succès l'effet photodynamique chez l'homme.^{29,34}

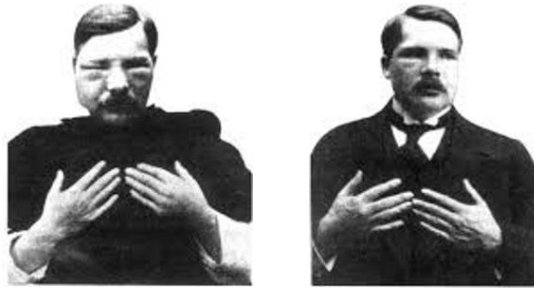


Figure 4. Photographies de Meyer-Betz : trois (gauche) et cinq jours (droite) après injection d'HP.³⁵

De nombreuses études ont démontré la pertinence d'utiliser l'HP en tant qu'agent diagnostique et thérapeutique pour le traitement de certains cancers.³⁶⁻⁴¹ L'HP a été obtenue pour la première fois par Scherer en 1841⁴² à partir de l'hémoglobine traitée dans un premier temps avec un acide minéral (acide sulfurique ou solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique) suivi d'une hydrolyse pour éliminer le fer et les protéines pour obtenir l'HP le plus souvent sous forme de dichlorure. Schwartz *et al.* démontrèrent, en 1955, que la préparation d'HP utilisée dans les précédentes études était un mélange de différentes porphyrines.⁴³ Après des essais de purification, il observa que l'HP pure obtenue présentait une très faible sélectivité pour les tumeurs. Ce n'est que dans les années 60 que Lipson *et al.*⁴⁴ développèrent, en recherchant un composé plus hydrosoluble, un mélange de différents produits, appelée dérivée d'HP (HpD), obtenue par traitement du dichlorure d'HP avec de l'acide sulfurique dans l'acide acétique puis neutralisation en milieu alcalin pour obtenir un pH de 7,4, et présentant l'avantage d'être deux fois plus cytotoxique que l'HP.

La première application de l'HpD pour la détection de tumeurs par fluorescence sur des patients fut décrite par Lipson *et al.* en 1967.⁴⁵ Quelques années plus tard, la phototoxicité de l'HP⁴⁶ (1972) et l'HpD^{47,48} (1975) furent évaluées, pour le traitement par PDT de gliomes⁴⁶, de carcinosarcomes et de tumeurs mammaires⁴⁷ sur des souris et rats démontrant alors une importante suppression de la croissance tumorale. En revanche, une réapparition des tumeurs fut observée après plusieurs jours.

En 1976, la première étude clinique utilisant l'HpD pour un traitement par PDT fut effectuée par Kelly et Snell sur cinq patients présentant des cancers de la vessie et après traitement, la nécrose des tumeurs fut observée sans lésions au niveau des zones non illuminées.⁴⁹ En 1978, un essai clinique à plus grande échelle fut réalisé par Dougherty *et al.* sur 25 patients présentant de nombreuses tumeurs de la peau et pour lesquelles les traitements classiques avaient échoués.⁵⁰ L'efficacité de la PDT fut alors démontrée avec succès. Ils ont plus tard identifié les fractions actives de l'HpD responsables de l'effet photodynamique généré : l'ester et l'éther de dihématoporphyrine.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

En 1985, le Photofrin®, une fraction enrichie des composés les plus actifs de l'HpD, développé par Dougherty à la fin des années 70,⁵⁰ fut alors commercialisée. L'HpD et le Photofrin® ont conduit à de nombreux essais cliniques durant les années 80 pour le traitement de nombreux cancers (vessie, poumon, peau...) conduisant généralement à des résultats encourageants. Le Photofrin® a été le premier composé à obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour un traitement par PDT du cancer de la vessie en 1993 au Canada.^{29,34,51}

II.2. La PDT pour le traitement du cancer

La PDT est une approche relativement simple et efficace nécessitant trois entités : la lumière, l'oxygène et un PS. Pris séparément, ces trois éléments ne présentent pas de toxicité, c'est leur combinaison qui va induire des réactions de photooxydation. Lors d'un traitement par PDT, le PS est administré au patient par injection intraveineuse la plupart du temps (ou sous forme de crème ou de suspension buvable). Après un certain temps, appelé intervalle drogue-lumière, dépendant de la nature du PS et du type de cancer traité, le PS est illuminé. Il va réagir avec l'oxygène présent dans les cellules et leurs microenvironnements, par réaction de photooxydation pour produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) (photoréactions de type I) ou l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (photoréactions de type II). Ces ROS vont finalement induire un stress oxydant entraînant l'éradication de la tumeur (Figure 5).

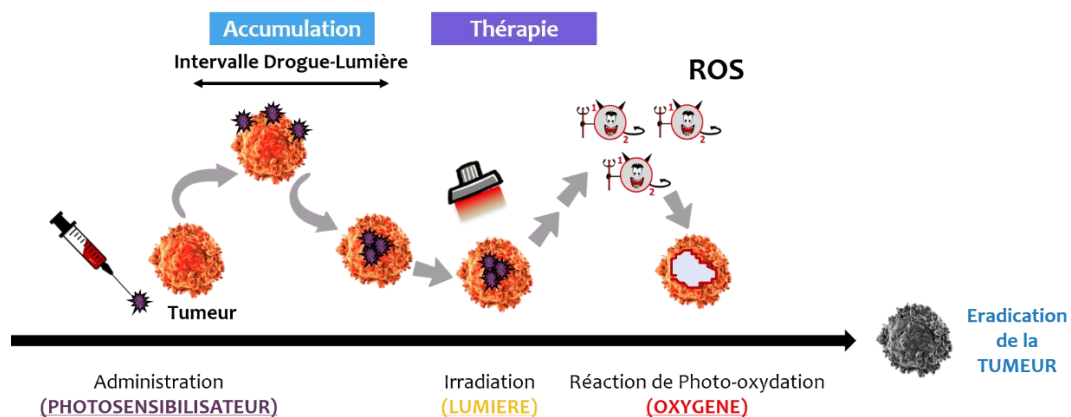


Figure 5. Principe du traitement par PDT

II.3. Mécanismes photophysiques

Pour générer l'effet photodynamique, le PS utilisé doit avant tout absorber les photons à la longueur d'onde d'illumination sélectionnée.³⁴ Les mécanismes photophysiques et photochimiques impliqués lors de l'illumination d'un PS sont illustrés par le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 6). Dans son état fondamental, le PS présente une

configuration pour laquelle les électrons sont appariés avec des spins opposés (spin total $S = 0$) et une multiplicité de spin (M_s), donnée par l'équation (1) :

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

Où M_s est la multiplicité de spin et S le spin total.

Dans le cas d'un PS à l'état fondamental, M_s est égale à 1 ce qui correspond à un état singulet. L'état fondamental S_0 représente un état où le PS se trouve à son plus faible niveau d'énergie.

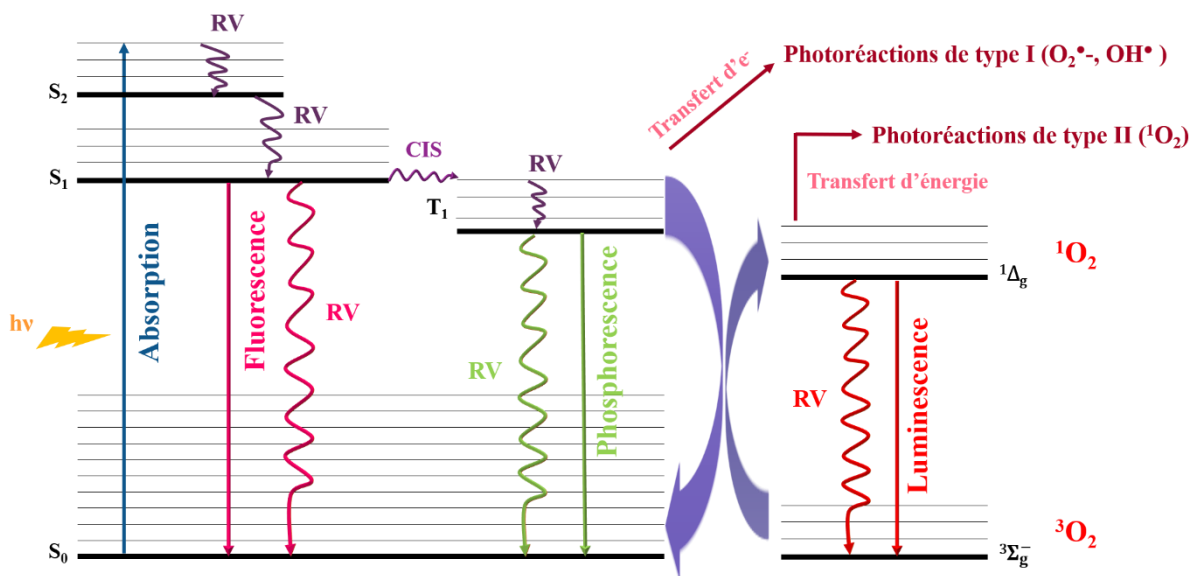


Figure 6. Diagramme de Perrin-Jablonski modifié. CIS, conversion intersystème ; e^- , électrons RV, relaxation vibrationnelle.

Lors de son illumination, le PS absorbe un photon conduisant à la migration rapide ($\approx 10^{-15}$ – 10^{-12} s) d'un électron de son état S_0 à un état d'énergie plus élevée, c'est-à-dire un état singulet excité (S_x avec $x = 1, 2, 3...$ augmentant avec l'état énergétique) dépendant de l'énergie transférée.⁵²

Lorsque l'électron se trouve à un état singulet excité dans un haut niveau vibrationnel, il redescend rapidement au niveau le plus faible de ce même état par un processus appelé relaxation vibrationnelle (RV) associé à une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Si cet électron se trouve à un état singulet supérieur (S_2 par exemple), ce dernier va retomber au premier état singulet excité (S_1), relaxation vibrationnelle par conversion interne (CI). Le retour à l'état fondamental peut alors se produire de différentes manières : i) l'émission d'un photon (fluorescence, $\approx 10^{-11}$ – 10^{-8} s), ii) la dissipation de chaleur (relaxation non radiative) ou iii) la conversion intersystème (CIS), c'est-à-dire le passage à un niveau isoénergétique d'un état triplet (T_1). A ce dernier état, les électrons sont

appariés et possèdent le même spin. Cette transition est favorisée pour la plupart des PSs. En revanche, cette transition de spin est interdite selon la règle de changement de spin, mais a une certaine probabilité de se produire du fait du couplage spin-orbite. Le passage à l'état T_1 est suivi par divers mécanismes : i) une RV, ii) une relaxation radiative à l'état S_0 appelée phosphorescence ($\approx 10^{-6}$ s) correspondant à l'émission d'un photon et iii) réactions avec les molécules environnantes dont l'oxygène soit par transfert d'un électron permettant de générer notamment le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle OH^\bullet correspondant aux photoréactions de type I, soit par transfert d'énergie permettant de générer de 1O_2 à partir de l'oxygène et correspondant aux photoréactions de type II.

II.3.1. Photoréactions de type I

Les photoréactions de type I sont caractérisées par un transfert d'électrons ou de protons aux molécules environnantes telles que l'oxygène entraînant la formation de radicaux anion ou cation, eux-mêmes capables de réagir avec l'oxygène pour générer des ROS (équations (2) et (3) Tableau 2). Le plus souvent, cela conduit à la formation, par transfert d'un électron du PS à l'oxygène, d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) peu réactifs en milieu biologique.⁵² En revanche, ces derniers peuvent réagir de différentes manières :

- Dismutation spontanée en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ayant la capacité de traverser facilement les membranes biologiques (équation (4) Tableau 2) ;
- Réaction d'Haber-Weiss, avec H_2O_2 , si ce dernier est présent en forte concentration, pour former des radicaux hydroxyles (équation (5) Tableau 2) ;
- Réaction de Fenton, catalysée par un métal (fer ou cuivre) qui permet la production de radicaux hydroxyles. Par exemple, l'interaction des $O_2^{\bullet-}$ avec le Fe (III) conduit à sa réduction en Fe (II) qui peut lui-même réagir avec H_2O_2 pour former les radicaux hydroxyles (équations (6) et (7) Tableau 2).^{52,53}

Tableau 2 : Principales photoréactions de type I.^{52,54}

Photoréactions	
$^3PS^* (T_1) + \text{Substrat} \rightarrow \text{Substrat}^{\bullet+} + PS^{\bullet-}$	(2)
$PS^{\bullet-} + O_2(^3\Sigma_g^-) \rightarrow PS + O_2^{\bullet-}$	(3)
$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$	(4)
$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-) + OH^- + OH^\bullet$	(5)
$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-) + Fe^{2+}$	(6)
$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$	(7)

SOD, superoxide dismutase.

Les radicaux hydroxyyles $\text{OH}\cdot$ sont les ROS les plus agressifs, hautement réactifs, et capables d'endommager la plupart des macromolécules biologiques.

II.3.2. Photoréactions de type II

Les photoréactions de type II sont caractérisées par un transfert d'énergie du PS à l'état triplet ($^3\text{PS}^*$) à l'oxygène. Ce transfert d'énergie ne peut se produire que lorsque les deux espèces ($^3\text{PS}^*$ et oxygène) rentrent en collision. Pour cela, deux conditions sont requises : d'une part la durée de vie de l'état triplet du PS doit être suffisamment longue et d'autre part un niveau minimal d'oxygène dans le milieu est requis.⁵⁵ Lors de son retour à l'état fondamental, le $^3\text{PS}^*$, transfère son énergie ($110\text{--}130 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) à l'oxygène, se trouvant à l'état triplet fondamental.⁵² Ce transfert d'énergie conduit à l'excitation de l'état triplet à un état singulet pour lequel les électrons sont appariés avec des spins opposés. On recense l'existence de deux états singulet excités d'énergie différents pour l'oxygène. Le premier, noté $^1\Delta_g$, présente un niveau d'énergie de $94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ alors que le second, noté $^1\Sigma_g^+$, possède une énergie de $156,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Seul le premier ($^1\Delta_g$) est considéré comme intervenant lors de l'effet photodynamique, le second, présentant une durée de vie trop courte, est rapidement quenché pour conduire au premier niveau d'énergie singulet excité.⁵⁵ L' $^1\text{O}_2$ formé est une espèce très réactive qui peut réagir très facilement (oxydation) avec les substrats biologiques environnants tels que les acides aminés, les bases pyrimidine et purine ainsi que les phospholipides. Du fait de sa durée de vie courte et sa grande réactivité, l' $^1\text{O}_2$ agit très localement là où il est formé, dans un rayon d'action de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

Les deux types de photoréactions (type I ou II) peuvent se produire simultanément, la proportion de l'une par rapport à l'autre varie en fonction de certains paramètres telles que la concentration en oxygène ou la nature du PS.⁵²

II.3.3. Paramètres

Les capacités d'absorption, de fluorescence et de production d' $^1\text{O}_2$ d'un PS peuvent alors être déterminés par quatre paramètres : le coefficient d'extinction molaire ϵ , les rendements quantiques de fluorescence et de production d' $^1\text{O}_2$ (Φ_f et Φ_Δ) et la durée de vie de fluorescence (τ_f).

La quantité de lumière absorbée par le PS est directement proportionnelle à la concentration de la solution illuminée. L'absorption de la lumière est ainsi définie par la loi de Beer–Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (8)$$

Avec A, l'absorbance une constante sans unité ; ε , exprimé en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ spécifique d'une molécule ; C, la concentration exprimée en $mol \cdot L^{-1}$ et l, la longueur du trajet parcouru par la lumière exprimée en cm.²⁹

Le rendement quantique de fluorescence, notée Φ_f , correspond au ratio du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés pendant le même temps. La durée de vie de fluorescence, notée τ_f correspond, quant à elle, au temps moyen pour qu'une molécule passe de l'état excité S_1 à l'état fondamental S_0 .²⁹

Le rendement quantique de production de 1O_2 , notée Φ_Δ , correspond au ratio du nombre de photons émis par luminescence de 1O_2 sur le nombre de photons absorbés par le PS pendant le même temps.⁵⁶

II.4. Lumière

II.4.1. Paramètres utilisés dans le choix de la source lumineuse

Afin de générer l'effet photodynamique le plus efficace, il est nécessaire de prendre plusieurs paramètres en considération lors du choix de la source lumineuse. La lumière peut être décrite sous la forme d'ondes et de photons. Il est donc possible de caractériser son déplacement dans l'espace de différentes manières : utiliser ses caractéristiques d'onde pour décrire son comportement ou utiliser la nature des particules et des quanta de lumière pour décrire les interactions et transferts d'énergie entre les molécules.⁵⁷ L'énergie d'un seul photon, exprimée en Joules (J), est donnée par l'équation (9) :

$$E_{\text{photon}} = \frac{hc}{\lambda} \quad (9)$$

Où h est la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s), c la vitesse de la lumière (3×10^{10} cm.s⁻¹) et λ la longueur d'onde (cm).

Il est également possible d'exprimer la longueur d'onde λ (cm) de la lumière en fonction de sa fréquence ν (ondes par seconde) et de sa vitesse c, suivant l'équation (10) :

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (10)$$

Dans le cadre d'applications photochimique et médicale, deux paramètres importants doivent être considérés : la quantité totale d'énergie utilisée pour un procédé photochimique donné et la vitesse d'application au système considéré. Nous pouvons considérer le taux de lumière absorbé et la quantité de lumière atteignant la surface

d'intérêt (dose de lumière reçue). Deux paramètres vont permettre de régler les conditions d'illumination optimales en fonction de la zone à traiter : 1) la puissance rapportée à l'unité de surface est appelée « éclairage énergétique » ou irradiance et est exprimée en W.cm^{-2} et 2) l'énergie rapportée à l'unité de surface est appelée « exposition énergétique » ou fluence (J.cm^{-2}).²⁹

Un des avantages de la PDT est l'utilisation de radiations non ionisantes, la lumière visible. La source lumineuse utilisée doit être choisie selon deux critères importants : 1) être suffisamment énergétique pour activer l'état triplet du PS et par conséquent l'état singulet de l'oxygène et 2) pénétrer suffisamment les tissus biologiques pour atteindre la cible visée. Au regard du spectre électromagnétique donné en Figure 7, nous pouvons observer que la lumière visible représente une très faible partie de ce spectre, la zone d'intérêt pour une application en PDT est par conséquent d'autant plus réduite.

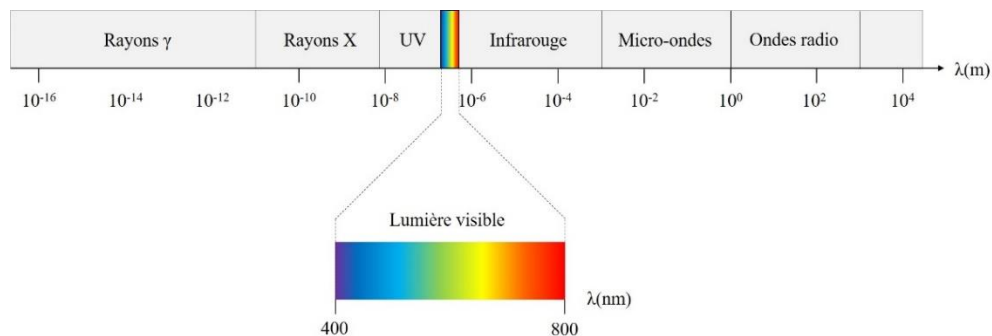


Figure 7 : Spectre électromagnétique.

En se référant à l'équation de l'énergie (8), plus la longueur d'onde est faible, plus elle est énergétique et susceptible d'activer la production d' $^1\text{O}_2$ mais par conséquent destructive des tissus à l'image des rayons ultraviolets (UV) qui peuvent générer des photo-dégâts importants. Au contraire, au-delà de 1200 nm, il devient difficile de générer un effet photodynamique permettant de produire de l' $^1\text{O}_2$ en raison de l'énergie insuffisante générée.

En ce qui concerne la pénétration de la lumière dans les tissus, plusieurs phénomènes peuvent se produire lorsqu'un faisceau lumineux traverse des tissus biologiques : il peut être réfléchi, diffusé ou absorbé (Figure 8). De plus, la pénétration de la lumière dans les tissus est très faible (de l'ordre de quelques millimètres) et est différente en fonction de la longueur d'onde (pénétration plus profonde de la lumière rouge et proche infrarouge).

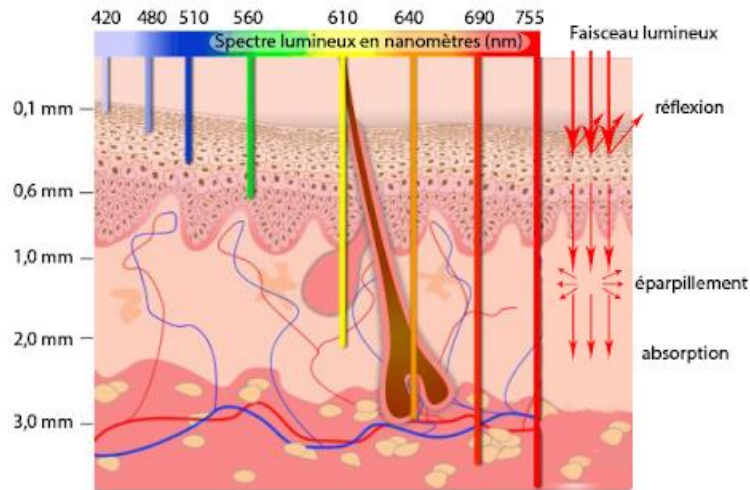


Figure 8 : Pénétration de la lumière dans les tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde. Extraite de ⁵⁸.

Il faut également prendre en considération l'absorption de la lumière par les différents composants des tissus biologiques qui peuvent entrer en compétition avec les PS. En lumière UV, ce sont principalement les protéines qui absorbent et en lumière rouge, ce sont principalement l'hémoglobine et la mélanine qui absorbent (Figure 9).

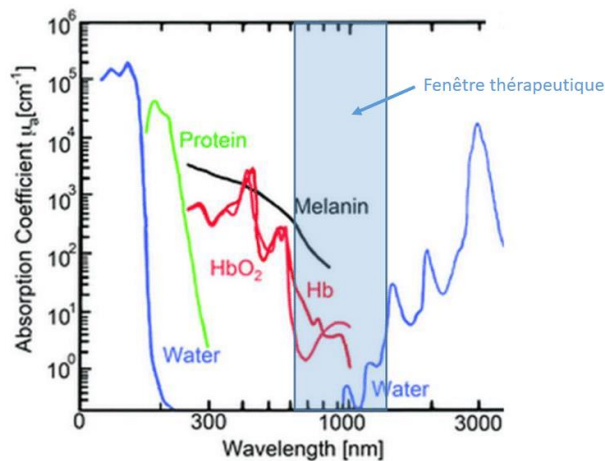


Figure 9 : Spectre d'absorption des principaux constituants des tissus biologiques. Extraite de ⁵⁹.

L'ensemble de ces considérations a permis de définir une fenêtre thérapeutique pour la source lumineuse utilisée en PDT comprise entre 700 et 1000 nm.

II.4.2. Sources lumineuses utilisées en PDT

De nombreuses sources lumineuses existent pour la PDT telles que le soleil, les lasers, les lampes et les diodes électroluminescentes (DELs).

II.4.2.1. Le soleil

La lumière du jour peut être utilisée comme source lumineuse en PDT. Ce traitement est connu sous le nom de *Daylight PDT* et a reçu l'AMM pour le traitement des kératoses actiniques en 2016 en France. Il consiste en l'exposition du patient à la lumière du jour pendant deux heures, 30 min après application du PS (ALA). L'utilisation de la lumière du jour est limitée par les conditions météorologiques (ciel dégagé, température comprise entre 10 et 30°C), la localisation de la lésion à traiter et ne peut être réalisée que d'avril à octobre.⁶⁰

II.4.2.2. Lasers

Les lasers sont très utilisés en PDT. En effet, le faisceau émis par un laser présente des caractéristiques intéressantes qui sont 1) homogène, 2) monochromatique, 3) possibilité d'émission par courtes pulsations et 4) couplage à une fibre optique avec une faible perte d'intensité. Il existe de nombreux types de lasers tels que les lasers à état solide, les lasers à gaz et les lasers à colorant. En revanche, ce type d'équipement peut présenter un coût élevé et nécessite une expertise technique en terme d'utilisation et de maintenance.²⁹ Les récents progrès font diminuer les coûts.

Les lasers à diode ont été plus récemment développés et présentent un potentiel pour des applications PDT. Ils sont composés d'un semi-conducteur qui les rend compacts tout en conservant une puissance élevée. De plus, ils peuvent être utilisés en mode continue ou pulsé, sont facilement transportables et faciles d'utilisation. Ils sont souvent couplés à des fibres optiques et utilisés pour de nombreuses applications PDT notamment endoscopique ou interstitiel.⁶¹ Par exemple, afin de pallier la faible pénétration de la lumière dans les tissus, la iPDT, consistant en l'insertion de ces fibres optiques dans les tissus à traiter, peut être utilisée.⁶²

II.4.2.3. Lampes

Les lampes sont moins coûteuses et leur entretien ainsi que leur portabilité sont plus aisés. Elles ne présentent pas une émission monochromatique mais un spectre beaucoup plus large nécessitant l'utilisation d'une combinaison de filtres permettant 1) de sélectionner une longueur d'onde avec une bande passante de 10 nm (filtre à bande étroite), 2) une réduction du rayonnement UV (filtre passe-haut) et 3) une réduction de l'émission infrarouge pouvant induire un réchauffement de la zone traitée (filtre passe-bas). L'utilisation des lampes est, de préférence, conseillée pour le traitement de lésions

superficielles larges (lésions de la peau) puisqu'elles peuvent être difficilement couplées à des fibres optiques.⁶¹

II.4.2.4. Diodes électroluminescentes (DELs)

Depuis quelques années, un intérêt pour les DELs en PDT a été démontré. Les DELs sont caractérisées par une émission non homogène (largeur de bande comprise entre 5 et 10 nm) et une faible puissance (maximum 150 mW.cm^{-2}) réduisant par conséquent la chaleur produite. Elles sont composées d'un semi-conducteur dont le choix permet d'ajuster la longueur d'onde utilisée pouvant aller de 350 nm à 1100 nm. Elles présentent plusieurs avantages comme leur faible coût, leur versatilité et leur facilité de transport.^{29,61}

Le choix de la source lumineuse va dépendre de la zone à traiter et de la longueur d'onde d'illumination souhaitée. Afin d'homogénéiser l'illumination de la zone à traiter, les sources lumineuses peuvent être couplées à une fibre optique (pour une tumeur située en profondeur), à un ballonnet (illumination d'une cavité) ou à des tissus lumineux (illumination superficielle).⁶²

II.5. Photosensibilisateurs (PSs) utilisés en PDT

II.5.1. Caractéristiques d'un bon photosensibilisateur (PS)

Un PS idéal doit présenter plusieurs caractéristiques⁵² :

- Être synthétisé facilement ;
- Avoir une forte absorption à la longueur d'onde d'excitation (un haut coefficient d'extinction molaire ϵ) ;
- Posséder un état triplet suffisamment long (typiquement, $\geq 500 \text{ ns}$)⁵⁴ et un rendement quantique d'oxygène singulet élevé ;
- Agir localement pour ne détruire que les cellules cancéreuses ;
- Être photostable durant le traitement PDT (faible photodégradation)
- Être soluble dans les milieux biologiques ;
- Être faiblement cytotoxique et rapidement excrété de l'organisme.

Depuis la découverte de la PDT, de nombreux PSs ont été développés et synthétisés conduisant à plusieurs générations de PS.

II.5.2. Première génération

Le Photofrin® et l'HpD décrit dans le § II.1 constituent la première génération de PSs autorisés dans le cas de traitement par PDT.

Bien que présentant des avantages certains (partiellement sélectifs des cellules cancéreuses, bon rendement quantique de génération d' $^1\text{O}_2$), des inconvénients (mélange complexe, faible coefficient d'extinction molaire à 630 nm, activité PDT modérée, photosensibilité rémanente) ont conduit à la recherche de nouveaux PSs correspondant aux cahiers des charges décrits dans le paragraphe II.5.1.

II.5.3. Seconde génération

La majorité des PSs de seconde génération sont dérivés de l'HpD et par conséquent du squelette tétrapyrroliques des porphyrines. Les porphyrines sont des composés macrocycliques constitués de quatre unités pyrrole possédant 22 électrons π dont 18 électrons π sont responsables de l'aromaticité de la molécule (Figure 10).^{29,34,57}



Figure 10 : Structures chimiques de la porphyrine et de ses dérivés.

Les porphyrines et leurs dérivés présentent de nombreux avantages : elles sont fluorescentes, ont une faible toxicité en l'absence de lumière et une durée de vie de l'état triplet relativement long. Du fait de leur importante aromaticité, les porphyrines présentent un spectre d'absorption caractéristique avec une bande très intense autour de 400 nm appelée bande de Soret et quatre bandes entre 500 et 650 nm, appelées bandes Q, dans la région de la lumière visible (Figure 11).

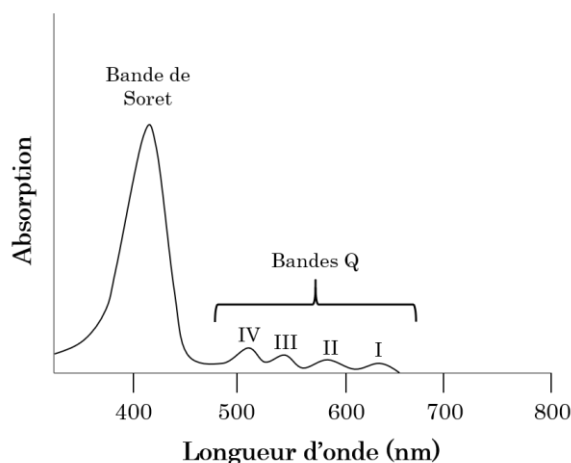


Figure 11 : Spectre d'absorption standard UV-visible d'une porphyrine.

Dans la structure de la porphyrine, deux doubles liaisons périphériques de deux motifs pyrroles opposés sont conjugués entre elles et ne participent pas à l'aromaticité de la molécule. La réduction d'une ou deux de ces liaisons conduit à l'obtention de dérivés de la porphyrine : les chlorines et les bactériochlorines (Figure 10). Ces modifications entraînent une modification du spectre d'absorption avec un décalage de la bande Q_1 vers les grandes longueurs d'onde ainsi qu'une modification du coefficient d'extinction molaire ϵ à la longueur d'onde correspondante. En effet, ces modifications de la structure de la porphyrine entraînent une diminution de l'écart entre les orbitales moléculaires HOMO (*highest occupied molecular orbital*) et LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*). Plus précisément, concernant les porphyrines, elles possèdent une absorption importante correspondant à la bande Q_1 entre 630 et 650 nm, décalés entre 660 et 710 nm et plus intense pour les chlorines et entre 740 et 800 nm pour les bactériochlorines qui dépend également de la nature des substituants périphériques. Ces modifications sont très intéressantes dans le cas de la PDT puisqu'elles permettent l'illumination des PSs à des longueurs d'onde plus grandes résultant en une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus biologiques. En revanche, les bactériochlorines présentent l'inconvénient d'être beaucoup plus sensibles à l'oxydation.

II.5.3.1. Foscan®

Le Foscan®, dont le nom générique est la Temoporfine, est une chlorine synthétique qui a été commercialisé en Europe en 2001 et a obtenu l'AMM européenne centralisée en 2008.^{63,64} Il est utilisé cliniquement pour le traitement de plusieurs cancers : tête et cou, poumon, peau, cerveau, œsophage. La structure chimique de la molécule, dont le nom complet est la chlorine 5,10,15,20-tétra(*m*-hydroxyphényl) (*m*THPC), est présentée en Figure 12.^{65,66}

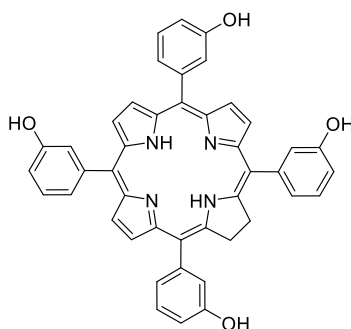


Figure 12 : Structure chimique du Foscan®.

En comparaison avec le Photofrin®, ce composé, développé par Bonnet *et al.* dans les années 80,⁶⁷ présente l'avantage d'être chimiquement pur et possède une bande

d'absorption Q_1 à 652 nm ainsi qu'un ϵ de 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$ à cette longueur d'onde dans le méthanol (MeOH). Par conséquent, de faibles quantités de ce composé sont nécessaires pour générer un effet photodynamique ainsi que de faibles doses de lumière. Dans le cas d'un cancer colorectal, l'intervalle drogue–lumière est de 2 jours pour avoir une accumulation préférentielle dans les cellules cancéreuses. Dans ce même cas, sa demi–vie d'élimination est de 10 à 12 jours.^{68,69}

II.5.3.2. Acide 5–aminolévulinique (ALA) et ses dérivés

Un autre PS très utilisé est la PpIX endogène obtenue à partir de l'ALA. L'ALA est une prodrogue précurseur de la PpIX elle–même précurseur dans la biosynthèse de l'hème (Figure 13).³⁴

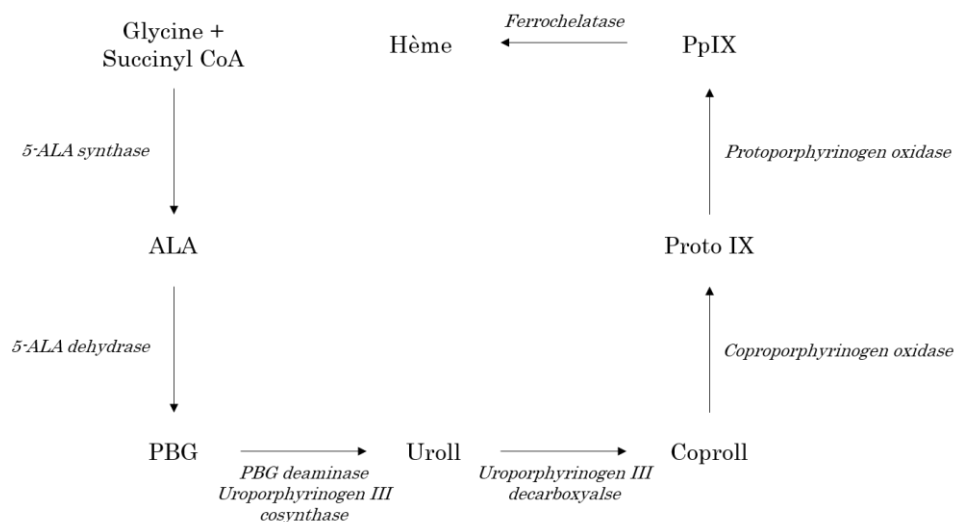


Figure 13 : Biosynthèse de l'hème. PBG, Porphobilinogène ; Uroll, Uroporphyrinogène ; Coproll, Coproporphyrinogène ; Proto IX, protoporphyrinogène IX. Adaptée de Hamblin et al.³⁴

L'ALA, tout comme l'hème, ne présente pas d'effet photodynamique à la différence de la PpIX. L'apport en excès d'ALA exogène conduit à une accumulation de la PpIX.³⁴ Ceci rend cette approche très sélective des tissus cancéreux en raison d'une faible activité de la ferrochélatase dans ces derniers en comparaison avec les tissus sains. L'ALA a été formulé sous plusieurs formes : orale, intraveineuse et topique dépendante de son application et plusieurs formulations chimiques dérivées. Cliniquement, suivant l'application, la PpIX peut être illuminée à 410 nm, 510 nm ou 635 nm.⁶⁸ Les longueurs d'onde les plus courtes permettent une plus grande production d' 1O_2 et par conséquent un traitement plus court. Pour des lésions superficielles, l'ALA est appliqué topiquement et illuminé aux plus basses longueurs d'onde alors que pour les lésions plus profondes, les formes orales et intraveineuse sont privilégiées avec une illumination à 635 nm.³⁴

L'ALA a été autorisé sous le nom de Levulan® en 1999 aux Etats-Unis pour le traitement de lésions superficielles de la peau, les kératoses actiniques en administration topique. La PpIX présente une clairance rapide ainsi qu'une faible intervalle drogue-lumière. Bien que très efficace dans le traitement de ce type de lésion, la destruction des tumeurs est limitée à une faible pénétration (1 mm) et le traitement entraîne une douleur importante pour le patient.⁷⁰ Grâce aux tissus lumineux composés de fibres optiques développés par le laboratoire INSERM OncoThAI à Lille, permettant une diffusion homogène de la lumière à une irradiance basse, la douleur est dorénavant complètement supprimée.⁶⁰

D'autres molécules dérivées de l'ALA ont été développées, des esters de l'ALA, permettant une pénétration dans la peau plus importante notamment le Metvix® (acide méthylaminolévunilique), également autorisé en Europe, qui présente une meilleure lipophilie que le Levulan® avec des propriétés photophysiques similaires, une plus grande sélectivité pour les cancers cutanés et une douleur associée au traitement réduite.

A travers le monde, l'ALA et ses dérivés sont grandement utilisés en dermatologie notamment pour le traitement des kératoses actiniques, de la maladie de Bowen, des carcinomes basocellulaires mais également pour les cancers tête et cou, de la vessie, de la prostate et de l'œsophage de Barret.^{65,68}

II.5.3.3. Visudyne®

La Visudyne® dont le nom générique est la Vertéporfine a reçu l'AMM européenne en 2000 pour des traitements ophtalmologiques notamment pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).⁷¹ La Vertéporfine est un dérivé de la benzoporphyrine dont la structure chimique est donnée en Figure 14.⁷²

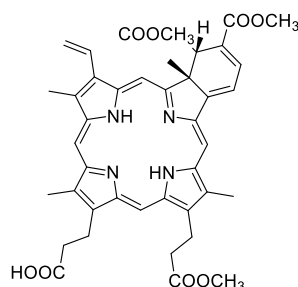


Figure 14 : Structure chimique de la Visudyne®

C'est un composé hydrophobe capable de générer efficacement de l' 1O_2 lorsqu'il est illuminé à 689 nm. De plus, il présente une photosensibilité de la peau, dépendante de la dose administrée, maximale seulement quelques heures après traitement.⁷³

II.5.3.4. Tookad®

Le Tookad® dont le nom générique est la padélorphine, est une bactériochlorine dont la structure chimique est donnée en Figure 15.

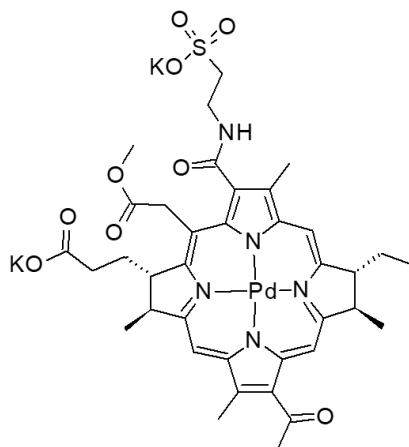


Figure 15 : Structure chimique du Tookad®.

Le Tookad® est un composé hydrophile, ainsi facile à administrer et agissant au niveau vasculaire. Son illumination à 763 nm permet une pénétration profonde de la lumière et il est rapidement excrété avec une disparition de la photosensibilité 3 heures après administration.⁶⁸ Lors d'essais cliniques, il a été montré que ce traitement était sûr et efficace avec une disparition du cancer dans 50% des cas après un suivi de 3,5 ans.⁷⁴ 12 essais cliniques utilisant ce composé sont recensés sur le site clinicaltrials.gov. Il a reçu l'AMM en France en 2017 pour le traitement du cancer de la prostate localisé à faibles risques par PDT vasculaire (VTP) mais son impact a été jugé insuffisant par la commission Nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé et la commission de transparence, en comparaison avec les modalités de traitement déjà utilisées. De ce fait, il n'est pas remboursé et pas utilisé.⁷⁵

En février 2020, la FDA (Food and Drug Administration) n'a pas non plus approuvé l'utilisation du Tookad®, préférant, pour les patients à faible risque, une surveillance active.

II.5.3.5. Autres PSs de seconde génération

Le Tableau 3 récapitule les principaux PSs ayant reçu une AMM ou étant en phase clinique dans le monde. En fonction du PS et du type d'illumination, la concentration administrée varie de 0,1 à 5 mg/kg par patient, avec une dose de lumière de 10 à 300 J.cm⁻².

Tableau 3 : Liste non exhaustive des PSs de seconde génération ayant reçu l'AMM ou en phase clinique.^{76,77}

Nom du médicament	PS	Longueur d'onde d'absorption	Applications	Approuvé	Essai clinique
Foscan®	Temoporfin, <i>m</i> -THPC	652 nm	Cancer tête et cou	Europe ⁶⁴	
Levulan®	ALA	635 nm	Kératoses actiniques	Europe, Etats-Unis ⁷⁸	
Lutrin®	Lu- <i>Tex</i> , Lutétium (III)- <i>tex</i> aphyrine	732 nm	Cancer du sein		Etats-Unis ⁷⁹
Metvix®	Methyl-ALA	635 nm	Kératoses actiniques	Europe, Australie ⁷⁸	
Pc-4	Silicon phtalocyanine	675 nm	Lésions cutanées/subcutanées de tumeurs solides diverses		Etats-Unis ⁸⁰
Photochlor	2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinylpyropheophorbide, HPPH	665 nm	Cancer de l'œsophage, des poumons, tête et cou et larynx		Etats-Unis ⁸¹
Tookad®	Bacteriochlorine	762 nm	Cancer de la prostate	Europe ⁸²	Mexique ⁸³
Visudyn®	Verteoporfine	689 nm	Ophtalmique (DMLA)	Monde ⁸⁴	

Bien que présentant une activité photodynamique importante, les PSs de seconde génération présentent deux inconvénients majeurs, à savoir une solubilité limitée ainsi qu'une faible sélectivité pour les cellules cancéreuses.

II.5.4. Troisième génération

Une troisième génération de PSs suscite depuis plusieurs années un intérêt croissant afin d'améliorer la sélectivité et l'accumulation des PSs actuels pour les tissus tumoraux. Afin de mener à bien ces objectifs, la stratégie de recherche repose sur l'association des PSs de seconde génération à des vecteurs par encapsulation ou conjugaison. Les PSs peuvent être couplés à des nanoparticules (NPs) ou des ligands de récepteurs membranaires surexprimés sur ces cellules.

Cette section sera détaillée plus précisément dans la partie suivante III.2.

II.5.5. Quatrième génération

La quatrième génération de PSs est basée sur le développement de composés remplissant à la fois le rôle d'agents de diagnostic et thérapeutique pour une application dite théranostique. En effet, la majorité des PSs sont des fluorophores pouvant être utilisés comme outil de diagnostic en parallèle d'un traitement PDT. Ceci présente plusieurs

intérêts pour guider ou améliorer le traitement tels que la confirmation de la localisation du PS ou la différenciation des cellules malignes des cellules saines.⁸⁵

Cette partie ne faisant pas l'objet de cette thèse, elle ne sera pas détaillée davantage.

III. Limites de la PDT

III.1. Pénétration de la lumière

Comme décrit dans le § II.4, le choix de la source d'illumination dépend de la localisation et du type de tumeur. Pour traiter des tumeurs profondes sans utiliser de fibres, il est nécessaire d'utiliser des longueurs d'onde d'excitation dans le rouge voire le proche infrarouge.

III.1.1. Excitation biphotonique dans le proche infrarouge

L'utilisation d'une illumination proche infrarouge (NIR) en PDT apparaît comme une stratégie prometteuse pour une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus. En effet, la fenêtre spectrale, pour laquelle la plus grande transparence des milieux biologiques est observée, est comprise entre 700 et 1100 nm.⁸⁶

L'application d'une excitation biphotonique en PDT est une approche développée ces dernières années qui permet l'excitation dans le proche infrarouge d'une molécule. Cette technique repose sur l'absorption simultanée de deux photons, par combinaison de leur énergie. Pour augmenter la probabilité d'une molécule à rentrer en contact avec deux photons simultanément, ceux-ci doivent être émis en grande quantité spatiale et temporelle ce qui est favorisé par l'utilisation d'un laser pulsé.⁸⁷ Le mécanisme de l'excitation biphotonique peut être visualisé comme un processus se déroulant en « deux étapes ». La première étape consiste au transfert de la molécule de son état fondamental à un état excité intermédiaire consécutivement à l'absorption d'un premier photon. Durant la seconde étape, la molécule termine sa transition de son état intermédiaire à un état excité final suite à l'absorption d'un second photon (Figure 16). En réalité, ces deux étapes ont lieu simultanément.⁸⁸

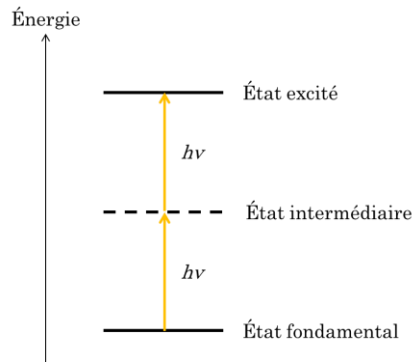


Figure 16 : Principe de l'excitation biphoton

Avec cette technique, l'énergie combinée des deux photons est équivalente à l'énergie d'un seul photon lors d'une excitation classique de la molécule. Pour utiliser cette technique, la molécule utilisée doit être capable d'absorber en bi-photon. En plus de présenter une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, une sélectivité spatiale importante est observée en raison d'une relation quadratique entre l'intensité du laser et l'excitation biphotonique. Cette sélectivité permet de concentrer le faisceau laser sur la zone cible en limitant le risque d'atteindre les tissus sains.⁸⁷

Ces dernières années, une autre approche reposant sur l'utilisation d'un nouveau type de NPs, appelé UCNPs (*upconversion* NPs), a été développée pour une excitation dans le proche infrarouge. Les UCNPs sont principalement constituées de matériaux en céramique dans lesquels sont introduits des atomes de terres rares. Ces NPs ont la capacité d'absorber séquentiellement deux photons à travers un état d'énergie métastable. Cet état d'énergie métastable possède une durée de vie de l'ordre de la microseconde beaucoup plus long que l'état intermédiaire (de l'ordre de la femtoseconde) impliqué dans le procédé d'excitation biphotonique. La durée de vie plus longue de cet état intermédiaire permet l'utilisation de laser en mode continu et de puissance plus faible de l'ordre de $1-10^3 \text{ W.cm}^{-2}$ ($10^6-10^9 \text{ W.cm}^{-2}$ en excitation biphotonique). Après absorption de deux photons de faible énergie, un photon de haute énergie est émis dans le spectre du visible et transfère une partie de cette énergie au PS (Figure 17).^{86,89,90}

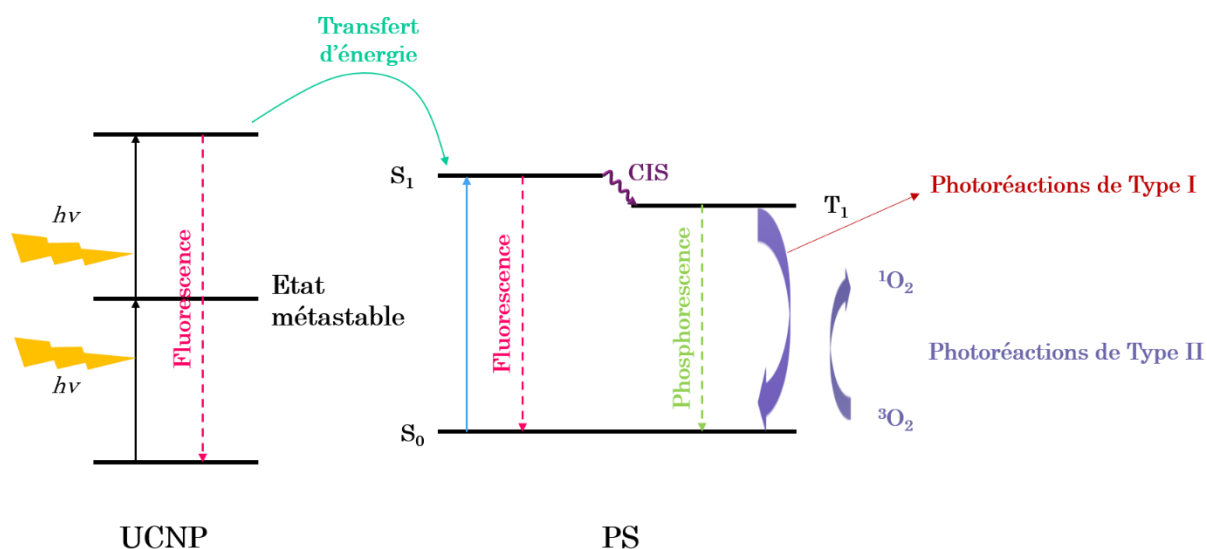


Figure 17 : Illustration du transfert d'énergie des UCNP à un PS. Adaptée de Mallidi et al.⁸⁶

III.1.2. Utilisation des rayons X

Une autre stratégie pour augmenter l'activation du PS en profondeur est l'utilisation des rayons X (RX). Elle a été largement étudiée depuis les années 90 avec un intérêt croissant depuis le début des années 2000 avec le développement de NPs spécifiques. Cette partie a fait l'objet d'une revue intitulée « Using X-ray in photodynamic therapy: an overview » publiée en 2018 dans le journal *Photochemical and Photobiological Sciences*.⁹¹

Deux approches principales ont été rapportées dans cette revue ; d'une part, l'utilisation des RX avec le PS seul et d'autre part l'utilisation de NPs excitable par RX. La première partie décrit l'utilisation de PSs comme radiosensibilisateurs tels que l'HpD, le Photofrin®, la PpIX et l'acridine orange. La seconde partie s'est intéressée à décrire les différents types de NPs excitable par les RX, couplés ou non à des PSs. Dans le cas où un PS est associé aux NPs, ces dernières sont activées dans un premier temps par les RX puis sont capables de transférer leur énergie par FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) au PS et ainsi générer la production de ROS. Certaines NPs peuvent également générer des ROS directement par excitation aux RX.

III.2. Ciblage

La PDT présente un inconvénient majeur qui est le manque de sélectivité de la majorité des PSs commerciaux pour les cellules cancéreuses. Même s'ils présentent une certaine sélectivité pour ces cellules par rapport aux cellules saines, ceci peut être amélioré. La recherche de nouveaux PSs ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses a

connu un intérêt croissant ces dernières années. Il existe deux approches majeures : le ciblage passif et le ciblage actif.

III.2.1. Ciblage passif

Le ciblage passif repose sur la diffusion de molécules actives dans les cellules cancéreuses par l'intermédiaire de nano-véhicules en exploitant le microenvironnement tumoral notamment l'effet EPR (*Enhanced Permeability Effect*). Cette stratégie vise à exploiter les différences physiologiques et morphologiques existantes entre les tissus sains et cancéreux afin de cibler spécifiquement ces derniers. En effet, l'effet EPR repose sur une différence de vascularisation entre les cellules saines et cancéreuses. Comme évoqué dans le § I.2, les cellules cancéreuses développent leur propre réseau vasculaire pour s'alimenter et se développer. Ce processus, appelé angiogenèse tumorale, correspond à la création de nouveaux vaisseaux sanguins par les tumeurs à partir de ceux préexistants des cellules saines. Les parois des vaisseaux sanguins sont composées de cellules endothéliales. Ils ont la capacité de se renouveler et de proliférer rapidement mais ceci est généralement régulé par des facteurs pro- et anti- angiogéniques. Dans le cas de nombreux cancers, les facteurs proangiogéniques sont surexprimés et entraînent un développement rapide de la néovascularisation des tumeurs. Il apparaît une différence majeure dans l'agencement des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins des tumeurs et des tissus sains.⁹² Dans le cas des tumeurs, les cellules endothéliales présentent un espacement important qui peut permettre la diffusion de nano-véhicules par effet EPR (Figure 18). De plus, suite à un drainage lymphatique moins important dans les cellules tumorales que dans les cellules saines, les nano-véhicules sont retenus dans les cellules cancéreuses.⁹³

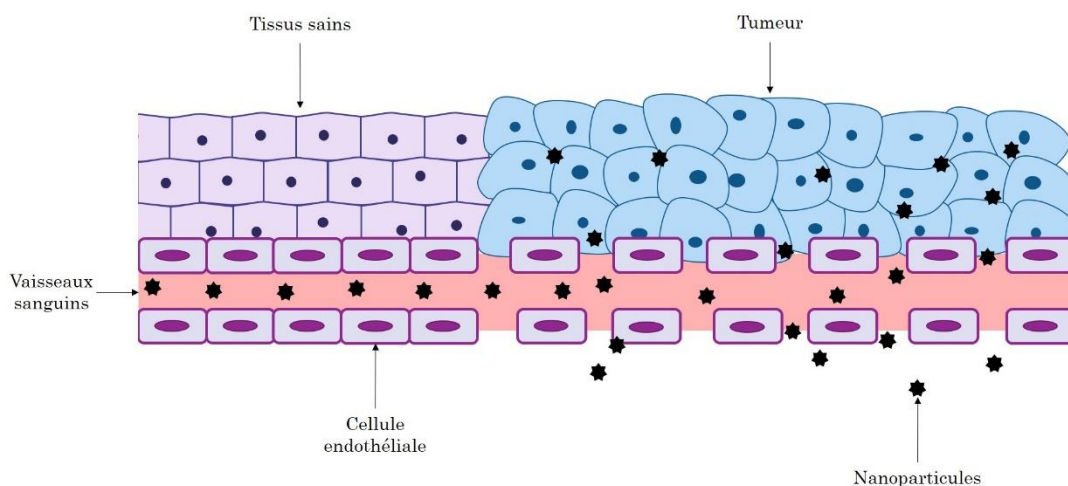


Figure 18 : Illustration de l'effet EPR. Adaptée de Bugaj.⁹³

Les nano-systèmes utilisés doivent répondre à deux critères : être biocompatibles et non toxiques. La taille hydrodynamique, la forme, la composition et les propriétés de surface de ces NPs doivent être maîtrisées. Tout objet possédant une taille inférieure à 100 nm peut être qualifié de NPs et le nom de NPs est souvent généralisé aux objets possédant une taille de quelques centaines de nanomètres. Le diamètre hydrodynamique idéal pour optimiser les critères de biocompatibilité et de toxicité est fixé entre 10 et 100 nm. Dans le cas du ciblage des tumeurs, les NPs présentent certains avantages comme une accumulation facilitée dans la tumeur ainsi d'une demi-vie d'élimination et une distribution dans l'organisme meilleure que pour les médicaments libres.^{93,94}

Quelques exemples de NPs sont donnés en Figure 19. Les NPs peuvent être différenciées en plusieurs catégories en fonction de leurs propriétés et leurs structures dont quelques exemples sont explicités ci-après :

- Les **Liposomes** sont des vésicules sphériques caractérisées par une taille comprise entre 80 et 300 nm et composées notamment de phospholipides et de stéroïdes. Ils permettent d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques (métabolisation rapide, accumulation tumorale) des molécules qu'ils transportent (hydrophiles et hydrophobes). Leur dégradation par le milieu biologique permet la libération de la molécule encapsulée dans les cellules cancéreuses. Cette dégradation dépend généralement de la composition du liposome et du milieu environnant.⁹⁴ De nombreuses études ont montré une accumulation rapide de PSs transportés par des liposomes dans les tumeurs en comparaison avec le PS administré seul.⁹⁵⁻⁹⁷ Elles présentent cependant une durée de vie limitée dans le plasma en raison de leur biodégradation.
- Les **Dendrimères** sont des polymères avec une structure et une taille qui leur est propre. Ils sont généralement composés de trois éléments : un cœur, des dendrons (bras dendrimériques) et des groupes en surface actifs. Les dendrons sont des monomères attachés au cœur (un atome ou une molécule) formant plusieurs couches polymériques et liés à des groupes fonctionnels en surface. Ce sont ces derniers qui sont responsables de leur biocompatibilité ainsi que leurs propriétés physicochimiques.⁹⁴ En plus d'être biocompatibles, ils présentent une faible toxicité ainsi qu'un coût de manufacture modéré.⁹³
- Les **NPs de silice** existent sous différentes formes : les xérogels (structure amorphe possédant une grande aire de surface et porosité) et les NPs de silice mésoporeuse (MSNs, structure homogène et faible polydispersité ainsi qu'une

adsorption de molécule facilitée par l'aire de surface disponible). Ils peuvent être utilisées pour des applications à la fois thérapeutique et diagnostique.⁹⁴

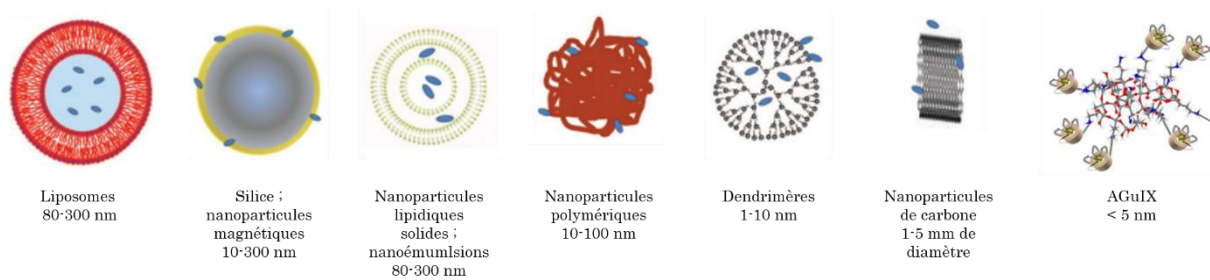


Figure 19 : Différents types de NPs. Adaptée de Wilczewska et al et Gries et al.^{94,98}

Bien que très utilisé et prometteur, ce type de ciblage n'est pas adapté à tous les types de tumeur. Si les NPs sont de trop petite taille, elles peuvent rapidement être excrétées par le système rénal mais également perdurer dans le système vasculaire. De plus, dans le cas de petites tumeurs, l'angiogenèse tumorale ne s'est pas mise en place et la diffusion des NPs par effet EPR n'est alors pas possible.⁹³

III.2.2. Ciblage actif

Le ciblage actif repose sur l'adressage spécifique de PSs par conjugaison de ces derniers à des molécules, agissant comme vecteurs, présentant une affinité importante pour des récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses (direct) ou des néovaisseaux (indirect) (Figure 20).

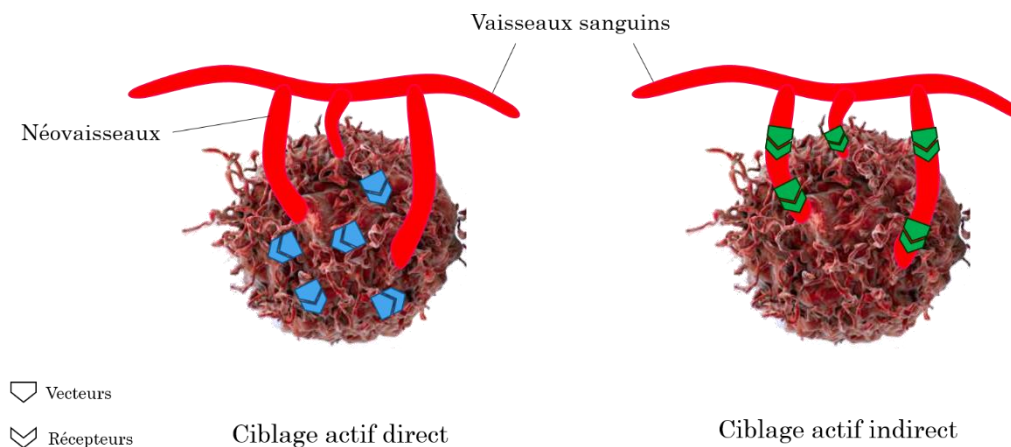


Figure 20 : Illustration des deux types de ciblage actif.

III.2.2.1. Ciblage actif direct

Le ciblage actif direct consiste en l'introduction du PS au sein des tissus tumoraux. Dans ce cas, des biomolécules (sucres, peptides, acide folique, stéroïdes...) sont utilisés comme agents de ciblage de la tumeur et sont liés de façon covalente au PS soit directement, soit par l'intermédiaire d'espaceurs. Cette stratégie présente deux avantages, d'une part un contrôle de l'amphiphilie limitant le phénomène d'agrégation et d'autre part l'augmentation de l'accumulation intracellulaire du PS.⁵⁷ Quelques exemples de récepteurs ciblés dans le cas de cette stratégie sont donnés ci-dessous.

III.2.2.1.i. Récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF)

L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est un facteur de croissance impliqué dans la croissance des cellules épithéliales. Le récepteur de l'EGF présente une activité tyrosine kinase. Les récepteurs de l'EGF sont surexprimés dans de nombreuses lignées cellulaires. L'activité de ce récepteur est également connue comme impliquée dans la prolifération et la croissance cellulaire, l'EGF étant un facteur stimulant l'angiogenèse.^{93,99} Il a également été montré que l'ajout d'EGF après un traitement PDT avec l'HpD, sur des lignées cellulaires de gliomes, réduisait la phototoxicité alors que son ajout avant traitement n'avait aucun effet.¹⁰⁰

Lutsenko *et al.* ont étudié l'effet de l'utilisation de l'EGF comme vecteur pour des phtalocyanines disulfonées d'aluminium et de cobalt *in vitro* sur des lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7) et *in vivo* sur des lignées du mélanome (B16).¹⁰¹ Le conjugué d'aluminium a montré une photoactivité sept fois plus importante que le PS non vectorisé *in vitro* et *in vivo*.

III.2.2.1.ii. Récepteur de l'œstrogène

Dans l'organisme, l'œstrogène constitue la principale hormone stéroïde sexuelle féminine et se lie naturellement à son récepteur, le récepteur de l'œstrogène qui est une protéine. Ce récepteur est surexprimé dans plusieurs types de cancer : le cerveau, les ovaires et le sein.¹⁰²

James *et al.* ont synthétisé une tétraphénylporphyrine C₁₁ conjugué au β-oestradiol pour cibler spécifiquement le récepteur de l'œstrogène.¹⁰³ Ce conjugué présente une affinité (CE₅₀ = 274 nM), de l'ordre du nanomolaire, pour ce récepteur mais cependant moins importante que l'œstrogène (CE₅₀ = 1 nM). Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires du cancer du sein ont montré une accumulation importante du conjugué dans des cellules MCF-7, beaucoup plus importante que pour le PS non vectorisé. En revanche,

l'activité photodynamique du PS n'a pas connu d'amélioration.¹⁰⁴ Khan *et al.* ont, quant à eux, couplé l'œstradiol à diverses phtalocyanines et évalué l'affinité des conjugués ainsi que leur phototoxicité pour un modèle cellulaire de cancer du sein.¹⁰⁵ Les conjugués les moins lipophiles ont montré de très bonnes affinités pour le récepteur à l'œstrogène (RBA (Receptor Binding Affinity) < 2) et certains conjugués ont montré une photoactivité similaire à celle observée pour le PS non conjugué.

III.2.2.1.iii. Récepteur à l'acide folique

L'acide folique (AF) est une petite molécule connue également sous le nom de vitamine B9 et présentant une forte affinité pour son récepteur « folate receptor » (FR α). De plus, il est facilement disponible, à des moindres coûts.⁹³

La fixation de l'AF à FR α conduit à son internalisation dans les cellules par endocytose dans des vésicules. FR α est de plus absent de la plupart des tissus sains et surexprimés dans de nombreux cancers (ovaire, reins, sein...).¹⁰⁶

Le ciblage de FR α apparaît donc comme une cible prometteuse en PDT, sa conjugaison à des PSs étant relativement simple. Le couplage de l'AF à des PSs pour la PDT a été largement étudiée.¹⁰⁶

Notre équipe a étudié le couplage de l'AF à la porphyrine 4-carboxyphényl (P1-COOH) et a montré que l'accumulation cellulaire du conjugué était sept fois supérieure à celle observée pour le PS seul. Ce conjugué a de plus montré une phototoxicité importante avec une survie cellulaire de 30% sur des cellules surexprimant le FR α (KB).¹⁰⁷ Une nouvelle molécule conjuguée à l'AF développée par notre équipe a fait l'objet d'un brevet et son efficacité a été prouvée sur des carcinomes péritonéales d'origine ovarienne.^{108,109}

III.2.2.2. Ciblage actif indirect

Comme décrit dans le § III.2.1, les tumeurs ont la capacité de développer leur propre réseau vasculaire par le phénomène d'angiogenèse tumorale. Cette vasculature est indispensable à la tumeur pour s'alimenter en oxygène et nutriments et par conséquent pour se développer. Le ciblage de ces néovaisseaux et un traitement PDT asphyxiant la tumeur et peut indirectement entraîner son éradication. Ce procédé est appelé ciblage actif indirect. Pour mener à bien cette stratégie, la recherche s'est intéressée au ciblage des récepteurs impliqués dans le développement angiogénique des tumeurs.

III.2.2.2.i. Intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur des cellules endothéliales néovasculaires surexprimé dans beaucoup de cellules cancéreuses et dans les cellules endothéliales en prolifération.

Il a été montré que ce récepteur jouait un rôle important dans l'angiogenèse.^{57,110} Le tripeptide RGD a été identifié comme ligand ayant une forte affinité pour ce récepteur. Ce peptide, sous sa forme linéaire ou cyclique, couplé à un PS (chlorure 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl) a été étudiée par notre équipe. Il a été montré *in vitro* dans des cellules endothéliales humaines (HUVEC) surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ une augmentation 80 (RGD cyclique) et 98 fois supérieure (RGD linéaire) de l'accumulation du PS conjugué en comparaison au PS seul.¹¹¹

III.2.2.2.ii. Récepteur du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)

Le VEGF est considéré comme un des facteurs angiogéniques les plus importants. Il appartient à une famille de glycoprotéines homodimériques jouant un rôle clé dans le développement embryonnaire du système vasculaire sanguin, du système lymphatique ainsi que dans l'angiogenèse.¹¹² Il est synthétisé notamment par les cellules tumorales et endothéliales et sa régulation est influencée par différents facteurs notamment l'hypoxie. Il existe plusieurs isoformes du VEGF qui sont classées en fonction du nombre d'acides aminés les composant, la forme la plus exprimée dans les tissus est le VEGF₁₆₅ composé de 165 acides aminés.

Le VEGF joue un rôle majeur dans le développement des tumeurs et des métastases. Il est responsable de l'induction de la prolifération des cellules endothéliales ainsi que de la stimulation de leur migration et favorisent la survie de ces dernières par inhibition de l'apoptose. Ces phénomènes se produisent par fixation de ce ligand à ses récepteurs fortement exprimés à la surface des cellules endothéliales.⁵⁶

Les récepteurs du VEGF sont des récepteurs à activité tyrosine kinase, dont deux de ces récepteurs sont les VEGFR-1 et VEGFR-2. Une autre famille de récepteur, les neuropilines (NRP), présentent également une interaction avec le VEGF. Ce sont des protéines transmembranaires ne présentant pas d'activité tyrosine kinase et jouant le rôle de co-récepteur des récepteurs de la famille du VEGF.¹¹² Il existe deux formes de ces récepteurs NRP-1 et NRP-2 qui ne sont pas exprimés de la même manière. NRP-1 est majoritairement localisé dans les cellules endothéliales artérielles alors que NRP-2 est exprimé dans l'endothélium lymphatique et veineux. NRP-1 est fortement surexprimée dans les lignées cancéreuses et joue un rôle dans la prolifération tumorale.¹¹³

III.2.2.2.iii. Le récepteur NRP-1

STRUCTURE ET FONCTION DE NRP-1

Il a été identifié que le récepteur NRP-1 interagissait avec le récepteur VEGFR-2. Cette interaction est responsable d'une augmentation de la signalisation associée à la voie du VEGFR-2 et favorise l'angiogenèse.^{114,115}

Le récepteur NRP-1 est un récepteur non-tyrosine kinase existant sous plusieurs isoformes avec une structure basique composée de plusieurs domaines (Figure 21)¹¹⁶ :

- Un domaine extracellulaire *N*-terminal, lui-même constitué de 5 domaines : a₁, a₂, b₁, b₂ et c ou domaine MAM. Les quatre premiers domaines permettent la liaison de ligands tels que les sémaphorines et les VEGFs alors que le dernier est impliqué dans l'homo- ou l'hétéro-dimérisation de récepteurs ;
- Un domaine transmembranaire ;
- Un court domaine cytoplasmique impliqué dans la dimérisation de récepteurs et possédant un motif de liaison PDZ (SEA).

Après la fixation d'un ligand au récepteur NRP-1, celui forme un hétéro-dimère avec le récepteur spécifique du ligand (récepteur primaire). Plusieurs ligands sont connus pour se lier à NRP-1, notamment ceux appartenant aux familles des sémaphorines et des VEGF. Les sémaphorines sont des protéines jouant un rôle dans le développement neuronal. Il existe sept classes de sémaphorines dont la classe 3 se lie préférentiellement à NRP-1. Les récepteurs spécifiques sont les plexines. La signalisation associée à la fixation de sémaphorines sur NRP-1 aurait des propriétés antitumorales.¹¹⁴

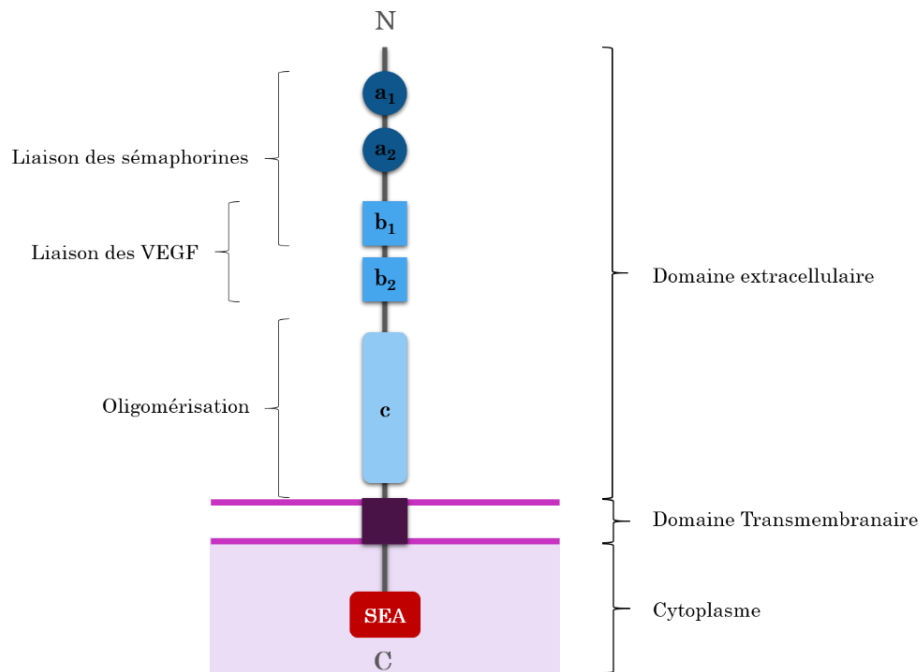


Figure 21 : Structure du récepteur NRP-1. Adaptée de Dumond et al.¹¹⁶

En ce qui concerne les VEGFs, parmi les six membres de cette famille, seulement trois se lient à NRP-1 (VEGF-A, VEGF-B et VEGF-C). Le VEGF-A représente la classe la plus étudiée avec des propriétés proangiogéniques établies, en faisant une cible d'intérêt dans le ciblage tumoral.¹¹⁴ Dans cette thèse, nous nous intéresserons essentiellement à ce ligand.

ROLE DE NRP-1 DANS LE DEVELOPPEMENT DE TUMEURS

Les premières études sur ce récepteur ont établi que la signalisation intracellulaire associée à NRP-1 ne pouvait être induite par le récepteur seul mais que la formation de complexes avec un co-récepteur était nécessaire.

NRP-1 joue un rôle dans la médiation de la signalisation du VEGF-A par le biais de complexes avec un co-récepteur qui peuvent être formés avec VEGFR-1 ou VEGFR-2. La plupart des études concernent son association avec ce second récepteur et sa liaison avec un isoforme du VEGF-A en particulier, le VEGF-165. Ce dernier peut se lier à la fois au récepteur NRP-1 et au récepteur VEGFR-2 formant un ainsi un complexe ternaire. L'association avec NRP-1 a pour effet d'augmenter la liaison du VEGF-165 au récepteur VEGFR-2 et ainsi renforcer la signalisation associée à ce récepteur et son activité proangiogénique.¹¹⁴

D'autres études ont également montré que NRP-1 pouvait également induire une signalisation cellulaire, après liaison du VEGF, en l'absence de co-récepteurs (VEGFR-1

et VEGFR-2). De plus, l'expression de ce récepteur a été observé dans de nombreux types de cellules tumorales (sein, pancréas, neuroblastome) en l'absence de ces mêmes co-récepteurs.

CIBLAGE DE NRP-1

NRP-1 est fortement exprimé sur les cellules musculaires lisses vasculaires et sur les cellules endothéliales. Il est également exprimé sur de nombreux types de cellules cancéreuses et son expression corrèle généralement avec une hausse de la progression tumorale.

L'expression de ce récepteur dans les cellules tumorales, son implication dans l'angiogenèse et la progression tumorale en font un récepteur cible d'intérêt pour une thérapie ciblée.

III.3. Nécessité en oxygène

III.3.1. Stratégies pour combattre l'hypoxie

Un autre inconvénient majeur de la PDT est le besoin d'oxygène pour être efficace. En effet, un niveau minimum d'oxygène est requis dans le milieu pour que l'effet photodynamique puisse se produire. De plus, l'oxygénation au sein des tumeurs n'est pas uniforme et des zones hypoxiques sont souvent rencontrées. L'hypoxie peut également se manifester au cours du traitement, la PDT consommant de l'oxygène. Dans la Figure 22, la désoxygénation des tissus après illumination est clairement observée.

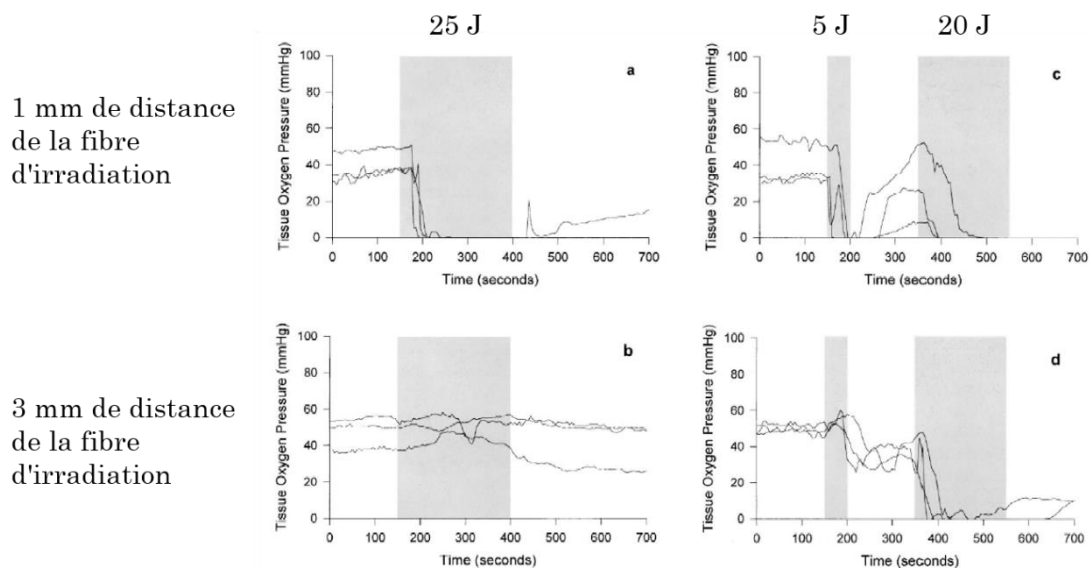


Figure 22 : Oxygénation des tissus au cours d'un traitement PDT utilisant l'ALA sur le colon de rat. Figure extraite de Curnow et al.¹¹⁷

Récemment, nous avons reporté dans une revue, située à la fin de ce chapitre § V., intitulée « Fighting hypoxia to improve PDT » et publiée dans le journal *Pharmaceuticals*, les différentes stratégies, mises en œuvre dans la littérature pour contourner ce problème.¹¹⁸ Six grandes stratégies ont été identifiées :

- 1) L'utilisation de véhicules d'oxygène afin d'augmenter l'apport en oxygène directement dans le milieu, par exemple en utilisant des perfluorocarbonés ;
- 2) La modification du microenvironnement tumoral en utilisant les particularités de celui-ci, par exemple par décomposition de H_2O_2 , présent fortement dans les tumeurs, pour générer de l'oxygène ;
- 3) Le recours à des thérapies combinées pour amplifier l'effet de la PDT en la combinant notamment à la chimiothérapie ou la thérapie photothermique ;
- 4) La PDT fractionnée, c'est-à-dire qu'au lieu d'illuminer la zone à traiter en une seule fois, cette dernière est illuminée plusieurs fois successivement afin de permettre la réoxygénation des tissus ;
- 5) L'utilisation de l'hypoxie des tumeurs en ayant recours à des composés spécifiquement activés par l'environnement hypoxique, par exemple des azobenzènes réduits spécifiquement en zone hypoxique ;
- 6) Une PDT indépendante de l'oxygène en utilisant des composés qui ne nécessitent pas d'oxygène pour avoir un effet toxique sur les cellules cancéreuses, par exemple en utilisant des donneurs d' 1O_2 tels que les endoperoxydes ou, dans le cadre de cette thèse, des composés photoactivables.

III.3.2. Utilisation d'alcoxyamines photoactivables en PDT

Depuis de nombreuses années, les alcoxyamines ont été largement étudiées et c'est leur application en polymérisation radicalaire contrôlée plus précisément la polymérisation contrôlée par des nitroxydes qui a fait grandir l'intérêt pour ce type de composés.^{119,120} Ce sont des composés très stables à température ambiante, capables de libérer d'une part un nitroxyde stable et d'autre part un radical alkyle hautement réactif par homolyse thermique de la liaison C–ON (Figure 23). La dissociation de cette liaison est, de plus, réversible. En effet, cette dernière liaison présente une faible énergie de dissociation de liaison (BDE) favorisant son homolyse.^{121,122} La réaction de combinaison entre les deux espèces radicalaires libérées est aussi possible, la réaction est réversible sans présence de pièges radicalaires.

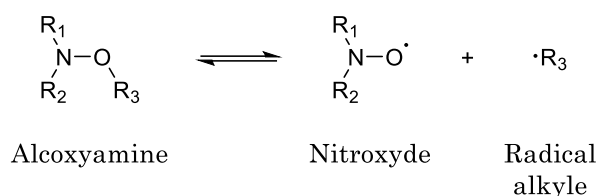


Figure 23 : Structure générale des alcoxyamines et leur homolyse.

Leur utilisation la plus connue est comme amorceurs de radicaux et contrôleurs pour la polymérisation médiée par des nitroxydes. Cette dernière repose sur l'utilisation de l'homolyse réversible de la liaison C–ON des alcoxyamines induite par l'augmentation de la température pour la préparation de polymères avec des structures bien définies.¹²³

Récemment, Audran *et al.*¹²⁴ ont proposé le concept de l'utilisation d'alcoxyamines pour des applications théranostiques. Pour cela, les alcoxyamines utilisées doivent être suffisamment stables pour être stockées et engendrer une homolyse de la liaison C–ON suffisamment rapide dans les conditions du milieu (température physiologique). Ils ont alors établi que la BDE idéale se trouvait entre 100 et 140 kJ.mol⁻¹. Pour une application théranostique, les radicaux nitroxydes générés sont utilisés pour le diagnostic par OMRI (*Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging*) alors que les radicaux alkyles sont utilisés en thérapie par induction d'un stress oxydant dans les cellules cancéreuses. L'homolyse des alcoxyamines peut être déclenchée par différents procédés : physique (température ou lumière), chimique (oxydation) ou biologique (protéases) et entraînant la libération de l'alcoxyamine dans le milieu suivi de son homolyse induite par la température physiologique.

La même équipe a montré l'efficacité de ce type de composé pour induire la mort cellulaire *in vitro* sur une lignée cellulaire du glioblastome par induction d'un stress oxydant dû à la libération *in situ* de radicaux alkyles.¹²⁵

L'utilisation d'alcoxyamines homolysables non pas par la température mais par la lumière fut reportée pour la première fois par Scaiano *et al.* en 1997, en tant qu'agent pour la photopolymérisation contrôlée par des nitroxydes.¹²⁶ Les alcoxyamines photoactivables n'ont jamais été utilisées dans le cas de traitement de cancers.

L'utilisation de ce type de composé en PDT s'avère prometteuse puisqu'ils permettent de générer des radicaux hautement réactifs et toxiques pour les cellules cancéreuses. De plus, leur génération ne nécessite pas la présence d'oxygène.

IV. Objectifs de la thèse

Dans la partie précédente III., nous avons décrit plusieurs limites de la PDT. Le but de cette thèse est de développer de nouvelles plateformes innovantes de ciblage qui puissent produire des ROS en milieux hypoxique ou normoxique pour améliorer le traitement du cancer, en particulier du glioblastome, par PDT.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons choisi de combiner plusieurs entités (Figure 24) :

- Un peptide d'adressage présentant une forte affinité pour le récepteur NRP-1 ;
- Une alcoxyamine photolabile utilisée comme composé indépendant de l'oxygène pour produire des radicaux alkyles ;
- Un PS comme composé dépendant de l'oxygène pour générer de l' 1O_2 .

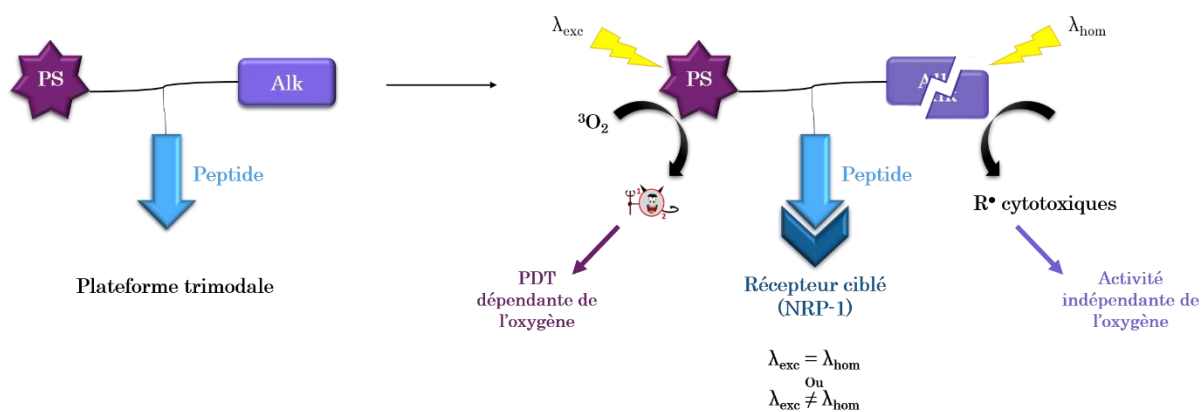


Figure 24 : Objectifs de la thèse.

Le choix des différentes unités a été fait en prenant tout d'abord en considération la longueur d'onde utilisée pour exciter le PS et l'alcoxyamine. Pour cela, deux approches ont été envisagées :

- L'excitation des deux unités à deux longueurs d'onde différentes (double excitation) ;
- L'excitation à la même longueur d'onde (excitation unique).

L'utilisation d'alcoxyamines photoactivables combinées à un PS et un peptide pour une application PDT n'ayant jamais été décrite, la première étape de cette thèse a été d'établir une preuve de concept. Celle-ci a consisté à prouver que le couplage de ces trois unités était possible et que chacune des unités n'avait pas d'interférence sur les propriétés des deux autres. Pour cela, les plateformes ont été synthétisées et les propriétés photophysiques du PS ont été vérifiées, ainsi que la photolabilité de l'alcoxyamine et

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

l'affinité du peptide pour le récepteur NRP-1. Cette preuve de concept a reposé sur l'utilisation d'une alcoxyamine et d'un PS excitable à deux longueurs d'ondes différentes. La synthèse de l'alcoxyamine photoactivable a été faite par nos collaborateurs, l'équipe du Pr Gérard Audran et du Pr Sylvain Marque de l'Institut de Chimie Radicalaire à Marseille. Cette alcoxyamine était excitable par lumière UV, ce qui ne rend pas possible la réalisation de tests PDT *in vitro*.

La seconde partie de cette thèse a donc été consacrée en l'amélioration de cette plateforme. Nous nous sommes focalisés sur trois pistes : 1) le développement d'un nouveau peptide ciblant toujours NRP-1 et pouvant être internalisé dans les cellules cancéreuses après fixation sur le récepteur, 2) l'amélioration de leur solubilité par l'utilisation de cyclodextrines et 3) le *design* d'une nouvelle alcoxyamine absorbant à de plus hautes longueurs d'onde compatibles avec une application *in vitro* voire *in vivo*.

V. Revue

Review

Fighting Hypoxia to Improve PDT

Ludivine Larue ¹, Bauyrzhan Myrzakhmetov ², Amina Ben-Mihoub ³, Albert Moussaron ¹, Noémie Thomas ⁴, Philippe Arnoux ¹, Francis Baros ¹, Régis Vanderesse ³, Samir Acherar ³ and Céline Frochot ^{1,*}

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS, Université de Lorraine, Nancy 54000, France; celine.frochot@univ-lorraine.fr

² M.Kh. Dulaty Taraz State University, Taraz 080012, Kazakhstan

³ Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, CNRS, Université de Lorraine, Nancy 54000, France

⁴ Biologie, Signaux et Systèmes en Cancérologie et Neurosciences, CRAN, UMR 7039, Université de Lorraine, CNRS, Nancy 54000, France

* Correspondence: celine.frochot@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-3-72-74-37-80

Received: 24 October 2019; Accepted: 26 October 2019; Published: date

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) has drawn great interest in recent years mainly due to its low side effects and few drug resistances. Nevertheless, one of the issues of PDT is the need for oxygen to induce a photodynamic effect. Tumours often have low oxygen concentrations, related to the abnormal structure of the microvessels leading to an ineffective blood distribution. Moreover, PDT consumes O₂. In order to improve the oxygenation of tumour or decrease hypoxia, different strategies are developed and are described in this review: 1) The use of O₂ vehicle; 2) the modification of the tumour microenvironment (TME); 3) combining other therapies with PDT; 4) hypoxia-independent PDT; 5) hypoxia-dependent PDT and 6) fractional PDT.

Keywords: PDT; oxygen; hypoxia.

1. Introduction

In the case of cancer, tissue hypoxia is a key feature of virtually all solid tumours [1]. The hypoxic adaptation, which is recognized as a source of therapeutic failure in clinical oncology [2] is critical for tumour expansion, invasion and metastasis, and some studies aim to target hypoxia for enhanced cancer therapy [3,4]. In vivo, reduced oxygenation induces a lack of nutrients and growth factors, increased acidosis and production of products coming from the close necrotic area. This leads to alteration of cells and cell-matrix interaction and even sometimes to cell death. Nevertheless, some tumor cells survive and these “hypoxic” cells become very aggressive and induce a local tumor relapse [5]. It is necessary for a treatment to be efficient to detect and control oxygenation in the tissue. Photodynamic therapy (PDT) has been applied to cure many diseases such as AMD, psoriasis, Barrett’s esophagus, and various malignant cancers for over a decade [6]. PDT is a simple and efficient approach relying on irradiation to move a photosensitizer (PS) from the ground state to a singlet excited state and then to a triplet excited state. This excited PS can react with the surrounding medium to produce Reactive Oxygen Species (ROS) such as superoxide anion (O₂^{•-}) and hydroxyl radical (HO•) or transfer its energy to triplet oxygen to generate singlet oxygen (¹O₂). Success of PDT requires that the PS incorporate preferentially into the tumor cell, that the number of photons be correctly evaluated in order to excite a majority of the PS molecules, and that there be enough O₂ to induce the photo-oxidation process [7]. Indeed, PDT, like

radiotherapy, suffers from a severe drawback: the need for O₂ to be efficient. Therefore, PDT displays a low efficiency in hypoxia or when hypoxia occurs due to the consumption of molecular O₂ by the PS, leading to PDT resistance. When the oxygen concentration in the medium is not high enough, the photodamage is reduced or even no photodynamic reaction occurs at all [8]. These spare hypoxic cells can induce the regrowth of the tumor. Hypoxia occurring during PDT has been studied by several teams last years [9–11]. Bush et al. for example used in 2000 oxygen-sensitive electrodes during PDT treatment in vivo [10]. The same team also showed that the spatial distribution of hypoxia during PDT treatment can influence the balance between destruction of the tumor and damage of the neovessels [12]. Several approaches have been described during the last decades to overcome hypoxia in PDT. In this review, we chose to divide them onto six strategies developed in the literature to fight hypoxia for an enhancement of PDT: 1) The use of O₂ vehicles; 2) the modification of the tumour microenvironment (TME); 3) combining other therapies with PDT; 4) hypoxia-independent PDT, 5) hypoxia-dependent PDT and 6) fractional PDT.

2. O₂ vehicles

Various clinical applications (i.e. radio-, chemo- and phototherapies) involve the presence of O₂ in the neighbourhood of the tumours to be treated, but hypoxia can lead to a poor treatment efficiency with enhanced malignant cell survival, increased angiogenesis and metastasis. The supply of O₂ is therefore a major asset and a new modality for many disease interventions [13,14]. In fact, the increase of the arterial and capillary O₂ pressure (pO₂) improves the transport of dissolved O₂ into the tissue.

2.1. Hyper-oxygenation/Hyperbaric Oxygenation (HBO)

Hyperoxic vasodilatation in healthy tissue makes way to vasoconstriction in hypoxic tissues, so one idea is to perform hyper-oxygenation during PDT of pre-existing hypoxic cells and to compensate the O₂ depletion. This so-called hyperbaric oxygenation (HBO) can be realized in several ways, which will be developed in this section. One way is to provide additional O₂ in the areas to be treated by the addition of ¹O₂ itself, H₂O₂, or other molecules. Another way is to favour the formation of ROS at the expense of ¹O₂ by switching the photochemistry of PSs from a type II to a type I mechanism [15,16]. Some other interesting reviews on this topic can help in understanding the history, the notion of hypoxia and the broad scope of HBO [17–19].

Hjelde et al. in 2005 [20] compared the in vitro PDT efficiency under normoxic or hyperoxic exposure on AY27 tumour cells, human colon adenocarcinoma WiDr and SW840 cells. The cultured cancer cells were incubated with 5-ALA and irradiated (435 nm, 0.5 and 30 min, 12.9 mW·cm⁻²), which matched a total light dose of 0.387 and 23.22 J·cm⁻² respectively. After PDT treatment under normoxia (21 kPa O₂) and hyperoxia (100, 200, 300, or 400 kPa), the cells' survival was evaluated and surprisingly, showed no significant difference between normoxia and HBO. However, the three cell lines exhibited very different sensitivities to PDT in normoxic conditions: At 21 kPa, and within 5 min illumination, about 90% of WiDr and SW840 cells were killed, while only 20–25% of AY27 cells were destroyed and an illumination for up to 30 min was necessary to attain a similar result.

Mei et al. in 2019 [21] used 5-ALA with or without HBO for PDT treatment of human squamous carcinoma (A431 cell line) in vitro. For HBO assays, the cells were flushed by a mixture 98% O₂ plus 2% CO₂ (0.25 MPa) for 1 h daily before addition of 5-ALA. Both treatments, after irradiation (530 nm, 5 J·cm⁻², 8 days) indicated: a) a decrease of cell proliferation as a function of a concentration gradient (0, 0.1, 0.3, 1, and 3 mM ALA), b) a synergistic effect of the combination ALA-HBO, especially at 1 and 3 mM ALA with 30–35% cell viability. Western blot analysis allowed the detection of apoptosis-related protein Bax, Bcl-2 and caspase 3. The data suggested synergistically increased levels of the proteins Bax and caspase, but a decrease for Bcl-2 in A431 cells, evidencing a mitochondria-intrinsic pathway cell apoptosis. Furthermore, it has been shown that the dual ALA-HBO treatment reduced ROS production in A431 cells and favoured autophagy. It can be considered that ALA-HBO could be used for the treatment of human squamous carcinomas.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Chen et al. [22,23] used hyper-oxygenation in vivo in mammary carcinoma tumours implanted into C3H mice (6-8 mm). Tumours were treated by Photofrin and illuminated at 630 nm ($200 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, $150 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Hyperbaric conditions were attained when the mice were under a 3-atmosphere pressure. Under normal conditions (1 atm and normoxia) about 20% of the tumour disappeared after 60 days. In normobaric conditions (NBO, 100% O_2), this percentage increase to 80 %. In hyperbaric conditions (HBO, 100% O_2), it was only 60 %. Reduction of light fluence to $75 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ combined with NBO treatment led to a 70% tumour cure. The relative negative effect of HBO was perhaps due to a reduced cardiac outcome. The same team used also an atmospheric composition of 95% O_2 and 5% carbon dioxide (carbogen) [24]. They did not observe any effects after decreasing the fluence. In all cases (HBO, NBO or carbogen) the rate of cellular death was doubled, compared to normal atmospheric conditions. In 2003, they [25] used the same protocol as previously, but measured the O_2 concentration in tumour in vivo with the Oxylite system. First, only room air (RA) and NBO conditions were used. Table 1 shows the important effect of NBO on the survival rate of tumours after different times (as a tumour fraction).

Table 1. % Mammary carcinoma tumour implanted into C3H mice after PDT treatment (630 nm, total light irradiation of $150 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

	0 h	4 h	18 h	24 h
RA	0.495	0.381	0.043	0.0045
NBO	0.185	0.120	0.006	0.00035

Similar results as previously were obtained using carbogen and HBO conditions. Li et al. [26] used also hyperbaric conditions with upconversion nanoparticles (UCNPs). They synthesized a core@shell NPs $\text{NaGdF}_4:\text{Yb,Er,Ca}@ \text{NaYbF}_4:\text{Ca}$, with an upconversion core which can transfer its energy to Rose Bengal, and produce ROS under 808 nm laser excitation (Figure 1). It was demonstrated that PDT assisted by HBO led to strong depletion of collagen fibre in the extracellular matrix, with a reduction of hypoxia and a simultaneous enhancement of NP levels in the tumour blood vessels.

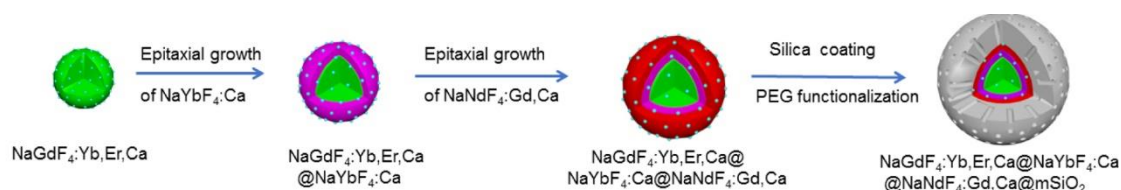


Figure 1. Schematic illustration for the synthesis of $\text{NaGdF}_4:\text{Yb,Er,Ca}@ \text{NaYbF}_4:\text{Ca}@ \text{NaNdF}_4:\text{Gd,Ca}@ \text{mSiO}_2$ NPs. Reprinted from [26] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2018.

In vivo experiments were performed on xenograft 4T1 cells (murine breast tumour cell line) tumour-transplanted mice mouse model. Fluorescence in tumour was observed 6 h after NP administration, up to 48 h and disappeared progressively from the tumour. Consequently, a second treatment (16 min of irradiation with an 808 nm laser, $0.75 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) was administered 48 h after the first one. In vitro, 4T1 cell viability was measured to about 75% under hypoxia, about 35% in normoxia and 20% in HBO conditions. In vivo, the tumour weight, initially 0.5 g, decreased to about 0.1 g with UCNP in HBO conditions.

Maier et al. [27] conducted a clinical pilot study to treat patients with advanced oesophageal carcinoma in 2000. They used HpD and illumination (630 nm , $300 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), 14 patients were treated by PDT and 17 with PDT under HBO (2 absolute atm pressures). A difference was observed between the two groups, with a median overall survival for the PDT group of 7.0 months (12-months survival rate was 28.6%) and 12 months for the PDT/HBO group (the 12-months survival rate was 41.2% for the PDT/HBO group). The same team published in 2000 another study for the treatment of advanced carcinoma of the cardia and oesophagus [28]. In the same conditions (vide supra), 23 patients were treated by PDT and 29 with PDT/HBO. The mean survival time for the PDT group was 8.7 months and

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

for the PDT/HBO group 13.8 months. This experience was re-conducted the same year on 31 patients for PDT alone and 44 patients for PDT/HBO for the treatment of tumour at the oesophago-gastric junction [29]. A median overall survival of 7 and 12 months was observed, respectively. In order to avoid the prolonged photosensitivity of the skin of HpD, the authors evaluated the efficacy of Photosan® and ALA on patients with oesophageal cancer [30,31]. As expected, polyhematoporphyrin seemed to be more effective than ALA in terms of reduction of dysphagia, tumour stenosis and Karnovsky performance status. A questionnaire of the patients indicated a best comfort for oral administration of ALA than intravenous injection of Photosan® and no complication or sunburn occurred for either treatment. Such a comparison has been made on lung cancer and more particularly in the treatment of advanced malignant bronchogenic stenosis [32,33] and no definitive conclusions have been drawn. At the best of our knowledge, no further investigations in the field of HBO have been undertaken by this team.

In 2001, Schouwink et al. [34] conducted preclinical studies for optimization of PDT by *m*-THPC in female BALB/c mice bearing human mesothelioma (H-MESO1) tumour. To overcome the PDT-induced O₂ deficit, they proposed a preliminary treatment by nicotinamide (300 mg·kg⁻¹) and/or carbogen (i.e. a mixture 5% CO₂ and 95% O₂) 30 min and/or 5 min before illumination, respectively. In a first series, they studied the influence of nicotinamide injection and/or carbogen breathing on the mean time of regrowth of tumour from 2 to 5 mm diameter. The mean time was found to be about 42 days in hypoxic conditions and 17 days in hyperbaric conditions. They analysed also the mean median pO₂ and they observed no significant increase of oxygenation with nicotinamide alone (17.6 mm Hg to be compared to a control value of 12.6 mm Hg), but a pO₂ of 24.8 mm Hg for nicotinamide plus carbogen. The efficiency of PDT by *m*-THPC (0.15 mg·kg⁻¹, 100 mW·cm⁻²) was then discussed and mice survival (after 24 h post PS-injection and illumination) reached 11% for PDT alone and 58% for PDT and carbogen, the nicotinamide bringing almost no improvement.

(Table 2)

Table 2. Summary of publications about HBO as O₂ vehicle.

Ref	Application	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[20]	PDT	Hyperbaric chamber with 100% O ₂ (21, 100, 200, 300, or 400 kPa)	5-ALA	435 nm, 12.9 mW·cm ⁻² , 0.5 min and 30 min	¹ O ₂	AY27, WiDr and SW840 cell line	No
[21]	PDT	HBO (0.25 MPa; 98% O ₂ + 2% CO ₂)	5-ALA	630 nm, 5 J·cm ⁻² , 8 h per days	ROS	A431 cancer cell line	No
[22–25]	PDT	HBO or NBO 100% O ₂ (hyperbaric chamber: 3 atp)	Photofrin	630 nm, “Fractional light” group: 150 mW·cm ⁻² , 200 J·cm ⁻² , 30 s light and dark intervals “Reduced light dose rate” group: 75 mW·cm ⁻² , 200 J·cm ⁻²	¹ O ₂	No	MCA tumour-bearing mice

Table 2. Cont.

[26]	PDT	HBO (hyperbaric chamber: 2.5 atm)	RB	808 nm 16 min, 0.75 $W \cdot cm^{-2}$	ROS	4T1 cell line	4T1 tumour bearing mice
[27–33]	PDT	HBO (hyperbaric chamber: 2 atm O_2)	HpD (Photosan) or 5-ALA	630 nm, 300 $J \cdot cm^{-2}$	nd	No	Clinical study on patients with oesophageal carcinoma
[34]	PDT	Nicotinamide and carbogen (95% oxygen with 5% carbodiocide)	<i>m</i> -THPC	652 nm, 20, 100 and 200 $mW \cdot cm^{-2}$, 5 min	nd	No	H-MESO1 tumour-bearing mice

nd: not determined; HBO: hyperbaric oxygen; 5-ALA: 5-aminolevulinic acid; RB: Rose Bengal; HpD: haematoporphyrin derivatives; *m*-THPC: *meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin.

2.2. Red Blood Cells (RBC) or Hemoglobin (Hb)

A new optical method based on in vivo laser-induced photodissociation of blood oxyhemoglobin have been proposed by Asimov et al. [35] to solve the hypoxia problem in malignant tissue and to stimulate the aerobic metabolism of cells. The kinetics of laser-induced oxygenation of cutaneous tissue dependence on the laser-irradiation time was investigated. It was found that upon He-Ne laser irradiation (632 nm, $225 W \cdot m^{-2}$) of the cutaneous blood vessels, a local increase in the O_2 concentration in the irradiated region was observed. Based on the obtained results, the proposed optical method for local hypoxia elimination in malignant tissues may be a good key to increase the efficiency of the different therapeutic procedure in oncology.

Luo et al. [36] developed stable nanosize artificial red cells denoted as I-ARCs by loading complexes of indocyanine green (ICG) and O_2 carrier (hemoglobin, Hb) to incorporate an O_2 supply and monitor the PDT process. The in vitro studies of I-ARCs compared to deoxy-I-ARCs and ICG NPs (INPs) were performed on MCF-7 human breast cancer cell line under NIR laser irradiation ($100 mW \cdot cm^{-2}$, 808 nm, 5 min). I-ARCs showed massive generation of ROS (9.5 times stronger than INPs) and 10.7-times higher formation of ferryl-Hb than deoxy-I-ARCs. I-ARCs presented the best phototoxic effects against MCF-7, with a cell viability of 8.9%. The authors explained the remarkable phototoxicity in I-ARCs by the enhanced both ROS production and ferryl-Hb generation. Similarly, the result of PDT-treated mice bearing MCF-7 tumours obtained with I-ARCs was the best compared to the other systems (Figure 2).

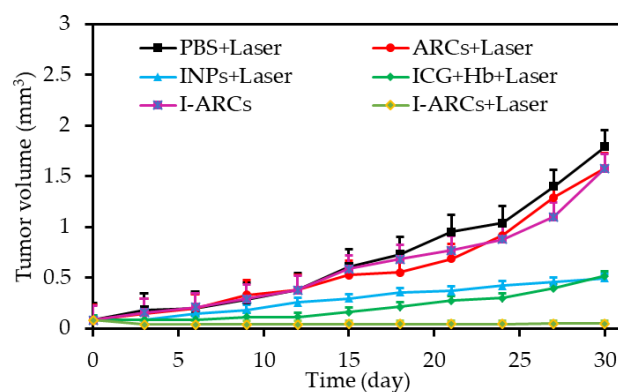


Figure 2. MCF-7 tumour growth curves of different groups after treatments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. All injectants were oxygenated before experiments. Adapted from Luo et al. [36].

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Two years later, the same team [37] designed a protein hybridization approach by developing a bioinspired hybrid protein O₂ nanocarrier with encapsulated chlorin e6 (Ce6) (C@HPOC) via intermolecular disulfide conjugations for O₂-augmented immunogenic PDT against tumour growth and metastasis. In vitro ¹O₂ production ability of C@HPOC was investigated in 4T1 tumour cells and compared to that of Ce6 and C@HSA. It was found that under laser irradiation (600 nm, 0.1 W·cm⁻², 2 min) C@HPOC significantly enhanced the ¹O₂ levels compared to the other systems. The PDT treatment revealed that at 1 µg·mL⁻¹ of Ce6, C@HPOC showed the highest PDT effect (80% apoptosis ratio of 4T1 cells) compared to Ce6 and C@HSA under the same conditions, indicating that C@HPOC boosted the PDT effect to kill tumour cells. In addition, according to the in vivo results, O₂-boosted PDT of C@HPOC provoked immunogenic cell death with enhanced release of danger-associated molecular patterns from 4T1 tumour cells and then promoted the maturation of dendritic cells. Finally, the well-defined C@HPOC evoked O₂-enhanced immunogenic PDT, which not only destroyed the primary tumours but also effectively suppressed distant tumours and lung metastasis in metastatic triple-negative breast cancer model by evoking systemic anti-tumour immunity.

Tang et al. [38] developed a novel red blood cells (RBC)-facilitated PDT methodology. They first loaded the phthalocyanine ZnF₁₆-Pc into ferritin NPs and then coupled the ZnF₁₆-Pc-loaded ferritins (P-FRT) onto RBC membranes to afford P-FRT-RBC-NPs. According to the in vitro and hypoxic tumour models, using RBCs as ZnF₁₆-Pc carriers could enhance the PDT efficiency. It was shown that RBCs could provide O₂ to enable sustained ¹O₂ production even when P-FRT-RBC NPs were under hypoxic conditions (Figure 3).

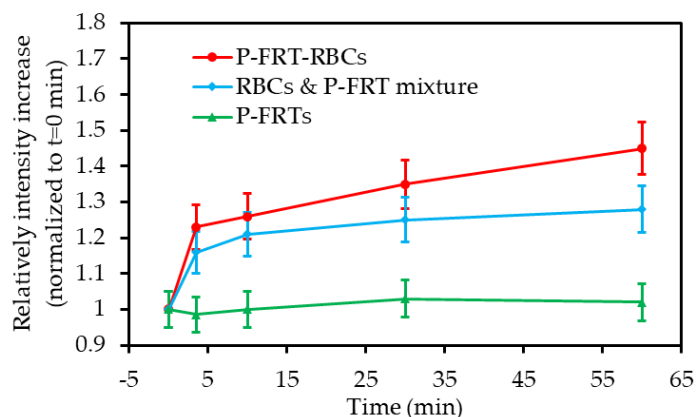


Figure 3. P-FRT-RBCs showed enhanced PDT effect under hypoxic environments. Comparison of ¹O₂ generation among P-FRT-RBCs, a mixture of RBCs and free P-FRTs, and free P-FRTs, conducted in an Ar-filled cuvette. The cuvette was irradiated by a 671 nm laser (0.1 W·cm⁻²) for up to 60 min. SOSG was used as an indicator of ¹O₂ production. Adapted from Tang et al. [38].

P-FRT-RBCs were injected onto U87MG human glioma tumour bearing mice (671 nm, 100 mW·cm⁻², 30 min). Significant improvement in the PDT efficiency was observed with P-FRT-RBC or O₂-treated P-FRT-RBC groups compared to that of the P-RBC and CO-treated P-FRT-RBC groups (76.7% of tumour suppression). Such results validated the contribution of O₂ released from RBCs in the enhanced treatment.

Wang et al. [39] reported a novel strategy for overcoming biological barriers and site specific hypoxia cancer therapy under NIR control. The latter consisted of preparing orthogonal excitation-emission UCNP's functionalized with a novel ultrasensitive specific hypoxia probe (HP) and RB, conjugated to the surface of RBC to finally obtain RBC microcarriers. According to the in vitro PDT results under hypoxic conditions, the inactive HP present in RBC microcarriers could be transformed into an active state specifically to trigger the O₂ release from oxygenated Hb under 980 nm excitation. PDT efficiency enhanced greatly under 808 nm excitation because of the increasing of O₂ amount from RBC microcarriers. Consequently, the highest cell mortality (60%) was achieved with RBC microcarriers after

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

alternately irradiating by 980 nm and 808 nm laser, indicating a highest PDT efficacy which was due to the large amount of released O₂. PDT for hypoxia tumours studies was investigated onto U87MG solid tumour-bearing mice. Much higher anti-tumour efficacy by remarkably regressing the solid tumour volumes was observed with RBC microcarriers in the presence of the alternate 980 nm and 808 nm laser irradiation, compared to that with Si microcarriers and RBC alone (Figures 4a and b).

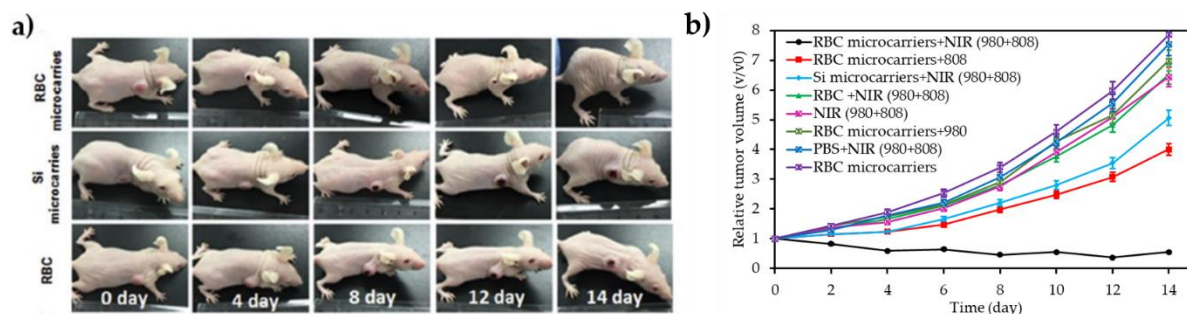


Figure 4. PDT for hypoxia tumours. **a)** Digital photos of U87MG tumour-bearing mice after 14 days of O₂ release and PDT treatments under NIR irradiation. From up to down mice were treated with RBC microcarriers + 980-nm +808-nm laser; Si microcarriers + 980-nm +808-nm laser; RBC + 980-nm +808-nm laser. **b)** Tumour growth profiles of the mice bearing U87MG tumour with different treatments. Reprinted from [39] with permission from Elsevier, Ltd, Copyright 2017.

Cao et al. [40] designed a multi-functional nanocomplex (BP@RB-Hb) by simple molecular assembly of bis(pyrene) (BP), RB, Hb and nanoliposomes (Figure 5) to improve both the depth and the effectiveness of antitumour PDT treatment. In brief, upon two-photon laser irradiation, RB was excited indirectly through intra-particle FRET mechanism for improving treatment depth. At meantime, Hb could supply extra O₂ into tumour through targeting effect for enhanced PDT efficiency.

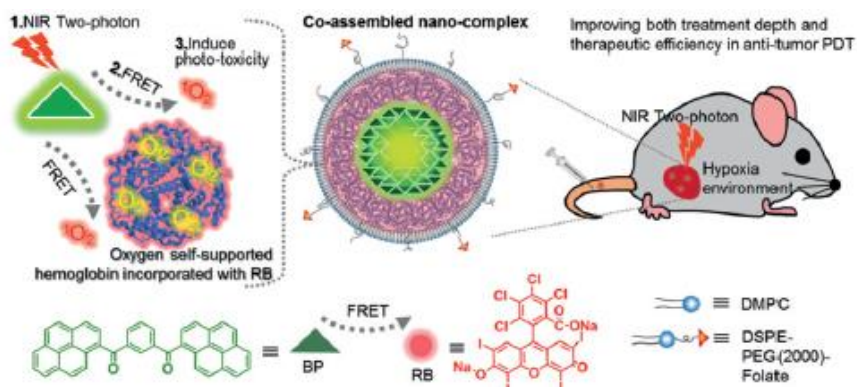


Figure 5. The BP@RB-Hb structure and the process of one-/two photon. Reprinted from [40] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2018.

In vitro studies were performed on MCF-7 cells lines at different concentrations of deoxy-BP@RB-Hb or BP@RB-Hb (0-1.25 mg·mL⁻¹). Upon mono-photon laser irradiation (150 W, 480 nm cutoff filter), BP@RB-Hb showed the best photocytotoxicity, which was explained by more ROS production by BP@RB-Hb via intra-particle FRET between RB and BP species.

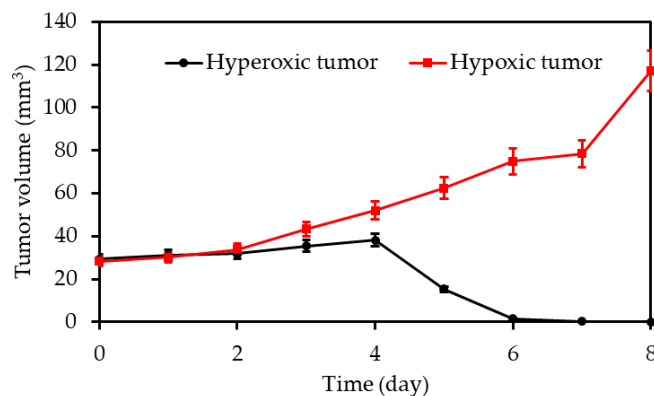


Figure 6. Tumour volume under hyperoxia and hypoxia. Adapted from Cao et al. [40]

Finally, *in vivo* photodynamic studies were also done in a mouse cancer model (BALB/c nude mice). BP@RB-Hb or BP@RB was injected to the mouse followed by two-photon laser (800 nm, 390 mW·cm⁻², 8 min). A significant anti-tumour effect was observed in the case of group injected with BP@RB-Hb. Furthermore, *in vivo* BP@RB-Hb showed a higher anti-tumour efficiency to the hyperoxic tumour than the hypoxic tumour after two-photon laser irradiation (Figure 6).

Guo et al. [41] designed an O₂-delivering photosensitive liposome (LIH) by loading complexes of Hb and ICG. LIH showed out-standing ability as an O₂ carrier and could generate massive ¹O₂ under NIR laser irradiation (808 nm, 1 W·cm⁻², 1 min), even in hypoxia conditions. *In vitro* O₂ carrying was investigated on CT-26 cancer colon cells. It was found LIH could not only get inside CT-26 cells and deliver O₂ into cells in hypoxia conditions, but also down-regulated hypoxia-associated protein to cells. Thus, the sufficient ¹O₂ produced by LIH under NIR laser treatment (808 nm, 1 W·cm⁻², 1 min) enhanced dramatically the PDT phototoxicity in hypoxic CT-26 cells. According to the *in vivo* studies on mice bearing tumours, LIH accumulated preferentially into subcutaneous and orthotopic CT-26 tumours. In addition, the vascular endothelial growth factor (VEGF) and **Hypoxia-inducible factor-1 α** (HIF-1 α) expression level in LIH treated tumours was also down-regulated and this state was maintained for several days. Consequently, under NIR laser irradiation (808 nm, 1.5 W·cm⁻², 3 min) dramatically enhanced PDT efficacy against hypoxic tumour *in vivo* was observed.

Liu and his team [42] synthesized Hb-conjugated biodegradable polypeptides as O₂ carrier via click reaction between polypeptides and Hb BODIPY-Br₂ NPs denoted (p-Hb-B-NPs). The O₂-carrying ability of the prepared NPs was confirmed by comparing the dissolved O₂ concentration of p-Hb-B-NPs to that of O₂ saturated ultrapure water. PDT efficiency of the NPs was investigated on hepatocellular carcinoma HepG2 cancer cells (620 nm, 25 mW·cm⁻², 10 min) under normal or N₂ atmosphere and compared to that of p-B-NPs. Even under low light irradiation both NPs showed phototoxic effect under normal atmosphere, where the best effect was obtained at a 4 μ M p-Hb-B-NPs concentration, however a non-phototoxic effect was observed under N₂ atmosphere. Furthermore, p-Hb-B-NPs found to be able to release O₂ even in hypoxic conditions.

Xu et al. [43] prepared a new biocompatible and stable nanocarrier (HbTcMs) with O₂ supply for enhanced PDT. A well-defined triblock copolymer mPEG-b-PAA-b-PS copolymer could self-assemble in aqueous solution to form micelles. The micelles and the PS (carboxyphenyl-porphyrin, TCPP) both covalently conjugated to Hb via amidation reactions formed a nanocarrier (HbTcMs). According to the O₂ binding ability results, HbTcMs was found to be able not only to retain the O₂ binding capacity as Hb did, but also showed better stability against both oxidation and trypsin digestion. HbTcMs conjugate showed little dark toxicity and rapid efficiency of cellular uptake by 4T1 cells. More importantly, under light irradiation (600 nm, 70 mW·cm⁻², 2 min), HbTcMs could generate more ¹O₂ to exert better phototoxicity *in vitro* compared to the carriers without O₂ supply.

Liu et al. [44] designed man-made red blood cells (RBCs). A complex between Hb and polydopamine (PDA, an enzyme-mimicking) was constructed and methylene blue (MB) was encapsulated inside the

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

biovesicle (Hb-PDA-MB, 500 nm in transverse length and 2000 nm in longitudinal length). To evaluate the influence of Hb, other complexes were synthesized in which Hb was substituted with albumin bovine serum (BSA) (called BSA-PDA@RBCM and BSA-PDA-MB@RBCM, respectively). Hb was unchanged in the vesicle and the capability of Hb to carry O₂ was the same for free Hb and Hb into the vesicle. ¹O₂ formation was higher for MB inside the vesicle than in solution due to the extra O₂ supply. In 4T1 cell line upon light illumination (660 nm, 30 mW·cm⁻², 1 min) DCFH-DA revealed the formation of ¹O₂. In hypoxic media, the vesicles were still able to produce ¹O₂, whereas almost no more ¹O₂ was produced by MB alone. The phototoxicity of Hb-PDA-MB decreased by 10% in hypoxic media compared to normoxic one whereas a decrease of 50% was obtained with free MB (660 nm, 220 mW·cm⁻², 5 min). In vivo in 4T1 tumour bearing mice, they used the same vesicle labelling with both Ce6 and DiR (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindotricarbocyanine) and could observe that the tumour stopped growing. Some tumours even completely disappeared.

(Table 3)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 3. Summary of publications about RBC as O₂ vehicle.

Ref	Application	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[36]	PDT	Artificial red cells (ARCs) containing Hb	ICG	In vitro: 808 nm, 100 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 808 nm, 100 mW·cm ⁻² , 30 min	ROS	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[37]	PDT	Hb	Ce6	In vitro: 660 nm, 0.1 W·cm ⁻² , 2 min In vivo: 660 nm, 0.1 W·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[38]	PDT	RBCs	ZnF ₁₆ Pc	In vitro: 671 nm, 100 mW·cm ⁻² , 0-60 min In vivo: 671 nm, 100 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	U87MG cell line	U87MG tumour bearing mice
[39]	PDT	RBCs	RB	980 nm + 808 nm, 1.5 W·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	U87MG cell line	U87MG tumour-bearing mice
[40]	PDT	Hb	RB	In vitro: two-photon 808 nm, 390 mW·cm ⁻² , 20 min In vivo: two-photon 808 nm, 390 or 250 mW·cm ⁻² , 8 or 15 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[41]	PDT	Hb	ICG	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 1min	¹ O ₂	CT-26 cell line	S180 and CT26 tumour-bearing mice
[42]	PDT	Hb	BODIPY-Br ₂	635 nm, 25 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HepG2 cell line	No
[43]	PDT	Hb	TCPP	600 nm, 70 mW·cm ⁻² , 2min	¹ O ₂	4T1 cell line	No
[44]	PDT	RBC membranes encapsulating Hb	MB	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 660 nm, 220 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[45]	PDT	Hb-RBC	ICG	808 nm, 60 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	Macrophages (RAW264.7 cell line) + multicellular tumour spheroids	MCF-7 tumour-bearing mice

Hb: Hemoglobin; ICG: Indocyanine green; Ce6: Chlorin e6; RBC: Red Blood cells; ZnF₁₆Pc: zinc 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-phthalocyanine; RB: Rose Bengal; BODIPY-Br₂: 4,4-difluoro-4-bora-3a,a-diaza-s-indacene brominated; TCPP: carboxyphenyl-porphyrin; MB: methylene blue.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Zirconium (IV)-based MOF (UiO-66) NPs (diameter 55 nm) coated with ICG were loaded with O₂ and coextruded with Hb-RBC membranes by Gao et al. [45]. They presented high O₂ storage capacities. The production of ¹O₂ was observed by DPBF after irradiation at 808 nm during 2 min (Figure 7). A photothermal effect was measured with a temperature of 43 °C after 5 min irradiation. The NPs were encapsulated in RBC membrane from male ICR mice and the circulation half-lives increased. The uptake of the NPs in macrophages (RAW264.7 cell line) was confirmed. The ¹O₂ production in multicellular tumour spheroids (MCTSs) was observed by DCFH-DA. The PDT efficiency was assessed showing a high cell mortality after NIR irradiation (808 nm, 0.06 W·cm⁻², 5 min). Intravenous injection of the NP in MCF-7 and light irradiation (808 nm, 0.06 W·cm⁻², 1 min) tumour-bearing mice showed a notably tumour growth inhibition.

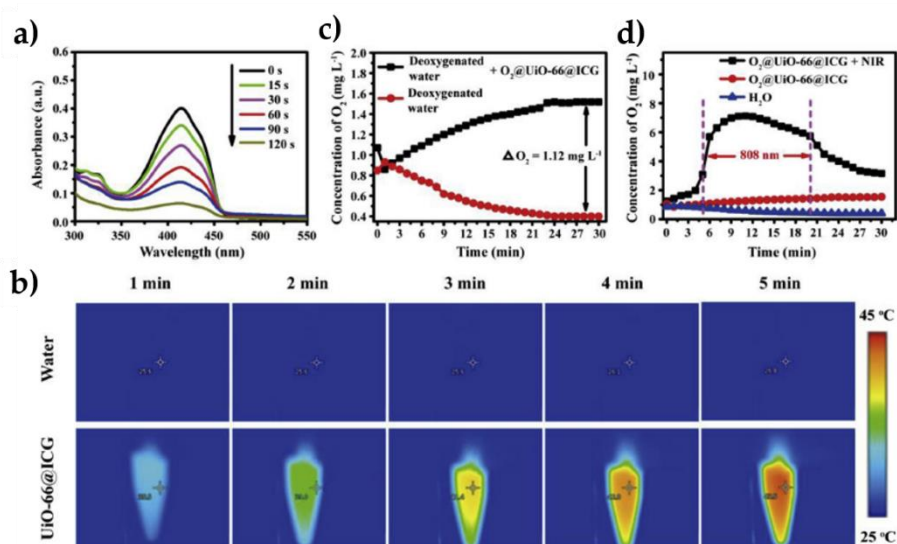


Figure 7. a) The absorbance changes of DPBF treated with UiO-66@ICG in DMF after 808 nm laser irradiation for different times. b) Infrared thermal images of pure H₂O and UiO-66@ICG aqueous dispersion (1 mg·mL⁻¹) after irradiation for 5 min by 808 nm laser (0.06 W·cm⁻²). c) O₂ concentration in 20 mL deoxygenated water before and after adding 5 mg of O₂@UiO-66@ICG. d) O₂ concentration changes in solutions of O₂@UiO-66@ICG under irradiation by 808 nm laser. DO₂: Enhanced O₂ concentration. The O₂ loading capacity per 1 g of ICG@UiO-66 was calculated as follows: the loading capacity of ICG@UiO-66 ¼ (DO₂: Enhanced O₂ concentration) / (ICG@UiO-66 concentration). The O₂ loading capacity of ICG@UiO-66 was determined to be ~140 mmol·g⁻¹ or 4.48 mg·g⁻¹. Reprinted from [45] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2018.

2.3. Perfluorocarbon

Perfluorocarbons (PFCs) are organofluorine compounds with the formula C_xF_y. PFCs are capable of dissolving relatively high volumes of gases due to the weak intermolecular interactions in these PFCs. They can maintain a higher O₂ content than the tumour matrix at a given O₂ partial pressure thanks to their high O₂ capacity. In this context, since 2016 19 publications have described the use of PFC to relieve tumour hypoxia and improve PDT efficiency. It can be used as the contrast enhancement agent of ultrasonography in the clinic [46], different formulations of liquid PFC have been explored to serve as an artificial blood substitute. PFCs could be excreted by exhalation from lungs or skin pores. Oxypherol (Fluosol-43) has obtained FDA approval in improving myocardial oxygenation and preventing abnormalities in ventricular function [47]. Oxygent™ is a concentrated PFC emulsion being developed for use as a temporary O₂ carrier. It has been approved in Russia to increase O₂ delivery during acute blood loss.

Cheng et al. [48] developed nanodroplets of perfluorohexane (PFH) coated with a lipid shell incorporating IR780 as a PS (diameter 200 nm). The irradiation of NPs in water with an 808 nm laser for 5 s intervals during 60 s (2 W·cm⁻²) showed a higher ¹O₂ production than irradiation of PFH or IR780

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

alone. MCF-7 cells or CT26 murine colon adenocarcinoma cells irradiated with 808 nm laser (20 s, 2 W·cm⁻²) led to an increase of ¹O₂ production with the NPs compared to PFH or IR780 alone. Phototoxicity of the nanodroplets on the two cell lines was observed. Photothermal effect did not play any role. The effects of the NPs in hypoxia were studied in CT26 cells in hypoxic conditions. After irradiation, NPs still maintained superior cytotoxicity to traditional PDT. In vivo evaluation of ¹O₂ production on CT26 tumour-bearing mice with SOSG indicated higher ¹O₂ generation with the conjugate than with PFH or IR780 alone. The tumour growth of the mice was inhibited after intratumoural injection. The tumour volume of mice receiving NPs and irradiation (808 nm, 10+10 s, 2 W·cm⁻²) was four folds lower than the volume of mice receiving IR780 alone.

PFC nanoemulsions (diameter 175 nm) containing a fluororous porphyrin were synthesized by Day et al. [49]. They could encapsulate O₂ with high concentration and produced ¹O₂ after light illumination (420 nm, 8.5 mW·cm⁻², 30 min). A minimal leaching of fluororous porphyrin to the hydrophilic medium was detected. The uptake of the emulsions in human malignant melanoma cells (A375) was successfully observed with confocal microscopy. Cell death was observed after irradiation (420 nm, 8.5 mW·cm⁻², 30 min), whereas minimal death occurred with an emulsion containing a fluororous rhodamine. In summary, fluororous porphyrins sequestered in PFC nanoemulsions were able to deliver ¹O and to perform efficient PDT.

Liu et al. [50] synthesized a core shell NP (Au core, SiO₂ and CuO₂ shell) incorporated into PFH droplets to form a liposome (diameter 190 nm). The plasmon-induced resonance energy transfer (PIRET) from Au to Cu₂O, Au@SiO₂@Cu₂O (670 nm, 0.48 mW·cm⁻², 10 min) produced ¹O₂ with a quantum yield evaluated at 0.71. NPs successfully incorporated into MCF-7 cells. ¹O₂ production in these cells was greatly enhanced by the O₂ supply of PFH. A strong phototoxicity appeared after light illumination (670 nm, 0.48 mW·cm⁻², 10 min) (Figure 8a). The caspase 3 protein activity, an apoptosis indicator, showed a 3.6 higher amount than without irradiation (Figure 8b). The NPs induced significant phototoxicity to MCF-7 cells under both normoxic and hypoxic conditions. The O₂ self-enriched effect of the NPs could guarantee PDT efficacy in MCF-7 cells. Irradiation of multicellular tumour spheroids (MCTS) of MCF-7 cells showed a high mortality. Tumour growth measurements on MCF-7 cancer-bearing female Balb/c mice conducted to a complete inhibition during 14 days after injection of the NPs and irradiation (670 nm, 0.48 mW·cm⁻², 10 min).

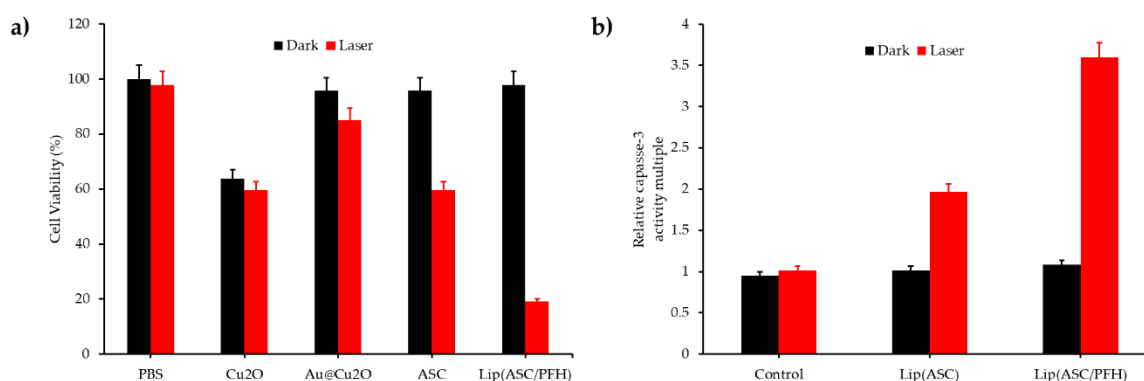


Figure 8. PDT in vitro on MCF-7 cells. **a)** Cytotoxicity of different samples in the presence or absence of irradiation (670 nm, 0.48 W·cm⁻²). **b)** Relative activity multiple of caspase-3 protein in MCF-7 cells activated by Lip(ASC) and Lip(ASC/PFH) (20 µg·mL⁻¹) with or without 670 nm irradiation for 10 min. Adapted from Liu et al. [50].

Que et al. [51] elaborated fluorine-containing NPs (a core of pentafluorophenyl and 5,10,15,20-tetrakis(4-aminophenyl) porphyrin) coated with PEG as spherical micelles (diameter 30 nm). ¹O₂ production, measured with ABDA was highly dependent of the concentration of PFC in the core, as O₂ supplier (655 nm, 1.52 mW·cm⁻², 15 min). The porphyrin in copolymers was then loaded with Pd. The heavy atom effect played a role in the enhanced PDT efficacy. No dark cytotoxicity was observed on

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

SMMC-7721 cells (human hepatoma cell line). The phototoxicity of the micelles after irradiation (655 nm, $1.52 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 60 min) showed a cell viability less than 30% and correlated with the PFC amount.

A nanoliposome was prepared by Sheng et al. [52] by incorporating perfluorooctyl bromide (PFOB) and ICG into a core coated by a bilipidic shell (diameter 200 nm). The release of O_2 from the NPs was assured by diffusion during at least 24 hours. The photothermal effect of the NPs was evaluated after laser irradiation (808 nm, $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) with a temperature increase from 43 to 50 °C. $^1\text{O}_2$ measured by SOSG under hypoxia was highly increased with the conjugate compared to ICG or liposome-ICG alone. The ROS production measured in vitro on human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells led to the same results. Under irradiation (808 nm, $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 3 min) the cell viability decreased to 10% both in normoxia and hypoxia by a combination of PDT and PTT effects. Mice bearing MDA-MB-231 tumours treated with the conjugate and irradiated (808 nm, $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) achieved almost complete tumour destruction without tumour recurrence.

Song et al. [53] synthesized nanodroplets of PFC (diameter 160 nm) loaded with O_2 and stabilized by albumin. Ce6 was modified (three hexylamine were added to increase the hydrophobicity) and loaded into the lipid bilayers of PEG-modified liposomes. The release of O_2 was triggered by an external ultrasound activation (Figure 9). This activation enhanced PDT and radiotherapy efficiency. 4T1 tumour-bearing mice placed under hyperoxic inhalation were treated with ultrasound (US). Oxygenation levels showed an increase of 50% for the mice treated with the conjugate. 4T1 tumour-bearing mice were treated with US and irradiated (671 nm, $1.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min). Mice tumour growth was significantly inhibited compared to the control group. Similar results were obtained on mice bearing CT-26 colon cancer tumours.

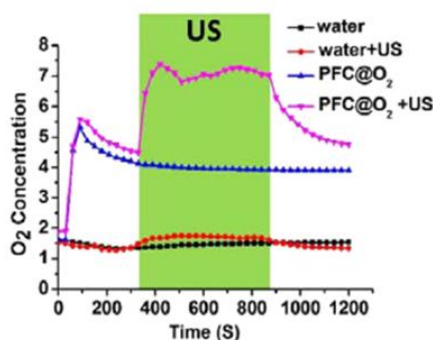


Figure 9. Time-dependent changes of dissolved O_2 concentrations in deoxygenated pure water without or with addition of O_2 -loaded PFC nanoemulsion (PFC@O_2). An US treatment was applied on these solutions within the indicated period. Reprinted from [53] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2016.

Tang et al. [54] designed PFC nanodroplets coated with IR Dye 800CW (for in vivo imaging) and incorporating ZnF_{16}Pc as a PS and perylene diimide (PDI) as photoacoustic agent (PA) imaging agent (diameter 110 nm). The high O_2 solubility in PFC enhanced PDT. The PDI agent converted light energy into heat for contrast-enhanced ultrasound imaging and for a photothermal effect. The PA intensity was registered proportionally to the PDI concentration. Under irradiation at 671 nm at different irradiance (until $1.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) the temperature of the solutions increased until 89 °C showing the photothermal effect for an irradiance of $1.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Phototoxicity was observed after light irradiation (671 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 200 s) on U87MG cells with a viability less than 34% without photothermal effect. $^1\text{O}_2$ was produced in normoxic and hypoxic media due to O_2 supply by PFC. Same conclusions were observed on U87MG cells. Mice irradiated at $500 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ during 10 min (671 nm) presented a complete tumour eradication (Figure 10).

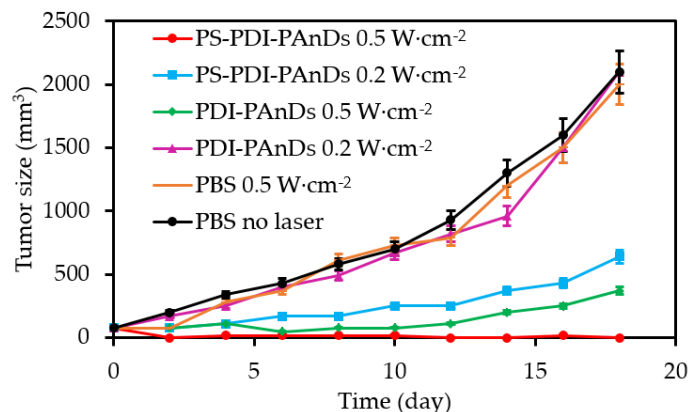


Figure 10. Tumour growth curves. Complete tumour eradication was found in the combinational PTT/Oxy-PDT treatment group with i.v. injection of PS-PDI-PANds plus a $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser irradiation. Significant tumour growth inhibition was also observed with animals treated with PTT only (i.v. injection of PS-PDI-PANPs plus a $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser irradiation) and Oxy-PDT only (i.v. injection of PS-PDI-PANds plus a $0.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ laser irradiation), indicating tumour growth inhibition rates of 82.3% and 67.5%, respectively, on day 18. Adapted from Tang et al. [54].

Tang et al. [55] designed a nanodroplet of PFH as core and a lipid shell containing IR780 as the PS. The high concentration of O_2 on PFH is playing as a sponge for O_2 and was able to overcome hypoxia in tumours. After irradiation (808 nm , $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20 s) $^1\text{O}_2$ production measured by the SOSG probe was higher with the conjugate than the lipidic NPs without PFH even when the conjugate was in hypoxic conditions. CT26 murine colon adenocarcinoma cells incubated and irradiated (808 nm , $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20 s) showed a higher level of $^1\text{O}_2$ with the conjugates than with the lipidic NPs alone. The phototoxicity of the conjugate in hypoxia presented a high mortality in the CT26 cells, while almost no cells were killed with the lipidic NPs. The NPs were injected intravenously in mice bearing CT26 subcutaneous tumours kept in hypoxia ($7\% \text{ O}_2$) during 30 min . After light illumination (808 nm , $2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, $10+10 \text{ s}$) the tumour growth was inhibited whereas no efficacy was observed for the lipidic NPs.

Tao et al. [56] prepared fluorinated covalent organic polymers (COPs) by linking covalently a porphyrin (THPP) with perfluorosebacic acid (PFSEA) and PEG (diameter $\sim 60 \text{ nm}$). PFCE, a type of PFC, was loaded into the porous structure of the NPs. The dissolved O_2 concentration was enhanced compared to the control. $^1\text{O}_2$ level measured by SOSG showed a significant increased production after irradiation (660 nm , $10 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min).

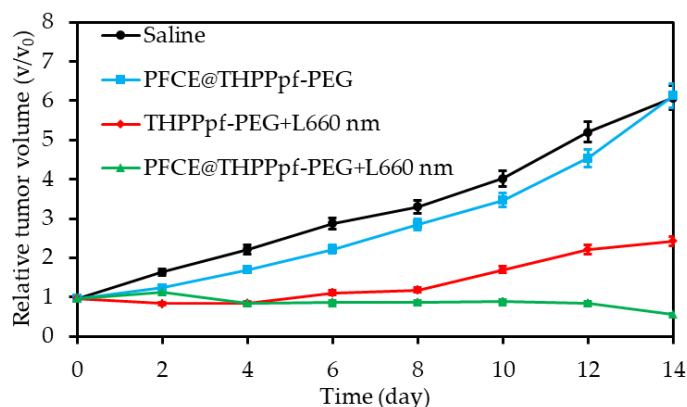


Figure 11. Tumour growth curves of four groups of mice after treatments as indicated. V_0 and V stand for the tumour volumes before and after the treatments, respectively. Adapted from Tao et al. [56].

Cellular uptake of the conjugates was successfully achieved on 4T1 cells. Phototoxicity of 80% was evaluated after irradiation (660 nm , $10 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 60 min). The tumour growth of 4T1 tumour-bearing

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

mice after intravenous injection and irradiation (660 nm, 50 mW·cm⁻², 30 min) was fully inhibited after 14 days (Figure 11).

Wang et al. [57] synthesized hollow MoS_x NPs (HMoS_x) by incorporating PFH in the core and loaded with albumin (HSA) and aluminum phthalocyanine (AlPc) (diameter 140 nm). The NPs were then loaded with O₂. A photothermal effect was observed after irradiation (670 nm, 1 W·cm⁻², 5 min), the temperature reached 68 °C. ¹O₂ production measured by DPBF showed a significant enhancement for the conjugate after irradiation. Phototoxicity assays realized on 4T1 cell lines led to an efficient activity of the conjugate on normoxia and hypoxia, when it was loaded with O₂. Intracellular ROS generation on 4T1 cells was also confirmed by measurement with the ROS-ID probe. Tumour growth measurements on 4T1 tumour mice conducted to a complete inhibition during 16 days after injection of the conjugate and irradiation (670 nm, 1 W·cm⁻², 5 min) confirming the dual PTT/PDT effect.

Wang et al. [58] prepared a polymeric micelle constituted of perfluorooctanoic acid and branched polyethyleneimine and incorporating Ce6 (diameter 120 nm). A non-fluorinated micelle was prepared as control. The two NPs were loaded with O₂ and the O₂ released concentration was significantly higher for the fluorinated NP (Figure 12). ROS production measured by DCFH-DA on C6 cells showed high concentration for the conjugate after irradiation (630 nm, 30 mW·cm⁻², 3 min). Hypoxia was greatly overcome by the conjugate in C6 cells compared to the control. Tumour growth measurements on BALB/c nude mice bearing C6 tumours conducted to a significant inhibition during 12 days after intravenous injection of the NPs and irradiation (660 nm, 500 mW·cm⁻², 20 min).

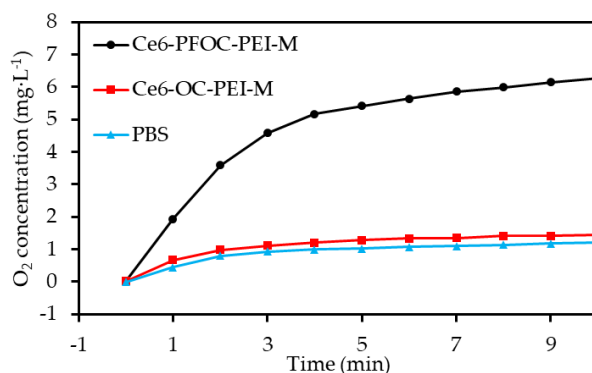


Figure 12. O₂ concentration changed after the addition of O₂ saturated Ce6-PFOC-PEI-M, Ce6-OC-PEI-M and PBS into deoxygenated water. Adapted from Wang et al. [58].

Yu et al. [59] designed PFH nanoliposomes incorporating O₂ and Ce6 (diameter 100 nm). PFH was able to encapsulate and then release O₂. The dissolved O₂ concentration was greatly enhanced during ultrasonic activation. The ROS generation using DPBF showed a time-dependent production for the conjugate in contrary to the control without PFH. Phototoxicity of the conjugate was clearly established in contrary to the control without PFH. In vivo tumour growth volume measurements on mice bearing subcutaneous 4T1 tumour showed that the conjugate induced the best tumour inhibition (670 nm, 1 W·cm⁻², 1 min).

Yuan et al. [60] synthesized fluorinated polypeptide micelles incorporating a NIR PS BODIPY (diameter 150 nm). The NPs was water dispersible and the PFC concentration allowed a high O₂ loading. Higher levels of dissolved O₂ were measured with the conjugate compared to the non fluorinated one. The same tendency was observed for the photosensitized ¹O₂ generation after irradiation at 635 nm (0.5 mW·cm⁻², 360 s). Phototoxicity (635 nm, 34 mW·cm⁻², 10 min) measured on HepG2 cells at the same irradiance showed a better efficacy of the conjugate compared to the non fluorinated one, confirming the role of PFC in O₂ supply. Tumour growth measurements on 4T1 tumour-bearing mice conducted to a complete inhibition during 19 days after injection of the NPs and irradiation (635 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min).

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Zhang et al. [61] synthesized perfluorooctyl bromide nanoliposomes incorporation IR780 NIR PS (diameter 270 nm). The photothermal effect of the NPs was evaluated after laser irradiation (808 nm, 1 W·cm⁻², 5 min) with a temperature increase from 25 °C to 70 °C. ¹O₂ generation was measured by SOSG under the same fluence with a high amount for the conjugate in contrary to the non-fluorinated NPs. Intracellular ¹O₂ generation was observed after light irradiation (808 nm, 1 W·cm⁻², 5 min). PTT and PDT treatments on 4T1 cancer cells showed less viability for the fluorinated conjugate and better efficacy with combined PTT/PDT. Tumour growth measurements on 4T1 cancer-bearing mice conducted to a complete inhibition during 18 days after injection of the NPs and PTT/PDT treatment (808 nm laser (on 30 s, off to room temperature, 20 cycles), 1.0 W·cm⁻²) (Figures 13a and b).

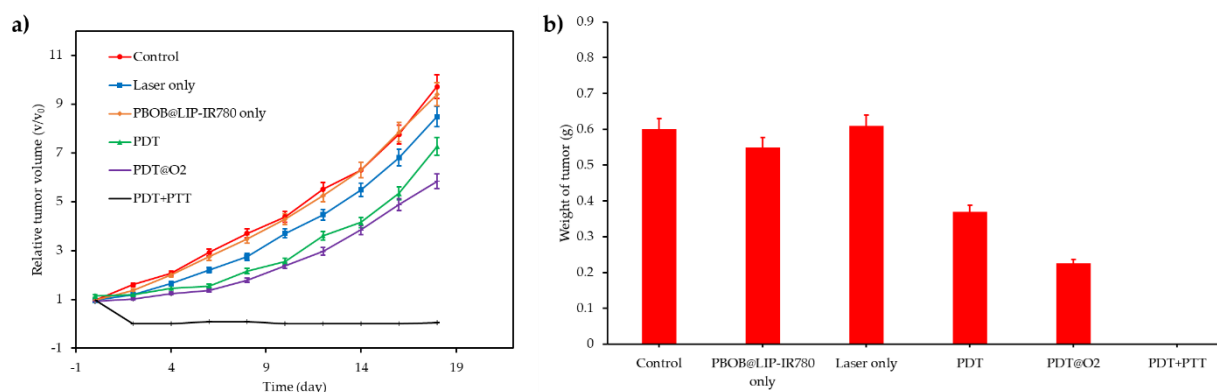


Figure 13. a) Tumour growth curves of six groups after various treatments. b) Weight of tumours 18 d post various treatments. (Values are means±s.d., n = 5, *P < 0.05). Adapted from Zhang et al. [61].

Zhao et al. [62] elaborated a NP made of a core of perfluorooctyl bromide and a shell with the PS IR780 and a tumour penetrating peptide CRGDK (diameter 210 nm). Hypoxia measurements made on MDA-MB-231 tumour-bearing mice showed a significant attenuation in the tumour where the conjugate was injected, confirming the role of PFC in the O₂ delivery. Tumour growth measurements on MDA-MB-231 tumour-bearing mice conducted to a complete inhibition during 13 days after injection of the NPs and irradiation (808 nm, 2 W·cm⁻², 20 s).

NPs with a PFH core and a hyaluronic acid (HA) and Ce6 shell were synthesized (diameter 220 nm) by Hu D. et al. [63]. These “on-off” NPs were redox-activatable and could release Ce6 and O₂ in hypoxic tumours. The ¹O₂ of the conjugate increased significantly in reducing conditions after light irradiation (660 nm, 100 mW·cm⁻², 5 min). The cellular uptake of the NP was studied on MDA-MB-231 cells. The ROS production in vitro was significantly higher with that conjugate than with NPs with incomplete composition. NPs were intravenously injected in MDA-MB-231 breast tumour xenograft mouse model. NPs retention in the organs was stronger after 24 h than for free Ce6, especially in the tumour (5.8 fold) (Figure 14).

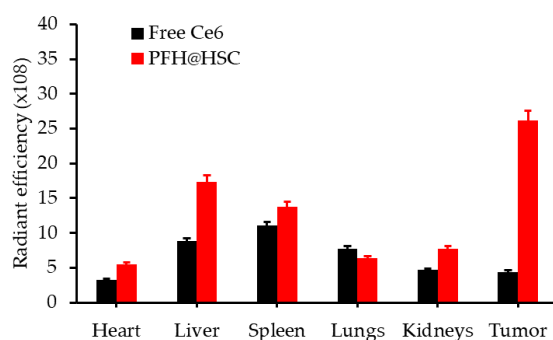


Figure 14. In vivo biodistribution of NPs. Semiquantitative fluorescence analysis of the radiant efficiency of organs and tumours isolated at 24 h post-injection. Adapted from Hu et al. [63]

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 4. Summary of publications about PFC as O₂ vehicle.

Ref	Application	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[48]	PDT	PFH	IR780	808 nm, 2 W·cm ⁻² , 20 s	¹ O ₂	MCF-7 and CT26 adenocarcinoma cell lines	CT26 tumour-bearing mice
[49]	PDT	PFC	Fluorous porphyrin	420 nm, 8.5 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	A375 cell line	No
[50]	PDT	PFH	Plasmon resonance	670 nm, 0.48 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[51]	PDT	Pentafluorophenyl	5,10,15,20-tetrakis(4-aminophenyl) porphyrin	In vitro: 655 nm, -1.52 mW·cm ⁻² , 15 min In vivo: 655 nm, 1.52 mW·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	SMMC-7721 cell line	No
[52]	PDT	PFOB	ICG	In vitro: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 3 min In vivo: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂ + ROS	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231 tumour-bearing mice
[53]	Ultrasound triggered PDT and RT	PFC	Ce6	671 nm, 1.2 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 and CT26 cell lines	4T1 and CT26 tumour-bearing mice
[54]	PDT	PFC	ZnF ₁₆ Pc	In vitro: 671 nm, 100 mW·cm ⁻² , 200 s In vivo: 671 nm, 500 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	U87MG cell line	U87MG tumour-bearing mice
[55]	PDT	PFH	IR780	808 nm, 2 W·cm ⁻² , 20 s	¹ O ₂	CT26 cell line	CT26 tumour-bearing mice
[56]	PDT	PFSEA	THPP	In vitro: 660 nm, 10 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 50 mW·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1-tumour-bearing mice
[57]	PDT + PTT	PFH	AlPc	670 nm, 1 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1-tumour-bearing mice
[58]	PDT	Perfluorooctanoic acid	Ce6	In vitro: 630 nm, 30 mW·cm ⁻² , 3 min In vivo: 630 nm, 500 mW·cm ⁻² , 20 min	¹ O ₂	C6, HepG2 and HeLa cell lines	C6 glioma tumour-bearing mice
[59]	PDT	PFH	Ce6	670 nm, 1 W·cm ⁻² , 1 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[60]	PDT	Fluorinated polypeptide NPs	BODIPY-Br ₂	In vitro: 635 nm, 34 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 635 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HepG2 cell line	4T1 tumour-bearing mice

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 4. Cont.

Ref	Application	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[61]	PDT + PTT	Perfluorooctyl bromide	IR780	In vitro: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , on 30 s, off to room temperature, 20 cycles	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[62]	PDT	Perfluorooctyl bromide	IR780	808 nm, 2 W·cm ⁻² , 20 s	¹ O ₂	MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines	MDA-MB-231 tumour-bearing mice
[63]	PDT	PFH	Ce6	In vitro: 660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂ + ROS	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231 tumour-bearing mice
[64]	PDT	PFC	Hypocrellin B	630 nm, 20 mW·cm ⁻² , 300 s, 6 J per well	¹ O ₂	H1299 cell line	No
[65]	PDT	NPs with fluorocarbon chains	IR780	In vitro: 808 nm, 2 W·cm ⁻² , 20 s In vivo: 808 nm, 2 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 tumour spheroids	4T1 tumour-bearing mice

PFH: perfluorohexane; PFC: perfluorocarbon; PFOBRB: perfluorooctyl bromide; ICG: Indocyanine green; Ce6: Chlorin e6; ZnF₁₆Pc: zinc 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-phthalocyanine; PFSEA: perfluorosebacic acid; THPP: meso-5, 10, 15, 20-tetra (4-hydroxylphenyl) porphyrin; AlPc: aluminium phthalocyanine; BODIPY-Br: 4,4-difluoro-4-bora-3a,a-diaza-s-indacene brominated.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The *in vivo* hypoxia intensity declined with the NPs compared to the NPs without PFH. The NPs showed effective tumour growth inhibition compared to NPs with incomplete composition even if the tumour did not disappear completely (660 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min).

Hu et al. [64] synthesized different amphiphilic fluororous random copolymers with different amount of PFC, that embed Hypocrellin B (HB) as PS, assembled themselves into micelles in water (diameter 200 nm). The O₂ carrying ability of the conjugate was related to the PFC content. ¹O₂ production of HB after light irradiation (630 nm, 6 J/well) of the conjugate measured with SOSG was equivalent as for HB in water. The phototoxicity (630 nm, 20 mW·cm⁻², 300 s) of the conjugate in human lung carcinoma H1299 cells depended on the amount of PFC. The highest amount led to the best efficiency.

Ma et al. [65] prepared NPs with fluorocarbon chains and IR780 PS in the core and iRGD peptides on the shell (diameter 80 nm). ¹O₂ concentration was measured *in vitro* and *in vivo* with SOSG showing increased values for the conjugate (808 nm, 2 W·cm⁻², 20 s). ROS generation measured on 4T1 tumour spheroids showed an enhanced concentration even inside the spheroid showing efficacy of the tumour-penetrating iRGD peptide. High phototoxicity was observed at 7.5 µg·mL⁻¹ with a cell viability less than 20% (808 nm, 2 W·cm⁻², 20 s). O₂ concentration in 4T1 solid tumours measured by photoacoustic system showed an enhanced amount after injection of the NPs and irradiation. Tumour growth measurements on 4T1 cancer-bearing mice conducted to a complete inhibition during 12 days after injection of the NPs and irradiation (808 nm, 2 W·cm⁻², 5 min). (Table 4)

2.4. O₂ Microbubbles

Free O₂ gas bubbles are not recommended to be directly injected into blood flow for hemolysis reason. A new approach of O₂ delivery, well documented in a review of Khan et al. [66] consists in the use of O₂ loaded micro-/nanobubbles to bring O₂ to the hypoxic tumour without side effects. In such particles, the shell is generally a monolayer biomaterial (lipids, proteins, polymers...) that encapsulates the core gas.

Huang et al. [67] have developed a new strategy for externally triggered PDT of tumour hypoxia using bone marrow-derived monocytes/macrophages as cellular vehicles for co-transport of O₂ and Ce6. Superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs) were co-entrapped within the polymer to afford functional bubbles denoted (SCOPBs). According to the *in vitro* studies, these functional bubbles were found harmless to cellular hosts without external trigger. However, significant apoptosis of cancer cells co-incubated with therapeutic monocytes was observed when treated with high frequency magnetic field (HFMF) and red light laser irradiation due to the combined effect of PDT and magnetic hyperthermia was observed. Furthermore, upon tumour treatment with HFHM (9 min) and red laser irradiation (660 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min), the therapeutic monocytes exhibited a superior performance in inhibiting tumour growth on tramp-C1 tumour-bearing mice. Moreover, immunohistochemistry (IHC) staining of tumour sections confirmed the successful cellular transport of the therapeutic payloads to tumour hypoxia and the pronounced antitumour effect elicited by combined hyperthermia/PDT along with the additional O₂ supply.

In 2018, Song et al. [68] developed nanocapsules composed of a decane core and a polymer shell linked to Ce6, surrounded by lipid molecules conjugated to a hydrophilic polymer PEG (263.2±10.3 nm with a thickness of about 20 nm for the shell). The O₂ nanobubbles (NBs-O₂) were finally obtained by O₂ infusion in the nanocapsules. Fluorinated caps on the PCL polymer avoided the liberation of O₂ at an undesired place. The authors had then compared their ability to release O₂ in comparison with well-known O₂ carrier, lipid-coated O₂ microbubbles (LOMs). They followed the level of O₂ dissolved in a hypoxic solution over time. LOMs showed a higher and faster increase of O₂ concentration, at the beginning (first minute) than NBs-O₂ but they decreased rapidly to a lower level than NBs-O₂. This indicated a better robustness of these nanobubbles due to their thicker shell. They also compared the effect of O₂ release on the ¹O₂ production of Ce6 and observed a level 3 times higher for NBs-O₂ in comparison with Ce6 alone. *In vitro* studies on C6 glioma showed that they were strongly accumulated in cytoplasm after endocytosis in comparison with Ce6 alone. *In vivo* studies were performed on

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

glioma-bearing nude mice. They evaluated their ability to improve the PDT treatment and showed a significant decrease of tumour growth for mice treated with these nanobubbles and laser irradiation (670 nm, 300 mW·cm⁻², 30 min) in comparison with the control group.

(Table 5)

Table 5. Summary of publications about O₂ microbubbles as O₂ vehicle.

Ref	Application	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[67]	Hyperthermia/PDT	O ₂ -loaded polymer bubbles	Ce6	660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	RAW 264.7 cell line	Tramp-C1 tumour-bearing C57BL/6JNarl mice
[68]	PDT	O ₂ nanobubbles	Ce6	670 nm, 300 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	C6 glioma cell line	C6 glioma tumour-bearing mice

Ce6: Chlorin e6.

2.5. Other

Niu et al. [69] designed β-NaGdF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconverting NPs (diameter 50 nm) associated with gold oxide (Au₂O₃), porous silica, Ce6, cyclo-RGD and PEG. Upon a NIR irradiation, Au₂O₃ is able to produce O₂ assisted by UCNPs via (FRET). When FRET occurred between UCNPs and Au/Au₂O₃ under NIR light, Au₂O₃ underwent a decomposition into Au and O₂. The O₂ production under NIR irradiation (980 nm, 30 min, 0.5 mW·cm⁻²) was demonstrated using a Ru probe. FRET was observed between the NPs and Au₂O₃ for O₂ production and between the NPs and Ce6 for a PDT effect. The phototoxicity of the NPs on human cervical cancer cells (HeLa) was demonstrated. The NPs were intravenous injected in nude mice inoculated with HeLa tumour cells. After NIR irradiation (980 nm, 30 min, 0.5 mW·cm⁻²), the relative tumour volume of the treated group stayed constant whereas it increased in the control group. The NPs presented also a photothermal effect that could be used for PA.

3. Modification of Tumour Microenvironment (TME)

The "normal" microenvironment is complex and dynamic. Its cellular component encompasses all neighbouring cells (adjacent cells belonging to the same tissue) and cells residing in their direct environment (fibroblasts, vascular cells, dendritic cells, immune system cells, etc.). The TME or stroma is defined as the cellular components, molecular components and mechanical stresses surrounding and interacting with tumour cells. It differs from the "normal" microenvironment by the biochemical composition of the extra cellular matrix and especially by the fact that the stromal cell populations, although not transformed, are subverted and controlled by the tumour cells to meet their own needs. It has been widely demonstrated that TME plays a major role in bone marrow clearance and tumour invasion, as well as resistance to chemotherapy [70]. By modifying the TME, it seems possible through specific response pathways, such as that of the proteins of the Hypoxia Inducible Factor (HIF) family, to induce the activation of several signalling pathways that regulate many cellular processes such as angiogenesis, metabolism, cell proliferation and apoptosis.

3.1. H₂O₂ Decomposition

It is known that cancer cells have higher levels of H₂O₂ than normal cells [71] because of the aberrant metabolism of cancer cell. The concentrations range from 10⁻⁴ to 10⁻³ M. One of the strategies to improve O₂ levels in hypoxic areas is to design compounds that could degrade endogenous H₂O₂ to produce O₂ inside the tumour. It is interesting to note that catalase is able to convert around 5 million H₂O₂ molecules per minute and catalase is explored nowadays to overcome tumour relief [72]. Moreover,

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

another advantage of this strategy is that the decrease of H_2O_2 in the cells leads to a decrease of cancer cell proliferation [73–75].

3.1.1. MnO_2

One advantage of MnO_2 is that it can adsorb different kinds of small molecules via physisorption or Mn-N coordination links. MnO_2 produces O_2 by catalytic H_2O_2 decomposition under neutral conditions, but also under acidic conditions by reaction with H^+ . This strategy is very new. The first publication has been written in 2015, and then we can find three publications in 2016, seven in 2017, 14 in 2018 and three already in 2019 (before March). Moreover, the efficacy of PDT is not only limited by tumour hypoxia but also over-expressed glutathione (GSH) in cancer cells that consumes ROS.

Xu et al. [76] synthesized a photoactive Mn(II) complex of BODIPY derivatives ($[(\text{BDA})\text{MnCl}_2]$, Mn_1) as a O_2 generator under irradiation (green LED, 500–600 nm, 10 W) in water. Mn_1 was loaded on graphene oxide ($\text{Mn}_1@\text{GO}$) and an in vitro biological evaluation for Mn_1 and $\text{Mn}_1@\text{GO}$ on HepG-2 cells in normal and hypoxic conditions was performed. In normal conditions, both Mn_1 and $\text{Mn}_1@\text{GO}$ after light illumination (green LED, 500–600 nm, 15 min) were active against HepG-2 cells. It was also found that both compounds could be used as photoactivated anticancer materials since Mn_1 and $\text{Mn}_1@\text{GO}$ were able to exhibit inhibition on the proliferation of HepG-2 cells when light irradiation. In particular, $\text{Mn}_1@\text{GO}$ reacted with H_2O_2 resulting in the formation of active species, and worked as H_2O_2 and light-activated anticancer NPs. Moreover, $\text{Mn}_1@\text{GO}$ could be an efficient anticancer material in hypoxic environments and Mn_1 could target mitochondria and had some effects on the expression of HIF-1 α in HepG-2 cells.

Multifunctional MnO_2 NPs loaded with Ce6 and coated with PEG were designed ($\text{Ce6} @ \text{MnO}_2\text{-PEG}$) by Zhu et al. [77]. In vitro studies in an O_2 -deficient atmosphere have shown that $\text{Ce6} @ \text{MnO}_2\text{-PEG}$ NPs can effectively increase the efficiency of light-induced PDT (661 nm, 5 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min) due to the increased intracellular level of O_2 . In vitro in 4T1 cells, it was found that $\text{Ce6}@\text{MnO}_2\text{-PEG}$ NPs were very effective, even under conditions of O_2 deficiency. With systemic administration to mice bearing subcutaneous 4T1 tumours, $\text{Ce6}@\text{MnO}_2\text{-PEG}$ NPs showed effective accumulation inside the tumour, in which the MnO_2 NPs gradually decomposed into Mn^{2+} ions. Meanwhile, as expected, the level of oxygenation of the tumour was significantly increased. Due to enhanced Ce6 uptake in the tumour and reversed tumour hypoxia, highly effective PDT treatment (661 nm, 5 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 1 h) of cancer was implemented using $\text{Ce6}@\text{MnO}_2\text{-PEG}$ NPs. Given the gradual decomposition of MnO_2 NPs, easy filtration of Mn^{2+} in the kidneys, and the lack of obvious short-term in vivo toxicity observed in this study, MnO_2 nanostructures could be a unique type of safe nanoplatform promising for cancer.

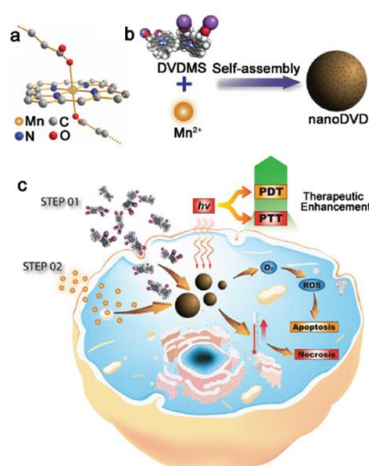


Figure 15. Schematic illustration showing a molecular model of the Mn^{2+} ion linking porphyrin ring and two carboxylate radicals of DVDMS molecules (a), the fabrication process of Mn/DVDMS (b), and photothermal/PDT (PTT/PDT) (c). Reprinted from Chu et al. [78] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2018.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Chu et al. [78] developed an engineering nanoplatform that combined many functions, including imaging (fluorescence imaging, MRI and PA imaging), as well as a synergistic combination of phototherapy (PTT and PDT). The MnO₂ nanosheets served as a highly efficient carrier for a sinoporphyrin sodium (DVDMS) PS and an in situ O₂ and nano-DVD (Mn/DVDMS) generator, enhanced theranostic capability of Mn²⁺-assisted assembly of DVDMS (MnO₂/DVDMS) (Figure 15).

MnO₂ nanosheets served as a highly effective DVDMS carrier and in situ O₂ and nanoDVD generator. In a tumour environment, MnO₂/DVDMS could be reduced by GSH and H₂O₂, which resulted in the release of Mn²⁺, DVDMS and O₂. In addition, GSH consumption, O₂ production, and nanoDVD formation demonstrated an overall improved efficacy of phototherapy in vitro (630 nm, 75 mW·cm⁻², 5 min) and in vivo (630 nm, 300 mW·cm⁻², 8 min) in MCF-7 tumour.

Gao et al. [79] developed an O₂-generating PDT nanocomplex (IHM) by encapsulating MnO₂ NP in HA NPs coupled to ICG. The O₂ content in the tumour increased by 2.25±0.07 times with IHM compared without IHM treatment. After laser irradiation in the IHM group, there was a significant inhibition of tumour growth compared to the group treated with NPs. Immunofluorescent staining confirmed a decrease in both HIF1- α and pimonidazole in the IHM group, implying that generating O₂ in the tumour not only improved the efficiency of PDT, but also weakened tumour hypoxia. In vitro studies in murine squamous SCC-7 cells showed a high suppression of cell proliferation under PDT (808 nm, 0.5 W·cm⁻², 10 min) treatment with IHM. In vivo in SCC-7 tumour-bearing mice highlighted a high inhibition of tumour growth with PDT treatment (808 nm, 0.8 W·cm⁻², 10 min) with IHM.

Hao et al. [80] designed poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) NPs loaded with hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) and coated with multifunctional MnO₂ shells, (PLGA/HMME@MnO₂ NPs). As expected, inside the tumour they could observe the generation of O₂ and degradation of MnO₂ into Mn²⁺ ions by glutathione. In vitro in MCF-7 cells, under illumination (532 nm, 1.5 W·cm⁻², 2 min), the released HMME produced ROS that destroyed tumour cells. Furthermore, the decreased of GSH level further inhibited the consumption of the produced ROS, which greatly enhanced the PDT efficacy. These results were confirmed by in vivo studies in S180 tumour model after PDT treatment (532 nm, 1.5 W·cm⁻², 1.5 min) with PLGA/HMME@MnO₂ NPs with a significant decrease of tumour volume.

Kim et al. [81] developed biocompatible mesoporous silica NPs with MnFe₂O₄ NPs (MFMSN) and Ce6 (MFMSN-Ce6). These results demonstrated the continuous generation of O₂ by the Fenton catalyst under physiological conditions, improving the generation of ROS under hypoxic conditions. In vitro PDT efficiency in human glioblastoma cancer (U-87 MG) cells in both normoxic and hypoxic conditions was investigated. A significant cell death was observed in both conditions after incubation of cells with MFMSN-Ce6 and irradiated at 670 nm (0.5 W·cm⁻², 30 s), contrary to cells incubated with Ce6 alone and irradiated, which highlighted a low cell death in hypoxic conditions. In vivo in U87 MG-bearing mouse xenograft model, PDT treatment (670 nm, 0.88 W·cm⁻², 5 min) with MFMSN-Ce6 showed the best efficiency.

Liu et al. [82] developed a bovine serum albumin (BSA) stabilized MnO₂ NPs on which TCC (HPPH) was physisorbed (hydrodynamic size 60.52±25.61 nm). In vitro studies in U87MG cells after 630 nm laser irradiation showed that the cells incubated with the NPs exhibited more reduced viability than those incubated with the PS alone (10 mW·cm⁻², 1 min). In vivo (630 nm, 10 mW·cm⁻², 10 min) in U87MG tumour bearing mice, a complete eradication of the tumour was observed after treatment with the NPs whereas no diminution was observed with the NPs without HPPH and only a low decrease with HPPH. Thanks to pimonidazole hypoxyprobe kit, they proved the decrease of tumour hypoxia.

Ma Z. et al. [83] in 2017 developed a H₂O₂-activatable nanostructure (SiO₂-MB@MnO₂) composed by a SiO₂-MB core coated to a MnO₂ shell. Under acidic hypoxic conditions, these NPs could release MB and generate O₂ by decomposition of H₂O₂ of the TME. SiO₂-MB@MnO₂ exhibited a significant PDT efficiency (650 nm, 100 mW·cm⁻², 15 min) in vitro in HeLa cells with 92% of cell death (42% for MB alone and 64% for SiO₂-MB). Moreover, in TME conditions (pH = 5.5), an efficient release of MB by SiO₂-MB@MnO₂ was observed after 5h of incubation (87%). The dramatic increase of PDT effect was also proven in vivo in U14 tumour-bearing mice with an important decrease of tumour volume in

comparison with irradiation of MB alone or SiO₂-MB and a decrease of HIF-1 α showing an improvement of hypoxia.

Ai et al. [84] developed upconversion nanoconjugate (UCN) loaded with Ce6 and integrating MnO₂ NPs and HA biopolymer (UCNs-MnO₂-Ce6-HA). Under NIR 808 nm light irradiation (0.4 W·cm⁻², 60 min), UCNs-MnO₂-Ce6-HA produced high level of O₂ by reaction of MnO₂ with H₂O₂ of the microenvironment and thus led to an increase of the production of ¹O₂ in hypoxic conditions. In vitro studies in murine melanoma cells (B16F10) confirmed this with an increase of cell death (49%) by treatment with UCNs-MnO₂-Ce6-HA under NIR irradiation (0.4 W·cm⁻², 60 min) in hypoxic conditions.

Gu et al. [85] synthesized nanocomposites (CaF₂:Yb,Er@silica/MnO₂-Ce6 = C@MSN-Ce6) constituted of CaF₂:Yb,Er crystals incorporated in mesoporous silica nanospheres (MSNs) coated with a thin layer of MnO₂ and loaded with Ce6. The MnO₂ coating modulated a hypoxic TME by generating in situ O₂ through a reaction with an endogenous H₂O₂ tumour. In vitro tests in 4T1 cells highlighted that C@MSN-Ce6 presented under light irradiation (980 nm, 0.5 W·cm⁻², 10 min) an improvement of PDT efficiency, in comparison with NPs without MnO₂, in both normoxic and hypoxic conditions confirmed by an elevation of intracellular ROS level. In 4T1 tumours on Balb/c mice, in vivo studies showed a decrease of hypoxia in tumour after injection of C@MSN-Ce6 by using pimonidazole probe. The highest efficiency of PDT treatment (980 nm, 0.5 W·cm⁻², 30 min) was observed for C@MSN-Ce6 with a significant decrease of tumour growth.

Chen et al. [86] prepared successfully pH/H₂O₂-responsive carbon dots CDs/MnO₂-PEG presenting interesting characteristics such as a low cytotoxicity and a complete clearance from the body and an increase of fluorescence and ¹O₂ production in TME conditions. In vitro, in HeLa cells, and in vivo, in 4T1 tumour-bearing nude mice, analyses revealed that the low-toxic CDs/MnO₂-PEG nanohybrids could be applied as pH/H₂O₂-driven, turn-on nanotheranostics for the concurrent bimodal MR/FL imaging and O₂-elevated PDT of solid tumours. In vitro PDT (635 nm, 100 mW·cm⁻², 30 min) effect was investigated in HeLa cells under hypoxic and acidic conditions and CDs/MnO₂-PEG exhibited high efficiency to kill cancer cells. In vivo studies, under PDT treatment (635 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min) with CDs/MnO₂-PEG, conducted a significant inhibition of tumour growth.

He et al. [87] synthesized large pore silica nanocomposites (LPMSNs) coupled to Ce6, AS1411 aptamer for the selectivity and MnO₂, denoted as AS1411/Ce6-LPMSNs-MnO₂. Due to the high reactivity of MnO₂ with endogenous acidic H₂O₂, massive O₂ molecules were formed, improving PDT efficiency (660 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min).

Kapri and Bhattacharyya [88] developed a p-n heterojunction nanofilm containing p-type MoS₂ nanoplates and nitrogen-doped reduced graphene oxide (n-rGO) with a thickness of ~ 5 nm. Illumination at 980 nm led to an effective electron-hole separation through the heterojunction. The nanoplates were modified with functionalized lipoic acid poly(ethylene glycol) to ensure better biocompatibility and colloidal stability and surface-decorated 3–5 nm MnO₂ NPs to finally obtain p-MoS₂/n-rGO-MnO₂-PEG nanosheets. MnO₂ increased intracellular O₂ by reacting with endogenous H₂O₂. In vitro studies in HeLa and HEK 293 (human embryonic kidney 293 cells) cells were performed highlighted an efficient PDT (980 nm, 0.4 W·cm⁻², 5 min) effect of the nanosheets. Compared to p-MoS₂/n-rGO-PEG and MoS₂/rGO-PEG, p-MoS₂/n-rGO-MnO₂-PEG nanoplates exhibit enhanced DCF fluorescence and they detected an increase of hypoxia due to increased apoptosis under the influence of NIR light.

Liang et al. [89] synthesized gold-coated NPs coupled to MnO₂ NPs (AuNC@MnO₂, AM). Sufficient oxygenation in the tumour site reduced local hypoxia. In addition, the O₂-enhanced effect of PDT AM not only effectively destroyed the primary tumour in vivo, but also caused the death of immunogenic cells (ICD) with the release of damage-related molecular patterns (DAMP), which subsequently caused maturation of DC and activation of effector cells, thereby causing a systematic inducing antitumour immune responses against mTNBC. In vitro analyses in 4T1 cells showed a high increase of ROS production and cell apoptosis after treatment with AM under NIR irradiation (808 nm, 0.8 W·cm⁻², 3 min). In vivo studies in 4T1 tumour-bearing mice showed a high inhibition of tumour growth after AM-PDT treatment. Moreover, they observed that AM could also destroy tumour metastasis.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

To enhance cancer PDT, a mitochondrial-directed multifunctional MnO₂ NP with a dye (IR808) was developed (IR808 @ MnO NP) by Zhou et al. [90] (Figure 16).

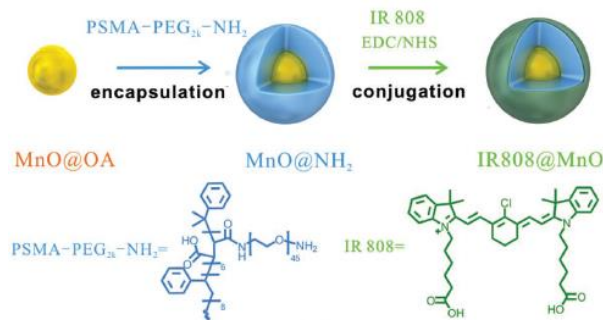


Figure 16. Synthetic route of MnO@OA, MnO@NH₂, and IR808@MnO. Reprinted from [90] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2018.

In this nanoplatform, IR808 acted as targeting ligand, eventually moving into mitochondria. Large amounts of ROS were formed during the reaction between H₂O₂ and MnO₂ NPs. The results, in MCF-7 cancer cells, showed that IR808@MnO NPs improved the hypoxia environment of the tumour, generating a large amount of ROS. Moreover, a high in vitro PTT/PDT efficiency (808 nm, 0.5 W·cm⁻², 5 min) was observed by treatment with IR808@MnO NPs with a significant decrease of cell viability (6%) under acidic conditions. In vivo in MCF-7 tumour-bearing mice, IR808@MnO NPs highlighted a significant phototoxicity with no tumour recurrence for all treated-mice and an improvement of hypoxia in tumour.

HSA-MnO₂-Ce6 woofers were prepared by Lin et al. [91]. HSA-MnO₂-Ce6 NPs generated O₂ when reacting with H₂O₂ at endogenous levels. In addition, ¹O₂ generation was doubled due to the use of HSA-MnO₂-Ce6 NPs instead of HSA-Ce6 NPs in the presence of H₂O₂ with 660 nm laser illumination. In vitro mouse bladder cancer cells (MB-49) viability tests showed that HSA-MnO₂-Ce6 NPs themselves were non-toxic, but significantly enhanced the effects of PDT on bladder cancer cells (MB-49) during laser irradiation (660 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min). O₂ content in orthotopic bladder cancer increased by 3.5 times after the introduction of HSA-MnO₂-Ce6 NPs compared with the previous introduction of HSA-Ce6 NPs without MnO₂. Given the superior tumour targeting and low toxicity, HSA-MnO₂-Ce6 NPs were then used for the PDT treatment of orthotopic bladder cancer (660 nm, 200 mW·cm⁻², 15 min). PDA with HS of HSA-MnO₂-Ce6 NPs showed significantly improved therapeutic efficacy and significantly increased the lifespan of mice compared with the control group.

Wang et al. [92] developed pH/H₂O₂ responsive nanocomplexes composed of Si QDs linked by electrostatic interaction to BSA-Ce6 to form BSA-Ce6-Si QDs (BCS) coated with MnO₂ on the surface of BSA to obtain blocked-cell shared-memory (BCSM NPs). In the same conditions as TME (H₂O₂, pH = 6.5), BCSM NPs showed a high production of O₂ and thus of ¹O₂ which was higher than Ce6 alone. PDT treatment (638 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min) with BCSM NPs in vitro in HeLa cells conducted to a significant decrease of cell viability (20 %) and a high production of ¹O₂ was observed. In vivo PDT experiments in HeLa tumour-bearing mice showed that the growth of tumours was effectively inhibited under light exposure (638 nm, 5 mW·cm⁻², 5 min).

Zhu et al. [93] synthesized hybrid semiconductor NPs (SPN-Ms) composed of semiconducting polymer NPs (SPN) as a core and MnO₂ nanosheets as a shell. The SPN core served as the NIR agent for fluorescence imaging and PDT, while the MnO₂ nanoribbons as O₂ formation agent. SPNs were coated with different amounts of MnO₂ and the SPN-M1 (1 w/w% of MnO₂) generated 2.68 times more ¹O₂ than uncoated SPN (SPN-0) under hypoxic conditions under NIR laser irradiation (0.44 W·cm⁻²). In vitro and in vivo in 4T1 cells model, SPN-M1 exhibited a high PDT (808 nm, 5 min, in vitro: 0.44 W·cm⁻² and in vivo: 0.3 W·cm⁻²) efficiency.

Zhu et al. [94] designed a multifunctional theranostic NP (NMOFs@BSA/SDs@MnO₂) with nanoscale metal organic frameworks (NMOFs, composed of TCPP as ligand and Fe³⁺), bovine serum albumin (BSA) and sulfadiazines (SDs), to provide actively targeting for the over-expressed carbonic anhydrase IX (CA IX) in tumour cells, and MnO₂. NPs presented an average hydrodynamic diameter of 122 nm and its ability to produce O₂ was also proved. In vitro in 4T1 cells, NMOFs@BSA/SDs@MnO₂ under laser irradiation (660 nm, 50 mW·cm⁻², 15 min) induced a high decrease of cell viability with a production of ROS due to H₂O₂ decomposition. In vivo in 4T1 bearing mice highlighted a significant inhibition of tumour growth by PDT treatment (660 nm, 50 mW·cm⁻², 15 min) with NMOFs@BSA/SDs@MnO₂.

Liu et al. [95] developed NPs based on black phosphorus nanocomposite as PS. The NPs (R-MnO₂-FBP) were composed by assembly of MnO₂ encapsulating in Rhodamine B (RhB) (R-MnO₂) for O₂ generator and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled peptide-functionalized black phosphorus (FBP) as PS. It was shown that the O₂ release was proportional to the liberation of Mn²⁺ and RhB in the R-MnO₂-FBP system. Under irradiation (660 nm), R-MnO₂-FBP presented ϕ_{Δ} of 9.9% which remained stable in hypoxic conditions. After delivery of R-MnO₂-FBP into cancer cells in acidic and H₂O₂-rich environment, the generation of O₂ was observed and PDT treatment in hypoxic cells conducted to 51.6% of cell (HeLa cells) apoptosis under laser irradiation (660 nm, 150 mW·cm⁻², 3 min). In vivo experiments in HeLa-bearing mice with R-MnO₂-FBP highlighted the ability of R-MnO₂-FBP to enhance PDT treatment (660 nm, 150 mW·cm⁻², 10 min).

Several teams have studied the use of MnO₂ NPs to improve combined therapies by designing self-oxygenated systems. We report three teams who described the interest of MnO₂ to improve PTT/PDT synergistic therapy.

Cao et al. [96] developed intelligent NPs to overcome limitations of dual PDT and PTT treatment. The NPs were constituted by a MnO₂ nanosheet decorating at the surface with Cu_{2-x}S (MnO₂/Cu_{2-x}S) and then loaded with siRNA (siRNA-small interfering RNA) to finally formed MnO₂/Cu_{2-x}S-siRNA. In an acidic microenvironment, the MnO₂ tumour was reduced to the Mn²⁺ ion and triggered the decomposition of H₂O₂ to O₂ to facilitate tumour hypoxia. Reduced Mn²⁺ ions significantly enhanced the contrast of MRI, and Cu_{2-x}S acted as a powerful PA and PT imaging agent, which led to accurate trimodal tumour-specific imaging and detection. In vitro studies in MCF-7 and A549 cells were performed. Under NIR irradiation (980 nm, 0.72 W·cm⁻², 5 min), MnO₂/Cu_{2-x}S NPs showed a high phototoxicity with a cell viability of only 29.68% due an effective synergistic PTT/PDT effect. In vivo studies in B16 tumour-bearing mice highlighted a high inhibition of tumour growth for mice treated with MnO₂/Cu_{2-x}S-siRNA and NIR irradiation ((980 nm, 0.72 W·cm⁻², 5 min) proving an enhancement of PTT/PDT treatment with a high increase of ¹O₂ due to H₂O₂ decomposition by MnO₂.

Yin et al. [97] coated uniformly carbon nanotubes (CNTs), as PTT agent with cross-linked MnO₂ flakes, as O₂ generator, MnO₂/CNTs (MCs) and incubated with Ce6 to give Ce6-MnO₂/CNTs (CMCs) for PTT/PDT therapy. This system could, in the TME, release Ce6 and CNTs while generating O₂ by reaction of MnO₂ with endogenous H₂O₂ and H⁺. In TME-mimetic conditions, the photothermal effect of CMCs and ¹O₂ generation under laser irradiation (PTT: 808 nm, 1.0 W·cm⁻² and PDT: 660 nm, 0.5 mW·cm⁻²) was observed. In vitro in HeLa cells, CMCs showed a high phototoxicity and a strong production of ¹O₂ under irradiation (660 nm, 1.0 W·cm⁻², 5 min). The synergistic PTT/PDT effect of CMCs was highlighted in vivo in HeLa tumour-bearing mice irradiated with 808 + 660 nm (1.0 W·cm⁻², 10 min) with eradication of tumours.

In 2019 Liu et al. proposed [98] new MnO₂-based nanotherapeutic agents (honeycomb MnO₂/IR780/BSA NPs, HMIB NPs) for NIR-activatable and self-oxygenated PTT/PDT. HMIB NPs exhibited efficient ¹O₂ production under NIR irradiation (785 nm, 20 mW·cm⁻²) and PT effect (785 nm, 0.3 and 1.0 W·cm⁻², 6 min). In vitro in HepG2 and 3T3 cells, the authors showed that the irradiation of cells with a higher power (785 nm, 1 W·cm⁻²) after incubation with HMIB NPs led to more cell death than irradiation at 785 nm and 50 mW·cm⁻² due to the PT effect. In vivo, HepG2 tumours could be completely eliminated when increasing the laser power density from 0.3 to 1 W·cm⁻², which could be attributed to the synergy of PDT and PTT.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

We report two studies about the use of MnO_2 to improve chemo-PDT synergistic therapy. Chen et al. [99] synthesized HSA- MnO_2 -Ce6 & Pt NPs (HMCP) constituted by MnO_2 nanoclusters coated to HSA modified with Ce6 or with a prodrug of *cis*-Pt (*c,t,c*-[Pt(NH₃)₂-(O₂CCH₂CH₂COOH)(OH)Cl₂] (*cis*-Pt(IV)SA)). These NPs were sensitive to pH/H₂O₂ using a simple one-step albumin-based biomimetalization method for effective combination therapy. Once inside the tumour, MnO_2 nanoclusters in HMCP NPs decreased hypoxia. Meanwhile, the reaction of MnO_2 with H⁺ and H₂O₂ in TME led to the gradual decomposition of these albumin- MnO_2 NPs into separate therapeutic albumin complexes with sizes less than 10 nm in order to achieve significantly improved intra-tumour interstitial diffusion for optimized treatment of tumours. As a result of these effects, large in vitro antitumour therapeutic results in 4T1 cells were achieved after combined PDT (660 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min) and chemotherapy using HMCP NPs by a single treatment at a rather low dose. In vivo studies were performed in 4T1 tumours-bearing mice and a significant decrease of hypoxia was also observed in presence HMCP NPs by using pimonidazole. In vivo studies of the efficiency of HMCP combined to light irradiation (660 nm, 5 mW·cm⁻², 1 h) highlighted an increase of tumour growth inhibition.

Zhang et al. [100] developed an O₂-generating and pH-sensitive nanoplatform, loading MnO_2 for O₂ generation, g-C₃N₄ for PDT, ZIF-8 (zeolitic imidazolate frameworks) for drug encapsulation and doxorubicin hydrochloride for chemotherapy (Figure 17).

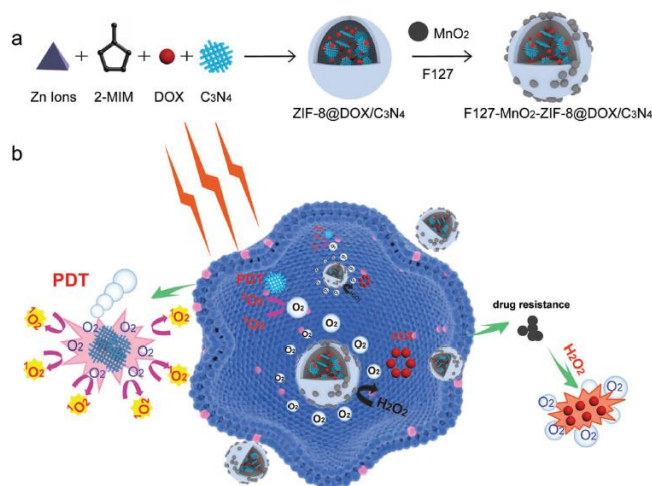


Figure 17. a) Schematic illustration of the fabrication of FMZ/DC nanocomposites. The diagram is not drawn to scale. b) Schematic illustration of FMZ/DC with O₂ generation enhancing the chemo-PDT under 660 nm light irradiation. Reprinted from [100] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2018.

In vitro experiments in 4T1 cells showed a higher therapeutic effect using the NPs compared to therapy without MnO_2 nanodot in hypoxic conditions or only with chemical and PDT (660 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min) with the presence of MnO_2 nanodot. In vivo experiments also showed that NPs could reduce tumour hypoxia and improve the effect of photodynamic and chemotherapeutic treatment. 4T1 tumours could be very effectively eliminated using the developed NPs when irradiated with light (660 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min).

Two others studies about the use of MnO_2 to improve combined therapies have been described. Fan et al. [101] were the first to propose intelligent MnO_2 nanosheets, anchored with UCNPs, to simultaneously visualize and treat solid tumours after X-ray/light excitation. After NIR illumination of the quenched UCNP, luminescence of the UCNPs was enhanced after the decomposition of MnO_2 into Mn^{2+} by acidic H₂O₂ in the tumours (Figure 18).

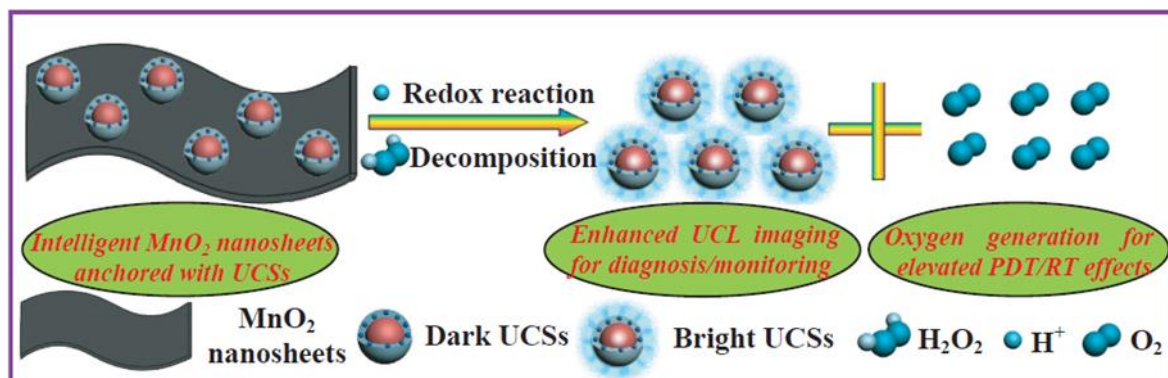


Figure 18. Schematic illustration of the decomposition of MnO₂ nanosheets arising from the redox reaction between UCSMs and acidic H₂O₂, which led to the enhanced UCL imaging for diagnosis/monitoring as well as the massive O₂ generation for improving the synergetic PDT/RT effects. Reprinted from [101] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2015.

Hypoxic murine breast cancer, hc-4T1 cells, were used. No killing could be observed after X-ray (5 Gy, 5 min) or light irradiation (NIR, 1.5 W·cm⁻², 5 min). After addition of the compound, cell death could be observed after PDT (UCSMs + NIR) and RT (UCSMs + RT) due to the O₂ generation. Moreover, after NIR and X-ray, the lowest cell viability would be detected showing the synergetic PDT/RT effects. The same effect was detected in vivo in 4T1 solid tumour (PDT: NIR, 2 W·cm⁻², 10 min and RT: 8 Gy, 5 min). In vivo PA imaging was performed to evaluate the vascular saturated O₂ by evaluating oxygenated and deoxygenated Hb. Injection of UCSMs increased the signal intensity of oxygenated/deoxygenated Hb but also enhanced O₂ by about 7%. Moreover, addition of UCSMs induced a down-expression of HIF-1α, due to the decreased hypoxia and increased oxygenation.

He et al. [102] proposed a glutathione-activatable and O₂/Mn²⁺-Evolving NPs for both PDT and gene-silencing therapy (GAOME N). This system consisted of the MnO₂ cellular nanocarrier (hMnO₂) loaded with catalase, Ce6, and foliar-tag DNAzyme. After endocytosis, hMnO₂ carriers were reduced by overexpressed GSH to Mn²⁺ ions, which led to a decrease of GSH level and the breakdown of GAOME NC. Then, the released catalases triggered the cleavage of endogenous H₂O₂ with the formation of O₂. The formation of O₂ and the consumption of GSH effectively increased the efficiency of PDT. In addition, the DNAzyme was released to silence the genes in the presence of self-generated Mn²⁺ ions as cofactors. Rational synergy of enhanced PDT and gene therapy led to a significant increase in the effectiveness of cancer treatment in vitro (MCF-7 cell line, 635 nm, 30 mW·cm⁻², 5 min) and in vivo (MCF-7 tumour-bearing mice, 635 nm, 100 mW·cm⁻², 5 min).

Another type of NPs was able to catalyse H₂O₂ to produce O₂ as well as being a contrast agent for both MRI and fluorescence imaging: carbon dot [103]. Jia et al. synthesized Mn-carbon dots (CDs) by a solvothermal approach with Mn(II) phthalocyanines (Mn-Pc) and cooperative self-assembly with DSPE-PEG. The hydrodynamic diameter of this Mn-CD assembly was around 162 nm. Mn(II) could be oxidized to MnO₂ that led to the catalytic decomposition of H₂O₂. Formation of O₂ was observed when Mn-CD was in acidic H₂O₂ solution whereas no O₂ was produced in the absence of H₂O₂ or Mn-CD. In acidic media, the O₂ bubbles were even more abundant. Mn-CD assembly totally disassembled in acidic H₂O₂ solution forming free Mn-CD. By ESR technique in solution and using SOSG probe in vitro in HeLa cells, they proved the formation of ¹O₂ even in hypoxic conditions. For PDT experiments (635 nm, 50 mW·cm⁻², 10 min) the cells were cultured in an acid medium (pH = 6.5) with addition of H₂O₂. 99% mortality rate could be observed whereas with CD without Mn, no PDT effect could be observed (no PS). In vivo PDT efficiency was evaluated in subcutaneous 4T1 tumour-bearing female nude mice (635 nm, 50 mW·cm⁻², 10 min). With Mn-CD the tumour was completely inhibited and no recurrence could be observed. All the mice survived over 60 days.

(Table 6)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 6. Summary of publication about the decomposition of H₂O₂ by MnO₂.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[76]	PDT	Mn (II) complex	H ₂ O ₂	BODIPY derivatives	500-600 nm, 15 min	¹ O ₂ , •OH and others ROS	HepG-2 cell line	
[77]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 661 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 661 nm, 5 mW·cm ⁻² , 1 h	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[78]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	DVDMS	In vitro: 630 nm, 75 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 630 nm, 300 mW·cm ⁻² , 8 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[79]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	ICG	In vitro: 808 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 10 min In vivo: 808 nm, 0.8 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	SCC-7 cell line	SCC7 tumour-bearing mice
[80]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	HMME	In vitro: 532 nm, 1.5 W·cm ⁻² , 2 min In vivo: 808 nm, 1.5 W·cm ⁻² , 1.5 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	S180 tumour model
[81]	PDT	manganese ferrite NPs	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 670 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 30 s In vivo: 670 nm, 0.8 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	U87 MG cell line	U87 tumour-bearing mice
[82]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	HPPH	In vitro: 10 mW·cm ⁻² , 1 min In vivo: 630 nm, 10 mW·cm ⁻² , 10 min		U87MG cell line	U87MG tumour-bearing mice
[83]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	MB	650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[84]	PDT	MnO ₂ nanosheets	H ₂ O ₂	Ce6	808 nm, 0.4 W·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	B16F10 cell line	No
[85]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 980 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 10 min In vivo: 660 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[86]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	CD	In vitro: 635 nm, 100 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 635 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	4T1-tumour-bearing mice

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 6. *Cont.*

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[87]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	No
[88]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	PEGylated p-n heterojunction nanosheets	980 nm, 0.4 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HeLa cells and HEK 293 cell lines	
[89]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Gold nano-cage (AuNC)	808 nm, 0.8 W·cm ⁻² , 3 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[90]	PDT	MnO NP	H ₂ O ₂	IR808	808 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[91]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 200 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	MB-49	Mice with orthotopic bladder cells
[92]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 638 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 638 nm, 5 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HeLa and HepG-2 cell lines	HeLa tumour-bearing mice
[93]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	Poly(cyclopentadithiophene -alt-benzothiadiazole) (PCPDTBT)	In vitro: 808 nm, 0.44 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: 808 nm, 0.30 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 cells	4T1 tumour-bearing mice
[94]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	NMOFs composed by TCPP and Fe ³⁺	660 nm, 50 mW·cm ⁻² , 15 min	·OH	4T1 cells	4T1 tumour-bearing mice
[95]	PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	FBP	In vitro: 660 nm, 150 mW·cm ⁻² , 3 min In vivo: 660 nm, 150 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[96]	PTT/PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Cu _{2-x} S	980 nm, 0.72 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	MCF-7 and A549 cell lines	B16 tumour-bearing mice
[97]	PTT/PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	Ce6	808 + 660 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 6. *Cont.*

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[98]	PTT/PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	IR780	785 nm PDT: 50 mW·cm ⁻² PTT/PDT: 0.3 to 1.0 W·cm ⁻²	¹ O ₂	HepG2 and 3T3 cell lines	HepG2 tumour-bearing mice
[99]	Chemo-PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 1 h	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[100]	Chemo-PDT	MnO ₂	H ₂ O ₂ and H ⁺	g-C ₃ N ₄	660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[101]	PDT	MnO ₂ nanosheets	H ₂ O ₂ , H ⁺	Silicon phthalocyanine dihydroxide (SPCD)	In vitro: NIR, 1.5 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: NIR, 2 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	hc-4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[102]	PDT and gene-silencing therapy	O ₂ /Mn ²⁺ -evolving nanocomposite	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 635 nm, 30 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 635 nm, 100 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[103]	PDT	Mn-Carbon dot	H ₂ O ₂	Mn-Pc	635 nm, 50 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	4T1 tumour-bearing mice

BODIPY: 4,4-difluoro-4-bora-3a,a-diaza-s-indacene; Ce6: Chlorin e6; DVDMS: sinoporphyrin sodium; ICG: Indocyanine green; HMME: hematoporphyrin monomethyl ether; HPPH: 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl)pyropheophorbide; MB: methylene blue; CD: carbon dot; NMOFs: nanoscale metal organic frameworks; TCPP: carboxyphenyl-porphyrin; FBP: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled peptide-functionalized black phosphorus; g-C₃N₄: Graphitic carbon nitrides; Mn-Pc: Mn(II) phthalocyanines.

3.1.2. Catalase

Catalase is a natural enzyme. Catalase has a specific catalytic behaviour and is able to decompose endogenous H_2O_2 to produce O_2 bubbles in the tumour tissue. It can then be used to regulate tumour hypoxia. However, it is not very stable in the presence of proteases in the blood circulation and systemic administration is compromised. In order to protect catalase, one solution can be its encapsulation or coupling to inorganic or organic NPs. That will be the aim of the next paragraph.

As far as we know, the first paper developing this strategy was written by Chen et al. [104]. They synthesized multifunctional NPs composed of catalase (encapsulation efficiency 13.1%) into a PLGA (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) NP with MB as a PS (encapsulation efficiency 19.51%), a black hole quencher-3 (BHQ-3) as an energy quencher of excited PS and a targeting unit (RGDFK) for $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting. The average hydrodynamic diameter of the HAOP NP was 205 nm measured by DLS. In the presence of H_2O_2 , formation of O_2 bubbles induced the destruction of the HAOP NPs shell and the release of MB. Using SOSG, they also demonstrated the formation of $^1\text{O}_2$ in the presence of H_2O_2 after 635 nm excitation ($100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) of the HAOP NPs, which was negligible for HAOP NPs without H_2O_2 and NPs without catalase. PDT efficacy was performed with light of 635 nm ($100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) on U87-MG cell line. After illumination, the apoptotic cells were 98.2% for cells treated with HAOP NPs and only 15.8 % for cells treated with HAOP NPs without catalase. A lysosome-associated pathway could be concluded using acridine orange as a marker of lysosome integrity. A commercially available O_2 probe ($[\text{Ru}(\text{dpp})_3\text{Cl}_2]$) allowed to detect intracellular O_2 which increased after incubation with HAOP NPs. The group treated with HAOP NPs without catalase showed high level of HIF-1 α whereas the group treated by HAOP NPs showed very weak level expression due to generated O_2 that overcame the hypoxia. In vivo PDT was realized on BALB/c mice bearing U87-MG tumour. As expected after HAOP NPs injection, the tumour growth was totally inhibited which was not the case for all the control groups. After release from the NPs, catalase could generate high level of O_2 .

Zhang et al. in 2016 [105] designed core-shell gold nanorod (APMECR@MB NC) (diameter of 75 nm) covered with phenyl mesoporous silica loaded with $[\text{Eu}(\text{THA})_3(\text{phen})]$ to trigger MB via luminescence resonance transfer, a catalase was covalently coupled to the surface via its amino group and conjugated to a targeting peptide (cRGD). Thanks to the overlap between emission spectrum of $[\text{Eu}(\text{THA})_3(\text{phen})]$ and absorption spectrum of MB, high energy transfer could happen upon 808 nm excitation between $[\text{Eu}(\text{THA})_3(\text{phen})]$ and MB estimated to be 96.1%. With DPBF, it was possible to conclude to the formation of $^1\text{O}_2$. APMECR@MB NC produced O_2 bubbles in the presence of H_2O_2 . Prostatic cancer cell lines (PC-3) were cultured in hypoxic incubator. Using DCFH-DA, $^1\text{O}_2$ could be detected after incubation with APMECR@MB NC whereas little or no $^1\text{O}_2$ could be detected after incubation with free MB or APME@MB without catalase. Pork tissues of various thickness were used and placed between the excitation source (808 nm, $1000 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 5 min) and the PC-3 cells. The authors proved that there was a synergistic PTT/PDT of PC-3 cells with the use of APMECR@MB.

Hu et al. [106] used a zeolite with mesoporous structure (531 nm) as a nanocarrier to immobilize catalase and MB (ZCM NPs). The catalase loaded in the zeolite was still efficient and kept 90% of enzymatic activity compared to free catalase. As expected, in closed tubes, it was possible to detect O_2 formation in the presence of ZCM NPs and H_2O_2 . In vitro detection of $^1\text{O}_2$ with SOSG revealed that the $^1\text{O}_2$ formation was 3.7 higher for the ZCM treated group than the group's zeolite or zeolite-MB. Formation of O_2 upon decomposition of in situ H_2O_2 thanks to the presence of the NPs was 4.8-fold higher than without NPs and allowed the release of MB. The PDT experiments were performed on athymic nude mice with SW1990 with laser at 635 nm, $50 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 10 min. They could observe a total inhibition of tumour growth at 18 days, which was not possible under other conditions (control, light only, ZCM only) (Figure 19).

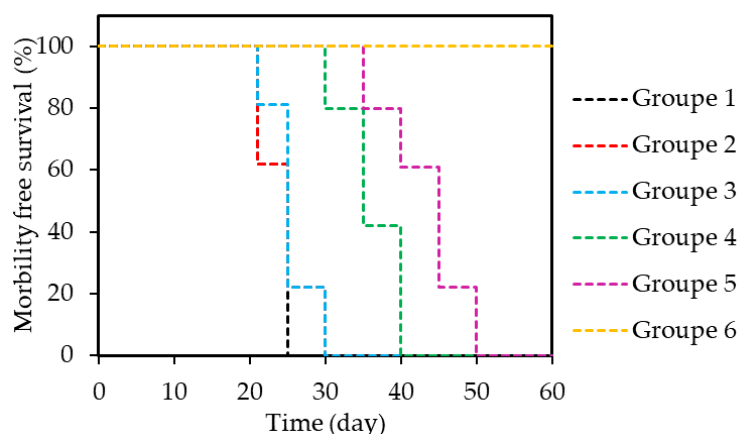


Figure 19. In vivo PDT in xenograft mice models with SW1990 PC. Survival rates of mice bearing SW1990 tumours after different treatments. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$. Group 1-PBS, Group 2-laser, Group 3-ZCM nanocapsule, Group 4-free MBlaser, Group 5-zeolite-MB-laser, and Group 6-ZCM nanocapsule-laser ($n = 5$ per group). Adapted from Hu et al. [106].

Cheng et al. [107] described catalase incorporated into a nanoscale metal-organic framework (NMOF) composed of a cancer cell membrane and a cytoskeleton-like porous zeolitic imidazole framework with AlPcS_4 (Al(III) phthalocyanine chloride tetrasulfonic acid) (10.6 %). The core-shell structure had size of about 110 nm and an outer lipid bilayer shell of 7.2 nm. After irradiation at 660 nm ($30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 1 min) of HeLa cells in presence of CAT-PS-ZIF@Mem, 75.6 % of the cells died whereas only 12.28% died when exposed to PS-ZIF@Mem without catalase. BALB/c-nu mice with HeLa cells were used as tumour model. HIF-1 α staining assay was used to evaluate the tumour hypoxic conditions. As expected the group treated with CAT-PS-ZIF@Mem presented low signal (low hypoxia) whereas the group treated with PS-ZIF@Mem without catalase presented high signal. For PDT experiments (660 nm, $220 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) the tumour growth was significantly inhibited showing that the CAT-PS-ZIF@Mem NPs have a high phototoxicity and that the formation of O_2 thanks to decomposition of H_2O_2 improved PDT efficiency.

Combination therapy is also possible. Chen et al. [108] described self-assembly of HSA in which they covalently coupled Ce6 (2.6 %) and encapsulated catalase and a chemotherapeutic drug the paclitaxel (PTX) (6.5 %). The NPs HSA-Ce6-Cat-PTX showed spherical structure of around 100 nm of diameter. They proved that HSA-Ce6-Cat-PTX NP produced more O_2 in the presence of H_2O_2 than HSA-Ce6-Cat may be due to some loss of activity of the catalase in HSA-Ce6-Cat. In HSA-Ce6-Cat-PTX NPs, the entrapped catalase maintained around 70% of its initial enzymatic activity. Moreover, the generation of $^1\text{O}_2$ by HSA-Ce6-Cat-PTX detected with SOSG was higher in the presence of H_2O_2 due to the additional O_2 supply. In vitro experiments were performed in 4T1 cells with 660 nm light ($5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min). Compared with PDT alone, chemotherapy alone or both, the combination treatment under light irradiation proved to be the best. After light illumination, the release of PTX into the cytoplasm improved the PDT effect. Under nitrogen atmosphere and addition of HSA-Ce-cat was not able to induce PDT effect whereas HSA-Ce6-Cat-PTX had a very good cancer cell killing efficiency. Female nude mice bearing 4T1 tumours were used for in vivo tests. To check the hypoxia into the tumour, (HIF)-1 α and pimonidazole were used. Both HSA-Ce6-Cat-PTX and HSA-Ce6-Cat showed significant decreased hypoxia signals compared to the control. After PDT (660 nm , $5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 60 min) the most effective tumour growth inhibition was observed for mice treated with HSA-Ce6-Cat-PTX compared to PDT alone or chemotherapy alone. To sum up, HSA-Ce6-Cat-PTX NPs accumulated into the tumour then decomposed, PTX was released, catalase decomposed endogenous H_2O_2 to produce O_2 , PDT induced the disruption of lysosomes and the PTX distributed into cytoplasm.

Yang et al. [109] also designed a very smart multifunctional NPs in which they encapsulated catalase in hollow silica NPs, with covalently coupled Ce6, covalently coupled CTPP (3-

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

carboxypropyl)triphenylphosphonium bromide) to target mitochondria and modified with an acidic pH responsive charge-convertible DPEG polymer (in acidic conditions, the DPEG polymer had positives charges that enhance tumour cell internalization) and programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody to promote the infiltration of T lymphocytes in metastasis. The obtained CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG had a size of around 100 nm with a shell thickness of 12 nm. Comparing O₂ formation in solution in the presence of H₂O₂, they could observe a rapid O₂ formation for CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG compared to the control BSA@S/Ce6-CTPP/DPEG. CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG kept 70% of its initial activity compared to free catalase in the presence of protease. Thanks to SOSG, they also observed the increase in ¹O₂ formation in solution with CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG excited at 660 nm in the presence of H₂O₂ compared to the absence of H₂O₂. 4T1 cells were used for in vitro tests (660 nm, 5 mW·cm⁻², 60 min). The cell killing efficiency was higher after incubation with CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG compared to BSA@S/Ce6-CTPP/DPEG. Confocal microscopy imaging revealed a specific intracellular targeting of mitochondria. Oxygenation level was increased with CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG compared to the control and the use of pimonidazole proved the decrease of hypoxia. PDT efficiency was also the best for CAT@S/Ce6-CTPP/DPEG (660 nm, 5 mW·cm⁻², 60 min). Very interestingly, thanks to the programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody, they showed that PDT plus anti-PD-L1 treatment was able to stop the progression of tumours that were not irradiated (1-2 cm away).

Shen et al. [110] synthesized pH-responsive aerobic NPs made of interaction of negatively charged catalase with positively charged chitosan. The resulting micelles (C&C) were used to encapsulate Ce6 and the size of the C&C-Ce6 was 68.5 nm. In acidic environment, the disassembly of the NPs led to the release of Ce6 (75% after 80 h) as well as the release of catalase. They showed that the formation of ¹O₂ after addition of H₂O₂ was higher in acidic media due to the release of both Ce6 and catalase in contact of H₂O₂. In vitro phototoxicity was evaluated in squamous cell carcinoma CAL-27 (650 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min). IC₅₀ was found to be 15.33 mg·mL⁻¹ for free Ce6 and 12.02 mg·mL⁻¹ for catalase + Ce6 mixture and only 4.03 mg·mL⁻¹ for C&C-Ce6. The percentage of apoptotic cell after PDT treatment for PBS, Ce6, chitosan + Ce6, catalase + Ce6 and C&C-Ce6 NPs were respectively 9.38%, 78.57%, 76.7%, 86.09% and 94.31% showing the important role of catalase that induced higher formation of ¹O₂. Female BALB/c mice bearing CAL-27 tumour (650 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min) were chosen for in vivo experiments. After 14 days after the treatment, the tumour volumes for PBS, Ce6, chitosan + Ce6, catalase + Ce6 and C&C-Ce6 NPs were respectively 1.87±0.14 cm³, 1.04±0.09 cm³, 0.99±0.15 cm³, 0.96±0.12 cm³ and 0.52±0.11 cm³, in good agreement with in vitro results. The lowest amount of hypoxia-inducible factor HIF-1 α was found as expected for the C&C-Ce6 NPs treated mice.

Zhao et al. [111] described graphitic-phase mesoporous carbon nitride nanosheet (mpg-C₃N₄, MCNs) in which hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) and catalase were wrapped into the 5 nm pores. HA was covalently coupled to the nanosheet. They checked that catalase still kept its activity when it was encapsulated. The best HMME loading was obtained with a feed rate HMME/MCNs of 3/1. A strong incorporation of HA@mpg-C₃N₄-HMME/CAT into murine melanoma B16-F10 cell line could be observed by confocal microscopy and the apoptosis rate was higher than all the others conditions ((HA@mpg-C₃N₄ + LED, HMME, HA@mpg-C₃N₄-HMME, HA@mpg-C₃N₄-HMME/CAT) after light illumination (LED, 3000 mW·cm⁻² for 2 min). In female C57 mice, the in vivo results were in good agreement with the in vitro ones, the authors could detect enhanced inhibition of tumour growth after injection (i.v.) of HA@mpg-C₃N₄-HMME/CAT, and light illumination compared to all the others groups. Using pimonidazole, reduced hypoxia could be detected in tumours from mice injected with HA@mpg-C₃N₄-HMME/CAT thanks to the formation of O₂ through the decomposition of H₂O₂ compared to mice injected with HA@mpg-C₃N₄-HMME and irradiated.

Another idea is to target proinflammatory-activated macrophages that are involved in chronic inflammation and also known to generate H₂O₂ to destroy undesirable invaders [112]. Lu et al. [113] developed selenium NPs (SeNPs) coated with a first layer of chitosan(CS)-RB-GSH, a thiolate catalase (CAT) covalently coupled to this first layer and a second layer of HA-ethylene diamine(EDA)-folic acid(FA). HA and FA were respectively CD44 and FR-b targeting agent over-expressed on cell surfaces of activated macrophages. The size of the NPs was 148.4±7.2 nm. ¹O₂ detection was performed by

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

electronic paramagnetic resonance (EPR) and using 9,10-diphenylanthracene (DPA) and was more important in the presence of H_2O_2 . The NPs presented high specificity for activated macrophages compared to normal macrophage. In RAW 264.7 (mouse macrophages) and under light illumination (green LED array, $40 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) a decrease of cell viability could be observed (43.3% cell viability) with SeNPs and 32.8% with CAT/SeNPs. Using CAT/SeNPs led to H_2O_2 depletion and inhibition of activation and proliferation of macrophages.

Ouyang et al. [114] proposed the use of thylakoid membrane which was able to catalyically decompose H_2O_2 to produce O_2 thanks to its membrane-related catalase [115]. With mechanical grinding, chloroplasts were extracted from spinach leaves. They underwent hypotonic lysis to release thylakoids. After extrusion, nanovesicle biomimetic nanothylakoids (NT) were obtained with a membrane thickness of around 9 nm and a size of around 50 nm. In hypoxic conditions and in the presence of H_2O_2 the dissolved O_2 concentration increased in solution and H_2O_2 was catalytically decomposed. Using SOSG, after 660 nm light excitation ($1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min), 7.8 more $^1\text{O}_2$ was produced within 5 min. NPs without catalase (LP) was synthesized as a control. In hypoxic environment, NPs produced larger amount of $^1\text{O}_2$ than LP. In 4T1 cancer cells, $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ quenched fluorescence in hypoxic environment proved the formation of O_2 and SOSG the formation of $^1\text{O}_2$. In vivo studies on tumour-bearing mice injected with NT or LP were performed. The expression of HIF1- α decreased after NT treatment which was not the case with LP injection, suggesting that tumour hypoxia disappeared after NT treatment. After PDT (660 nm, $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) the tumour growth was totally inhibited after injection of NT whereas with LPs, the tumour growth was only delayed within the first 4 days and even recurred later.

An original strategy was developed by Wang et al. [116]. Catalase could lose a part of its activity when encapsulated into NPs. In this paper, they used the acrylate onto the surface of the protein to enable free radical polymerization of a small PEG as the drafting moiety and *Meso*-tetra(*p*-hydroxyphenyl)porphine (THPP) as a cross linker. The CAT-THPP-PEG nanocapsules showed spherical morphology with a size of around 25 nm and 30 nm by DLS (Figure 20).

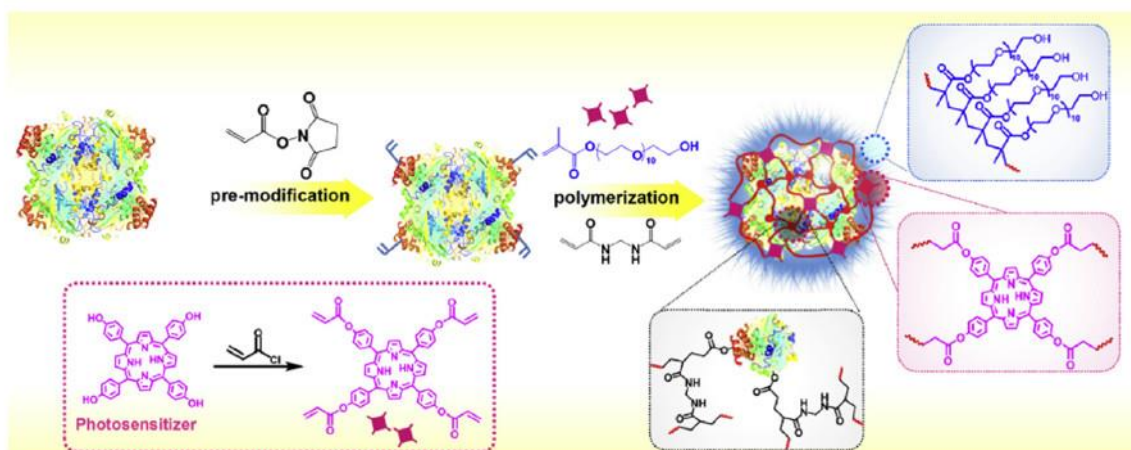


Figure 20. Schematic illustration of the preparation and structure of CAT-THPP-PEG. (b) Hydrodynamic diameters of catalase, BSA-THPP-PEG and CAT-THPP-PEG in water, PBS and FBS. Reprinted [116] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2018.

Using SOSG, after light illumination (660 nm , $5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min) they could detect in solution a high production of $^1\text{O}_2$ in the presence of H_2O_2 both in normoxic and hypoxic media due to the formation of extra O_2 . In vitro experiments in 4T1 cells were performed (660 nm , $5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min). As expected, cell killing increased under hypoxic conditions in presence of CAT-THPP-PEG and not in presence of the control BSA-THPP-PEG. Antipimonidazole antibody was used to detect hypoxia zones on tumour slices and revealed a large decrease of tumour hypoxia after CAT-THPP-PEG treatment compared to BSA-THPP-PEG treatment. In vivo studies in BALB/c mice bearing 4T1 tumours (660 nm , $5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$,

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

60 min) confirmed the in vitro studies with a large inhibitory effect of the tumour growth after CAT-THPP-PEG injection.

Another strategy is not to use natural enzyme but nanomaterial-based artificial enzyme. They are called nanozymes. The advantage is that the requirement of enzyme encapsulation is not needed neither the controllable release.

In 2017 Liu et al. [117] developed peroxidase amine-terminated PAPAM dendrimer-encapsulated gold NP with catalase like activity (AuNCs-NH₂) and coupled to Protoporphyrin IX (PpIX). They proved that the AuNCs-NH₂ NPs possessed catalase-like activity at pH 4.8-7.4 that could allow H₂O₂ consumption to form O₂ in cytoplasm (pH = 7.4), endosomes (pH = 5.5) or lysosomes (pH = 4) Evidence of O₂ formation was obtained in lung cancer H 460 cells. PDT efficiency (532 nm, 200 mW·cm⁻², 5 J per well) in hypoxic and normoxic conditions with AuNCs-NH₂ and PPIX showed that AuNCs-NH₂ overcome cancer cell hypoxia and induced a better PDT efficacy.

Yang et al. [118] in 2018 described a new kind of catalase-mimeting DNAzyme function NP with AN1411 DNA G-quadruplex/hemin (iron-containing porphyrin)-Ce6 coordinated to calcium ions and surrounding by poly(L-histidine)polyethylene glycol. AS1411/Ce6 (AC) and AS1411/hemin (AH) complexes had a size of 10 nm. Thanks to Ca²⁺ coordination, and poly(L-histidine)- polyethylene glycol (pHis-PEG) as stabilizing agent, the CACH-PEG NP was elaborated with a size of 70 nm. CACH and CACH-PEG NP were more efficient in producing ¹O₂ in the presence of H₂O₂ under 660 nm light irradiation than free Ce6. At acidic pH (5.5), the hydrodynamic size of CACH-PEG NP decreased to 12 nm showing the formation of smaller G-quadruplex. In 4T1 cells, the CACH-PEG NP internalized via endocytosis and Ce6 localized in the nuclei. PDT treatment (660 nm, 5 mW·cm⁻², 30 min) with or without H₂O₂ was conducted and as expected, the level of ¹O₂ produced was higher in the presence of H₂O₂. In BALB/c mice bearing 4T1 tumours, ^{99m}Tc CACH-PEG NPs showed tumour retention (5.4% of injected dose per gram of tissue (%ID/g)). Using pimonidazole proved that hypoxia was reduced in the mice that have been injected with PEG CACH-PEG NPs. After PDT (660 nm, 5 mW·cm⁻², 60 min) the best inhibition of tumour growth was observed for mice treated with CACH-PEG NP.

Ruan et al. [119] synthesized manganese-iron layered double oxide (MnFe-LDH) that possessed catalase-like activity and was loaded with MB. The particle size was about 200 nm and thickness of 2.8 nm with 2-3 layers. Under 808 nm laser with high irradiance (1000 mW·cm⁻²) for 10 min, the temperature increased rapidly. In HeLa cells incubated with MnFe-LDH, they detected the formation of O₂ by checking the quenched fluorescence of [Ru(dpp)₃]Cl₂. In solution using DPBF, ¹O₂ formation after 650 nm light excitation of MnFe-LDH/MB could be detected and addition of H₂O₂ in the solutions increased ¹O₂ formation. With SOSG in HeLa cells, the same results were obtained. The irradiation of HeLa cells (650 nm, 100 mW·cm⁻² for 10 min) with free MB and MnFe-LDH/MB led to respectively 15% and 40% of cell death. After irradiation at 808 nm, 51 % cell death was observed. After 650 nm and 808 nm irradiation, cells treated with MnFe-LDH/MB all died showing the synergistic effect of PTT and PDT. In female Kunming mice with murine cervical cancer cells (U14) (650 nm, 100 mW·cm⁻² for 15 min and 808 nm 1000 mW·cm⁻² 10 min) tumour growth inhibition was moderate after PTT or PDT, whereas the dual treatment induced an almost total destruction of the tumour. HIF-1 α was very low.

Two papers utilized Prussian Blue (PB) NPs that are known for their catalase-like activity and were FDA approved for clinical application [120,121]. In the first one, Yang et al. [121] described periodic mesoporous organosilica coated with PB NPs and loaded with Ce6. TESPTS (1,4-bis(triethoxysilyl)propane tetrasulfide) was used as organosilica molecule to coat PB NPs. The hydrodynamic diameter of PB@PMO-Ce6 NPs was about 170 nm. In solution, the mixing of PB@PMO-Ce6 and H₂O₂ resulted in the formation of O₂ bubbles showing the catalase-like activity of PB@PMO-Ce6 NPs. In U87MG cells, after irradiation at 660 nm (1000 mW·cm⁻², 5 min), total amount of formed ¹O₂ was higher for PB@PMO-Ce6 in the presence of H₂O₂ than with PB@PMO-Ce6 alone PDT in vivo was investigated in U87MG tumour-bearing mice by intratumoural injection of PB@PMO-Ce6 or Ce6 alone and 660 nm light (1000 mW·cm⁻², 2 min). Higher formation of ¹O₂ and apoptotic cells were observed after PB@PMO-Ce6 treatment than Ce6 treatment. Tumour growth presented a slower rate after Ce6 treatment and was totally broken after PB@PMO-Ce6 treatment.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The second paper concerns Wang's work [120] who used mesoporous silica to coat PB, coated by PEG and loaded by Zinc phthalocyanine (ZnPc) (Figure 21). The NPs with a PB core and SiO₂ shell surrounding by PEG had a hydrodynamic diameter of around 140 nm (PSP NCs). More than 50% H₂O₂ was degraded in the presence of PSP NCs within 1 hour at 25 °C with the apparition of O₂ bubble and increased at 43 °C. The concentration of O₂ formed was 1.95 time higher at 43 °C than at 25 °C.

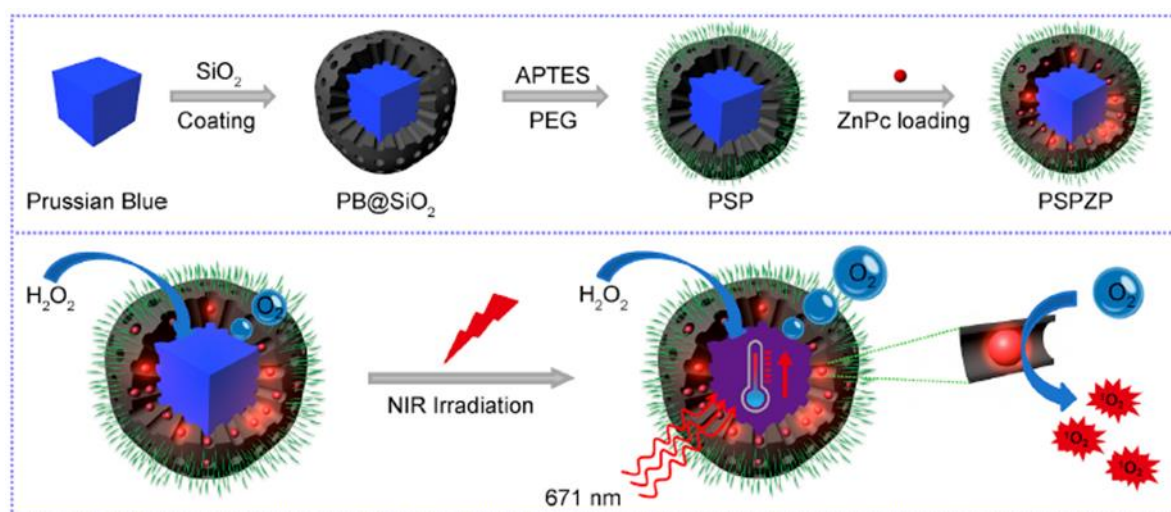


Figure 21. Schematic of the synthetic procedure and photo-enhanced therapy of the PSPZP NCs. Reprinted from [120] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2018.

For each PSP particle, it was possible to load 18,800 ZnPc (PSPZP). Using DPBF in hypoxic condition a significant increase of ¹O₂ formation was observed after addition of H₂O₂. 4T1 cells were incubated under hypoxia conditions with [Ru(dpp)₃]Cl₂. After being treated with PSP NCs, the decrease of the fluorescence of [Ru(dpp)₃]Cl₂ proved the formation of O₂. HeLa, A549 (Human lung cancer cells) and 4T1 cells were selected for PDT experiments (671 nm, 400 mW·cm⁻² for 5 min). After incubation with PSPZP, the cytotoxicity was higher in normoxic than hypoxic conditions. Addition of H₂O₂ in hydroxic condition increased cytotoxicity that was even enhanced at 43 °C. In vivo experiments were performed in 4T1 tumour-bearing mice (671 nm, 400 mW·cm⁻², 5 min) after intravenous injection of PSPZP. The growth of the tumour stopped which was not the case for PSPZP without light, light, ZnPc + light, PSP + light. The reduced pimonidazole fluorescence in tumour slices extracted from mice treated with PSPZP showed that the tumour hypoxia disappeared. The drawbacks were the low accumulation and the lack of targeting unit.

Two papers have described the use of Fe(III) for its catalase like-activity. Ma et al. showed that Fe(III) could have catalase-like activity and could decompose H₂O₂ to create O₂ [122]. They elaborated Fe(III) doped Graphitic-phase C₃N₄ nanosheet covalently coupled to a mitochondria-targeting moiety—(4-carboxybutyl)triphenylphosphonium bromide (TPP)—and loaded with MB on the surface. The C₃N₄-Fe-TPP NF/MB NPs in water had a size of 110 nm that moved to 116 nm after 5 days. Fluorescence of [Ru(dpp)₃]Cl₂ after addition of H₂O₂ to C₃N₄-Fe-TPP NF/MB NPs solution suggested an increase of local O₂ concentration. With DPBF, formation of ¹O₂ was proven under 650 nm light illumination (100 mW·cm⁻²) and in vivo in HeLa cells (650 nm, 100 mW·cm⁻², 15 min) with DCHF-DA. PDT experiments in vitro in HeLa cells showed a slight decrease of cell viability with free MB and C₃N₄-NS/MB NPs without Fe(III) whereas a strong decrease of cell viability was observed after incubation with C₃N₄-Fe NF/MB NPs and C₃N₄-Fe-TPP NF/MB NPs. The in vivo efficiency was determined in U14 cervical cancer in Kunming mice (650 nm, 100 mW·cm⁻², 15 min each day, 2 days interval). C₃N₄-Fe-TPP NF/MB NPs proved to be very efficient and led to almost complete elimination of the tumour with no regrowth during the 15 days of the experiment. HIF-1α indicated a higher O₂ concentration in the group treated with C₃N₄-Fe NF/MB and C₃N₄-Fe-TPP NF/MB NPs.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Few months later, Zhen et al. [123] also used the catalase-like activity of Fe(III) and developed BSA that coordinated with Fe³⁺ through different active groups such as carboxyl, thiol amino. MB was then added and loaded in BSA through amide bond and/or hydrophobic interaction. The monodispersed MB-BSA-Fe(III)NP had a hydrodynamic size of 28.21 nm. In solution, the production of O₂ was measured in the presence of MB-BSA-Fe(III)NP and H₂O₂ suggesting that MB-BSA-Fe(III) possessed catalase-like activity. In solution under light illumination (650 nm, 100 mW·cm⁻² 10 min) the absorbance of DPBF (proportional to ¹O₂ formation) decreased to 79% with H₂O₂ and only 60% without H₂O₂. In HeLa cells, the fluorescence of Ru(dpp)₃Cl₂ disappeared after 24 h in cells treated with MB-BSA-Fe(III)NP suggesting that NPs could overcome the hypoxia. After PDT (650 nm, 100 mW·cm⁻², 15 min) viability was 83.3% after MB incorporation whereas a high decrease of 33.7% was observed with MB-BSA-Fe(III)NP.

Metal-organic frameworks (MOFs) are self-assembled molecules that have nanometric size and present excellent properties such as high surface-to-volume ratio, large pore size and pore windows. Two papers in 2018 used MOFs. Hu et al. [124] used iron(III) carboxylate MOF (MIL-100 (Fe); MIL stands for Materials Institutes Lavoisier) as a carrier for three kinds of PS: Ce6, 2-((4'-(2,2-bis(4-methoxyphenyl)-1-phenylvinyl)-1,1'-biphenyl-4-yl)(phenyl)methylene)malonitrile (TPEDC) and (E)-2-(4-(2,2-bis(4-methoxyphenyl)-1-phenylvinyl)styryl)-3-cyano-5,5-dimethyl- furan- 2(5H)-ylidene)malonitrile (TPETCF). To improve the water dispersibility, they coated the NPs with a nonionic amphiphilic block copolymer F127. The average hydrodynamic size was 140 nm (size distribution 90-400 nm). In solution and in the presence of H₂O₂, a catalytic reaction occurred thanks to Fe(III) leading to the release of free Fe(III) that will decomposed rapidly H₂O₂ to produce O₂. 9,10-Diphenylanthracenediyl-bis(methylene) dimalonic acid (ABDA) was used to prove that PSs did not produce ¹O₂ when trapped into the MOF, but were still able to produce ¹O₂ when they escaped. F127-TPETCF@MIL-100 was chosen to study the activatable PDT effect in vitro on 4T1 cells. By confocal microscopy with DCHF-DA in the presence of H₂O₂ the photosensitization capability of F127-TPETCF@MIL-100 was demonstrated. After light excitation (white light excitation, 50 mW·cm⁻², 5 min) in the presence of H₂O₂ cell death was observed, which was not the case without H₂O₂. If TPETCF could induce nonspecifically apoptosis in both normal and tumour cells, F127-TPETCF@MIL-100 specifically induced cell death in the tumour. In vivo experiments in subcutaneous 4T1 tumour-bearing mice both TPETCF and F127-TPETCF@MIL-100 injected into the tumour could inhibit tumour growth after light illumination (50 mW·cm⁻², 10 min) but the tumour treated with F127-TPETCF@MIL-100 had a slower growing rate. The hydroxyprobe-1 kit was used to show that the hypoxia was weaker in the tumour treated with F127-TPETCF@MIL-100. After intravenous injection, F127-TPETCF@MIL-100 localized mainly in liver and tumour and could still inhibit the tumour growth.

The same year, Lan et al. [125] proposed also a nanoscale MOF elaborated from Fe₃O clusters and 5,10,15,20-tetra(p-benzoato)porphyrin (TBP). The Fe-TBP had a length of 100 nm and was able to catalyze the decomposition of H₂O₂ to produce O₂. Incubation in CT26 cells under low O₂ conditions led to the accumulation of HIF-1 α , but when heated with Fe-TBP, the signal decreased significantly showing the decrease of hypoxia thanks to the production of O₂. After irradiation (650 nm, 20 mW·cm⁻², 15 min) under hypoxic conditions and using SOSG in solution, they proved that after addition of H₂O₂ Fe-TBP was able to produce ¹O₂ similar than the production in normoxic conditions whereas the control H₄TBP or Hf-TBP without Fe(III) generated only traces of ¹O₂. IC₅₀ in normoxic conditions were 2.60 \pm 1.59, 11.33 \pm 6.75, 25.13 \pm 6.83 mM for Fe-TBP, Hf-TBP and H₄TBP. In hypoxic conditions, Fe-TBP presented an IC₅₀ of 3.10 \pm 1.66 whereas H₄TBP or Hf-TBP were totally ineffective (IC₅₀ superior to 50 mM). In vivo experiments were performed in mouse model of CT26 colorectal adenocarcinoma (650 nm, 100 mW·cm⁻², 7.5 min) and PDT was effective in both normoxic and hypoxic conditions. Interestingly, they studied the effect of PDT in immunotherapy. A bilateral model of CT26 tumours was built.

One of the tumours was treated with Fe-TBP and illuminated and the other tumour did not receive any treatment. Then an α -PD-L1 treatment was performed. Both tumours decreased (more than 90%)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

with a very low dose of Fe-TBP (0.2 mM and 45 J·cm⁻²). They also demonstrated that PDT together with α -PD-L1 treatment induced formation of cytotoxic T cells that could infiltrate in distant tumour.

A very sophisticated system has been developed by Liu et al. [126]. They designed black phosphorus nanosheets (BPNSa) on which they coupled FA by non-covalent interaction to target FA receptor as well as a DNA duplex made of Cy5-aptamer-heme (H1) and 3'-heme-labelled oligo-nucleotide (H2) (Cy5-dHeme-BPNS-FA). The idea was that after endocytosis the strong affinity between intracellular ATP and the aptamer would induce the release of H1 and H2 that would be able to convert H₂O₂ to O₂. In solution in presence of Cy5-dHeme-BPNS-FA and ATP, the fluorescence of Cy5 increased proving the release of Cy5 labelled H1. When H₂O₂ was added, the formation of O₂ was detected. Using DPBF, Cy5-dHeme-BPNS-FA produced ¹O₂ mainly due to BPNS. In normal air atmosphere, ¹O₂ formation of Cy5-dHeme-BPNS-Fa in presence of ATP was 44.6 % higher than without ATP. Under hypoxic conditions, after 20 min irradiation (660 nm, 150 mW·cm⁻²) in vitro, ¹O₂ formation was even 16.0- and 6.8-fold higher with and without ATP. In HeLa cells, [Ru(dpp)₃]Cl₂ was used to show that activated heme was essential in O₂ formation in hydroxic and normoxic HeLa cells. Thanks to SOSG, it was also possible to demonstrate in vitro production of ¹O₂. Cell death after PDT (660 nm, 150 mW·cm⁻², 3 min) in normoxic conditions treated with Cy5-BPNS-FA was 35.8 % whereas it was 79.1 % for cells treated with Cy5-dHeme-BPNS-FA due to higher concentration of O₂ after decomposition of H₂O₂. In vivo in subcutaneous 4T1 tumour-bearing female nude mice (660 nm, 150 mW·cm⁻², 10 min), the tumour volume decreased to 6% for the group treatment with Cy5-BPNS-FA and 45% for the group treatment with Cy5-dHeme-BPNS-FA in good agreement with in vitro experiments (Table 7).

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 7. Summary of publications about the decomposition of H₂O₂ by catalase.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[104]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	MB	635 nm, 100 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HaCaT, U87-MG, MCF-7 and SKOV-3 cell lines	U87-MG tumour bearing mice
[105]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	MB	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	PC-3 and bMSCs cell lines	No
[106]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	MB	In vivo: 635 nm, 50 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	SW1990 and 293 T cell lines	SW1990 tumour-bearing mice
[107]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	AlPcS ₄	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 1 min In vivo: 660 nm, 220 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HeLa, COS7, SCC-7 and 4T1 cell lines	HeLa tumour-bearing mice
[108]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[109]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	Ce6	660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[110]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min, 25 J·cm ⁻² In vivo: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	CAL-27, HeLa, L929 cell lines	CAL-27 tumour-bearing mice
[111]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	HMME	LED, 3000 mW·cm ⁻² for 2 min	¹ O ₂	B16-F10 cell line	Female C57 mice
[113]	PDT	Thiolate catalase (CAT)	H ₂ O ₂	RB	Green LED array, 40 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	RAW 264.7 cell line	No
[114]	PDT	Biomimetic nanothylakoid	H ₂ O ₂	chlorophyll	660 nm 1 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[116]	PDT	Catalase	H ₂ O ₂	THPP	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 60 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[117]	PDT/lung cancer	AuNCs-NH ₂	H ₂ O ₂	PpIX	532 nm, 200 mW·cm ⁻² , 5 J per well	¹ O ₂	H 460 cell line	No
[118]	PDT	G-quadruplex-hemin DNAzyme	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 60 min		4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[119]	PDT	MnFe-LDH	H ₂ O ₂	MB	In vitro: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 7. Cont.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[120]	PDT	PB NPs	H ₂ O ₂	ZnPc	671 nm, 400 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HeLa, A549 and 4T1 cell lines	4T1 tumour-bearing mice
[121]	PDT	PB NPs	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 660 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: 660 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 2 min	¹ O ₂	U87MG and HUVEC cell lines	U87MG tumour-bearing mice
[122]	PDT	Fe(III)	H ₂ O ₂	MB	650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[123]	PDT	Fe(III)	H ₂ O ₂	MB	In vitro: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂	HeLa cell line	-
[124]	PDT	Fe(III)	H ₂ O ₂	Ce6, TPEDC, TPETCF	In vitro: white light excitation, 50 mW·cm ⁻² 5 min In vivo: white light excitation, 50 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[125]	Immuno-PDT	Fe (III)	H ₂ O ₂	TBP	In vitro: 650 nm, 20 mW·cm ⁻² , 15 min In vivo: 650 nm, 100 mW·cm ⁻² , 7.5 min	¹ O ₂	CT26 cell line	CT26 tumour-bearing mice
[126]	PDT	Cy5- aptamer-heme (H1) and 3'-heme labelled oligonucleotide (H2)	H ₂ O ₂	BPNS	In vitro: 660 nm, 150 mW·cm ⁻² , 3 min In vivo: 660 nm, 150 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	4T1 tumour-bearing mice

MB: Methylene Blue; AlPcS₄: Al(III) phthalocyanine chloride tetrasulfonic acid; Ce6: Chlorin e6; HMME: Hematoporphyrin monomethyl ether; RB: Rose Bengal; THPP: meso-5, 10, 15, 20-tetra(4-hydroxyphenyl) porphyrin; AuNCs-NH₂: peroxidase amine-terminated PAPAM dendrimer-encapsulated gold NP; PPIX: Protoporphyrin IX; MnFe-LDH: Manganese-iron layered double oxide; PB NPs: Prussian Blue nanoparticles; ZnPc: Zinc phthalocyanine; TPEDC: 2-((4'-(2,2-bis(4-methoxyphenyl)-1-phenylvinyl)-1,1'-biphenyl-4-yl)(phenyl)methylene)malonitrile; TPETCF: (*E*)-2-(4-(4-(2,2-bis(4-methoxyphenyl)-1-phenylvinyl) styryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5*H*)-ylidene)malonitrile; TBP: 5,10,15,20-tetra(*p*-benzoato)porphyrin. BPNS: black phosphorus nanosheet.

3.1.3. Platinum (Pt) NPs

Pt NPs are other types of artificial catalases. They can also be used as catalysts and are well-known to possess good peroxidase-like properties. They can indeed catalyze in situ the intracellular H_2O_2 to produce large amounts of O_2 thanks to the decomposition of H_2O_2 . In the literature, we found five publications describing the use of Pt NPs all in 2018 and four of them reported in vivo experiments. In all of them, Pt NPs are associated with others NPs. Pt NP converts H_2O_2 into O_2 .

Zhang et al. [127] developed Pt NPs (approximately 2 nm) in a metal-organic framework (average diameter of about 90 nm) coated with PEG. The dynamic diameter of the NPs was 160.1 nm. They chose the TCPP as the PS. Thanks to dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and DPBF they proved that the NPs could efficiently produce $^1\text{O}_2$ in hypoxic conditions in the presence of H_2O_2 . After intravenous injection in hepatoma 22 (H22) tumour-bearing mice after light illumination (638 nm, 1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min), the tumour growth of the group treated with the NPs and light was significantly different from the groups with only light and only NPs (around six times less).

Wei et al. [128] decided to develop 2D Pd-based nanoplates as a carrier. They coupled SH-PEG-COOH to improve the stability and coupled Ce6 onto the carboxylic acid group (10 wt%). The resulting Pd@Pt-PEG-Ce6 nanoplates have a hydrodynamic size of about 80 nm. Using DPBF, they proved that Pd@Pt-PEG-Ce6 and Ce6 produced the same amount of $^1\text{O}_2$. Adding H_2O_2 , only Pd@Pt-PEG-Ce6 was able to increase the production of $^1\text{O}_2$. In vitro experiments in A4T1 cell lines, in N_2 atmosphere addition of exogenous H_2O_2 under 660 nm laser irradiation (5 min, 150 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) produced a diminution of PDT effect with Ce6 but not with Pd@Pt-PEG-Ce6 compared that in air atmosphere, proving the production of O_2 . Under 808 nm irradiation (0.5 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min), Pd@Pt-PEG-Ce6 exhibited a moderate photothermal effect, which could lead to an enhancement of PDT treatment. In vivo studies in Balb/v mice with 4T1 tumour showed that Pd@Pt-PEG-Ce6 under both 660 nm and 808 nm illumination led to the best tumour growth inhibition compared to the others groups (Ce6 alone, light alone, only Pd@Pt-PEG-Ce6).

Wang et al. [129] synthesized hybrid core-shell NPs composed of a polydopamine (pda) core, Pt NP interlayer, zirconium-TCPP (PCN) porphyrin shell and a coordination between Zr_6 and the carboxyl group of folic acid. The size of Pda-Pt@PCN was 250 nm with a thickness of the shell of about 30 nm. With ADPA and Pda-Pt@PCN, in solution saturated with N_2 , formation of $^1\text{O}_2$ was higher after addition of H_2O_2 revealing the formation of O_2 via the decomposition of H_2O_2 . The incorporation of Pda-Pt@PCN-FA into FAR over-expressed CT26 cells was higher than that into FAR-negative COS7 cell line demonstrating the FA targeting effect. PDT efficacy was investigated under both normoxia and hypoxia conditions. In normoxic conditions, no difference could be observed between Pda-Pt@PCN-FA and Pda@PCN-FA whereas in hypoxia conditions, Pda@PCN-FA presented higher phototoxicity (nearly 80%). Using a wound-healing test, they also proved that cells treated with Pda-Pt@PCN-FA were less capable of moving compared with cells without treatment demonstrating the advantage of these NPs for the metastatic process. In a CT26-cell-bearing mice model tumour hypoxia had been improved (hypoxia-inducible factors staining assay), 660 nm illumination (220 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) induced a significant tumour suppression effect as well as an inhibition of tumour metastasis.

Cai et al. [130] designed 3D-dendritic mesoporous silica NP (3D-dentritic MSNs DMSNs) in which were incorporated Pt NPs. They coupled NH_2 -PEG- NH_2 to improve the biocompatibility, triphenylphosphine (TPP) to target mitochondria and loaded Ce6 as a PS (13% (w/w)). Pt-DMSNs-TPP/Ce6 had an average diameter of around 113.5 nm. An important increase of $^1\text{O}_2$ production by Pt-DMSNs-TPP/Ce6 was noticed with addition of H_2O_2 using ADBA. A549 cells treated with free Ce6, DMSNs/Ce6, Pt-DMSNs/Ce6 and Pt-DMSNs-TPP/Ce6. As expecting, mitochondria-triggered apoptosis and therapeutic PDT (660 nm, 50 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) in vivo efficacy was higher in the cells treated with Pt-DMSNs-TPP/Ce6 than the others conditions.

Ouyang et al. [131] used 2D semiconductor NPs namely BPNS with an average diameter of 200 nm on which Pt NP of 4.2 nm were uniformly placed. BP nanosheet did not induce decomposition of H_2O_2 whereas Pt@BP nanohydrids did. Formation of $^1\text{O}_2$ was observed thanks to DPBF whose absorption decreased less than 10% under NIR illumination for Pt@BP but by 35% after adding H_2O_2 . In vitro

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

antitumour studies were performed on 4T1 cells; after incorporation and light illumination (660 nm, 1 W·cm⁻², 10 min), the cell viability decreased of 26% with BP and 65 % with Pt@BP, with a dysfunction of mitochondria. In vivo in mice bearing subcutaneous 4T1 tumours, PDT treatment led to total regression of the tumour (Table 8).

3.1.4. Others

In order to produce O₂ inside the hypoxic zones of the tumours, three others strategies have been developed. Three studies focused on the decomposition of H₂O₂ but not endogenous H₂O₂ of tumour cells. In these strategies, the authors encapsulated H₂O₂ in nanostructures.

Li et al. [132] designed light-triggered polymeric vesicle coupled to Ce6 and encapsulating H₂O₂. Briefly, PAMAM dendrimer coupled to Ce6/cypate and H₂O₂ were co-assembled with a block copolymer that could be cleaved upon ROS production into polymeric vesicles (HC@P1-vesicle) (155.2±21.5 nm). Upon 808 nm excitation, H₂O₂ was decomposed in O₂. Upon 660 nm illumination, excitation of Ce6 induced the formation of ¹O₂ that disrupted the copolymer and destabilized the vesicle leading to the release of Ce6/cypate into the tumour. One cycle of 660/805 nm illumination induced the fast release of H₂O₂ due to cleavage of the copolymer and disruption of the vesicle. 808 nm excitation of HC@P1-vesicle did not lead to high formation of ¹O₂ but 660 nm excitation did. One cycle of 660/805 nm illumination induced an increased amount of ¹O₂. In human pancreatic BxPC-3 cancer cells, the cellular uptake of CC-PAPAM was five times higher with light irradiation of HC@P1-vesicle than without light. A higher PDT effect (805 nm, 1000 mW·cm⁻², 3 min - 660 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min) was observed for HC@P1-vesicle than for the same vesicles without H₂O₂. In vivo experiments in BxPC-3 tumour-bearing mice (805 nm, 1000 mW·cm⁻², 3 min - 660 nm, 100 mW·cm⁻², 10 min) showed that HC@P1-vesicle preferably accumulated into the tumour compared to CC-PAMAM. After one cycle of 660/805 nm illumination, CC-PAPAM released from the vesicle deeply distributed into the tumour.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 8. Summary of publications about H₂O₂ decomposition by Pt NPs.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[127]	PDT	Pt NP	H ₂ O ₂	TCPP	In vitro: 638 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 10 min In vivo: 638 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 8 min	¹ O ₂	HeLa and 4T1 cell lines	H22 tumour-bearing mice
[128]	PDT	Pt NP	H ₂ O ₂	Ce6	660 nm, 150 mW·cm ⁻² , 5 min + 808 nm, 500 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[129]	PDT	Pt NP	H ₂ O ₂	zirconium-TCPP	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 3 min In vivo: 660 nm, 200 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	CT26 cell line	CT26 tumour-bearing mice
[130]	PDT	Pt NP	H ₂ O ₂	Ce6	660 nm, 50 mW·cm ⁻² ; 5 min	¹ O ₂	A549 cell line	No
[131]	PDT	Pt NP	H ₂ O ₂	BPNS	660 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

TCPP: carboxyphenylporphyrin; BPNS: black phosphorus nanosheet.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Thanks to pimonidazole, after treatment with HC@P1-vesicle and one cycle of 660/805 nm illumination it was proved that the hypoxia decreased in the tumour. Multiple cycles of 660/805 nm illumination were then performed. After five cycles, *in vivo*, tumour treated with HC@P1-vesicle had less than 20% hypoxic areas compared to more than 70% for tumour treated with only 660 nm light. A total ablation of hypoxic hypopermeable pancreatic tumour was observed.

Wang et al. [133] developed NPs (PLGA-FA/IR780-H₂O₂ NPs) composed of a core-shell (poly(lactico-glycolic acid) (PLGA) and H₂O₂/poly(vinylpyrrolidone) complex (O₂ source)) covalently conjugating folic acid (targeting) and entrapping in the shell IR780 diiodide (PTT/PDT agent) (Figure 22). The authors proved the photothermal effect of these NPs as well as their ability to produce ROS to kill cancer cells *in vitro* in HepG2 cell line after laser irradiation (808 nm, 0.5 W·cm⁻², 60 s) with a decrease of cell viability of 80%. The photothermal effect conducted to an efficient release of H₂O₂ to increase the O₂ concentration. These observations were confirmed *in vivo* in Hep-G2 tumour-bearing mice with a significant inhibition of tumour growth.

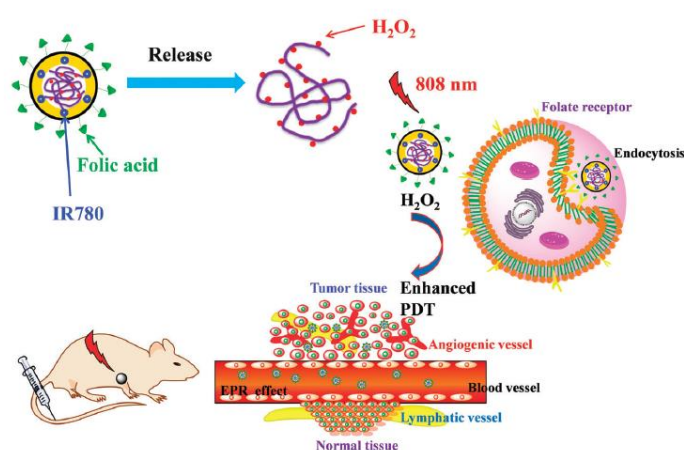


Figure 22. Illustrations of O₂ self-enriched PLGA-FA/IR780-H₂O₂ NPs and their application for PTT and enhanced PDT against tumours. Republished from [133] with permission of the Royal Society of Chemistry, Copyright 2018.

In 2011, Manifold et al. [134] described a preliminary study on the influence of topical application of H₂O₂ cream on the potential photodynamic reaction (PDR) by 5-ALA methyl ester (MAL) on skin diseases. In this study, the aim was to investigate the possible side effects of H₂O₂ cream (Crystacide®), of MAL cream under different pO₂. Forty healthy volunteers participated in the protocol and each of them wore a patch on the right forearm. The patch was constituted of four sites; i.e. a) normal skin without any treatment, b) a positive control with MAL cream and further illumination after removal of excess of PS, c) same as b) in hypoxic condition, and d) same of b) with H₂O₂ cream. Another patch on the left forearm was devoted to control the different factors taken alone (light, MAL cream, Crystacide®). An evaluation by the naked eye was carried out to highlight the presence of erythema or oedema on the cutaneous sites. Laser Doppler perfusion imaging quantified the change in cutaneous blood flow *in vivo*. The first results indicated a great variability in terms of appearance of erythema as a function of time and 25% of volunteers showed strong response. Regarding oedema, this side effect was much less problematic. In summary, further investigation should be necessary before topical administration of Crystacide® for cutaneous PDR applications.

Two others studies have described two other systems to decompose endogenous H₂O₂. Zhen et al. synthesized a BiOI/BiOIO₃ nanocomposite (BB NCs) (108 nm) [135]. The photogenerated electrons (e⁻) under 650 nm light irradiation reacted with H₂O₂ to produce •OH and slit H₂O to produce O₂ then ¹O₂ both in hypoxic and normoxic conditions. •OH was detected thanks to hydroxyphenyl fluorescein probe (HPF) after 650 nm illumination and its concentration was even higher after addition of H₂O₂. ¹O₂ was detected thanks to SOSG probe even in hypoxic conditions. In HeLa cells, the use of SOSG probe also proved the formation of ¹O₂ even in hypoxic cells. DCHF-DA presented the same fluorescence in

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

normoxic or hypoxic cells showing the equal amount of ROS production. Fluorescence of $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]\text{Cl}_2$ was quenched even in hypoxic conditions in the presence of irradiated BB NCs. In vivo (650 nm, 500 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 15 min), the tumour in the BB NCs/laser group was totally destroyed and a low level of HIF-1 α was detected.

Wu et al. [136] synthesized an UCNP containing Ce6 and Ferric Hydroxide $\text{Fe}(\text{OH})_3$, biocompatible and acting as a synergetic agent between PDT and chemotherapy. When irradiated at 808 nm in presence of H_2O_2 , these UCNP (176 nm diameter) excited Ce6 which generated $^1\text{O}_2$, using O_2 produced by the Fenton-like reaction of $\text{Fe}(\text{OH})_3$ with H_2O_2 . In vitro, 4T1 and 293T human embryonic kidney cells viability was tested in normoxia or hypoxia, in presence or in absence of H_2O_2 with or without irradiation (808 nm, 1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min). They clearly showed the amplified effect of using these UCNP in presence of H_2O_2 and irradiation (Figure 23).

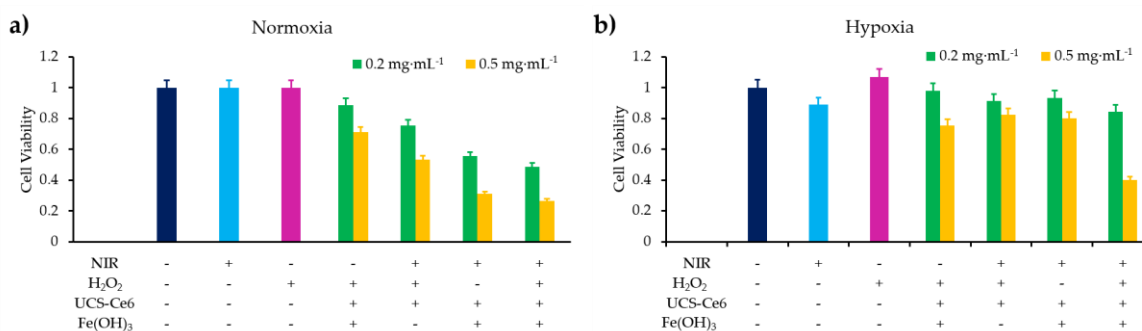


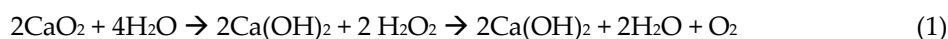
Figure 23. a) and b) CCK-8 assay of 4T1 cells after incubating in a normoxia/hypoxia environment and treated by different methods. Adapted from Wu et al. [136]

In vivo, the 4T1 mouse tumour model was irradiated at 808 nm (1 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min) and 14 days after treatment with UCNP, not only the growth of tumour dramatically decreased, but also the tumour nearly disappeared (Table 9).

3.2. Water Splitting

Until 2010, water splitting was essentially studied for H_2 production as it appears a potentiate solution to the energy and environmental issues. Numerous active photocatalysts such as metaloxides, sulfides, nitrides, nanocomposites, and doped materials have been proposed for the generation of H_2 (and concomitant O_2 generation) [137]. However, it is well known that nature (and especially plants) is able to use light to catalyse the synthesis of O_2 from H_2O in chloroplasts with high yields. Inspired by this and, as water is the most abundant element in the human body, scientists have thought of using light-driven water splitting for in situ O_2 formation at the tumour site and thus decrease hypoxia. For this, some teams have developed various O_2 generators based on oxides (CaO , ZnO , Bi_2WO_6 ...), carbon nitride NPs and other materials such as nanorods or nanosheets.

CaO_2 is an O_2 -generating material that can be used to suppress hypoxia. It has many advantages such as highly compatible, efficient O_2 generator and rapidly metabolized in cells. When it reacts with water or weak acid, it can release O_2 and can alleviate tumour hypoxia:



Hu et al. [138] developed an « optical battery » based on UCNP associated with RB by electrostatic interactions in biocompatible PDMS (polydimethylsiloxane) which was able to produce $^1\text{O}_2$ after NIR irradiation (980 nm, 2 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 s). The persistent luminescence of the battery allowed to irradiate during a short time (5 s) and to induce a PDT effect without continuous irradiation. This avoided photothermal effects.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 9. Summary of publications about H₂O₂ decomposition by other ways.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[132]	PDT	Light-triggered polymeric vesicle coupled to Ce6 and encapsulating H ₂ O ₂ .	H ₂ O ₂	Ce6	805 nm, 1000 mW·cm ⁻² , 3 min - 660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	BxPC-3 cell line	BxPC-3 tumour-bearing mice
[133]	PTT/PDT	Hydrophilic H ₂ O ₂ /poly(vinylpyrrolidone) complex	H ₂ O ₂	IR780	808 nm, 0.5 W·cm ⁻² , 3 min	ROS	HepG2 cell line	HepG2 tumour-bearing mice
[134]	PDT	Cream	H ₂ O ₂	5-ALA methyl ester (MAL, Metvix®)	570-670 nm, 105 mW·cm ⁻² , 16 min, <i>in vivo</i>	nd	Eritrema cell line	40 healthy volunteers
[135]	PDT	BiOI/BiOI ₃ nanocomposite	H ₂ O ₂	BiOI/BiOI ₃	650 nm, 500 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂ and •OH	HeLa cell line	4T1 tumour-bearing mice
[136]	Chemo-PDT	Fe(OH)-modified UCNP	H ₂ O ₂	Ce6	In vitro: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 10 min In vivo: 808 nm, 1 W·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂ , •OOH and •OH	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

nd: not determined; Ce6: chlorin e6; 5-ALA: 5-aminolevulinic acid; UCNP: Up-conversion nanoparticles.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The battery was implemented under different thicknesses of pork tissue. The NIR irradiation (980 nm) induced $^1\text{O}_2$ production at a thickness of 4 mm, whereas UV light (365 nm) was efficient at only 1 mm. The battery was biocompatible in a human colon adenocarcinoma cell line HT29 and presented phototoxicity under light illumination. CaO_2 was encapsulated in the battery and a higher molecular O_2 concentration and hypoxia inhibition was observed. Finally, the device was implanted subcutaneously onto a HT29 solid tumour. The PDT effect of the battery after NIR irradiation (660 nm, $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 + 60 s) during 15 days (two times each day) led to a better oxygenation and a tumour volume decrease (Figure 24).

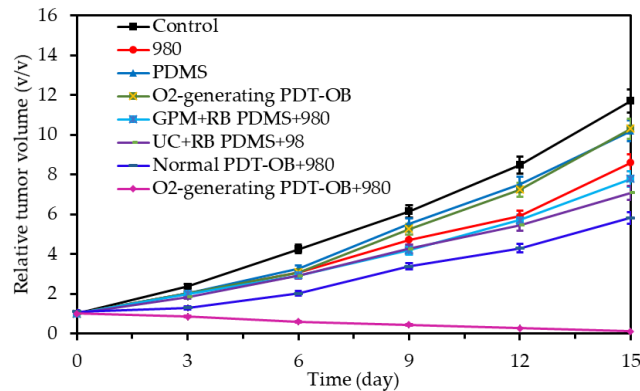


Figure 24. Tumour volumes evolution in different treatments groups. PDT-OB = O_2 generating optical battery; GPM: Green luminescent material Adapted from Hu et al. [138].

A liposome-based NP containing MB and the O_2 supplier CaO_2 were synthesized by Liu et al. [139]. After a short irradiation time (30 s), photobleaching of the NPs occurred inducing the formation of O_2 by release of CaO_2 in water. After a long irradiation time (60 s), hypoxia in the tumour environment was regulated and a PDT effect was observed. The NPs were tested on 4T1 cells. The regulation of hypoxia was demonstrated using a ROS detection kit. Dual-stage irradiation (660 nm, $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 1 min and 5 min) led to improved phototoxicity compared to single irradiation. The NPs were tested on subcutaneously 4T1 solid tumour bearing mouse. Tumour inhibition was observed after light illumination (658 nm, $280 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2+8 min) whereas negligible effect appeared in the dark group (Figure 25).

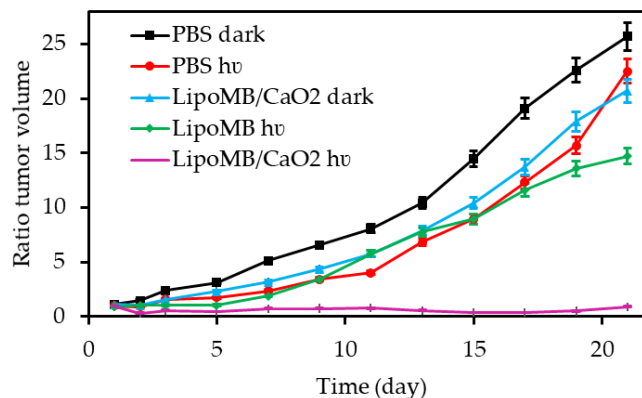


Figure 25. Relative tumour volume after different treatments. Adapted from Liu et al. [139].

Sheng et al. [140] synthesized a core shell NP with a CaO_2 core coated with a pH sensitive methacrylate based copolymer that could undergo a dissolution at pH lower than 7.4, leading to the exposure of the CaCO_2 to aqueous medium. The authors prepared a de-oxygenated PBS solution containing SOSG and RB and added CaO_2 NPs and irradiated (white light, 5 min). The results revealed

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

a significant increase (324.8%, $p < 0.001$) of SOSG fluorescence compared to the control experiments, indicating the ability of the NPs to provide O_2 during PDT, to enhance the formation of 1O_2 . The injection of NPs in a BxPC-3 human pancreatic cancer cell line demonstrated an enhancement of the PDT effect. In vivo experiments were performed in Mia-PaCa 2 xenograft mice, (3×3 min Fenix LD01 LED50 mW, $205 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) which is a model known to form hypoxic tumours. No significant difference in tumour volume for mice treated with PDT alone or CaO_2 NPs alone 5 days after treatment was observed whereas a significant reduction of 70.5% was observed for animals treated with the CaO_2 NPs and PDT.

C_3N_4 is known as a water splitting material biocompatible but presents limit efficiency in the red light region. Carbon-dot (CD)-doped carbon nitride (C_3N_4) NPs were designed by Zheng et al. [141] to enhance red light absorption and allow O_2 production via water splitting. To overcome the limit efficiency in red light region, carbon dots have been added. PpIX-PEG-RGD was grafted on the NP. The association showed an enhanced O_2 production compared to C_3N_4 alone, allowing the decrease of hypoxia. ROS production after light illumination (630 nm, $80 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) was measured in a 4T1 cell line. An enhancement could be observed with the NP, and not for PpIX or C_3N_4 without CDs. After laser irradiation at 630 nm, NPs displayed the same phototoxicity in hypoxic and normoxic medium, contrary to PpIX. The NPs were tested in subcutaneously 4T1 solid tumour bearing mouse. NP injection and irradiation showed remarkable tumour growth inhibition contrary to PpIX or C_3N_4 without CDs.

Li et al. [142] associated Fe- C_3N_4 NPs with tris(bipyridyl)cationic Ru complexes ($Ru(bpy)_3^{2+}$) which could enhance photocatalytic activity and act as PS. Ru complex absorption of near infrared light enhanced the charge transfer to C_3N_4 and photocatalytic water splitting. The NPs irradiated at 800 nm (2.7 W, 5 min) allowed more O_2 generation than C_3N_4 or ($Ru(bpy)_3^{2+}$) alone. The ROS production was also confirmed by using DCFH-DA and ESR. The NP biocompatibility, cellular uptake and phototoxicity (800 nm, 2.7 W, 3 min) were demonstrated on a 4T1 cell line. Experiments on 4T1 tumour bearing mice after intravenous injection of NPs and light irradiation (800 nm, 2.7 W, 5 min) showed significant tumour inhibition.

Yang et al. [143] developed a theranostic platform that associated UCNPs ($NaGdF_4:Yb,Tm@NaGdF_4$) graphic- C_3N_4 nanosheets (one PS) and carbon dots (another PS) incorporated in a ZIF-8 metal-organic framework (MOF) shell. The combination of g- C_3N_4 and CDs could induce stepwise water splitting: (1) $2H_2O \rightarrow H_2O_2 + H_2$; (2) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. The phototoxicity was observed on HeLa cells after NIR irradiation (980 nm, $500 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) (Figure 26). The NPs injected in U14 tumour-bearing mice irradiated at 980 nm ($0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) induced a delayed tumour growth.

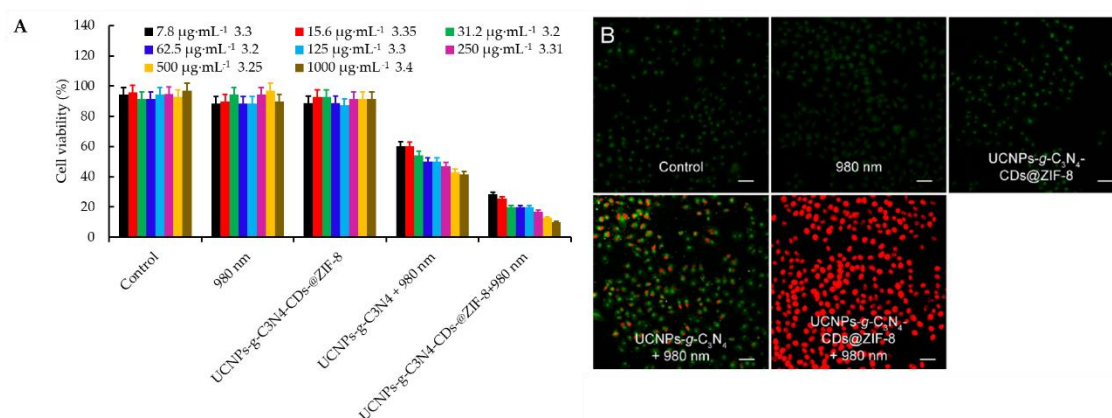


Figure 26. (A) In vitro cell viabilities of HeLa cells incubated with cell culture (control), 980 nm light, UCNPs-g- C_3N_4 with 980 nm laser irradiation, and UCNPs-g- C_3N_4 -CDs@ZIF-8 at varied concentrations with and without 980 nm laser irradiation. Adapted from Yang et al. [143] (B) CLSM images of HeLa cells incubated with different conditions corresponding to the toxicity test *in vitro*, and all the cells are marked with calcein AM and PI. Reprinted from [143] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2017.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Zheng et al. [144] designed a platform assembling an O₂-generated thylakoid membrane from plants (spinach, lettuce, cabbage) fused with synthetic NP (Ag, SiO₂, ZnO). This idea comes from the fact that in nature, plants possess a very oxygenic photosynthesis system that allows the photocatalyzed formation of O₂. These platforms exhibited good O₂ generation that could reverse the tumour hypoxia. This O₂ production proved to be higher compared to CaO₂ or MnO₂. The *in vivo* generation of O₂ was proven in CT26 tumour-bearing Balb/C mice. The authors observed enhanced PDT when they added the platform to MB (660 nm, 155 mW·cm⁻², 2 min).

In 2015, Zhou et al. [145] synthesized a monolayer of Bi₂WO₆ with a highly active surface that could generate photocatalytic oxidation reactions, leading to the oxidation of H₂O (or OH⁻) to •OH upon laser irradiation. Indeed, Bi₂WO₆ could produce ROS without the need of O₂. Zhang et al. [146] demonstrated that small Bi₂WO₆ NPs (5 nm) grafted with carboxylic acid groups could efficiently generate •OH after irradiation in the NIR range (808 nm, 1 W·cm⁻², 5 to 20 min). The *in vivo* injection of the NPs in HeLa tumour-bearing nude mice showed a photothermal effect until 47°C after 8 min irradiation (808 nm, 1 W·cm⁻²) because of their strong Plasmon resonance. The ROS production was evaluated both by the SOSG for ¹O₂ and by EPR for •OH radicals. Formation of •OH played a dominant role. The *in vivo* PDT (HeLa tumour-bearing mouse model, 808 nm, 1 W·cm⁻², 8 min) showed that Bi₂WO₆ NPs induced photodynamic killing in a hypoxia-free manner resulting in tumour continuous decrease of the tumour volume (Figure 27). It was not the case for ICG and W₁₈O₄₉ NPs, which could react, with O₂ absorbed onto the NPs to generate ROS in an O₂ independent manner.

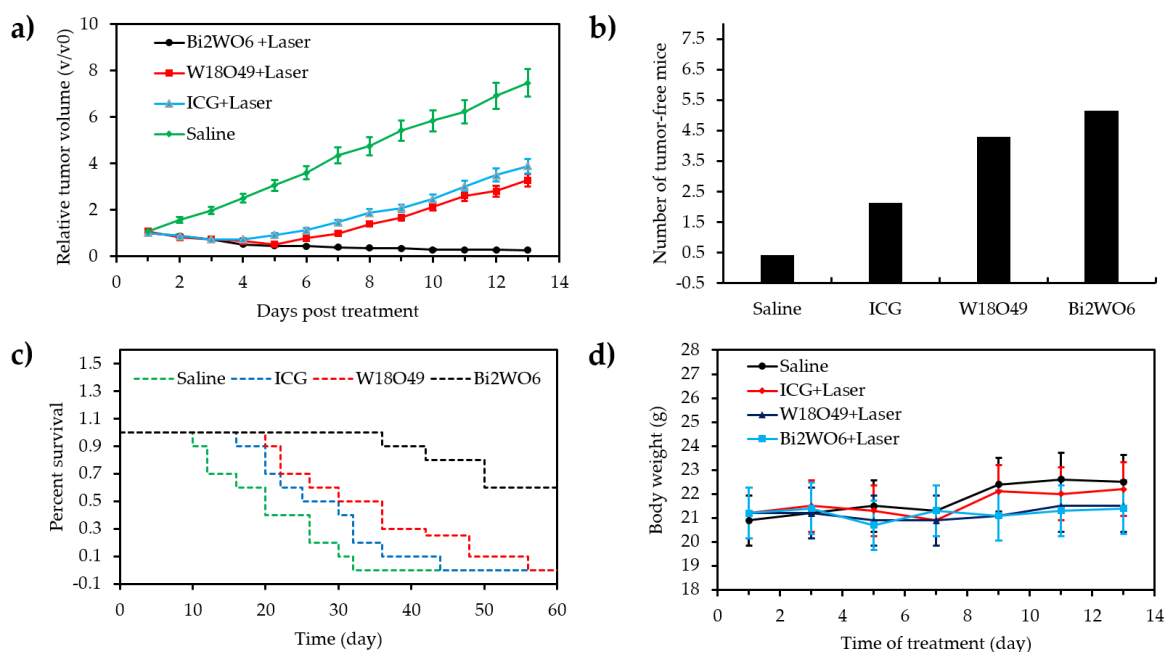


Figure 27. a) Tumour volumes of HeLa-tumour-bearing mice that received different treatments as displayed. b) Number of tumour-free mice after treatment during the observation. c) Survival curves of HeLa-tumour-bearing mice that received different treatments as displayed. d) Body weight of HeLa-tumour-bearing mice that received different treatments as indicated. Adapted from Zhang et al. [146].

Fan et al. in 2017 [147] developed semiconductor materials with broadband light response in UV and visible region. Usually photocatalytic reactions produce O₂ by splitting water, *in vivo*, but not enough to produce ROS in sufficient quantity by PDT. To improve the efficiency, such nanorods (CdSe-seeded/Cds) were doped with deposited Au, forming a hybrid nanocomposite (HNC) (Figure 28). RGD peptide was coupled to target $\alpha_v\beta_3$ receptors. Under visible excitation, the nanorods induced charge separation and delocalized electrons, which were transferred to Au, increasing the ROS generation by water splitting.

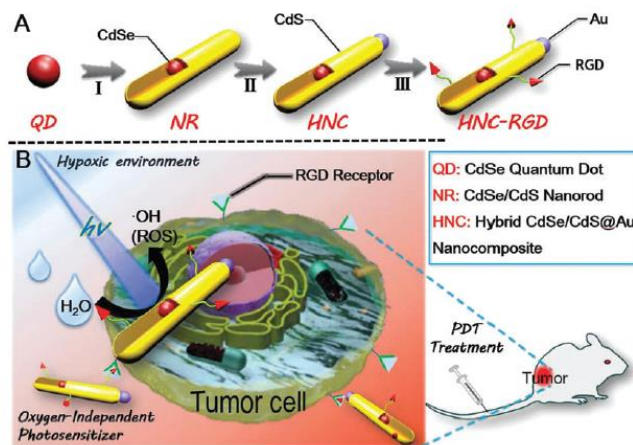


Figure 28. (A) Structure of HNCs: (I) anisotropic growth of NRs; (II) gold deposition on top of NRs; (III) RGD modification of HNCs; (B) schematic diagram of visible light driven water splitting to generate ROS for PDT treatment. Republished from [147] with permission from the Royal Society of Chemistry, Copyright 2017.

In vitro, excitation was performed with a blue LED (450 nm, 500 mW·cm⁻², 10 min). A significant increase of intracellular ROS was observed in COS-7 and HeLa cells with HNC in normoxic conditions. Moreover, cytotoxicity assays have been performed on 4T1 cells, with irradiation by blue LED during 1, 2 and 3 minutes. 20% viability of cells was observed in normoxic and hypoxic conditions, to be compared to the 80% obtained with non-modified nanorods (CdSe-seeded/Cds). In vivo model was the murine 4T1 breast-adenocarcinoma mouse on female balb/c mice. Obvious tumour growth inhibition was observed when NCNs-RGD were used under blue light irradiation (30 min), indicating the excellent accumulation of these nanorods in the tumour and improvement of the PDT effect in hypoxic media (Table 10).

3.3. Destruction of Tumour Extracellular Matrix (ECM)

Proteins such as collagen, glycoproteins, elastin, and proteoglycans are constituents of normal connective tissues. The tumour-associated proteases are likely to destroy some of these proteins inducing, by the way, the invasive process and thus metastasis. However, destruction of the extracellular matrix may be useful if it is cleverly applied. Indeed, it can lead to better vascularization and therefore to an excess supply of O₂, thus reducing hypoxia.

In 2016, Gong et al. [148] investigated the effect of the administration of hyaluronidase (HAase) before PDT with nanomicelles containing Ce6 (NM-Ce6). The HAase treatment could degrade ECM by breaking down hyaluronan leading to an increase of the blood vessel density and the perfusion of the tumour. The accumulation of NM-Ce6, with an average size of 33 nm, in tumours was studied after administration of different doses of HAase (0, 375, 750, 1500 and 3000 U) and a significant increase in the tumour uptake of NM-Ce6 (~ 2-fold) was observed with the HAase treatment with an optimal dose at 1500 U. The significant decrease of HIF-1 α after this HAase administration proved an improvement of hypoxia conditions in the tumour. In vivo PDT studies were performed in balb/c mice bearing 4T1 tumours. No effect on the tumour growth was observed with the administration of HAase alone but in combination with PDT treatment with NM-Ce6 under light irradiation at 660 nm (2 mW·cm⁻², 1 h), there was an almost total inhibition of the tumour growth. The authors also investigated the effect of HAase administration on PDT efficiency against lymphatic metastasis since HAase presented the ability to move in drainage lymph nodes and thus increased the EPR effect of NM-Ce6 and relieved the hypoxia in both the tumour and the metastases sites. To reduce invasiveness of local injection of HAase, this last one was PEGylated to form HAase-PEG for systemic local injection and the same EPR and hypoxia effects were observed.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 10. Summary of publication about water splitting.

Ref	Application	Catalyst	O ₂ source	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[138]	PDT	CaO ₂	Water splitting	RB	980 nm, 2 W·cm ⁻² , 5 s	¹ O ₂	HT29 cell line	HT29 tumour-bearing mice
[139]	PDT	CaO ₂	Water splitting	MB	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 30 + 60 s In vivo: 658 nm, 280 mW·cm ⁻² , 2 + 8 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[140]	PDT	CaO ₂	Water splitting	RB	White light, 205 J·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	BxPC-3 cell line	MIAPaCa-2 tumour-bearing mice
[141]	PDT	C ₃ N ₄ NPs	Water splitting	PpIX	630 nm, 80 mW·cm ⁻² , 10 min	nd	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[142]	PDT	Fe-C ₃ N ₄ NPs	Water splitting	Ru(bpy) ₃ ²⁺	In vitro: 800 nm - 2 photons, 2.7 W, 3 or 5 min In vivo: 800 nm - 2 photons, 2.7 W, 5 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour bearing mice
[143]	PDT	C ₃ N ₄ nanosheets	Water splitting	CD	In vitro: 980 nm, 500 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 980 nm, 500 mW·cm ⁻² , 10 min	•OH O ₂ •	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[144]	PDT	Thylakoid membrane from plants	Water splitting	Ag, SiO ₂ or ZnO NPs	660 nm, 155 mW·cm ⁻² , 2 min	ROS	CT26 cell line	CT26 tumour-bearing mice
[146]	PTT/PDT	Bi ₂ WO ₆ NPs	Water splitting	Bi ₂ WO ₆ NPs	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 5 to 20 min	•OH	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[147]	PDT	Au-semiconductor nanocomposite	Water splitting		In vitro: 450 nm, 500 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 450 nm, 500 mW·cm ⁻² , 30 min	nd	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

nd: not determined; RB: Rose Bengal; MB: Methylene Blue; C₃N₄: Carbon nitride; PPIX: Protoporphyrin IX; Ru(bpy)₃²⁺: tris(bipyridyl)cationic Ru complexes; CD: Carbon dot.

Liu et al. [149] described another strategy, based on two steps to enhance PDT treatment: a first injection of NPs containing collagenase (CLG) to destroy tumour ECM by degradation of collagen and a second injection of liposomes containing Ce6 for PDT treatment. The pH-sensitive NPs were composed of Mn^{2+} coordinated with benzoic-imine (BI)-linker to form nanoscale coordination polymers (NCPs) encapsulating CLG (CLG@NCP). CLG@NCP NPs were surrounded by a lipid PEG shell to finally formed CLG@NCP-PEG NPs possessing a hydrodynamic size of 106 nm. The pH-sensitive relapse of CLG by CLG@NCP-PEG NPs was investigated by changing the pH of a solution containing CLG@NCP-PEG NPs, from 7.4 to 6.5 and after 24 h of incubation a release of ~90% was observed. Moreover, a recovery of ~80% of CLG enzyme activity was highlighted for a pH 6.5. In vivo in 4T1 tumour bearing mice, a high tumour uptake was observed 24 h after injection of CLG@NCP-PEG NPs as well as a significant decrease of the collagen level in the tumours leading to an ECM degradation and thus an enhancement of blood flow perfusion. As a consequence of these effects of the level of tumour oxygenation, a significant increase over time was observed after treatment with CLG@NCP-PEG NPs (Figure 29) as well as a high decrease of hypoxia signals.

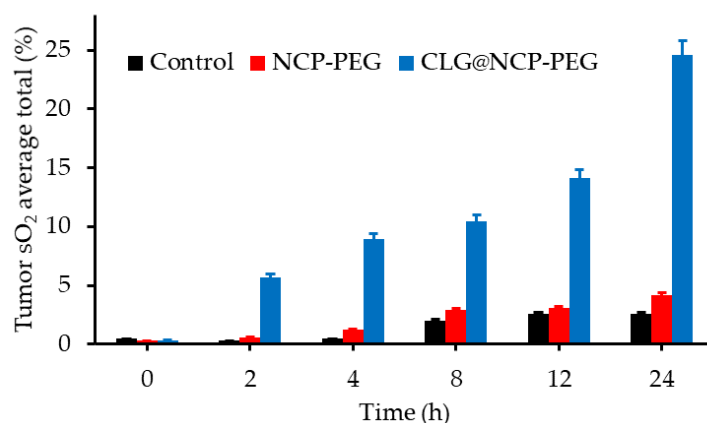


Figure 29. Quantification of the oxyhemoglobin saturation in the tumour from different groups over time. Adapted from Liu et al. [149].

The effect of a pretreatment with CLG@NCP-PEG NPs before PDT treatment with liposomes containing Ce6 (liposome@Ce6) was finally studied. The therapeutic PDT effect was dramatically improved with an effective tumour growth inhibition when mice were pretreated with CLG@NCP-PEG NPs 24 h before injection of liposome@Ce6 and irradiated (660 nm, $5mW \cdot cm^{-2}$, 60 min) after again 24 h. Moreover, CLG@NCP-PEG NPs showed no cytotoxicity over time (14 days) (Table 11).

3.4. Decrease of Tumour O_2 Consumption

A recent strategy consists to decrease the tumour cells' demand for O_2 by inhibiting mitochondrial respiration ((*via* NADH dehydrogenase). Several mitochondrial receptors can be targeted such as papaverine's or metformin's complexes and others. The expected reduced O_2 consumption induces an increased oxygenation concentration. Since 2015, some drugs with potential ability to decrease the hypoxic fraction have been developed in the field of PDT and/or PTT. Nevertheless, some requirements must be taken into account to obtain a significant improvement in the treatment of cancer. Normally oxygenated tissues should not be affected, uptake by tumour cells should be rapid, minimal side effects and optimal clearance should be observed. Two teams have reported the use of metformin (Met) which is known to reduce tumour O_2 consumption and thus increase tumour oxygenation.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 11. Summary of publications about the destruction of ECM to modify TME.

Ref	Application	Target	Additional compound	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[148]	PDT	Hyaluronan of ECM	Hyaluronidase	Ce6	660 nm, 2 mW·cm ⁻² 60 min	¹ O ₂ and others ROS	No	4T1 tumour-bearing mice
[149]	PDT	Collagen of ECM	Collagenase	Ce6	660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 60 min	nd	No	4T1 tumour-bearing mice

nd: not determined; Ce6: Chlorin e6.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

In 2017, Song et al. [150] incorporated in PEG liposomes, HCe6 (hydrophobic Ce6) and a hypoglycemic agent, Met. The resulting NPs exhibited a $^1\text{O}_2$ generation under 660 nm light excitation. In vitro studies were performed in 4T1 cells to evaluate the PDT efficiency of Met-HCe6-liposomes in comparison with HCe6-liposomes and Met or Ce6 alone. After a 660 nm light irradiation for 10 min, all Ce6 formulations showed almost the same PDT effect in normoxic conditions. In vivo tests were performed in mice bearing 4T1 tumours injected with Met-HCe6-liposomes. The authors used PA to evaluate the tumour oxygenation in presence of Met alone or Met-liposomes by following the level of oxygenated Hb (oxyhemoglobin) in tissues. A high increase was observed for both after 2 h with a decrease over time, after 2 h, for Met alone. However, for Met-liposomes, the increase of oxyhemoglobin subsist over time due to a continuous release of Met. After injection of Met-HCe6-liposomes, a significant reduction of hypoxia was observed 2h and 24h after injection (57% to 27% and 15% respectively), by using pimonidazole hydrochloride. The improvement of tumour oxygenation with this compound was also proved in two other tumour models (CT26 colon cancer and SCC-7). Finally, the improvement of PDT efficiency was confirmed by in vivo studies in a 4T1 tumour model. After injection of Met-HCe6-liposomes or HCe6-liposomes 24h before a 660 nm light irradiation ($0.035 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min), the tumour growth was highly decreased for both in comparison with PDT treatment with Ce6 alone. Moreover, the most significant inhibition of tumour growth was observed for group treated with Met-HCe6-liposomes-mediated PDT.

Zuo et al. [151] designed NPs (PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs) composed by $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs (PDT and PTT application) and Met encapsulated in platelet membranes (PM) for a better biocompatibility. They first evaluated the properties of $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs and PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs without Met and found respective mean diameter of 5 nm and 115 nm. Under an 808 nm laser irradiation ($1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min), a solution of PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs showed an increase of temperature from 24.2 to 61.6°C over time. Moreover, they observed a conservation, over time, of $^1\text{O}_2$ production and of the ability to transform laser energy to heat for PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs contrary to $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs alone indicating a protecting effect of PM. The introduction of Met in PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs did not affect its characteristics (size, morphologic, optical) and PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs allowed an effective release of Met in the tumour. The efficiency of PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs to reduce tumour O_2 consumption was evaluated in Raji cells and compared to that of Met alone. For both compounds, a significant decrease (70%) of O_2 consumption rate was observed after 24h incubation. An induction of hypoxia simultaneously to increase of ROS production was observed for PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs whereas a higher level of ROS production was observed for PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs with a decrease of hypoxia. In vitro PTT/PDT studies were performed in Raji cells incubated with PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs, PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs or $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ NPs and irradiated at 808 nm ($1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min). A highly decrease of cell viability was observed for all these compounds but PM- $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ -Met NPs presented the highest cytotoxicity with a level of viability inferior at 20%. The antitumour efficacy was confirmed by in vivo tests in mice bearing Raji-lymphoma xenografts injected with the same compounds and irradiated at 808 nm (10 min).

Two others systems based on two different compounds (tamoxifen, TAM, and atovaquone, Ato) able to reduce O_2 consumption have been described. In 2018, Yang et al. [152] developed a system based on the use of TAM. They combined in solution Ce6-modified HSA (HSA-Ce6) with TAM to induce a self-assembly of NPs which could be dissociated under acidic pH. They also synthesized as a control covalently cross-linked HSA-Ce6 NPs (C-HSA-Ce6 NPs). The NPs formed: HSA-Ce6/TAM NPs and C-HSA-Ce6 NPs presented a hydrodynamic size of 130 nm and 80 nm respectively. When the environment became acidic, the TAM molecules were protonated, which could induce NPs dissociation. They found that the presence of TAM and HSA did not affect the $^1\text{O}_2$ generation induce by Ce6. In vitro PDT efficiency was evaluated in 4T1 cells incubated with HSA-Ce6/TAM NPs 6 h before 660 nm light irradiation ($5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min). The HSA-Ce6/TAM NPs showed a photocytotoxicity similar as that observed for C-HSA-Ce6 NPs or Ce6 alone. By performing in vivo studies, in mice bearing 4T1 tumours, the authors observed a tumour uptake of HSA-Ce6/TAM NPs significantly higher than C-HSA-Ce6 NPs or Ce6 alone due to the pH-induced dissociation of HSA-Ce6/TAM NPs in HSA-Ce6 allowing an intratumoural penetration more efficient. Moreover, they investigated the evolution of tumour

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

oxygenation after injection of HSA-Ce6/TAM NPs by using PA imaging and observed an increase of tumour oxygenation from 0.91% to 10.9%. By using pimonidazole they found a reduction of hypoxia from 21.6% to 2.04% for mice treated with HSA-Ce6/TAM NPs. The *in vivo* PDT efficiency was evaluated by injection in mice of HSA-Ce6/TAM NPs and C-HSA-Ce6 NPs following by 660 nm light irradiation. A high phototoxic effect was highlighted for mice treated HSA-Ce6/TAM NPs and light with some complete eradication of the tumour whereas for the control groups (C-HSA-Ce6 + Light or HSA-Ce6/TAM NPs alone), any inhibition of tumour growth was observed.

Xia et al. [153] described another vehicle with a reducible size based on gelatin for a better tumour uptake encapsulating a PS (ICG-BSA nanocomplex) and Ato. The gelatin NPs thus formed were denoted Ato-ICG-GNPs (437±52 nm). These NPs could be reduced in the tumour by enzymes (matrix metalloproteinase, MMP-2) and thus highly release in the tumour site Ato and ICG-BSA after only 2 hours (Figure 30).

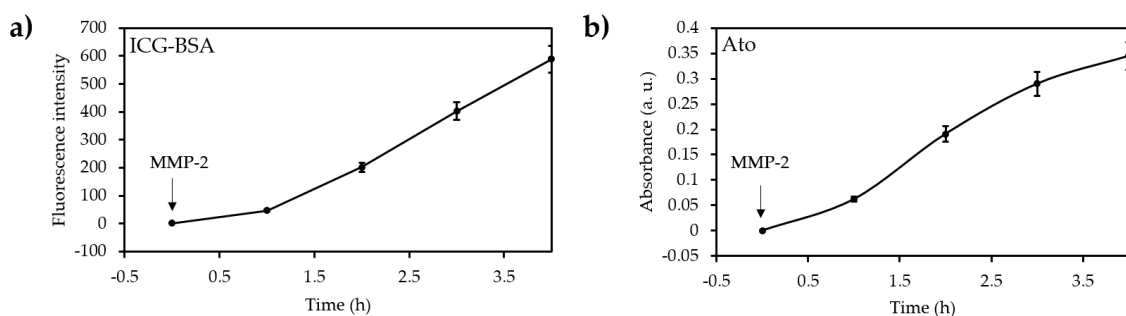


Figure 30. MMP-2-triggered shape remodelling and cell uptake behaviour of Ato-ICG-GNPs. **a)** Fluorescence intensity of ICG-BSA (795 nm) in the supernatant. **b)** Absorbance of Ato (490 nm) in the supernatant. Adapted from Xia et al. [153].

The ability of Ato-ICG-GNPs to reduce tumour O_2 consumption was investigated in HeLa cells and compare to Ato alone. The O_2 consumption rate was significantly reduced by 50%, after incubation of cells with 2 μ M of Ato or Ato-ICG-GNPs and no difference was observed between the two compounds. The evaluation of OCR was done in both normoxic (21% of O_2) and hypoxic (2% of O_2) conditions and any influence of O_2 on Ato efficiency was highlighted. It was also observed that in presence of Ato-ICG-GNPs, the cell proliferation slowed down. (Table 12)

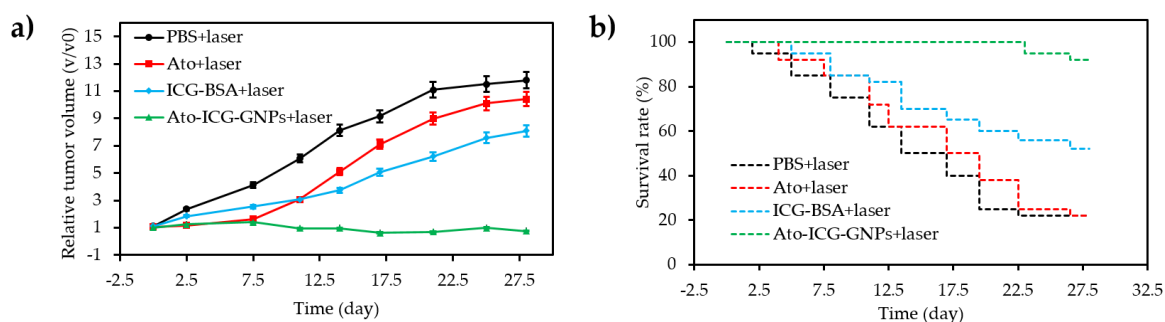


Figure 31. In vivo therapeutic outcome. **a)** Relative tumour growth curves of mice received different treatments within a total of 28 days. Control (0.1 mL per mouse, PBS); Ato (0.1 mL per mouse, containing 330.15 μ g·mL⁻¹ Ato); ICG-BSA (0.1 mL per mouse, containing 37.44 μ g·mL⁻¹ ICG); Ato-ICG-GNPs (0.1 mL per mouse, containing 330.15 μ g·mL⁻¹ Ato and 37.44 μ g·mL⁻¹ ICG). The tumour region was irradiated by a 808 nm laser with a power density of 1 W·cm⁻² for a duration of 5 min at 4 h post injection. (n = 18 in each group). **b)** Survival profiles as represented by the calculated rate of survival. Adapted from Xia et al. [153].

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 12. Summary of publications about the reduction of tumour O₂ consumption to modify TME.

Ref	Application	Additional Compound	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[150]	PDT	Met	HCe6	In vitro: 660 nm, 10 min In vivo: 660 nm, 30 min, 0.035 W·cm ⁻²	nd	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[151]	PDT	Met	W ₁₈ O ₄₉	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	Raji cell line	Raji lymphoma-bearing mice
[152]	PDT	TAM	Ce6	660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[153]	PDT	Ato	ICG-BSA nanocomplex	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 5 min	ROS	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice

nd: not determined; Met: Metformin; HCe6: Hydrophobic Chlorin e6; TAM: Tamoxifen; Ato: Atovaquone; ICG-BSA: Indocyanine Green-Bovine Serum Albumin.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The PDT efficiency of Ato-ICG-GNPs in comparison with ICG-BSA was investigated *in vitro* in HeLa cells incubated with Ato-ICG-GNPs or ICG-BSA and irradiated with an 808 nm laser ($1.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min). A high decrease of cell viability was observed for both with a significantly better phototoxicity for Ato-ICG-GNPs. *In vivo* studies in mice bearing HeLa-xenograft confirmed the results observed *in vitro* with a high decrease of tumour growth for mice treated with Ato-ICG-GNPs and laser irradiation (treatment repeated four times) (Figure 31a) and a survival rate of 90% after 3 weeks of treatment (Figure 31b).

3.5. Others

Two others ways to modify the TME have been reported. Gui et al. [154] explored a new strategy consisting in finding a way to deplete ATP in hypoxic cells. They synthesized a metal-organic framework NP with Cu^{2+} and $\text{ZnPc}(\text{COOH})_8$ leading to a 3D architecture ($(\text{Cu}_8(\text{ZnPc}(\text{COOH})_8)_n, \text{ZPCN})$). $\text{ZnPc}(\text{COOH})_8$ was aggregated into the NPs and ROS production was not efficient. The authors showed that addition of ATP led to the formation of ATP-Cu complex and free $\text{ZnPc}(\text{COOH})_8$ could then produce again $^1\text{O}_2$. In A549 cells after PDT (665 nm) incubation with Cu^{2+} only did not decrease the survival, whereas with the PS survival was 55.4 % and with ZPCN 23.7 %. They showed also that cells treated with ZPCN caused an important decrease in ATP concentration, arrested in the S phase, suggesting that DNS replication was stopped in the cells, a decrease in GSH level and high production of ROS and induced mitochondrial transmembrane potential depolarization of 68.72%. *In vivo* in A549 tumour xenografts in nude mice, PDT (665 nm) induced the suppression of tumour growth.

In 2016, Lv et al. [155] designed two PS based on iridium (III) complexes: $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ and Ir-alkyl (Figure 32) for the specific targeting of mitochondria and lysosomes, respectively, to enhance the PDT effect.

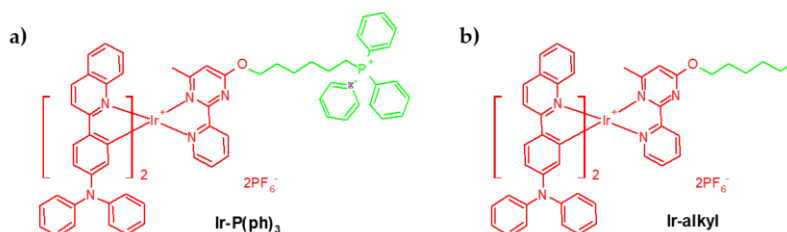


Figure 32. Chemical structures of a) $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ and b) Ir-alkyl. Adapted from Lv et al. [155].

The authors treated HeLa cells with both complexes at different O_2 levels and found that even under hypoxic conditions, the intracellular O_2 concentration remains high for $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$. They attributed this finding to an inhibition of respiration in mitochondria due to the PS. The PSs exhibited ϕ_Δ of 0.17 for $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ and 0.21 for Ir-alkyl. After incubation with $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ or Ir-alkyl, under hypoxic conditions, a high intracellular O_2 concentration was observed with $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ (11% against 3% for Ir-alkyl). Under a 475 nm irradiation ($22 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min), for both compounds, cell death occurred in 4 h whereas in hypoxic conditions, $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ was more efficient to kill cells. Moreover, the irradiation of $\text{Ir}(\text{P}(\text{ph})_3)_3$ induced more ROS generation than Ir-alkyl under both normoxic and hypoxic conditions.

4. Combined therapies

In many diseases, a single treatment is often not effective or selective enough. One solution is to add a second therapy to the usual treatment. As a result, there are many opportunities for clinicians to improve the healing and comfort of patients. The combination of two or more simultaneous or consecutive modes of action may result in additive or synergistic effects, i.e. creative cooperation. For example, one often speaks of "cocktail effect" in the case of complex mixtures of chemicals. In the field of cancer, various modalities can be applied [156,157] and combining several interventions can minimize drug resistance, or fight against expected resistance.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

In this section, recent advancements of PDT associated with various other modalities (chemo-, antiangiogenic-, immuno-, or photothermal therapies) will be addressed.

4.1. Chemo-PDT

Chemotherapy is still the major treatment for many cancers. However, cancer cells can develop drug resistance, decreasing the effectiveness of the protocol, or even generating recurrence of cancer. The combination of chemotherapy and PDT as an adjuvant therapy can bring a synergistic effect that can lead to a decrease in drug doses and reduced systemic toxicity.

4.1.1. Tirapazamine (TPZ)

TPZ belongs to the class of benzotiazine-di-N-oxides of hypoxic cytotoxin. Thanks to a one-electron reduction of the molecule, free radical species are formed and induce single and double-strand breaks. Hypoxic microenvironment triggers TPZ. It was the first molecule not based on nitro or quinone functionalities to induce ROS in hypoxic conditions.

Liu et al. [158] designed double silica-shelled UCNP able of co-delivering silicon phthalocyanine dihydroxide (SPCD) and TPZ to afford TPZ-UC/SPCD for the NIR-induced synergetic therapy of tumours, by combining PDT and hypoxia-activated chemotherapy. Under 980 nm laser irradiation ($1.4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min), TPZ-UC/SPCD generated a large amount of ROS, and therefore high PDT efficacy against HeLa cells was achieved, resulting in a severe hypoxia which would further facilitate the activation of TPZ. Furthermore, according to the *in vivo* studies performed on tumour-bearing nude mice under 980 nm laser light ($1.4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 15 min), TPZ-UC/SPCD showed remarkably suppressed tumour growth compared to UC-PDT alone, which confirmed that the combined TPZ-PDT treatment could lead to marked cell apoptosis, further demonstrating the synergistic effects.

Guo et al. [159] designed an angiogenesis vessel-targeting NPs (AVT-NPs) that consisted of a PS (5-(4-carboxyphenyl)-10, 15, 20- tris(3-hydroxyphenyl)chlorin, TPC), angiogenic vessel-targeting peptide (GX1 cyclopeptides), and TPZ (Figure 33).

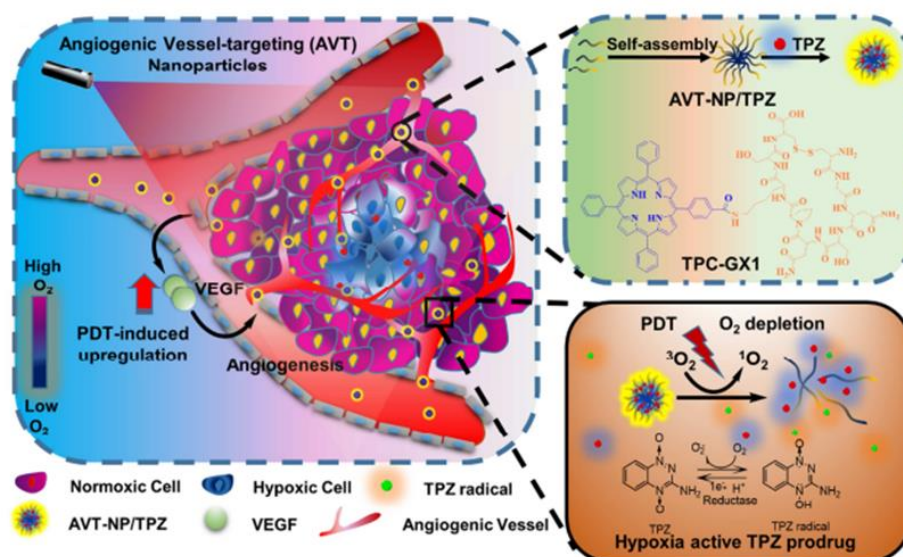


Figure 33. Schematic illustration and characterizations of AVT-NPs. (A) The formation of AVT-NP, generation of cytotoxic TPZ radical under hypoxic conditions in cancer cells, and illustration of AVT-NP/TPZ based PDT that induces a local hypoxic environment and promoted angiogenesis for targeted drug delivery and synergistic chemo-photo therapy. Reprinted from [159] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2017.

The designed AVT-NPs showed high accumulation efficiency at the tumour site, resulting in a large production of ROS under laser (650 nm, $1.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) irradiation, and therefore high PDT efficacy

was achieved which resulted in a severe hypoxia and increased angiogenesis. In the meantime, the exaggerated hypoxia further activated the bioreductive prodrug TPZ to also release highly cytotoxic radicals, leading to an enhanced antitumour efficacy both in vitro and in vivo (MCF-7 cells, 650 nm, 1.2 W·cm⁻², 10 min) compared to free drug or non-targeted nanodrugs.

Li et al. [160] demonstrated a novel biomimetic nanoplatform (TPZ@PCN@Mem) for tumour-targeted combination therapy. TPZ@PCN@Mem was elaborated by loading the hypoxia-activated prodrug TPZ in a PCN-224 porphyrinic metal organic framework and then coating with the homotypic cancer cell membranes. The authors found that PCN-224 present in the nanoplatform generated large amounts of cytotoxic ROS once exposed to laser irradiation (660 nm, 30 mW·cm⁻², 30 s) and the resulting hypoxia in the tumour aggravated by the photochemical O₂ depletion further facilitated the activation of TPZ for successive bioreductive chemotherapy. Thus, according to the both in vitro (660 nm, 30 mW·cm⁻², 5 min) and in vivo (660 nm, 220 mW·cm⁻², 10 min) investigations, TPZ@PCN@Mem exhibited highly efficient therapeutic effect against a 4T1 tumour model with negligible side effects.

Wang et al. [161] reported the development of hybrid PLGA/lipid NPs able of codelivering ICG and TPZ to solid tumours by combining PDT and hypoxia-activated chemotherapy against metastatic breast cancer. Further conjugation of the NPs to iRGD (CRGDKGPDC) peptide provided NPs (iNP/IT) studied in both 3D tumour spheroids in vitro and orthotopic breast tumours in vivo. Upon near-IR laser (808 nm, 2 W·cm⁻², 3 min), the NPs showed a high ROS production and therefore an important antitumour efficacy against metastatic 4T1 tumour model under normal O₂ conditions. Meanwhile, the hypoxic microenvironment in tumours triggered TPZ for synergistic cell-killing effect. Furthermore, according to the in vivo results (4T1 tumour-bearing mice, 808 nm, 2 W·cm⁻², 5 min), iNP/IT could inhibit both primary tumour growth and metastasis with minimal side effects contrary to a mixture of NPs containing individual drugs.

Chen et al. [162] have successfully developed photolabile HSA-based NPs modified with diazirine (DA) and loaded with ICG and TPZ (ICG/TPZ@HSA dNMs). Such photoresponsive ICG/TPZ@HSA dNMs were able to form aggregates via crosslinking of surface DA groups upon 405 nm (1.0 W·cm⁻²) laser irradiation, thus causing enhanced tumour site accumulation and prolonged retention time. A successive laser exposure (808 nm, 1.0 W·cm⁻², 7 min) of the ICG/TPZ@HSA dNMs at the tumour area enabled to trigger a cascade of synergistic therapeutic events by generation of ROS, hyperthermia, and consequent hypoxia microenvironment, which activated the initially nontoxic TPZ. Following systemic administration to mice bearing 4T1 tumours, ICG/TPZ@HSA dNMs eradicated efficiently the tumours by sequential irradiation of lasers (405 nm, 0.75 W·cm⁻², 5 min and 808 nm, 1.0 W·cm⁻², 10 min).

Liu et al. [163] designed a multifunctional (Hf/TCPP) NMOF platform, denoted Hf/TCPP loaded with TPZ. Thanks to their porous surface nature, the Hf/TCPP NMOFs possessed a high TPZ loading capacity (80 %). In addition, further surface PEGylation with DOPA-PIMA-mPEG enhanced their dispersibility and stability in physiological media and, significantly controlled the release rate of TPZ within TPZ/Hf/TCPP/PEG. Exposure of TPZ/Hf/TCPP/PEG NMOFs to laser irradiation (635 nm, 12 mW·cm⁻², 9 min) provoked an efficient ROS production, triggered the activation of TPZ and as consequently a great cytotoxic effect against both HeLa and 4T1 cells. Finally, the in vivo studies (635 nm, 0.1 W·cm⁻², 30 min) confirmed the prominent antitumour efficacy against 4T1 tumours.

Yang et al. [164] developed another drug delivery system for synergistic breast cancer treatment. The lipid carrier denoted Lip(IR780&TPZ) was successfully prepared by encapsulating the lipophilic IR780 in the phospholipid bilayer of liposome while TPZ was loaded in the hydrophilic core. According to both in vitro and in vivo results, (Figure 34), the lipidic carrier Lip(IR780&TPZ) could exert PDT by generating ¹O₂ once exposed to laser irradiation (808 nm, 1.0 W·cm⁻², 3 min) in 4T1 tumour, leading to the formation of a hypoxic microenvironment which activated TPZ.

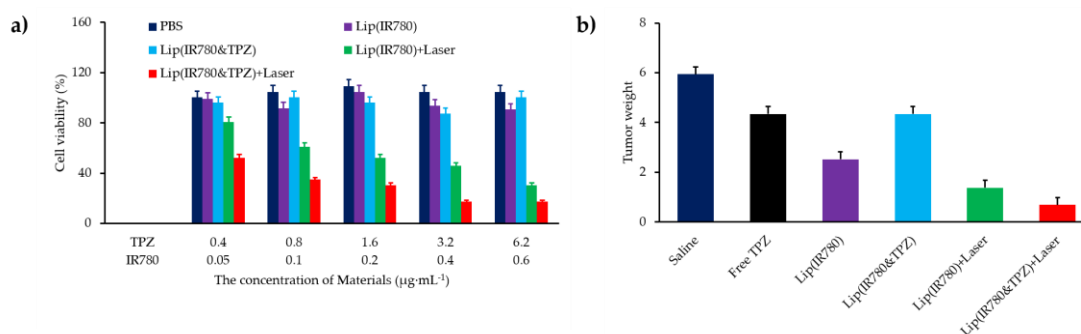


Figure 34. a): Survival of 4T1 cells after photo-thermal treatment: Viability of cells treated with different formulations under an 808 nm laser for 3 min with a sequence of 10 s irradiation and 10 s break. b): Toxicity of Lip(IR780&TPZ) in 4T1 tumour-bearing mice: Tumour weights in the different groups of mice after the indicated treatments. Adapted from Yang et al. [164].

Zhang et al. [165] reported the synthesis of an innovative hypoxia-responsive 2-nitroimidazole (NI) derivative conjugated with PEG amphoteric polymer-based liposomes (PEG-NI) co-encapsulating Ce6, TPZ and a gene probe (P_{miRNA}) for synergistic PDT-chemotherapy. Exposition of the multifunctional liposomes (Lip/Ce6/TPZ- P_{miRNA}) to laser irradiation (670 nm, $0.48 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) caused Ce6-mediated PDT and severe hypoxia, leading to the disassembly of the liposome and activation of the TPZ. A greatly improved anti-cancer activity compared to conventional PDT was achieved upon laser irradiation (670 nm, $0.48 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) for both in vitro and in vivo studies in MCF-7 cell lines, indicating the benefit of the hypoxia-activated chemotherapy combined PDT of the as prepared multifunctional liposomes for synergistic treatment.

Wang et al. [166] elaborated a multifunctional supramolecular vesicles based on the recognition of water-soluble pillar [5]arene (WP5) and NIR-absorbing diketopyrrolopyrrole (DPP)-based guest (G) for combined photothermal/photodynamic/hypoxia-activated chemotherapy. These supramolecular vesicles were able to highly encapsulate TPZ. The photothermal conversion efficiency and ROS generation ability of the vesicles were investigated (660 nm , $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 7 min). The results revealed that such vesicles could efficiently convert O_2 to $^1\text{O}_2$ for PDT. Meanwhile, the continuous O_2 consumption during the PDT process resulted in hypoxic microenvironment, which triggered antitumour activity of the TPZ-loaded vesicles for synergistic enhancement of anticancer efficacy in vitro against MCF-7 cancer cells (Figure 35). (Table 13)

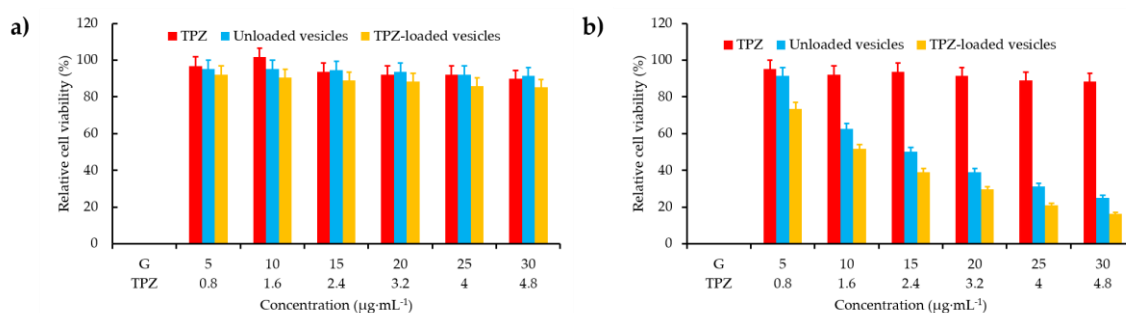


Figure 35. In vitro cytotoxicity of MCF-7 cancer cells incubated for 24 h with free TPZ, unloaded vesicles, and TPZ-loaded vesicles in the dark (a) and in light (b). Adapted from Wang et al. [166].

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 13. Summary of publications about the use of TPZ for Chemo-PDT.

Ref	Application	Supplementary Therapy used	Chemo-Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[158]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	SPCD	In vitro: 980 nm, 0.7 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: 980 nm, 1.4 W·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂ and others ROS	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[159]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	TPC	650 nm, 1.2 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[160]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	PCN-224	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 660 nm, 220 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	4T1 and COS7 cell lines	4T1 tumour-bearing mice
[161]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	ICG	In vitro: 808 nm, 2 W·cm ⁻² , 3 min In vivo: 808 nm, 2 W·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[162]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	ICG	405 nm, 0.75 W·cm ⁻² , 5 min and 808 nm, 1.0 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[163]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	TCPP	In vitro: 635 nm, 12 mW·cm ⁻² , 9 min In vivo: 635 nm, 0.1 W·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[164]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	IR780	808 nm, 1 W·cm ⁻² , 3 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[165]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	Ce6	670 nm, 0.48 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[166]	Chemo-PDT	Chemotherapy	TPZ	Diketopyrrolopyrrole (DPP)-based compound	660 nm, 1.5 W·cm ² , 10 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	No

TPZ: Tirapazamine; SPCD: silicon phthalocyanine dihydroxide; TPC: 5-(4-carboxyphenyl)-10, 15, 20-tris(3-hydroxyphenyl) chlorin; PCN-224: porphyrinic metal organic framework; ICG: Indocyanine green; TCPP: Carboxyphenyl-porphyrin; Ce6: Chlorin e6.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

4.1.2. Doxorubicin (Dox)

DOX is an anthracycline that slows or stops the growth of cancer cells by poisoning TOP-2. Qian et al. [167] reported the synthesis of light-activated hypoxia-responsive NPs by combining the PDT and hypoxia responsive chemotherapy. Such a conjugated polymer-based delivery system denoted as DOX/CP-NI NPs were designed based on three components, i.e., 2-nitroimidazole-grafted conjugated polymer (CP-NI), polyvinyl alcohol (PVA) and DOX (Figure 36).

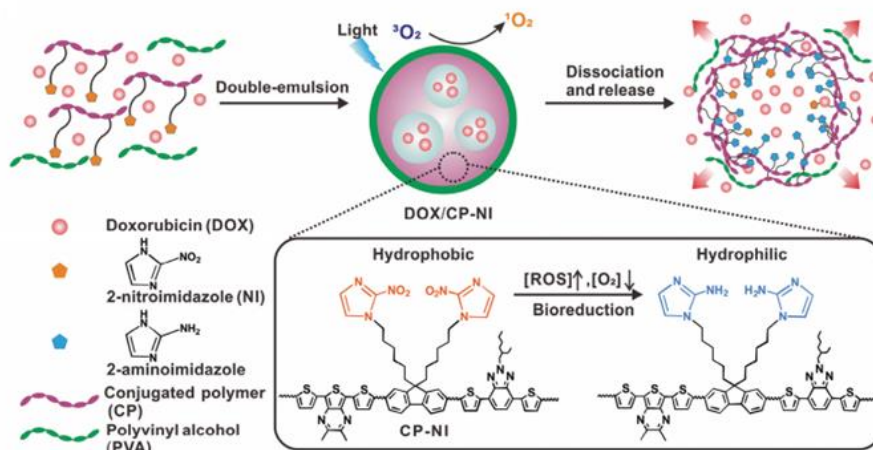


Figure 36. Schematic of the light-activated hypoxia-responsive drug-delivery system. Formation and mechanism of DOX/CP-NI NPs. Reprinted from [167] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2016.

According to both in vitro and in vivo studies on HeLa cells, DOX/CP-NI NPs could efficiently generate ROS when exposed to light irradiation (532 nm, 0.1 W·cm⁻², 20 min). Meanwhile, the continuous O₂ consumption for PDT facilitate generation of hypoxic conditions which promoted the disassembly of DOX/CP-NI, and thus an efficient DOX release which resulted in enhanced anticancer effect.

Hu et al. [168] synthesized multifunctional polymeric Ce6-DOX-MnO₂ NPs (CDM NPs) for combined chemo and PDT enhanced by O₂ generation. The CDM NPs were fabricated by hierarchically assembling DOX, Ce6 and colloidal MnO₂ with poly(ε-caprolactone-co-lactide)-β-poly(ethyleneglycol)-β-poly(ε-caprolactone colactide). Once administrated through systemic injection, the CDM NPs passively accumulated in the tumour, induced decomposition of endogenous tumour H₂O₂ under laser irradiation (660 nm, 100 mW·cm⁻², 5 min) to generate O₂ and Mn²⁺ for T1-weighted MRI. More importantly, CDM NPs dramatically improved antitumour efficiency against MCF-7 tumour-bearing mouse mode. Luo et al. [169] elaborated tumour-targeted hybrid protein O₂ carriers loaded with DOX and Ce6 (ODC-HPOCs) (Figure 37).

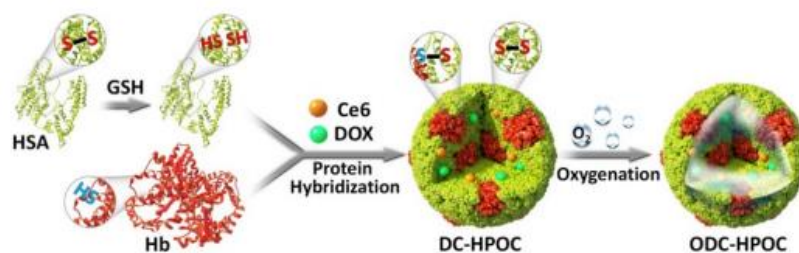


Figure 37. Schematic illustration of the fabrication of the ODC-HPOCs [169].

Laser irradiation (660 nm, 100 mW·cm⁻², 2 min) of tumour-targeted ODC-HPOCs allowed outstanding performance in tumour accumulation of O₂, DOX and Ce6. The high O₂ affinity of ODC-HPOCs guaranteed sufficient tumour oxygenation, which was able to break hypoxia-induced

chemoresistance through inhibiting the expressions of HIF-1 α , multidrug resistance 1 (MDR1) and P-glycoprotein (P-gp). Meanwhile, the abundant O₂ enhanced the ROS generation in PDT, and the enhanced chemo-PDT (660 nm, 100 mW·cm⁻², 2 min) managed to offer a single-dose treatment with minimized concentration of DOX and Ce6.

Xu et al. [170] designed mesoporous MnO₂ (mMnO₂)-coated UCNPs for TME-enhanced chemo-PDT and multiple imaging under NIR light excitation. The mesoporous silica shell covalently loaded with Ce6 were coated on the core-shell structured UCNPs (NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄:Yb). Subsequently, mMnO₂ was coated on silica shell and then modified with PEG and loaded with DOX to obtain UCNPs@Ce6@mSiO₂@mMnO₂-PEG-DOX (UCSM-PEG-DOX). Upon 980 nm irradiation (0.5 W·cm⁻², 5 min), the fast degradation of mMnO₂ shell in TME resulted in markedly enhanced T1-contrast MRI signals, an efficient DOX release, and greatly relieved tumour hypoxia by in situ generation of O₂.

Xie et al. [171] developed a novel O₂-loaded pH-responsive multifunctional nanodrug carrier UC@mSiO₂-RB@ZIF-O₂-DOX-PEGFA (URODF) for an improved chemo-PDT efficiency. NaYF₄:Yb/Er@NaYbF₄:Nd@NaGdF₄ NPs (UC) were employed for dual-modal upconversion/MR imaging. Meanwhile, the core-shell structure allowed UC NPs to activate RB in the mesoporous silica shell (mSiO₂) for PDT in 808 nm laser irradiation. Thus, under acidic conditions, the outmost O₂ reservoir ZIF-90 shell would decompose, allowing quick release of O₂ and DOX at low pH TME, and therefore achieving improved synergetic therapy and alleviating tumour hypoxia. Finally, according to the in vitro (808 nm, 0.5 W·cm⁻², 10 min) cytotoxicity against 4T1 and HeLa cells and in vivo (808 nm, 0.5 W·cm⁻², 5 min) tumour inhibition studies against H22 cancer cells, the URODF NPs demonstrated remarkably enhanced tumour inhibition effect.

He et al. [172] reported a cancer-targeting vehicle characterized by cascaded reactivity to external (light) and internal (hypoxia) triggers for selective release of the cancer drug. The hypoxia-responsive drug delivery was prepared from self-assembled polyethylenimine-nitroimidazole (PEI-NI) micelles loaded with DOX that were further co-assembled with HA-conjugated Ce6 (HC) to form NPs. Upon internalization into mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells via CD44-mediated endocytosis, the hypoxia-responsive HC/PN/DOX NPs generated high levels of ROS under light irradiation (660 nm, 10 mW·cm⁻², 30 min) The continuous O₂ consumption provoked the disassembly of the DOX-loaded PEI-NI micelles which maximized the DOX release.

Yang et al. [173] developed a multifunctional NP composed of an iron oxide (Fe₃O₄) core coated to a combined shell of MnO₂ and polypyrrole (PPy), which was both the photothermal agent and PS, to form Fe₃O₄@MnO₂@PPy. Magnetic Fe₃O₄ was used to increase the intracellular O₂ concentration. DOX was loaded on the Fe₃O₄@MnO₂@PPy nanocomposite to finally obtain Fe₃O₄@MnO₂@PPy-DOX NPs. The increase of O₂ concentration was proven in presence of H₂O₂ with these NPs. In vitro experiments were performed on HepG2 and Chinese hamster ovary (CHO) cells to study the chemotherapeutic effect of the Fe₃O₄@MnO₂@PPy-DOX NPs for cancer and normal cells. An acidic environment-dependent of DOX release was highlighted for the NPs as well as synergistic effects of chemotherapy and PTT/PDT improved by the increase of O₂ tumour level. An enhancement of cellular uptake and an increase of cell death was observed with the combined chemo-PTT/PDT (638 nm, 1 mW·cm⁻², 10 min) treatment using Fe₃O₄@MnO₂@PPy-DOX NPs.

Deng et al. [174] reported the synthesis of multifunctional nitroimidazole (NI)-bearing polymeric micelles to co-deliver DOX and Ce6 for dually hypoxia- and ¹O₂-responsive integration of chemotherapy and PDT. As proof of concept, in vitro and in vivo studies were investigated on 4T1 cells and 4T1 tumour-bearing mouse model, respectively. It was found, that upon 660 nm laser irradiation (100 mW·cm⁻², 10 min), the NCs/DOX + Ce6 produced large amount of ¹O₂, which caused oxidation of NI, provoking micelle collapse, triggered payload release, and the production of aldehyde which results in high PDT effect. Meanwhile, the continuous consumption of ¹O₂ resulted in a hypoxic environment, which triggered the micelle disassembly, DOX release, and thus caused glutathione GSH depletion that provided a supplementary anti-tumour efficacy. (Table 14)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 14. Summary of publications about the use of DOX for chemo-PDT.

Ref	Application	Supplementary therapy used	Drug	PS	Energy of excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[167]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	2-nitroimidazole (NI)	In vitro: light, $0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 or 20 min In vivo: 532 nm, $0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min or 635 nm, $0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min	$^1\text{O}_2$	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[168]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	Ce6	In vitro: 660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min In vivo: 660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min	$^1\text{O}_2$	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[169]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	Ce6	In vitro: 660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2 min In vivo: 660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20 min	$^1\text{O}_2$	MCF-7 cell line	Female BALB/c nude mice
[170]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	Ce6	980 nm, $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min	ROS	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[171]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	RB	In vitro: 808 nm, $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min In vivo: 808 nm, $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min	$^1\text{O}_2$	L929 cell line	H22 tumour bearing mice
[172]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	Ce6	In vitro: 660 nm, $2 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min In vivo: 660 nm, $10 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min	$^1\text{O}_2$	LLC cell line	LLC tumour bearing mice
[173]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	PPy	638 nm, $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min	$^1\text{O}_2$	HepG2 cell line	No
[174]	Chemo-PDT	Chemotherapy	DOX	Ce6	660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min	$^1\text{O}_2$	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

DOX: Doxorubicin; Ce6: Chlorin e6; RB: Rose Bengal; PPy: Polypyrrole.

4.1.3. AQ4N

AQ4N is a banoxantrone (Figure 38) and a hypoxia-activated prodrug (HAP) which can be reduced by endogenous isozymes (inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cytochrome P450 (CYP) in hypoxia conditions.

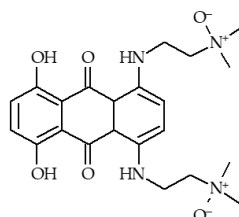


Figure 38. Structure of AQ4N.

Feng et al. [175] prepared a liposome (AQ4N-⁶⁴Cu-*h*Ce6-liposome) encapsulating hydrophilic AQ4N and hydrophobic hexadecylamine conjugated *h*Ce6 conjugated with a ⁶⁴Cu isotope for in vivo positron emission tomography (PET) and a combined hypoxia-activated chemo-PDT. In vitro fluorescence imaging showed an efficient accumulation of these liposomes after intravenous injection in 4T1 cells. Moreover, an effective cell killing ability was observed after illumination (660 nm, 30 min) of cells treated with AQ4N-⁶⁴Cu-*h*Ce6-liposome. In vivo PDT experiments (660 nm, 2 mW·cm⁻², 1 h) were performed in 4T1 tumour-bearing mice injected with AQ4N-⁶⁴Cu-*h*Ce6-liposome and a severe tumour hypoxia was observed triggering the activation of AQ4N and thus improved the inhibition of tumour growth.

A graphene oxide (GO)-based NP was designed by Luan et al. [176] for a trimodal cancer therapy. This NP was composed of verteporfin (VP) and the peptide c(RGDfK) for vascular-targeted PDT, AQ4N as hypoxia-activated prodrug (HAP), and HIF-1 α siRNA (siHIF-1 α) to suppress the HIF-1 α expression upon hypoxia and thus increase the AQ4N activation. These NPs significantly hindered the growth of tumours in PC-3 models in vivo after illumination (690 nm, 30 mW·cm⁻², 10 min) compared to the control groups.

He et al. [177] engineered NPs for hypoxia-activated chemo-PDT composed of pegylated UiO-66 NMOFs co-anchoring a PS photochlor (HPPH) and an azide group and encapsulating AQ4N (Figure 39).

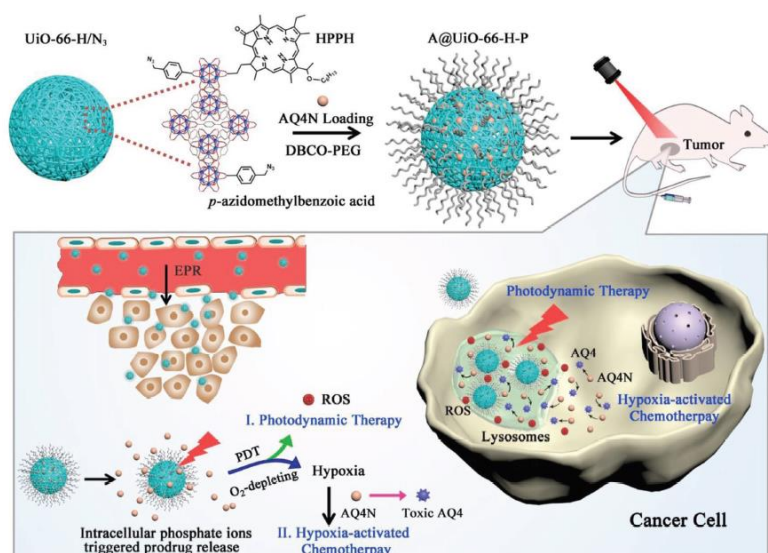


Figure 39. Schematic illustration showing the synthetic procedure of A@UiO-66-H-P NPs and the mechanism of PDT and hypoxia-activated cascade chemotherapy. Reprinted from [177] with permission from John Wiley and Sons, Copyright 2018.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 15. Summary of publications about the use of AQ4N for chemo-PDT.

Ref	Application	Supplementary therapy used	Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[175]	Chemo-PDT	Chemotherapy	AQ4N	Ce6	In vitro: 660 nm, 2 mW·cm ⁻² , 30 min In vivo: 660 nm, 2 mW·cm ⁻² , 1 h	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[176]	Chemo-PDT	Chemotherapy	AQ4N	Verteporfin	In vitro: 690 nm, 30 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 690 nm, 50 mW·cm ⁻² , 20 min	¹ O ₂	PC-3 cell line	PC-3 tumour-bearing mice
[177]	Chemo-PDT	Chemotherapy	AQ4N	Photochlor (HPPH)	In vitro: 671 nm, 100 mW·cm ⁻² , 6 min In vivo: 671 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 min	ROS	U87MG cell line	U87MG tumour-bearing mice

Ce6: Chlorin e6.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

In both in vitro and in vivo studies (U87MG cells and tumour, 671 nm, 100 mW·cm⁻², 6 min) the authors observed that the O₂-depleting PDT with these NPs conducted to an intracellular/tumour hypoxia leading to the activation of AQ4N and thus an efficient synergistic chemo-PDT therapy. (Table 15)

4.1.4. Platinum drugs

Platinum (IV) complexes are prodrugs which can be reduced in toxic Pt (II), by UV light irradiation or reducing agents. These species act as drugs for chemotherapy. Guo et al. [178] reported a Pt(IV) complex-based photoactivatable polyprodrug able to simultaneously generate highly toxic Pt(II) species for chemotherapy and a high level of ROS. This chemo-PDT concept did not rely on the use of a PS and the consumption of O₂. The polyprodrug was obtained by co-polymerizing Pt(IV) complex-based prodrug monomer (PPM) with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), nanosized hydrogel-like polyprodrug. Under light exposure, a reduction of Pt(IV) moieties contained in this photoactivatable polyprodrug was observed leading to the generation of Pt(II) species. In vitro experiments were performed in A549 cancer cells and in vivo in nude mice bearing A 549 cells and IC₅₀ values for polyPPM of 2.6 mM and 2.9 mM against A549 and cisplatin-resistant A549R cells respectively were observed under irradiation (396 nm, 5 mW·cm⁻², 5 min). In vivo A549 tumour-bearing mice were treated with polyPPM and light irradiation (0.4 W·cm⁻², 10 min) and resulted in the decrease in tumour growth.

The same strategy was described by Xu et al. [179]. They developed a NP containing Pt(IV) and Ce6, loading with UCNPs for the conversion of 980 nm near-infrared light into 365 nm and 660 nm emissions. After tumour accumulation, the NPs were triggered by a 980 nm laser to generate O₂ and could also release active Pt(II). Results suggested that NPs generated O₂ inside HeLa and L929 cells (980 nm, 0.85 W·cm⁻², 5 min). In vivo in HeLa, B16 (Murine tumour cell line skin cancer), HCT116 (Human colon cancer cell line) and MDA-MB-231 tumour model, the capability of NPs to improve tumour hypoxia was demonstrated (980 nm, 0.80 W·cm⁻², 10 min).

A new kind of compounds (covalent-organic polymers, COPs) which are able to cross-linked different organic molecules by covalent bond to form organic network structures have been used in various fields. Wang et al. [180] cross-linked a PS, mesotetra(p-hydroxyphenyl) porphine (THPP), to a chemotherapeutic pro-drug, cis-Pt (IV) and conjugated to PEG to obtain THPP-Pt-PEG COPs. Cis-Pt(IV) was also used as a reduction-responsive linker. The ability of THPP-Pt-PEG COPs to kill cancer cells after PDT (660 nm, 5 mW·cm⁻², 20 min) was observed in 4T1 cells and a reduction-responsive degradation/drug release was highlighted. After injection of THPP-Pt-PEG COPs in 4T1 tumour-bearing mice, the combined chemo-PDT (660 nm, 5 mW·cm⁻², 45 min) of the COPs showed a n improvement of therapeutic outcome in comparison with PDT and chemotherapy taken separately (Table 16).

4.2. Antiangiogenic-PDT

PDT also induces expression of angiogenic and survival molecules including VEGF, cyclooxygenase-2 (COX-2), and MMPs. The founding member of the hypoxia-inducible factor (HIF) family, HIF-1 α , regulates a broad array of genes in response to O₂ deprivation.

4.2.1. HIF-1 α inhibitors

The expression of HIF-1 α is increased after PDT treatment of cancer cells, which induces PDT resistance. The inhibition of HIF-1 α combined to PDT can lead to an improvement of the PDT efficiency. Chen et al. [181] developed anisamide-targeted lipid-calcium-phosphate (LCP) NPs encapsulating HIF-1 α siRNA to reduce the expression of HIF-1 α prior to PDT treatment with Photosan[®]. In vitro in SCC4 and SAS cells, targeted LCP with anisamide showed an efficient release of HIF-1 α siRNA 2.5 or 3.5 fold higher than observed for LCP without anisamide.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 16. Summary of publications about the use of Pt (IV) drugs for chemo-PDT.

Ref	Application	Supplementary Therapy used	Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[178]	Chemo-PDT	Chemotherapy	Pt (IV) complex	No	In vitro: 396 nm, 5 mW·cm ⁻² , 5min In vivo: 396 nm, 0.4 W·cm ⁻² , 10 min	•OH and ¹ O ₂	A549 cell line	A549 tumour-bearing mice
[179]	Chemo-PDT	Chemotherapy	Pt (IV) Up conversion NP	Ce6	980 nm near-infrared light convert into 365 nm and 660 nm emissions In vitro: 0.85 W·cm ⁻² , 5 min In vivo: 0.80 W·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	L929 cell line	HeLa, B16, HCT116 or MDA-MB-231 tumour-bearing mice
[180]	Chemo-PDT	Chemotherapy	cis-Pt (IV)	THPP	In vitro: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 20 min In vivo: 660 nm, 5 mW·cm ⁻² , 45 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

Ce6: Chlorin e6; THPP: mesotetra(p-hydroxyphenyl)porphine.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Treatment with these NPs prior to photosan-PDT (640 nm, 320 mW·cm⁻², 100 J·cm⁻²) led to a significant decrease of cell viability in comparison with PDT alone. In vivo in SCC4 and SAS tumour-bearing mice, the combination of HIF-1 α siRNA and PDT led to a significant decrease of tumour volume (40 %) after 10 days.

Sun et al. [182] designed a multifunctional compound (siHIF@CpMB) constituted by cationic porphyrin lipip microbubbles (CpMBs), elaborated from cationic porphyrin lipip NPs, and loading HIF-1 α siRNA (siHIF) on the surface by electronic adsorption. In vitro in MDA-MB-231 cells, the authors observed an efficient release of siHIF after ultrasound exposure (1.03 MHz, 50 % duty, 1 W·cm⁻², 1 min) and production of ¹O₂ after irradiation (650 nm, 200 mW·cm⁻², 10 min). Moreover, the combinaison of siHIF treatment and PDT led to significant effect to kill cancer cells in both in vitro and in vivo models.

Broekgaarden et al. [183,184] elaborated a strategy relying on the use of acriflavine (ACF) to inhibit the expression of HIF-1 α in combinaison with PDT treatment with ZnPC-ETLs (Zinc Phthalocyanine in endothelium-targeting liposomes). An increase of HIF-1 α expression has been observed with PDT alone. The authors observed an increase of PDT effect (500 mW, 15 J·cm⁻²) with the addition of ACF before PDT in both normoxic and hypoxic conditions in vitro in human perihilar cholangiocarcinoma models (SK-ChA-1 cells). They reproduced the experience in A431 cells and observed an increase of cell death in hypoxic conditions after combination of ACF and PDT (671 nm, 500 mW·cm⁻², 15 J·cm⁻²) whereas no adjuvant effect of ACF was highlighted in normoxic conditions. (Table 17).

4.2.2. VEGF Inhibitors

Vascular endothelial growth-factor (VEGF) is overexpressed in tumour after PDT treatment and is involved in the neovascularisation of tumours which can induce PDT resistance. The inhibition of VEGF during PDT can lead to an enhancement of its efficiency.

Ferrario et al. [185] studied the overexpression of HIF-1 α and VEGF after PDT treatment (570-650 nm, 0.35 mW·cm⁻²) with Photofrin of BA tumours (mouse mammary carcinoma). To reduce this overexpression and thus improving the efficiency of PDT, they combined antiangiogenic therapy with PDT by treating mice with an angiogenic synthetic dipeptide (IM862) or an endothelial-activating polypeptide (EMAP-II) to inhibit VEGF production. The authors observed a decrease of VEGF level after combined antiangiogenic-PDT therapy (630 nm, 75 mW·cm⁻², 200 J·cm⁻²) with IM862 or EMAP-II and Photofrin as well as an increase of the tumoricidal action of PDT.

Zhou et al. [186] examined the influence of antiangiogenic coumpounds (VEGF inhibitors: SU5416 and SU6668) in combination with PDT with hypericin. In vivo studies in CNE2 tumour-bearing mice (poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma) showed a significant inhibition of tumour growth for mice treated with SU5416 or SU6668 in combination with PDT (halogen light source, 47.7 J·cm⁻², 60 mW·cm⁻²) with a better enhancement of the tumour response to PDT with SU6668.

Weiss et al. [187] compared the used of two types of compounds: an anti-VEGF antibody (bevatizumab) and angiostatic tyrosine kinase inhibitors (TKIs, sunitinib, sorafenib and axitinib) to inhibit VEGF receptor for an antiangiogenic treatment in combinaison with PDT using visudyne. They chose two tumour models (A278 human ovarian carcinoma cells and HCT-116 human colorectal carcinoma cells) implanted in chorioallantoic membrane of the chicken embryo. They observed the best improvement of PDT (35 mW·cm⁻², 5 J·cm⁻²) by combination with TKIs especially sorafenib and axitinib, the last one leading to a complete suppression of VEGFR-2 receptors expression in the vasculature of the tumour. The use of bevacizumab did not lead to any improvement of PDT.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 17. Summary of publications about the use of HIF-1 α inhibitors for antiangiogenic-PDT.

Ref	Application	Supplementary Therapy used	Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[181]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	HIF-1 α siRNA	Photosan	640 nm, 320 mW·cm ⁻² , 100 J·cm ⁻²	nd	SCC4 and SAS cell lines	SCC4 and SAS tumour bearing nude mice.
[182]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	HIF-1 α siRNA	Cationic porphyrin-grafed lipid	650 nm, 200 mW, 10 min	¹ O ₂	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231 tumour-bearing mice
[183]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	Acridine	ZnPc	671 nm, 500 mW, 15 J·cm ⁻²	nd	A431 cell line	No
[184]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	Acridine	ZnPc	671 nm, 500 mW, 15 J·cm ⁻²	ROS	SK-ChA-1 cell line	No

nd: not determined; HIF-1 α siRNA: hypoxia-inducible factor-1 α small interfering RNA; ZnPc: zinc phthalocyanine.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Lecaros et al. [188] combined PDT using Photosan® with lipid-calcium-phosphate NPs (LCP NPs) delivering VEGF-A small interfering RNA (siVEGF-A) in cells to enhance the PDT effect by decreasing VEGF-A expression. In vivo studies in human oral squamous cancer cell (HOSCC), SCC4 and SAS models were performed and the combination of siVEGF-A and PDT (640 nm, 320 mW·cm⁻², 100 J·cm⁻², 11 min) induced a significant reduction of tumour volume in both models.

Liang et al. [189] synthesized pH-responsive direct-acting-antiviral (DAA) NPs with an average diameter of 55 ± 2 nm and composed of dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) as active-targeting VEGF receptor and diketopyrrolopyrrole (DPP-4) as PTT/PDT agent to improve combined PTT/PDT treatment by the destruction of the vascular region of tumours (Figure 40). Under acidic conditions of the TME, there was an effective release of DMXAA and an increase of ¹O₂ generation as well as a good photothermal effect in comparison with pH of 7.4. In vitro and in vivo studies in HeLa tumour model highlighted an efficient synergistic effect of antivascular activity of DMXAA and PTT/PDT (660 nm, 0.8 W·cm⁻², 4 min) to kill cancer cells with a complete ablation of tumour (Table 18).

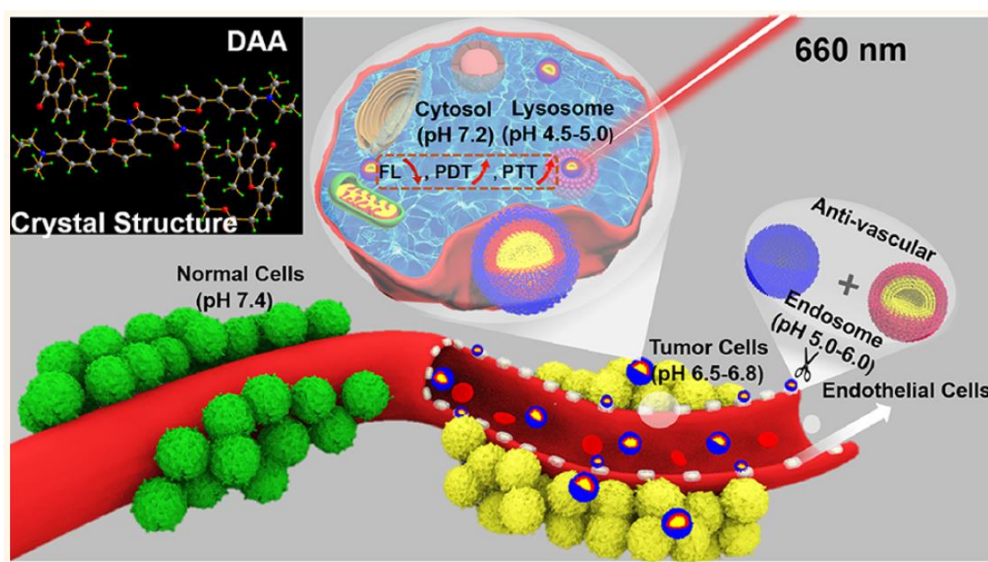


Figure 40. Antivascular and pH-Responsive Cancer PTT/PDT of DAA NPs at the tumour site. Reprinted from [189] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2018.

4.2.3. Others

Cyclooxygenase 2 (COX-2) expression is induced by PDT treatment and it is involved in the progression of cancer. In 2005, Ferrario et al. [190] evaluated the effect of COX-2 inhibitors (celecoxib, a COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drug or NS-398, a COX-2 inhibitor) combined to PDT with Photofrin on cancer cell death in comparison with PDT alone. In vitro in BA cells, they observed a light dose-dependent increase of apoptosis of cancer cells after combined PDT (570-650 nm, 0.35 mW·cm⁻², 0 to 525 J·cm⁻², 0 to 150 s) with COX-2 inhibitors. In vivo (630 nm, 75 mW·cm⁻², 0 to 200 J·cm⁻²) injection of COX-2 inhibitors decreased angiogenesis and inflammation and increased PDT efficiency.

Tuncel et al. [191] synthesized a phthalocyanine-chalcone conjugate composed of chalcones holding properties of vascular disrupting agents (VDA) and a phthalocyanine as the PS. They observed a moderate inhibition of HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) proliferation after treatment with the conjugate lower than those observed with chalcone alone as well as a lower ¹O₂ for the conjugate in comparison with the PS alone (55% against 83%). However, PDT treatment (red light, 3.6 J·cm⁻²) with the conjugate in vitro in human colon adenocarcinoma cells (HT-29) led to the best efficiency, which could be explained by a better cellular uptake thanks to its amphiphilic character.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 18. Summary of publications about the use of VEGF inhibitors for antiangiogenic-PDT.

Ref	Application	Therapy Used	Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[185]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	EMAP-II or IM862	Photofrin	In vitro: 570-650 nm, 0.35 mW·cm ⁻² In vivo: 630 nm, 75 mW·cm ⁻² , 200 J·cm ⁻²	nd	BA cell line	BA tumour-bearing mice
[186]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	SU5416 and SU6668	hypericin	Halogen light with red acetate filter, 47.7 J·cm ⁻² , 60 mW·cm ⁻²	nd	No	CNE2 tumour-bearing mice
[187]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	sunitinib, sorafenib and axitinib/bevacizumab	Visudyne	420 nm, 5 J·cm ⁻² , 35 mW·cm ⁻²	nd	No	A2780 tumour-bearing mice
[188]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	VEGF-A siRNA	Photosan	640 nm In vitro: 10 J·cm ⁻² , 159 s In vivo: 320 mW·cm ⁻² , 100 J·cm ⁻² , 11 min	nd	SCC4 and SAS cell lines	SCC4 and SAS tumour bearing nude mice
[189]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid	DPP-4	660 nm, 0.8 W·cm ⁻² , 4 min	¹ O ₂ and others ROS	HeLa and HUVEC cell lines	HeLa tumour-bearing mice

nd: not determined; DPP-4: diketopyrrolopyrrole.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The activation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is induced by PDT treatment and has a negative role for this last one. Li et al. [192,193] studied the combination of dihydroartemisinin (DHA), which could inactivate NF- κ B and displayed an anticancer activity, with PDT using 5-ALA in comparison with PDT alone. In vitro and in vivo in human oesophageal cancer models (Eca109 and Ec9706), they showed a better tumour inhibition with a reduction of NF- κ B expression for the combined treatment with DHA and PDT (630 nm, 20-25 J·cm⁻²) as compared to each treatment alone.

Carbonic anhydrase IX (CAIX) is overexpressed in tumour and is involved in the tumour survival and invasion. Jung et al. [194] synthesized an acetazolamide-functionalized boron dipyrromethene PS (AZ-BPS) (Figure 41) to combine antiangiogenic therapy by inhibiting CAIX with PDT.

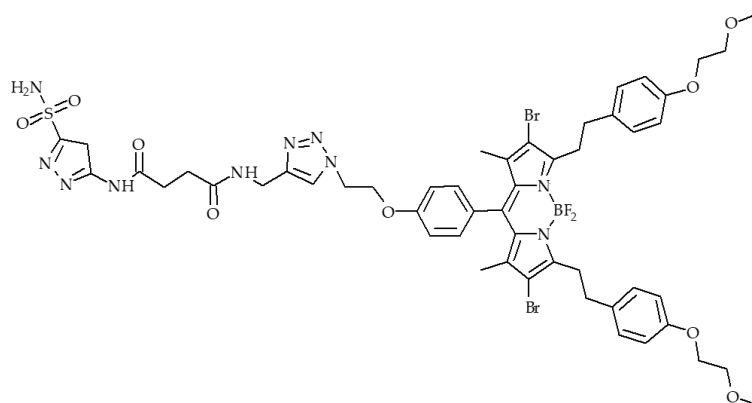


Figure 41. Structure of AZBPS. Adapted from Jung et al. [194].

In vitro in aggressive cancer MDA-MB-231 cells, they evaluated the phototoxicity (660 nm, 2 W·cm⁻², 30 min) of AZ-BPS in comparison with BPS alone and observed an enhancement of phototoxicity. The same observation was done in vivo in MDA-MB-231 tumour-bearing mice, which may be due to the inhibition of tumour angiogenesis combined to PDT (Table 19).

4.3. PTT/PDT

Photothermal therapy is a technique to destroy cancer cells by burning them selectively. This technology uses a low-power laser beam that is directed to the tumour containing small amount of molecules capable of absorbing near-infrared rays (between 800 and 1300 nm), and which efficiently convert this energy into heat. Since this technique uses irradiation, some teams considered associating PTT with PDT and proposed targeted hybrid nano-objects capable of being excited to produce both heat and ROS. This dual PTT/PDT modality offers the advantage of using only one NP for a double effect by involving only light. In contrary to PDT, PTT does not require O₂ to be efficient.

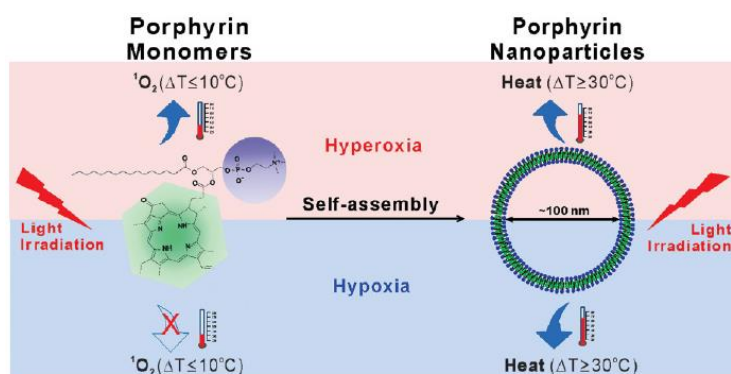


Figure 42. Schematic illustration of the study rationale and design. Reprinted from [195] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2013.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 19. Summary of publications about the use of others inhibitors for Antiangiogenic-PDT.

Ref	Application	Supplementary Therapy Used	Drug	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[190]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	celecoxib or NS-398	Photofrin	570-650 nm, 0.35 mW·cm ⁻² , 0 to 525 J·cm ⁻² , 0 to 150 s	nd	BA cell line	BA tumour-bearing mice
[191]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	Chalcone	phthalocyanine	red light (>600 nm), 3.6 J·cm ⁻²	¹ O ₂	HT29 cell line	No
[192]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	DHA	5-ALA	630 nm, 25 W·cm ⁻²	nd	Eca109 cell line	Eca109 tumour-bearing mice
[193]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	DHA	5-ALA	630 nm, 20 or 25 W·cm ⁻²	nd	Eca109 and Ec9706 cell lines	No
[194]	Antiangiogenic-PDT	Antiangiogenic	acetazolamide	AZBPS	660 nm, 2 W·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	MDA-MB-231 and MCF7 cell lines	MDA-MB-231 tumour-bearing nude mice

nd: not determined; AZBPS: acetazolamide conjugated BODIPY; 5-ALA: 5-aminolevulinic acid;

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Nanostructured self-quenched porphyrin NPs (Figure 42) have been developed by Jin et al. [195]. PDT with Photofrin (633 nm, 200 mW with a spot size of 9 mm diameter for 318 s) in treating mice bearing KB xenograft under hyperoxic conditions induced 100% reduction of tumour volume 2 days after treatment and 100% survival over 50 days. When molecules of Photofrin were assembled in the bilayer of self-quenched porphyrin NPs, no PDT effect could be observed (671 nm, 200 mW, 5 min 18 s). Porphyrins proved in fact to be photothermal enhancers that induced rapid and significant tumour temperature increase ($T_{\text{final}} > 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 85 s) upon PTT irradiation (PTT: 671 nm, 750 mW, $100\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, 85 s) for a complete KB tumour elimination regardless of cellular O_2 amount in both hyperoxic and hypoxic conditions.

Zhu et al. [196] designed a NP (BSA/SAs–NMOF NPs) based on NMOFs (TCPP as organic ligands and iron ions as metal center) as PTT/PDT agent, covalently conjugated to BSA/SA complexes (bovine serum albumin/sulfonamides) for biocompatibility. In vitro in 4T1 cell line, the authors observed a photothermal conversion efficiency of 40.53% (660 nm, $50\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) and an efficient ROS generation (660 nm, $50\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min then $1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) in both normoxic and hypoxic conditions under laser irradiation. The synergistic effect of PTT/PDT (660 nm, $50\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min then $1.0\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) to kill cancer cells was demonstrated in both in vitro and in vivo 4T1 tumour models and appeared to be significantly better than PTT or PDT alone.

In 2016, Hu et al. [197] developed an original strategy based on the increase of temperature to improve circulation of the blood, blood O_2 concentration in tumour tissue. This strategy is different from PTT since it does not based on a conversion of energy into heat but on an external change of the temperature of mice. They synthesized a human serum albumin loaded with Ce6 conjugated with Mn^{2+} (HSA-Ce6 NAs) with an average hydrodynamic diameter of $100\pm 2.4\text{ nm}$. Reduced GSH could induce the cleavage of intermolecular disulfide bonds of HSA-Ce6 NAs and the release of Ce6. In vitro in 4T1 cells, they showed that PDT (660 nm, $50\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) led to cell viability of 25.7 % at 37°C and 5.8 % at 43°C . In vivo in 4T1 tumour-bearing mice, PDT was also performed (660 nm, $200\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 20 min). They designed a warm water bath to simulate « hot spring » bath. By changing the temperature from 37°C to 43°C , blood flow velocity increased from $17.3\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ to $32.4\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, O_2 saturation in tumour tissue also increased from 52% to 79%. After PDT, mice treated with Ce6 at 37°C showed a tumour growth delay, with HSA-Ce6 NAs at 37°C a partly inhibition of tumour growth whereas with HSA-Ce6 NAs at 43°C they could observe significant tumour regression with no tumour recurrence.

In 2017, Feng et al. [198] described liposomes activatable by NIR light to relieve tumour hypoxia and to be an efficient PDT-agent while protecting skin. The liposomes (DiR-*h*Ce6-liposomes) were composed by a PEG shell and encapsulated hexylamine conjugated Ce6 (*h*Ce6) and 1,1'-dioctadecyl-3,3',30,3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide (DiR) as a NIR dye quenching the photophysical properties of *h*Ce6. In the absence of NIR light, *h*Ce6 contained in DiR-*h*Ce6-liposome presented a quenching of its photophysical properties and under a 785 nm NIR irradiation, a photobleaching of DiR induced a recovery of *h*Ce6 properties but also a photothermal heating leading to a reduction of tumour hypoxia. A quenching of 97% of *h*Ce6 fluorescence in DiR-*h*Ce6-liposomes was observed and a recovery of fluorescence was observed after NIR irradiation (785 nm, $1\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min). The $^1\text{O}_2$ generation was also evaluated under light excitation (660 nm, $2\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min) and the production by DiR-*h*Ce6-liposomes was significantly lower than Ce6 alone and *h*Ce6-liposomes but under NIR irradiation followed by 660 nm irradiation, DiR-*h*Ce6-liposomes recovered this ability. In vitro PDT efficiency was investigated in 4T1 cells. Under light irradiation (660 nm, $2\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 30 min), DiR-*h*Ce6-liposomes showed a slight phototoxicity but a succession of NIR and 660 nm irradiation, a high phototoxic effect was observed similar to that observed for *h*Ce6-liposomes. In vivo studies in balb/c mice bearing 4T1 tumours under NIR irradiation, an increase of temperature over time was observed corresponding to a photothermal heating. A significant reduction of tumour hypoxia from 38% to 12% was also observed after NIR irradiation (Figure 43).

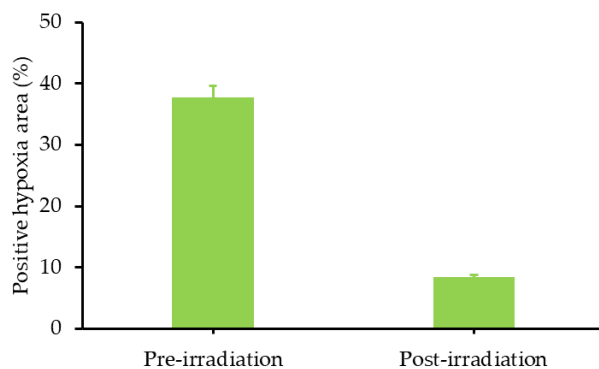


Figure 43. In vivo activation of DiR-hCe6-liposome by NIR laser irradiation and the followed tumour Oxygenation. Semi-quantitative analysis of the percentage of positive hypoxia region before and after laser irradiation. Adapted from Feng et al. [198].

Finally, the in vivo PDT effect of DiR-hCe6-liposomes after successive irradiations (785 nm, 0.7 W·cm⁻² for 20 min followed by 660 nm, 2 mW·cm⁻² for 1h) was studied and a high inhibition of tumour growth was observed whereas for mice injected with hCe6 and irradiated at 660 nm, only a moderate effect was observed (Figure 44) (Table 20).

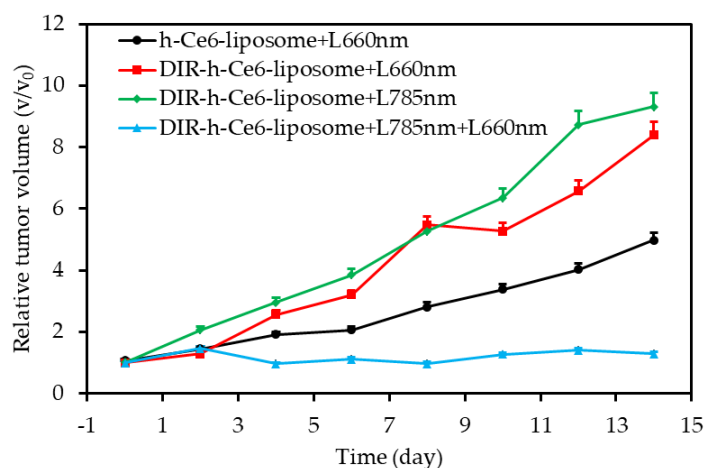


Figure 44. In vivo NIR light activated synergistic cancer phototherapy. (a) Relative tumour volume (V/V_0) changing curves of mice after various different treatments at indicated for 14 days. V and V_0 stood for the tumour volumes after and before the treatment, respectively. Adapted from Feng et al. [198].

4.4. Immuno-PDT

Cancer cells undergo profound genetic rearrangements that allow them to acquire their malignant properties. Thus, they begin to express on their surface specific molecules (tumoural antigens) that distinguish them from healthy cells and are able to induce immune reactions. Immunotherapy is a therapeutic approach that acts on the immune system of a patient to fight against his disease. This technique relies on the injection of specific proteins to the targeted tumour, the goal being to teach the patient's immune cells to identify tumour and eliminate it. PDT may be a synergistic adjunct to this type of treatment as shown by the following example.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 20. Summary of publications about PTT/PDT.

Ref	Application	Supplementary Therapy Used	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[195]	PTT/PDT	PTT	Photofrin and Porphysome	Photofrin: 635 nm, 200 mW, 318 s Porphysome: 671 nm, 200 mW, 18 s; PTT: 671 nm, 750 mW, 85 s	nd	No	KB tumour-bearing mice
[196]	PTT/PDT	PTT	Iron porphyrin	600 nm, PDT: 50 mW·cm ⁻² , 10 min PTT: 1.0 W·cm ⁻² for 5 min,	ROS	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[197]	PDT	External heating	Ce6	In vitro: 660 nm, 50 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 660 nm, 200 mW·cm ⁻² , 20 min	¹ O ₂	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[198]	PTT/PDT	PTT	<i>hCe6</i>	NIR irradiation: 785 nm, 1 W·cm ⁻² , 10 min Light irradiation: 660 nm, 2 mW·cm ⁻² , 30 min	nd	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

nd: not determined; Ce6: Chlorin e6; *hCe6*: hexylamine conjugated chlorin e6.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Im et al. [199] developed hypoxia-responsive Ce6-doped-azobenzene-glycol chitosan(GC)-PEG mesoporous silica NPs (CAGE) to enhance cancer immunotherapy (CIT) with PDT by modulation of dendritic cells and destruction of cancer cells (Figure 45). The effective generation of ROS by CAGE under laser irradiation was confirmed using SOSG. Biocompatibility and photoinduced cytotoxicity (660 nm, 150 mW·cm⁻², 15 min) of carriers was validated in vitro in a murine melanoma cell line (B16.F1). In vivo studies in B16.F1 tumour bearing mice showed an efficient inhibition of tumour growth for mice treated with CAGE and irradiated at 660 nm (200 mW·cm⁻², 15 min).

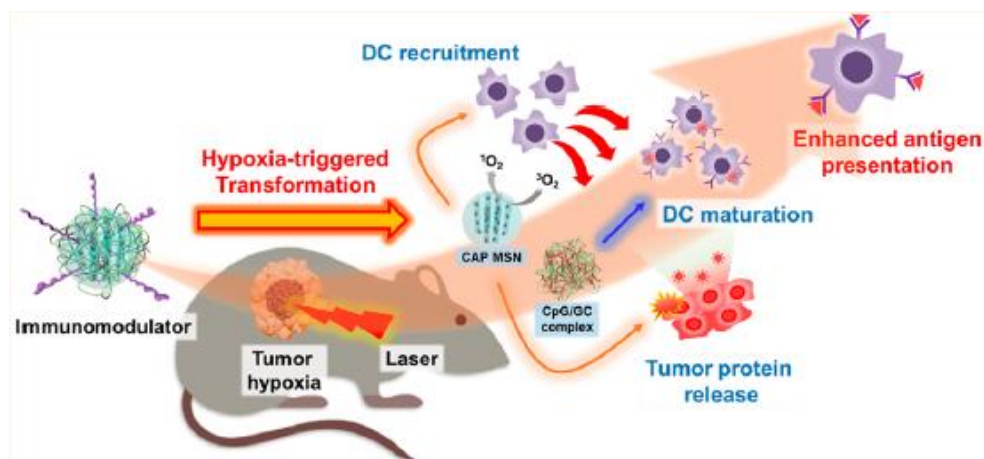


Figure 45. Schematic representation of Immuno-PDT concept of the study. Reprinted from [199] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2019.

5. Hypoxia-Independent PDT

Intratumoural hypoxia is one of the major limitations in clinical use of PDT owing to insufficient generation of ¹O₂. This hypoxic environment is further aggravated by consumption of oxygen during PDT limiting the therapeutic outcome [195,200]. To overcome that problem, various oxygen-sufficient materials or oxygen-independent PSs to produce ROS are developed and presented in this section.

5.1. PDT Type I

The principle of PDT is based on a PS excitation at a specific wavelength enabling PS to move to its triplet excited state and leading to the formation of cytotoxic ROS. These ROS can be produced by Type I (i.e. free radicals such as •OH) or Type II (i.e. ¹O₂) photochemical reactions simultaneously. Most of the clinical applications relating to PDT are based on Type II PDT and suffering badly from the insufficient O₂ supply in TME. One of the approaches being explored to circumvent this problem is the use of Type I PDT for more cytotoxic free radicals' generation to reduce dependence on intracellular oxygen content.

Ding et al. (2011) [201] designed micelles with 5,10,15,20-tetrakis-(*meso*-hydroxy-phenyl)porphyrin) (mTHPP) effective under both normoxic (50 mm Hg O₂) and hypoxic (less than 20 mm Hg O₂) conditions by modulation of photoactivation mechanism. Diameter of such micelles were 57 nm (electron rich: β-poly(2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate (mTHPP-PDPA) micelles), 49 nm (electron deficient: poly(D,L-lactide)) micelles (mTHPP-(PEG-b)PLA) (Figure 46).

In vivo experiments were performed with various cancer cells (H2009, A549 and PC-3) in hypoxic conditions, irradiated at 532 nm (20 mW·cm⁻², 10 min) and cell survivals was observed 2 days after treatment. PDPA micelles generate less ¹O₂ (relative quantum yield of 0.46) than PLA micelles in air saturated solution but about three time more others ROS. As example, survival of H2009 cells were two folds lower with PDPA micelles than with PLA micelles and three folds lower than with free mTHPP.

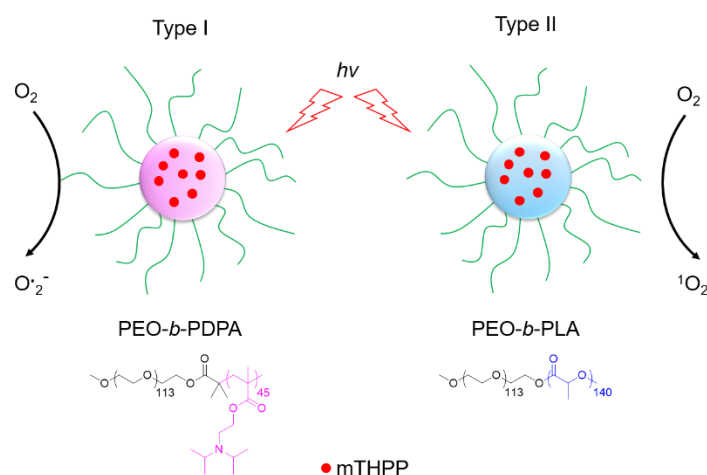


Figure 46. Modulation of photoactivation mechanism of a model PS, mTHPP, by the micelle microenvironment. Electron-rich PDPA micelles led to increased type I reactions producing superoxide radical anions, while electron-deficient PLA micelles generated 1O_2 as predominant species by type II reactions. Adapted from Ding et al. [201].

In 2014, Usacheva et al. [16] designed MB-loaded alginate NPs (275 ± 30 nm) to study the PDT efficiency under normoxic and hypoxic conditions. The authors compared the ROS and 1O_2 production with free MB and MB NPs after irradiation under different concentration of O_2 . The 1O_2 production and fluorescence were systematically higher for MB NPs than free MB even at low O_2 concentration. More interesting was a higher production of ROS with the NPs than free MB. Nitroblue tetrazolium (NBT) assay clearly indicated a high level of $O_2^{\bullet-}$. Cytotoxicity of MB and MB NP-mediated PDT was studied in various breast cancer cells (MDAMB231, 4T1, SKBR3, and MCF7 cells) under ambient conditions and NPs showed a better efficacy for the MB. A similar study in normoxia and hypoxia led to the same result. The authors investigated the MB-mediated PDT (660 nm, 6 mW·cm $^{-2}$) on mammospheres induced by MCF-7 cancer stem cells (CSCs) and showed that MB NPs effectively disrupted the formation of mammospheres as well colonies of cells under hypoxic conditions.

Li et al. (2018) [202] developed a molecular superoxide radical generator (ENBS-B) (**Figure 47**) that excited by near infrared light produced $O_2^{\bullet-}$ through type I reaction. A significant part of this $O_2^{\bullet-}$ was transformed in $\bullet OH$ after formation of H_2O_2 (Figure 48).

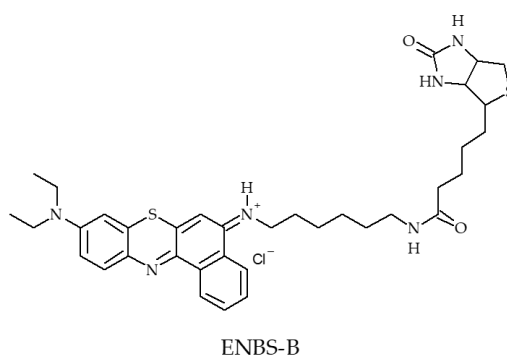


Figure 47. Structure of ENBS-B. Adapted from Li et al. [202].

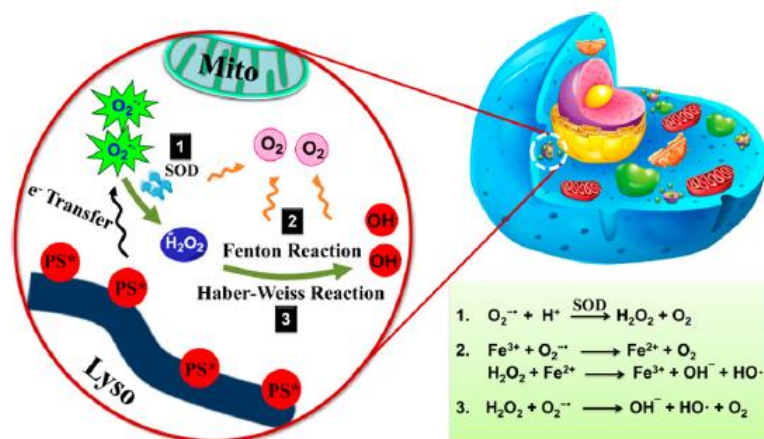


Figure 48. Schematic Illustration of Photo-Induced Radical Generation Mechanism of ENBS-B. Reprinted from [202] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2018.

In vitro cytotoxicity of HepG2 cells under normoxic and hypoxic conditions was increased at equal time up to 94 % at low concentration of ENBS-B. In vivo studies were performed on tumour bearing BALB/c mice with light irradiation (660 nm, 15 min, 14.4 J·cm⁻²) after injection of ENBS-B. They could observe the suppression of tumour growth. This was probably due to a better targeting on biotin receptors and also to the overcoming of traditional PDT involving O₂ consumption.

Liu et al. (2018) [203] irradiated copper ferrite nanosphere (CFNs) (Figure 49) with 650 nm laser, in synergy with PTT. PDT and Fenton reaction together allowed the theranostic nanoplatform to generate cytotoxic •OH and O₂• by electron/hole pairs of CFN. This platform was synthesized using BSA as biocompatible surfactant and had a diameter of 70 nm.

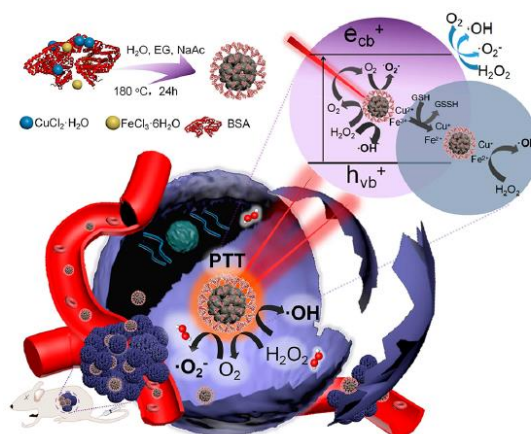


Figure 49. Schematic illustration of synthetic process and therapeutic mechanism of CFNs. Reprinted from [203] with permission from the American Chemical Society, Copyright 2018.

In vitro in HeLa cells treated with CFNs and light illumination (650 nm, 15 min, 0.469 W·cm⁻²) of CFNs induced ROS formation, with higher concentration than with light alone or CFNs alone. The CFNs were proven to regulate the TME via the catalysis of H₂O₂ producing O₂ and consuming GSH. The authors observed the decrease of tumour hypoxia using ([Ru(dpp)₃]Cl₂). Cell viability decreased nearly to zero when concentration of CFNs increased after two different illuminations (650 nm, 15 min, 0.469 W·cm⁻² and 808 nm, 10 min, 1.3 W·cm⁻²). In vivo experiments were performed on U14 tumour bearing mice, leading to a complete ablation of tumour when both PDT and PTT were in synergy.

Lv et al. [204] synthesized type I PSs based on ruthenium (II) complexes with different cyclometalated ligands, one with 2,4-difluorophenylpyridine (Ru1) and the other with a coumarin (Ru2). In both

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

normoxic and hypoxic conditions, experiments showed a strong effect attributed to charge transfer followed by type I reaction, leading to ROS production. It was found that ROS production (475 nm, 10 mW·cm⁻²) by Ru2 was 6.7 time larger than by Ru1. In vitro PDT effect was evaluated in HeLa cells irradiated in the visible region (400-800 nm, 30 mW·cm⁻²) during 10 min. Ru2 was clearly more aggressive than Ru1 even at low concentration (Figure 50). Moreover, under hypoxia, the quantity of apoptotic cells after treatment was 2.83 % for Ru1 and 54 % for Ru2.

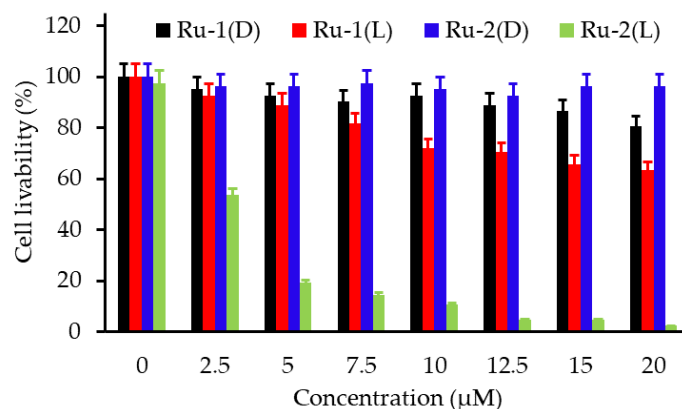


Figure 50. Dose-dependent curves for cell viability of HeLa cells treated with Ru1 and Ru2 using a typical MTT assay under light irradiation (L) or in the dark (D). Cells were irradiated with white light (400–800 nm, 30 mW·cm⁻², 10 min). Adapted from Lv et al. [204].

In vivo PDT treatment (Xe lamp) on HeLa tumour bearing mice using Ru2 as PS indicated a tumour weight going from about 2 g to less than 0.1 g after 14 days.

Wang et al. (2018) [205] designed another nanoplatfrom Fe₃O₄@MIL-100(Fe)-UCNP (FMU) (MIL, Material of Institute Lavoisier) which generate •OH species in large amount due to a photo Fenton reaction. PEGylated FMU were also synthesized (FMUP) (Figure 51). In vitro cytotoxicity was measured on HeLa cells excited by 980 nm laser (0.9 W·cm⁻², 10 min) and the cell viability was about 10 %.

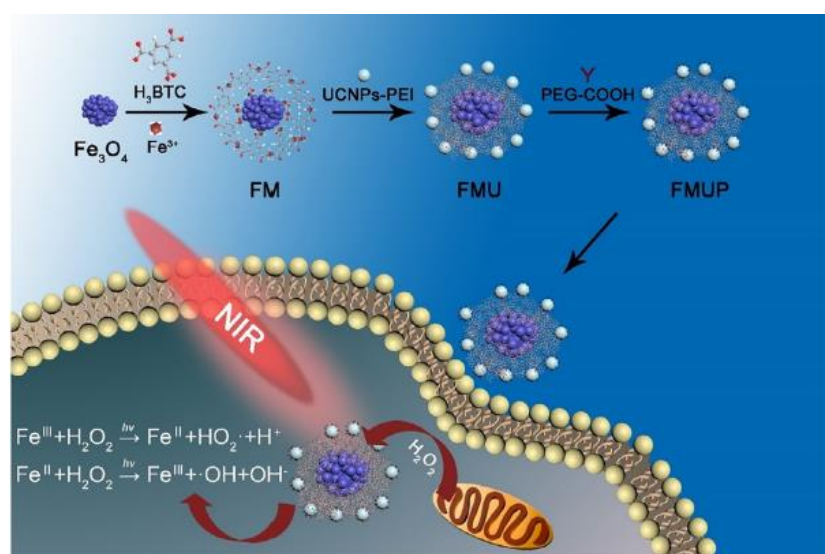


Figure 51. Schematic illustration of the synthesis process of FMUP, and the intracellular photon-Fenton reaction of FMUP with intracellular H₂O₂ under the irradiation of 980 nm. Reprinted from [205] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2018.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

In vivo experiments were performed on mice transplanted with carcinoma cells U14. Starting from a tumour of about 6 mm of diameter, illumination during 15 min at 980 nm ($0.9 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) was followed after 14 days of treatment by a significant inhibition of growth and even a small decrease of the initial tumour diameter. Synergy between PDT and Fenton photoreaction was clearly the reason of such a result.

Tian et al. (2018) [206] integrated chloromethyl group into a Ru(II)-bipyridine complex leading to three chemical structures showed in Figure 52. Known to accumulate easily into mitochondria these complexes generate radicals in presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) abundant in such organelles. These radicals induced strong damages on DNA even in hypoxic conditions, leading to apoptosis. *In vitro*, the cytotoxicity toward SKOV-3 was evaluated, after incubation at different concentrations and irradiation at 470 nm (LED) during 30 min. Complex 3 induced the highest cytotoxicity (between 50 and 10 % of viability). Under hypoxic condition (3% O_2), this complex induced 21.1 % of apoptotic cells after 30 min of irradiation (470 nm, $22.5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). A disadvantage of this method is clearly that complexes were consumed during the PDT treatment, which could be solved by integration of Ru complexes into a drug delivery platform.

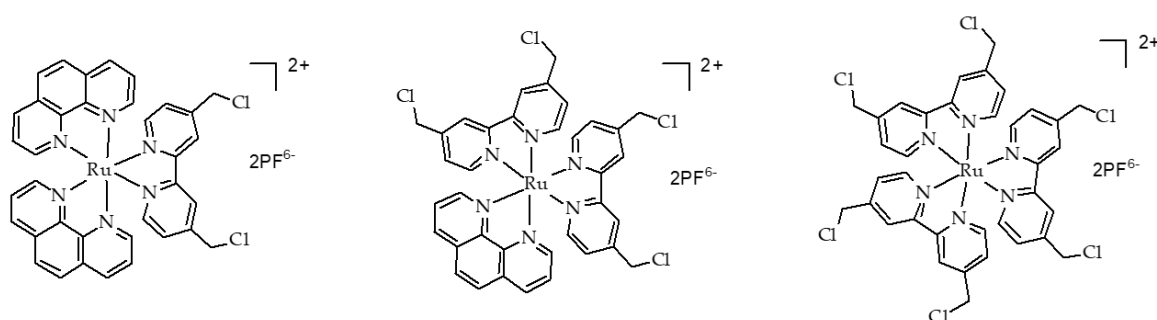


Figure 52. Chemical structures of complexes Ru (II) complexes. Adapted from Tian et al. [206].

Lazic et al. [207] developed three panchromatic PSs (TLD1822, TLD1829 and TLD1824) based on osmium complexes containing different 2,2'-biquinoline (biq) ligands (Figure 53) for PDT applications in both normoxic and hypoxic environment. These compounds presented the particularity to be activatable from 200 to 900 nm and the evaluation of $^1\text{O}_2$ generation by these compounds showed very low ϕ_Δ ($\sim 4\%$) for TLD1822 and TLD1829 and no production of $^1\text{O}_2$ was observed for TLD1824 indicating PDT effect with these molecules was not mediated by $^1\text{O}_2$ but by other ROS.

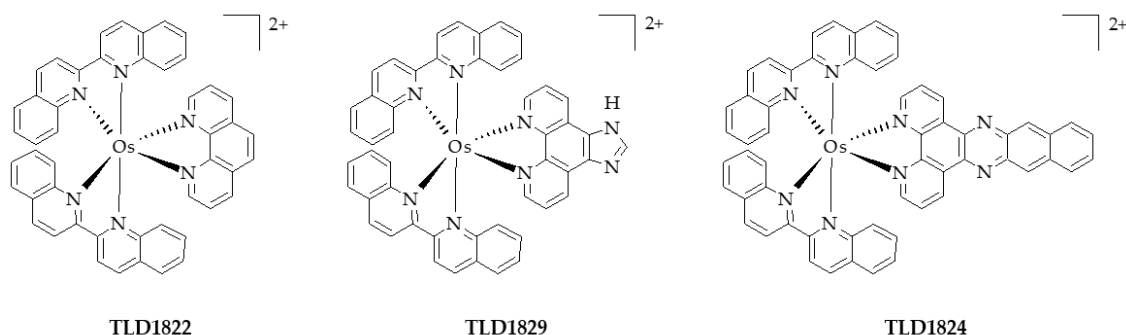


Figure 53. Molecular structures of the osmium-based PSs. Adapted from Lazic et al. [207].

In vitro PDT efficiency was evaluated in both HT1376 (human bladder cells) and U87 (human glioblastoma cells) under NIR (808 nm, $900 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 667 s) or red (625 nm, $450 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for 200 s) light irradiation. The workers first evaluated PDT efficiency in normoxic conditions and observed that all PSs under both irradiations, TLD1829 displayed the highest cytotoxicity in U87 cells whereas for TLD1822 highest cytotoxicity was found in HT1376 cells. Moreover, no significant influence of the type

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

of irradiation was highlighted. In hypoxic conditions, the cytotoxicity of TLD1822 under irradiation was similar to that observed in normoxic conditions contrary to a PS of reference (PPIX) and TLD1829, which losted all their cytotoxicity in hypoxic media. In vivo studies were performed in a subcutaneously colon carcinoma tumour model and the PDT efficiency was evaluated for TLD1829 only under both red (192 or 266 J·cm⁻²) and NIR irradiation (600 J·cm⁻²). Under red light illumination (266 J·cm⁻²), a significant tumour regression was observed with a majority of complete regression. Under NIR light, similar observations could be done. (Table 21)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 21. Summary of publications about the use of PDT type I strategy for a PDT Hypoxia-independent.

Ref	Application	Hypoxia-independent Strategy	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[201]	PDT	Modulation of the mechanism of photoactivation by micelles	mTHPP	532 nm, 20 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂ and others ROS	H2009, A549 and PC-3 cell lines	No
[16]	PDT	Alginate formulation to switch photochemistry of PS from type II to type I	MB	600 nm, 6 mW·cm ⁻²	O ₂ • and others ROS	MDAMB231, 4T1, SKBR3, and MCF7 cell lines	
[202]	PDT	Superoxide radical generator	ENBS-B	660 nm, 14.4 J·cm ⁻² , 15 min	O ₂ •, •OH	HepG2 cell line	HepG2 tumour-bearing mice
[203]	PTT/PDT	Fenton reaction	CFNs	650 nm, 0.49 W·cm ⁻² , 15 min and 808 nm 1.3 W·cm ⁻² , 10 min	•OH, O ₂ •	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[204]	PDT	Type I PSs	Ru (II) complexes	In vitro: white light (400-800 nm) 30 mWcm ⁻² , 10 min In vivo: xenon lamp, 250 mW·cm ⁻² , 15 min	¹ O ₂ and others ROS	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[205]	PDT	Fenton reaction	Fe ₃ O ₄ @MIL-100(Fe)-UCNP	In vitro: 980 nm laser, 0.9 Wcm ⁻² , 10 min In vivo: 980 nm laser, 0.9 Wcm ⁻² , 15 min	•OH	HeLa cell line	U14 tumour-bearing mice
[206]	PDT	Carbon radical generator	Ru(III) complexes	470 nl LED	Carbon radicals	SKOV-3 cell line	No
[207]	PDT	Type I reaction	Os(biq) ₂ (phen)](PF ₆) ₂ , Os(biq) ₂ (IP)](PF ₆) ₂ and Os(biq) ₂ (dppn)](PF ₆) ₂	625 nm (90 J·cm ⁻² = 450 mW·cm ⁻² , 200 s) or 808 nm light (600 J·cm ⁻² = 900 mW·cm ⁻² , 667 s)	¹ O ₂ and oxygen-independent pathways	HT1376 and U87 cell lines	CT26.CL25 tumour-bearing mice

*m*THPP: 5,10,15,20-Tetrakis(*meso*-hydroxyphenyl)porphyrin; MB: Methylene Blue; CFNs: copper ferrite nanosphere.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

5.2. O₂ independent Cytotoxic Compounds

Some other teams have developed compounds which could be photoactivated and do not need O₂ to be cytotoxic. Babii et al. (2016) [208] used a light sensitive diarylethene-derived peptidomimetic (Figure 54), which did not need O₂ to be cytotoxic since it was itself a toxic molecule in its isomeric form, appearing after irradiation by UV or visible light. A new photoswitchable block of peptidomimetics was designed with diarethylene connected to the peptide by a keto group. Absorption of this new compound was shifted to the red for about 50 nm.

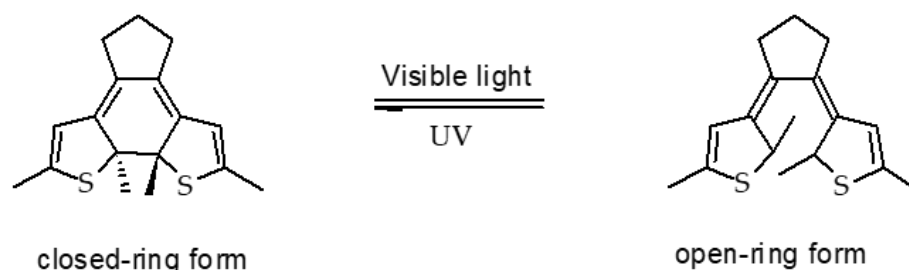


Figure 54. Reversible photoisomerization of the diarylethene core with UV and visible light. Adapted from Babii et al. [208].

Cytotoxicity on HeLa cells and COLO-205 cells showed that the closed ring had always less toxicity (5.5 to 8-fold lower) than the open one (Figure 55). Excitation with 664 nm light led to about 50% transformation from closed-ring form to open-ring form.

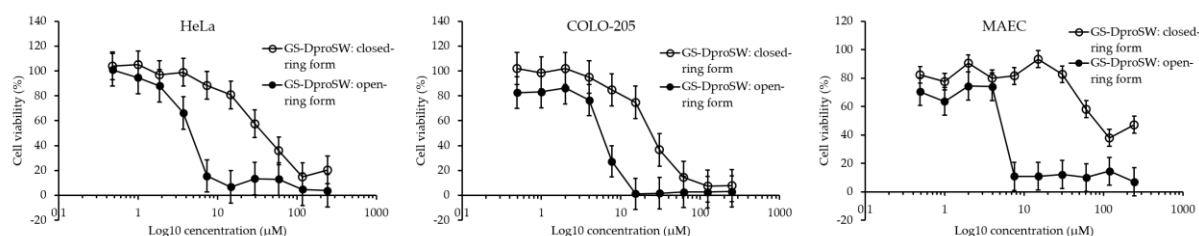


Figure 55. In vitro cytotoxic activities of the two GS-DProSw photoforms as measured in the MTT test. Adapted from Babii et al. [208].

In vivo, the authors used LLC model in C57B1/6 mice and PDT with visible light (100 mW·cm⁻², 20 min), inducing above 60 % more viability of mice after 20 days of therapy.

Fadhel et al. (2016) [209,210] developed in the same work PEG-functionalized and hydrophilic silica NPs-enriched photacid generator (PAG) (Figure 56). These NPs were used to kill HCT-116 cells via an O₂ independent mechanism, involving one or two NIR photon excitation. Under illumination, PAG incorporated in the silica NP functionalized with amines, induced the decrease of the pH inside the cells, leading to their destruction.

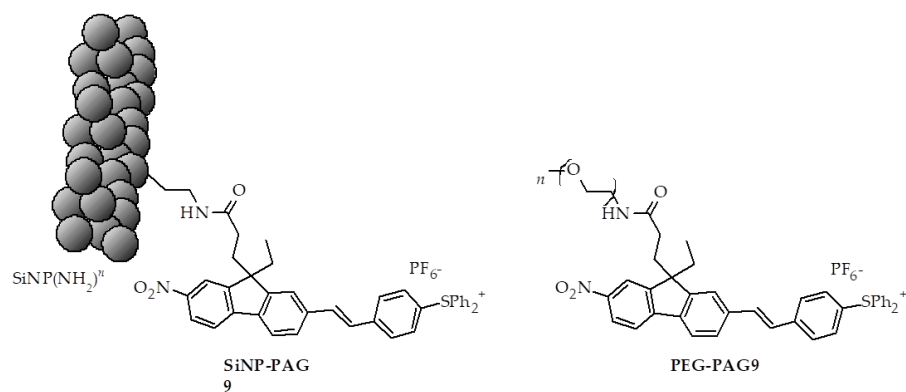


Figure 56. Structure of SiNP-PAG9 and PEG-PAG9. Adapted from Fadhel et al. [209].

Intrinsic toxicity in cells was evaluated after exposure with light at 377 nm ($5.4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min). A viability of 64% for PEG-PAG9 and 42 % for SiNP-PAG9 was found. (Table 22)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 22. Summary of publications about the use of O₂ independent cytotoxic compounds for PDT hypoxia-independent.

Ref	Application	Hypoxia-independent Strategy	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[208]	PDT	Photocontrollable cytotoxic peptidomimetic (photoisomerization)	Diaryletene-derived peptodomimetics	Visible light, 100 mW·cm ⁻² , 20 min	No	HeLa and COLO-205 cell lines	LLC tumour-bearing mice
[209,210]	PDT	Photoacid generators to induce an imbalance of the pH of tumour cells	PAG	In vitro: 377 nm, 5.4 mW·cm ⁻² In vivo: two-photon (710 nm), 2.0 mW·cm ⁻²	No	HCT-116 cell line	No

PAG: photacid generator.

5.3. NO Donors

Several strategies relying on the use of NO donors have been developed to overcome the problem of hypoxia for PDT treatment. Since NO is known to inhibit cell respiration by competition with O₂ by binding on mitochondrion, O₂ consumption in cancer cells is inhibited and the spared O₂ can be used for PDT. Some teams proposed an alternative to the O₂-supply strategy i.e. an O₂-economizer for the PDT treatment of hypoxic tumour.

Recently, Yu et al. [211], synthesized poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanovesicles (PV) in which either sodium nitroprusside (SNP), tetraphenylporphyrin as PS or both were loaded. SNP was a precursor of nitric oxide NO in the presence of thiol compounds such as glutathione or cysteine. The thiols concentration in tumour cells being much higher than in normal cells, NO production was then higher. At the same time, the higher O₂ contain was also evidenced by the use of HIF-1 α and immunofluorescence assay. Thus, NO could be considered as O₂-economizer in hypoxic tumours. This effect was verified in vitro by pO₂ measures and NO release in normal or hypoxic conditions and in the dark or under irradiation (660 nm, 20 mW·cm⁻²). As expected, hypoxic conditions led to lower cell viability than in normoxic ones after 3 min irradiation. However, prolonged irradiation time from 3 min to 10 min induced the death of about 90 % cells. The nature of oxidizing agent(s) was not clearly explicit. In vivo experiments were conducted on 4T1 tumour bearing female BALB/c mice and the first results exhibited a very low tumour growth in the group of PV-TS illuminated by NIR (660 nm, 150 mW·cm⁻², 5 min) and a progressive shrinkage of tumour until eradication.

Heinrich et al. (2013) [212] studied the synergy between ROS and NO. A Ru complex (Ru(phthalocyanine)(pyrazine)₂(Ru(bpy)₂(NO))₂)(PF₆)₆ (Figure 57) was synthesized and produced both NO and ¹O₂ under 660 nm irradiation. NO production depended on excitation wavelength and pH, and reached a maximum value for 377 nm and pH3.0. In vitro, viability of B16F10 cells was found to be minimal at about 22 %, 4 hours after irradiation by 660 nm laser (5 J·cm⁻²). A proposed mechanism was the inhibition of mitochondrial respiration due to NO allowing an increased sparing of O₂.

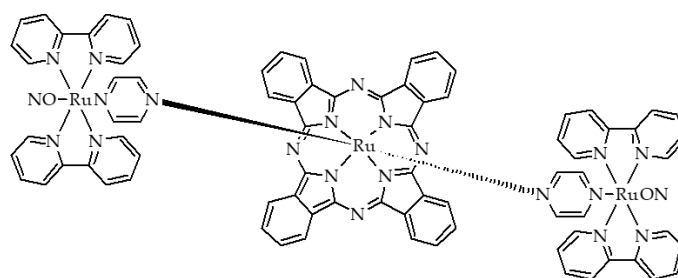


Figure 57. Molecular structure of [Ru(phthalocyanine)(pz)₂{Ru(bpy)₂NO}₂]⁶⁺. Adapted from Heinrich et al. [212].

Wan et al. (2018) [213] also designed a NP taking benefit from the synergy between PDT and NO production. Starting from a porous coordination network (porphyrinic metal-organic framework), containing L-arginine (a NO donor), they coated it with a cancer cell membrane (4T1 cells) and obtained the so-called (L-Arg@PCN@Mem) NPs. Under NIR (640 nm and 720 nm) irradiation, L-Arg reacted with ROS to produce great amount of NO. In vitro, 4T1 cells were incubated under normoxic and hypoxic conditions. The cell death reached up to 71 % in normoxia and 18 % in hypoxia after PDT treatment (660 nm, 30 mW·cm⁻², 8 min), due in part to the long lifetime of NO and its large diffusion coefficient. In vivo experiments on 4T1 tumour bearing mice showed a nearly complete ablation of tumour 14 days after the treatment (660 nm, 200 mW·cm⁻², 10 min).

Deng (2018) et al. [214] synthesized a NO nanogenerator, a glutathione (GSH)-sensitive NO carrier by conjugating S-nitrosothiol to alpha-cyclodextrin, integrated in a supramolecular nanocarrier alpha-CD-Ce6-NO (Figure 58). This compound presented many advantages: 1) acted as GSH scavenger, 2) SMC (smooth muscle cells) relaxation to increase blood flow and 3) NO generation which could react with ROS to produce radical nitrogen species (RNS).

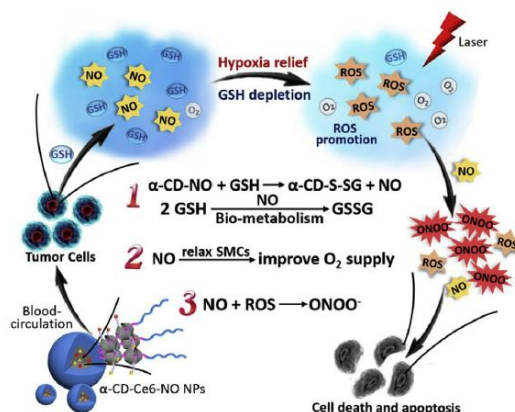


Figure 58. Multiple synergistic effects between NO and PDT generated from the supramolecular NPs α -CD-Ce6-NO NPs to improve therapeutic efficacy. Reprinted from [214] with permission from Elsevier Ltd, Copyright 2018.

After NPs internalization in MCF-7 cells great amount of ROS was produced when cells were exposed to 660 nm laser irradiation without GSH, slightly less when GSH was added, but nevertheless four times larger than NPs without NO. Cell viability (Figure 59) decreased up to 12.6 % when synergy between PDT (660 nm, 0.2 W·cm⁻², 2 min) and NO production was taken into account.

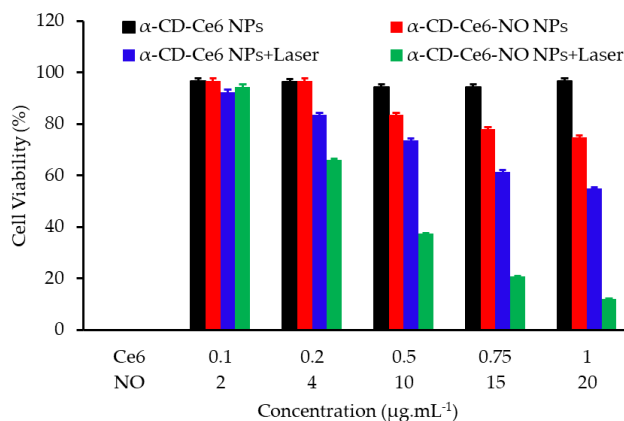


Figure 59. Cytotoxicity of MCF-7 cells incubated with α -CD-Ce6 NPs, α -CD-Ce6-NO NPs, α -CD-Ce6 NPs with laser, and α -CD-Ce6-NO NPs with laser (660 nm, 0.200 W, 2 min). Adapted from Deng et al. [214].

In vivo, tumour growth (nude mice bearing MCF-7 xenograft) was clearly inhibited with this treatment, going up to a complete ablation 21 days after treatment (660 nm, 0.5 W·cm⁻², 5 min). (Table 23)

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 23. Summary of publications about the use of NO donor for PDT hypoxia-independent.

Ref	Application	Hypoxia-independent Strategy	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	Others Radicals	In vitro	In vivo
[211]	PDT	SNP: NO donor to reduce O ₂ consumption	Tetraphenylporphyrin	660 nm, 20 mW·cm ⁻² , 3 or 10 min	¹ O ₂	NO + others ROS	4T1 cells	4T1 tumour-bearing mice
[212]	PDT	Compound able to produce both NO and ¹ O ₂ under irradiation	Ru complex	660 nm, 5 J·cm ⁻²	¹ O ₂	NO	B16F10 cell line	No
[213]	PDT	NO-generation induced by ROS production (NO donor: L-arginine)	Porphyritic metal-organic framework	In vitro: 660 nm, 30 mW·cm ⁻² , 8 min In vivo: 660 nm, 200 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	NO	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice
[214]	PDT	Glutathione-sensitive supramolecular NO nanogenerator	Ce6	In vitro: 660 nm laser, 0.2 W, 2 min In vivo: 660 nm laser, 0.5 W, 5 min		NO + Peroxynitrite anions	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice

NO: Nitric oxide; Ce6: Chlorin e6.

5.4. $^1\text{O}_2$ Donor

We report two teams who have described the use of compounds with endoperoxide able to directly generate $^1\text{O}_2$ under photothermal conditions. Yuan et al. [215] used substituted diphenyl anthracene (DPA) as $^1\text{O}_2$ donor. The endoperoxide of DPA is known to be stable and biocompatible, with a great $^1\text{O}_2$ formation yield. Substituents in various positions affect the cycloreversion. A nanomicelle of 60 nm diameter was synthesized with an amphiphilic block copolymer in which were introduced both ortho-substituted DPA and tetraphenyl porphyrin. IR780 iodide was then encapsulated in the core of the NPs to form PMT NPs. These PMT NPs could produce heat and ROS under illumination at 808 nm, heat conduced to the release of $^1\text{O}_2$ from endoperoxide of DPA. In vitro, PDT was performed onto HepG2 cells (human liver carcinoma) and led to more than 95 % of dead cells, compared to about 20 % when no substituted DPA was used. In vivo experiments on HepG2 tumour bearing mice, with a light density around $1.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ were performed. Large tumour with a volume of 500 mm^3 was treated both with PT NPs (block copolymer different) and PMT NPs. In the first case, growth was inhibited during treatment but accelerated after. In the second case, a decrease of the tumour volume was observed after three days of treatment (808 nm , $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 2-4 min), leading to such a weak value of the volume that cannot be measured.

Han et al. [216] designed pH-responsive micelles (C/O@N-Micelle) with an average size of 43 nm and obtained by self-assembly of the triblock copolymer poly(ethyleneglycol)- β -poly(ϵ -capro-lactone)- β -poly(2-(piperidin-1-yl)ethyl methacrylate) (PEG-b-PCLb-PPEMA) co-encapsulating cypate (a photothermal agent) and a $^1\text{O}_2$ donor (diphenylanthracene endoperoxide, DPAE). Under NIR irradiation (808 nm , $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min), an increase of temperature of 7°C was highlighted confirming the photothermal effect of cypate and an efficient $^1\text{O}_2$ generation due to this effect. In vitro in 4T1 cells, a better cellular uptake of C/O@N-Micelle was observed when the pH was decreased from 7.4 to 6.8 and a high cytotoxic effect was observed under a combined PTT/PDT treatment (808 nm , $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min) with C/O@N-Micelle. In vivo in 4T1 tumour-bearing mice, they confirmed in vitro results with high tumour accumulation, significant hyperthermia and ROS production and an efficient tumour growth inhibition after PTT/PDT treatment with C/O@N-Micelle. (Table 24)

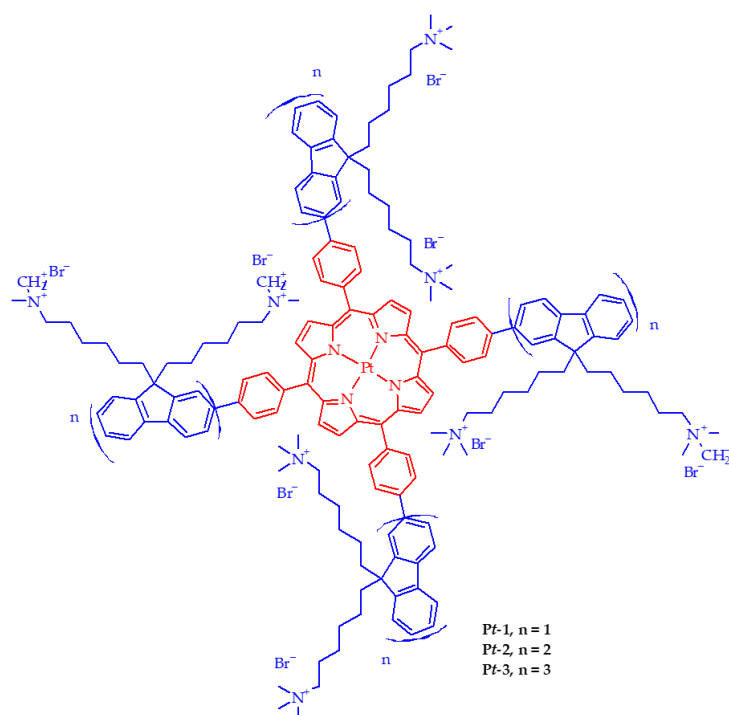


Figure 60. Chemical structures of Pt-1, Pt-2, and Pt-3. Adapted from Lv et al. [217].

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 24. Summary of publications about $^1\text{O}_2$ donor for a PDT Hypoxia-independent.

Ref	Application	Hypoxia-independent Strategy	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[215]	PTT/PDT	Use of $^1\text{O}_2$ donor: endoperoxide of DPA	tetraphenylporphyrin	In vitro: 808 nm, $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 1 min In vivo: 808 nm, $1.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 0-5 min	$^1\text{O}_2$ and others ROS	HepG2 cell line	HepG2 tumour-bearing mice
[216]	PTT/PDT	Use of $^1\text{O}_2$ donor: DPAAE	DPAAE	808 nm, $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 min	ROS	4T1 cell line	4T1 tumour-bearing mice

DPA: diphenylanthracene; DPAAE: diphenylanthracene endoperoxide.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

5.5. Active Compounds in both Normoxic and Hypoxic Conditions

Lv et al. [217] elaborated bifunctional agents, based on Pt (II) porphyrins, for tumour hypoxia imaging and PDT treatment efficient under hypoxia. A Pt (II) porphyrins core and four cationic fluorine oligomers arms with different lengths composed the three agents synthesized (Pt-1, Pt-2 and Pt-3) (Figure 60).

These compounds presented emission in the red with an increase of phosphorescence emission with decreasing level of O₂ and high ϕ_{Δ} of 0.80, 0.86 and 0.92 respectively. Pt-3 showed the lowest aggregation and the highest O₂ sensitivity due to its 3D architecture and was tested in vitro and in vivo. In vitro studies were performed in HeLa cells incubated with Pt-3 and irradiated by light at 520 nm (10 mW·cm⁻², 10 min). The molecule showed high efficiency in normoxic media to kill cancer cells and under hypoxic atmosphere, its efficiency was significantly better than hematoporphyrin used for comparison, with an apparition of apoptosis of cells 1 h after PDT for Pt-3 against 2h for HP. A HeLa xenograft tumour-bearing mice model was used for in vivo studies. Under 520 nm irradiation (160 mW·cm⁻², 10 min), a high decrease of tumour volume was observed for Pt-3 and HP with a more significant decrease for Pt-3.

Pinto et al. [218] investigated a benzophenazine compound (OR141) as a PS for PDT applications under normoxic and hypoxic conditions (Figure 61). They chose this compound after a phenotypic screening.

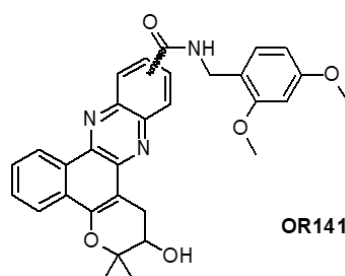


Figure 61. Molecular structure of OR141. Adapted from Pinto et al. [218].

Generation of ¹O₂ was identified as the main photoinduced mechanism by light excitation of OR141. The authors showed that the production of ¹O₂ was independent of the level of O₂ (1 or 21 %) since almost no change was observed between the two conditions contrary to others PS such as verteporfin and MB. They studied in endothelial cells the pathways inhibited under hypoxia by OR141 under light irradiation and found that OR141 inhibited the HIF-2 α expression and the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. Finally, they investigated OR141 efficiency in vivo in a human colon carcinoma xenograft model. The PS accumulated during 4 h after injection and the mice were irradiated with white light (optic fiber, 15 min) after this time. This protocol was repeated each four days and a significant decrease of tumour growth was observed.

Sun et al. [219] developed a novel PS based on a donor-acceptor-donor (DAD) model for targeting mitochondria and be an effective PDT agent. This molecule (Mito-DAD) was composed of an electron-donor (benzodithiophene), a median electron acceptor (benzotriazole), an oligoethylene glycol for a better water solubility, and a mitochondrial targeting unit (four triphenylphosphonium units) (Figure 62).

This compound presented a high ϕ_{Δ} of 0.64 in methanol. Under low O₂ concentrations (5%), the ϕ_{Δ} remained high with a value of 0.52. No ROS generation was observed in the dark but under LED light irradiation an elevation of intracellular ROS was showed. Moreover, the cell death was induced very quickly after 2 min of visible light irradiation (470 nm, 16 mW·cm⁻²). After light irradiation (LED lamp, 3 min), the HeLa cells viability have been shown to be Mito-DAD concentration-dependent with a decrease of viability of 96% to 4.6% with concentration from 0 to 5 μ M whereas under the dark, the cell viability remained superior at 90%.

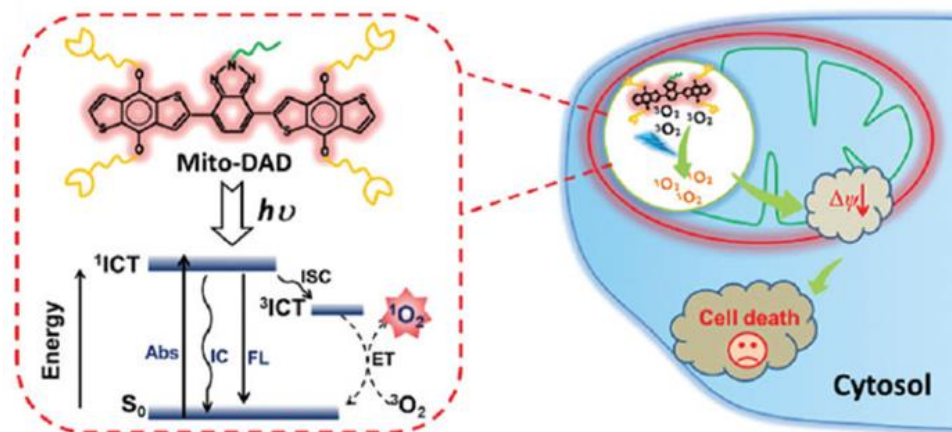


Figure 62. Illustration of enhanced cytotoxicity through photogeneration of $^1\text{O}_2$ by a mitochondria-targeting DAD molecule. Republished from [219] with permission of the Royal Society of Chemistry, Copyright 2018.

Under 5% O_2 concentration, an efficient PDT effect was also observed, after treatment of cells with Mito-DAD and irradiated (LED lamp 470 nm, $16 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) during 5 min, with a percentage of cells viability of only 6.6%.

Wieczorek et al. [220] designed novels porphyrazines incorporated in liposomes for PDT application in both normoxia and hypoxia media. They synthesized three compounds derived from porphyrazines, one of them the tribenzoporphyrazine (Figure 63) presented a ϕ_{Δ} of 0.069 and 0.180 in DMF and DMSO, respectively.

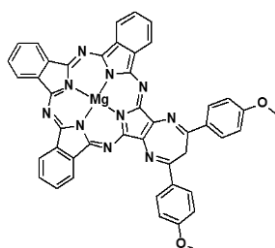


Figure 63. Structure of tribenzoporphyrazine. Adapted from Wieczorek et al. [220].

Two types of liposomes formulations were chosen to incorporate the porphyrazines, the first one, composed of 1- α -phosphatidyl-D,L-glycerol (PG) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), negatively charged and the second one, composed of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (chloride salt, DOTAP) and POPC, positively charged. Porphyrazines alone and their liposomes formulations were tested in vitro in human prostate carcinoma cells (LNCaP). Under normoxic conditions, the tribenzoporphyrazine, as for the DOTAP-POPC and PG-POPC formulations, showed a significant cytotoxicity under light irradiation (690 nm , $2 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). IC_{50} was significantly lower for the both liposome formulations in comparison with tribenzoporphyrazine alone. The same results were observed in hypoxic conditions (1% of O_2). (Table 25)

6. Hypoxia-Dependent PDT

The cell survival and propagation of the tumour are greatly facilitated by a hypoxic TME which is a common factor in tumours. Hypoxia induces a number of complex intracellular signaling pathways, a major one being the HIF pathway. The overexpression of HIF-1 α and HIF-2 α subunits lead to key cellular responses, which cause, among other things, the increase of blood vessel formation, aggressiveness and metastasis.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 25. Summary of publications about the use of active compounds in both normoxic and hypoxic conditions for PDT hypoxia-independent.

Ref	Application	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[217]	PDT	Pt (II) porphyrins linked to cationic oligofluorenes arms	In vitro: 520 nm, 10.0 mW·cm ⁻² , 10 min In vivo: 520 nm, 160 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[218]	PDT	OR141	White light, 15 min	¹ O ₂	Endothelial cells	Human colon carcinoma xenograft model
[219]	PDT	Mito-DAD	470 nm, 16 mW·cm ⁻² , 3 min in normoxia and 5 min in hypoxia	¹ O ₂	HeLa cell line	No
[220]	PDT	Porphyrazines derivatives	690 nm, 2 J·cm ⁻²	¹ O ₂	LNCaP cell line	No

DAD: donor-acceptor-donor.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

The use of hypoxia-responsive drug delivery system for PDT seems to be a rising approach for an improvement of its efficiency, which could be altered by hypoxia. Therefore, several strategies are designed to overcome hypoxia in the treatment of solid cancers such as the development of anti-hypoxia agents, hypoxia-active nanoparticles, and hypoxia-targeting agents for anticancer PDT. The aim of these strategies is to produce O_2 and activate the nanoparticles or agents in the TME, but also to target biomarkers of tumour hypoxia to improve the PSs' effectiveness that are administered.

6.1. Hypoxia-Reducible Compounds

6.1.1. Azobenzene (AZO)

The AZO group ($-N=N-$) can be reduced and cleaved by azoreductase (a typical biomarker of hypoxia) under the hypoxic environment of tumour cells, acts as the hypoxia responsive linker component.

Zhang et al. [221] reported a NP (CPs-CPT-Ce6 NPs) composed of a conjugated polymer containing AZO bridges (CPs), which was hypoxia-responsive, adsorbing Ce6 and camptothecin as chemodrug and coating to PVP. Under irradiation (670 nm, 50 $mW\cdot cm^{-2}$, 10 min), an efficient ROS production by CPs-CPT-Ce6 NPs was observed which induced an enhancement of tumour hypoxia and thus induced the dissociation of NPs by the reductive cleavage of AZO bridges and finally release CPT for an efficient chemo-PDT treatment. Both in vitro in HeLa and NIH3T3 cells and in vivo chemo-PDT (670 nm, 50 $mW\cdot cm^{-2}$, 10 min) studies in HeLa tumour-bearing mice proved the better efficiency of this synergistic treatment in comparison with PDT and chemotherapy alone.

Huang et al. [222] also developed a drug delivery system (DDS) based on the use of hypoxia-induced cleaved AZO bridges composed of gold NPs (AuNPs) functionalized with β -cyclodextrins conjugating on the surface DRHC (double-stranded DNA/RNA hybridization complex) containing HIF-1 α -against antisense oligonucleotide (ASO). A PS (5,10,15,20-tetra-*kis*-(1-methyl-4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine, TMPyP4) was finally loaded on DDS to obtain DDS@TMPyP4. In HepG2 cells and in hypoxic conditions, an effective cleavage of AZO bridges was observed conducting to the release of ASO and a decrease of HIF-1 α expression. In vitro in HepG2 and L02 cells incubated with DDS@TMPyP4, an efficient synergistic effect of hypoxia-triggered ASO release and PDT was observed (660 nm, 1 $W\cdot cm^{-2}$, 30 min).

Piao et al. [223] developed azoSeR based on a seleno-rosamine-based dye (SeR) linked to an AZO. The ϕ_{Δ} was very weak for azoSeR (0.03) in comparison with SeR (0.56) due to the presence of the azo moiety which interfere with the intersystem crossing. In vitro studies were performed in rat liver microsomes to evaluate the ability of NADPH to reduce the AZO in normoxic and hypoxic conditions. Under normoxia, no change on the absorption spectra of azoSeR was observed after addition of NADPH while under hypoxia a new absorbance peak was observed. Its ability to induce cell death under light irradiation (535 nm, 28 $mW\cdot cm^{-2}$, 3 min) was evaluated in human lung cancer-derived A549 cells incubated with the PS under normoxia or hypoxia conditions. The cell death was mainly induced for cells treated under hypoxia. Moreover, azoSeR was able to selectively kill hypoxic cells without ablating normoxic cells. The evaluation of sensitivity of azoSeR to different O_2 concentrations, under light irradiation, showed a significant toxicity even for O_2 concentration of 5% and the authors also observed an increase of cell death in mild hypoxia conditions ($\sim 8\%$ of O_2).

Li et al. [224] developed polymeric micelles which presented the ability to be responsive to both hypoxia and 1O_2 to improve the tumour uptake and the cargo release of the PS in the tumour site. The micelles (mPEG-Azo-PAsp-IM Micelles) were composed by AZO covalently bind to both hydrophilic (mPEG) and hydrophobic (PAsp-IM) polymers, the last one containing the 1O_2 -responsive moiety (imidazole, IM). The micelles were formed by self-assembly of mPEG-Azo-PAsp-IM and could encapsulated Ce6 with a content of $4.1\pm 0.5\%$. The 1O_2 production could induce a rapid drug release whereas the hypoxia conditions could induce a dissection of AZO to enhance the PS uptake in tumour. The micelles without AZO (SR micelles) were synthesized as a comparative to mPEG-Azo-PAsp-IM

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

micelles (DR micelles) for investigation of Ce6 release. The authors showed similar $^1\text{O}_2$ production for both SR and DR micelles under a 660 nm irradiation ($100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) and observed a good Ce6 release due to the dissociation of micelles by oxidation of imidazole moiety by $^1\text{O}_2$. In Lewis lung carcinoma (LLC) cells, the intracellular level of Ce6 was significantly higher after laser irradiation of DR micelles in hypoxic conditions in comparison with SR micelles. In vitro PDT studies in Lewis lung carcinoma (LLC) cells were performed to investigate the efficiency of DR micelles in comparison with Ce6 alone and SR micelles. High similar phototoxicity (irradiation at 660 nm, $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10 min) was observed in hypoxic conditions for Ce6 alone and DR micelles, which 2 folds more than that for SR micelles. Under normoxic conditions, Ce6 alone showed the highest photocytotoxicity and for DR micelles, it was lower than that in hypoxia. The in vivo PDT tests in LLC tumour-bearing mice highlighted a better efficiency of DR micelles in comparison with SR micelles confirming the in vitro studies.

Li et al. [225] designed a light-enhanced hypoxia responsive NP denoted (PAP-FC NPs) for synergic treatment of solid tumours. The PAP molecules were obtained by covalent combination of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) triblock copolymer Pluronic (P123), polyethyleneimine (PEI600), hypoxia-responsive AZO and polyethylene glycol (PEG2000), while FC molecules were obtained by covalent conjugation of Ce6 to triblock copolymer Pluronic F127. At critical micellar concentration, PAP and FC polymers self-assembled into PAP-FC NPs, which ensure the encapsulation of DOX and thus afford PAP-FC/DOX for combined chemo-PDT treatment (Figure 64).

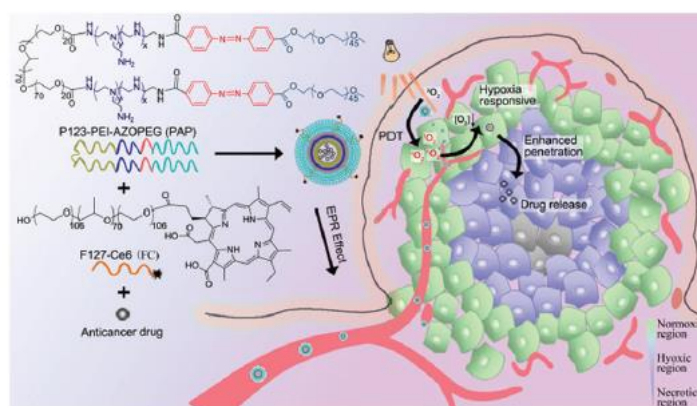


Figure 64. The structure and mechanism of PAP-FC for combined chemo-PDT. Republished from [225] with permission of the Royal Society of Chemistry, Copyright 2018.

According to both the in vitro and in vivo studies against MCF-7 cells, PAP-FC/DOX found to be able to generate high level of $^1\text{O}_2$ upon laser irradiation (660 nm , $8 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 6 min). In addition, followed by consumption of the tissue O_2 , the AZO bond broke quickly in the hypoxia condition, leading to an efficient release of DOX, and therefore triggering apoptosis of the internal tumour cells, which resulted in enhanced antitumour efficacy.

Wang et al. [226] designed a kind of “one stone two birds” living drug delivery system by combining the PDT and hypoxia responsive chemotherapy, denoted as Ce6-PEG-Azo-PCL for cervical cancer treatment. This living drug delivery system was fabricated with three essentials constituents, i.e., AZO, biodegradable hydrophobic poly(ϵ -caprolactone) (PCL), and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG)-conjugated Ce6. Subsequently, the functional NP Ce6-PEG-Azo-PCL was further loaded with DOX to afford Ce6-PEG-Azo-PCL@DOX (DOX@NP). Irradiation of DOX@NP with 671 nm laser (10 mW, 5 min) resulted in high ROS generation. The continuous consumption of O_2 facilitated intracellular hypoxia microenvironment, and triggered the disassembly of hypoxia responsive AZO at tumour site to release loaded DOX resulting in enhanced anticancer effect.

6.1.2. Other

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Chen et al. [227] designed pH-sensitive nanoliposomes constituted by a PS activatable under hypoxia conditions (DiBDP), substituted by a nitro group, and a Cy7-marked anti-HIF-1 α antibody (Ab-DiBDP) for theranostic applications. DiBDP was not able to release $^1\text{O}_2$ due to the nitro group but could be reduced by an enzyme, the nitroreductase (NTR), and thus, was “switched on” and could release $^1\text{O}_2$ (Figure 65). The nanoliposomes showed an average size of 86 ± 17 nm and were able to release quickly 86 % of DiBDP at pH 5.0 within 24 h.

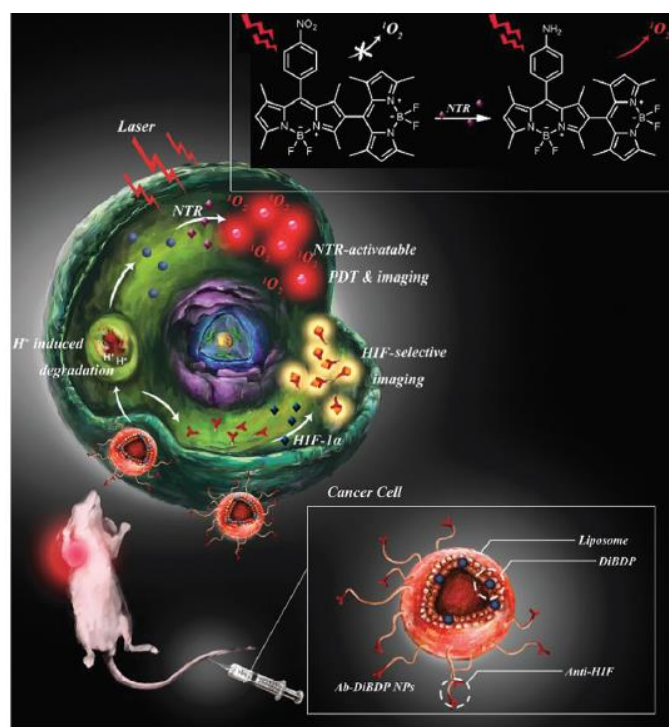


Figure 65. Schematic illustration of Ab-DiBDP NPs for dual hypoxia marker imaging and activatable PDT against tumours. Republished from [227] with permission of the Royal Society of Chemistry, Copyright 2018.

They first evaluated the NTR-activatable generation of $^1\text{O}_2$ induced by the irradiation of DiBDP by using DPBF and showed a high increase of ϕ_{Δ} of the PS, from 0.05 to 0.46 when it was incubated with NTR. They performed the same evaluation for Ab-DiBDP NPs, by using the SOSG and showed a significant increase of SOSG fluorescence with NTR. The combination of Ab-DiBDP NPs and laser in vitro in HeLa cells in hypoxic conditions showed a high cytotoxicity (more than 56 % of cell death). In vivo studies in HeLa tumour-bearing mice were also performed to evaluate the efficiency of Ab-DiBDP NP-mediated PDT. The tumour growth was severely reduced for mice treated with Ab-DiBDP NPs and laser in comparison with other treatments (Ab-NPs + laser and DiBDP + laser). (Table 26)

6.2. Environment-Accumulated Hypoxia Compounds

Evans et al. [228] described the use of a MB like molecule (EtNBS) capable of destroying hypoxic region in the core of 3D models of OVCAR-5 human OvCa cells of metastatic ovarian cancer. EtNBS was capable to incorporate into the core of the nodule. After PDT (652 nm, $15 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, 25 to $300 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) even at low light fluence ($5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) EtNBS could destroy the nodule core cells. At higher fluence, the entire nodule could be destructed. In hypoxic conditions, PDT (670 nm , $100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 5 to $20 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) with EtNBS was still very efficient and the authors could observe significant cell killing at $20 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. In vivo experiments will be performed.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 26. Summary of publications about the use of Hypoxia-reducible compounds for PDT hypoxia-dependent.

Ref	Application	Hypoxia-dependent Strategy	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[221]	Chemo-PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	Ce6	In vitro: 670 nm, 50 mW·cm ⁻² , 6 min In vivo: 670 nm, 50 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa and NIH3T3 cell lines	HeLa tumour-bearing mice
[222]	Chemo-PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	TMPyP4	660 nm, 1 W·cm ⁻² , 30 min	ROS	HepG2 and L02 cell lines	No
[224]	PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	Ce6	In vitro: 660 nm, 100 mW·cm ⁻² , 10 and 5 min In vivo: 660 nm, 200 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	LLC cell line	LLC tumour-bearing mice
[223]	PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	azoSeR	535 nm, 28 mW·cm ⁻² , 3 min	¹ O ₂	A549 cell line	No
[225]	Chemo-PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	Ce6	In vitro: 660 nm, 8 mW·cm ⁻² , 6 min In vivo: 660nm, 8 mW·cm ⁻² , 30 min	¹ O ₂	MCF-7 cell line	MCF-7 tumour-bearing mice
[226]	Chemo-PDT	Hypoxia-cleaved Azobenzene	Ce6	In vitro: 671 nm, 10 mW·cm ⁻² , 5 min In vivo: 671 nm, 150 mW·cm ⁻² , 10 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice
[227]	PDT	Hypoxia-reducible compound by NTR	DiBDP substituted with a nitro group	520 nm, 100 mW·cm ⁻² , 5 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice

Ce6: Chlorin e6; TMPyP4: 5,10,15,20-tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine; azoSeR: azobenzene seleno-rosamine-based dye; NTR: Nitroreductases; DiBDP: dimeric BODIPY.

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Guan et al. [229] synthesized a novel theranostic nanosheet, composed of a metal complex ($\text{Ru}(\text{C-bpy})_2$) loaded to single layered layered double hydroxide (LDH), denoted as $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2/\text{mLDH}$ for theranostic applications. The nanosheets $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2/\text{mLDH}$ showed an average diameter of 35 ± 5 nm and a stronger fluorescence under an excitation at 488 nm for hypoxia media in comparison with normoxic media. Under light excitation (520 nm, $100 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ for 8 min), a significant decrease of cell viability was observed for $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2/\text{mLDH}$ which appeared to be more phototoxic than $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2$ alone. They observed that ϕ_{Δ} was depended of the excitation wavelength and the combination of single layered LDH with the ruthenium complex significantly enhanced the generation of $^1\text{O}_2$ with a ϕ_{Δ} of 0.28 for $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2/\text{mLDH}$ against 0.19 for $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2$ alone. An in vivo model of nude mice bearing subcutaneous HeLa tumour was used to evaluate the PDT efficiency of the nanosheets. The animals treated with $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2/\text{mLDH}$ and irradiation at 520 nm ($100 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) for 8 min, showed a significant suppression of tumour volume in comparison with the control and $\text{Ru}(\text{C-bpy})_2$ groups. (Table 27)

6.3. Other

Guan M. et al. [230] developed a biocompatible, water soluble and photostable PS, the trimethylpyridylporphyrin-C70 (PC_{70}) constituted by C_{70} linked to 5-(4-formyl- phenyl)-10,15,20-tris(4-pyridyl)-porphine (D-TMPyP), which could be used in hypoxic media. PC_{70} could be assembled in a structure similar to liposome with a diameter of 30 nm. In vitro studies in A549 cells were performed to evaluate PDT efficiency of this compound in normoxic and hypoxic conditions. Under normoxic conditions, it was shown that PC_{70} phototoxicity was both concentration and illumination time-dependent. For cells incubated with $1 \mu\text{M}$ of PC_{70} and illuminated with white light ($17 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) during 10 min, the percentage of cell death reached 98 % (Figure 66).

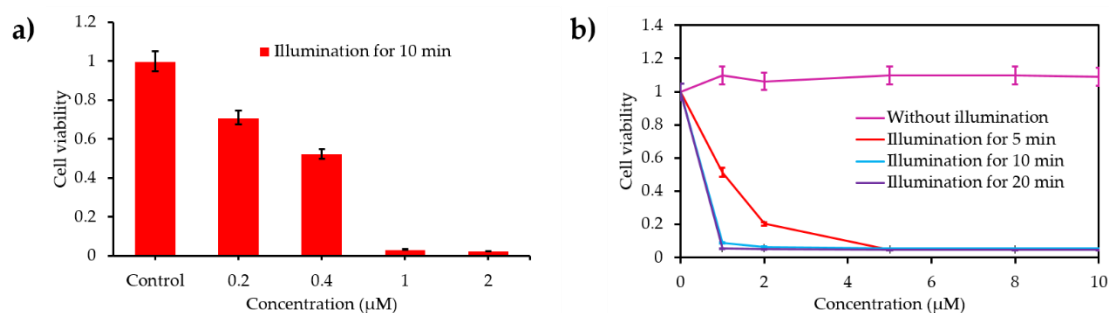


Figure 66: a) Cell viability of A549 cells incubated with PC_{70} at gradient concentrations for 3 h and exposed to light irradiation for 10 min at a power density of $17 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ and b) dose- and time-dependent PDT effects of PC_{70} on the A549 cell viability. Adapted from Guan et al. [230].

Under hypoxic conditions, in the same conditions of irradiation as previously, the photodamage of A459 cells was significantly higher with PC_{70} (80%) in comparison with D-TMPyP (22 %) demonstrating the high potential of PC_{70} under white light illumination, to kill hypoxic cells.

7. Fractional PDT

The strategy is to intermittently irradiate the tumour in order to regulate the consumption of $^3\text{O}_2$ and the formation of $^1\text{O}_2$. This discontinuous irradiation technique proved positive in most cases studied. This phenomenon seems due to the fact that the pulsed irradiation allows an optimal replenishment of cellular O_2 .

CHAPITRE I : La thérapie photodynamique pour traiter le cancer

Table 27. Summary of publications about the use of compounds hypoxia environment-accumulated for PDT hypoxia-dependent.

Ref	Application	PS	Energy of Excitation	Type of ROS	In vitro	In vivo
[228]	PDT	EtNBS	EtNBS-PDT: 652 nm, 15 J·cm ⁻² , 25 to 300 mW·cm ⁻² Hypoxia EtNBS-PDT: 670 nm, 100 mW·cm ⁻² , 5 to 20 J·cm ⁻²	nd	3D adherent OVCAR-5 human OvCa model	No
[229]	PDT	Ru(C-bpy) ₂ /mLDH	520 nm, 100 mW·cm ⁻² , 8 min	¹ O ₂	HeLa cell line	HeLa tumour-bearing mice

nd: not determined.

In 1996, Van Geel et al. [231] investigated the influence of different ways of illumination (single or fractionated) or different fluence rates for a discontinuous illumination, on the PDT efficiency of two PS (Photofrin and *meta*-tetrahydroxyphenylchlorin, mTHPC) in female C3H/Km mice inoculated with RIF1 cells. They first studied the difference between interstitial and superficial illumination and showed that to have the same fluence rate of interstitial illumination they have to increase the time of superficial illumination, by a factor of 2.7. However, they did not observe a significant difference of tumour response with PDT treatment Photofrin for both illuminations whereas they highlighted an increased response with mTHPC under superficial illumination. The fractionated illumination studies were performed only with mTHPC and no marked difference on tumour regrowth was observed between continuous or fractionated illumination. They also tested a single dose application of mTHPC in comparison with two doses (each 24h before the illumination) and observed no difference in the tumour response. However, for a single dose of mTHPC and by varying the time interval between each illumination, even if no change was observed on the delay for tumour regrowth, an increase of cure mice was observed for a time interval of 1h. Moreover, the number of cure mice was better with the injection of two doses of mTHPC. They finally determined that the fluence rate, for a discontinuous illumination had no influence on the tumour response.

In two studies, Klimenko et al. [232,233] studied the influence of the type of irradiation (pulse or continuous) on the O₂ consumption and ¹O₂ generation. A first theoretical model showed a high decrease of O₂ generation and the cumulative ¹O₂ production at high fluence rates under continuous wave (CW) mode whereas, for pulse irradiation mode, a high level of ³O₂ was maintained as the cumulative ¹O₂ concentration, which increased in comparison with CW mode.

Both modes of irradiation were tested *in vitro* in k562 cell line by using radachlorin and the authors observed that there was less cell surviving while CW mode in comparison with pulse mode at fluence of 1.25 and 2.5 J·cm⁻². Moreover, they observed different mechanisms of cell death with the two modes with an apoptotic mechanism for pulse mode and a necrotic mechanism for CW.

Kawauchi et al. [234] in 2004 studied the difference in mouse renal carcinoma cells (Renca) viability and total O₂ consumption and O₂ consumption rate after pulsed laser irradiation (670 nm nanosecond pulsed Nd:YAG laser, peak fluence rate 1 mW·cm⁻², 30 Hz) or continuous laser irradiation (CW, 670 nm, 40 J·cm⁻²) by using (13,17-bis[1-carboxypropionyl]carbamoyl-ethyl-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxy-2,7,12,18-tetramethylporphyrin sodium (PAD-S31). Concerning the cytotoxicity at two different irradiances (180 mW·cm⁻² and 270 mW·cm⁻²), continuous excitation induced more cell viability than pulsed irradiation. The cytotoxic effect was independent of the fluence rate for both excitation modes. The O₂ consumption rate decreased of half after pulsed light compared to CW. The total O₂ consumption was also less important with pulsed light compared to CW. Fluence rates for both excitation modes influenced the O₂ consumption (less O₂ consumption for 270 mW·cm⁻² than for 180 mW·cm⁻²) but did not have any influence on the total O₂ consumed.

In 2016, Turan et al. [235] developed a PS for fractional PDT able to produce ¹O₂ under light irradiation and in the dark. This PS was based on a pyridone (PYR) which could be converted in 2-pyridone endoperoxide (EPO) after light irradiation (650 nm) by reaction with ¹O₂ generated. In the dark EPO was able to release ¹O₂ by thermal conversion and thus returned to the PYR form (Figure 67).

Under alternation of dark and light (650 nm, 15 min) cycles on this PS, a continuous production of ¹O₂ was observed. The PDT efficiency of PYR and EPO was evaluated *in vitro* in HeLa cells and for a better solubility, the compound was incorporated into micelles. After administration of the compounds and 655 nm LED array irradiation (324 μmol·m⁻²·s⁻¹ photon flux) during 10 min repeated every one hour, a significant decrease of cell viability was observed for both compounds.

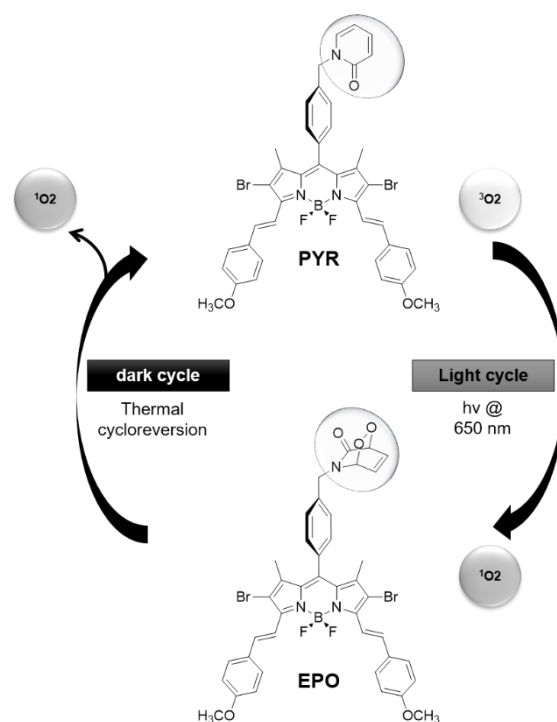


Figure 67. $^1\text{O}_2$ generation achieved first by irradiation of bifunctional compound PYR at $\lambda = 650 \text{ nm}$, and subsequently by thermal cycloreversion in the dark. The cycles can be repeated indefinitely. Adapted from Turan et al. [235].

Moreover, EPO seemed to present a better phototoxic effect with a CC50 (50% cytotoxic concentration) of 8.6 nM against 49.0 nM for PYR. (Table 28)

Table 28. Summary of publications about fractional PDT.

Ref	Application	PS	Excitation Wavelength	Type de ROS	In vitro	In vivo
[231]	Continuous vs. fractional PDT	Photofrin and mTHPC	Interstitial: $628 \pm 3 \text{ nm}$ for Photofrin and $652 \pm 3 \text{ nm}$ for mTHPC Superficial: $100 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$	nd	No	RIF1 tumour-bearing mice
[232,233]	Continuous vs. fractional PDT	Radachlorin	$20 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ Pulse mode: 200 ms – pulse duration, 700 ms - period	$^1\text{O}_2$	k562 cell line	No
[234]	Continuous vs. fractional PDT	PAD-S31	Pulsed: 670 nm nanosecond pulsed Nd:YAG laser, peak fluence rate $1 \text{ MW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 30 Hz CW: 670 nm, $40 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$, $180 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ or $270 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$	nd	Renca cell line	No
[235]	Fractional PDT	Pyridone	655 nm, $324 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ photon flux for 10 min every 1h	$^1\text{O}_2$	HeLa cell line	No

nd: not determined; mTHPC: meta-tetrahydroxyphenylchlorin.

8. Conclusions

The first clinical trial in PDT were performed in 1978 by Dougherty in Roswell Park (Buffalo, NY, USA) and the first approval of PDT using Photofrin for the treatment of bladder cancer was 25 years ago in 1993. Since then, many efforts have been done to improve the chemistry of the PS, the light illumination and also the oxygenation of the tissue. In this review, we collected all the data till March 2019 concerning the improvement of oxygenation for PDT applications. We showed that different strategies can be used to decrease hypoxia, leading to highly efficient treatment, and even metastasis inhibition of aggressive hypoxic malignant cancers. In all the studies, two main approaches have been described concerning hypoxia. In one side, the authors tried to relieved tumor hypoxia by carrying O₂ in tumour or decreasing tumour O₂ consumption and in another side, they used hypoxia to activate their designed platforms and thus improved PDT efficiency. To summarize, five different ways can be followed: 1) playing with the light and realizing fractionated illumination to allow the re-oxygenation of the tissues between two illuminations; 2) designing molecules or NPs that are able to produce ROS even in hypoxic media; 3) adding O₂ into the hypoxic media by transporting O₂ with hemoglobin or perfluorocarbon systems, improving the blood flow by increasing the temperature or with combination of anti-angiogenic compounds, producing O₂ by the decomposition of H₂O₂ in the hypoxic medium; 4) using combined strategies, in particular hypoxic-activated chemotherapy, PTT that does not require O₂ or antiangiogenic therapy and 5) development of hypoxia-activated compounds. These strategies present a significant interest to enhanced cancer-PDT effect by fighting hypoxia. Many in vitro and in vivo experiments in all kind of cancer proved that the decrease of hypoxia really improved PDT efficiency. At this time, no clinical trial is registered using one of this strategy, it should be the next step.

Overcoming hypoxia to improve PDT is a relatively new subject whose interest has been steadily increased since the 1990s. In 1991, Freitas and Baronzio [5] reported a few strategies to fight hypoxia by improving the oxygenation of tumours which rely essentially on the increase of tumour O₂ concentration. In our review, we reported an enhancement of the attention for hypoxia these last years with an increase of publications about hypoxia and PDT year after year. In our point of view, fighting hypoxia could become essential for an efficient PDT treatment of cancer and could lead to significant improvements for the treatment of patients.

Author Contributions: writing-review and editing: L. Larue , B. Myrzakhmetov , A. Ben-Mihoub , A. Moussaron, N. Thomas , P. Arnoux, F. Baros , R. Vanderesse , S. Acherar , C. Frochot

Funding: This research received no external funding

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Semenza, G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **2009**, *29*, 625.
2. Hammond, E.M.; Asselin, M.C.; Forster, D.; O'Connor, J.P.B.; Senra, J.M.; Williams, K.J. The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. *Clin. Oncol.* **2014**, *26*, 277–288.
3. Dang, J.J.; He, H.; Chen, D.L.; Yin, L.C. Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1500–1511.
4. Li, X.; Kwon, N.; Guo, T.; Liu, Z.; Yoon, J. Innovative strategies for hypoxic-tumor photodynamic therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11522–11531.
5. Freitas, I.; Baronzio, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: Possible role in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1991**, *11*, 3–30.
6. Frochot, C.; Mordon, S. Update of the situation of clinical photodynamic therapy in Europe in the 2003–2018 period. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2019**, *23*, 347–357.
7. Price, M.; Heilbrun, L.; Kessel, D. Effects of the oxygenation level on formation of different reactive oxygen species during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 683–686.
8. Freitas, I. Facing hypoxia: A must for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1988**, *2*, 281–282.

9. Busch, T.M.; Hahn, S.M.; Wileyto, E.P.; Koch, C.J.; Fraker, D.L.; Zhang, P.; Putt, M.; Gleason, K.; Shin, D.B.; Emanuele, M.J.; et al. Hypoxia and photofrin uptake in the intraperitoneal carcinomatosis and sarcomatosis of photodynamic therapy patients. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4630–4638.
10. Busch, T.M.; Hahn, S.M.; Evans, S.M.; Koch, C.J. Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: Detection by the hypoxia marker EF3 2-(2-nitroimidazol-1 H -yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl) acetamide. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2636–2642.
11. Hirsch, B.D.; Walz, N.C.; Meeker, B.E.; Arnfield, M.R.; Tulip, J.; McPhee, M.S.; Chapman, J.D. Photodynamic therapy-induced hypoxia in rat-tumors and normal-tissues. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 847–852.
12. Busch, T.M. Hypoxia and perfusion labeling during photodynamic therapy. In *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols*; Gomer, C.J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Volume 635, pp. 107–120.
13. Al-Waili, N.S.; Butler, G.J. Phototherapy and malignancy: Possible enhancement by iron administration and hyperbaric oxygen. *Med. Hypotheses* **2006**, *67*, 1148–1158.
14. Al-Waili, N.S.; Butler, G.J.; Beale, J.; Hamilton, R.W.; Lee, B.Y.; Lucas, P. Hyperbaric oxygen and malignancies: A potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, RA279–RA289.
15. Li, Q.; Huang, C.; Liu, L.; Hu, R.; Qu, J. Enhancing Type I Photochemistry in Photodynamic Therapy Under Near Infrared Light by Using Antennae–Fullerene Complexes. *Cytom. Part A* **2018**, *93*, 997–1003.
16. Usacheva, M.; Swaminathan, S.K.; Kirtane, A.R.; Panyam, J. Enhanced photodynamic therapy and effective elimination of cancer stem cells using surfactant-polymer nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 3186–3195.
17. Ariffin, A.B.; Forde, P.F.; Jahangeer, S.; Soden, D.M.; Hinchion, J. Releasing pressure in tumors: What do we know so far and where do we go from here? A review. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2655–2662.
18. Fuchs, J.; Thiele, J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 835–847.
19. Moen, I.; Stuhr, L.E. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—A review. *Target. Oncol.* **2012**, *7*, 233–242.
20. Hjelde, A.; Gederaas, O.A.; Krokan, H.E.; Brubakk, A.O. Lack of effect of hyperoxia on photodynamic therapy and lipid peroxidation in three different cancer cell lines. *Med. Sci. Monit.* **2005**, *11*, Br351–Br356.
21. Mei, L.H.; Yang, G.; Fang, F. Hyperbaric oxygen combined with 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy inhibited human squamous cell proliferation. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 394–400.
22. Chen, Q.; Beckers, J.; Hetzel, F.W. Modification of tumor response by manipulation of tumor oxygenation. In *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy, Proceedings of SPIE—The International Society for Optical Engineering*, San Jose, CA, USA, 23 January 1999; Dougherty, T.J., Katzir, A., Eds.; International Society for Optics and Photonics: San Diego, CA, USA, 1999; Volume 3592, pp. 60–64.
23. Chen, Q.; Huang, Z.; Chen, H.; Shapiro, H.; Beckers, J.; Hetzel, F.W. Improvement of tumor response to photodynamic therapy by manipulation of tumor oxygenation in an in vivo model system. In *Optics in Health Care and Biomedical Optics: Diagnostics and Treatment*; Chance, B., Chen, M., Yoon, G., Eds.; International Society for Optics and Photonics: San Diego, CA, USA, 2002; Volume 4916, pp. 43–52.
24. Hetzel, F.W.; Shakil, A.; Beckers, J.; Chen, Q. Hyperoxygenation enhances photodynamic therapy tumor cure. In *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy X*; Dougherty, T.J., Ed.; International Society for Optics and Photonics: San Diego, CA, USA, 2001; Volume 4248, pp. 56–59.
25. Huang, Z.; Chen, Q.; Shakil, A.; Chen, H.; Beckers, J.; Shapiro, H.; Hetzel, F.W. Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 496–502.
26. Li, J.Q.; Huang, J.Z.; Ao, Y.X.; Li, S.Y.; Miao, Y.; Yu, Z.Z.; Zhu, L.T.; Lan, X.L.; Zhu, Y.H.; Zhang, Y.; et al. Synergizing upconversion nanophotosensitizers with hyperbaric oxygen to remodel the extracellular matrix for enhanced photodynamic cancer therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 22985–22996.
27. Maier, A.; Anegg, U.; Tomaselli, F.; Rehak, P.; Sankin, O.; Fell, B.; Renner, H.; Pinter, H.; Smolle-Juttner, F.M.; Friehs, G.B. Does hyperbaric oxygen enhance the effect of photodynamic therapy in patients with advanced esophageal carcinoma? A clinical pilot study. *Endoscopy* **2000**, *32*, 42–48.
28. Maier, A.; Anegg, U.; Fell, B.; Rehak, P.; Ratzenhofer, B.; Tomaselli, F.; Sankin, O.; Pinter, H.; Smolle-Juttner, F.M.; Friehs, G.B. Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in the treatment of advanced carcinoma of the cardia and the esophagus. *Lasers Surg. Med.* **2000**, *26*, 308–315.

29. Maier, A.; Tomaselli, F.; Anegg, U.; Rehak, P.; Fell, B.; Luznik, S.; Pinter, H.; Smolle-Juttner, F.M. Combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in carcinoma of the esophagus and the esophago-gastric junction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2000**, *18*, 649–654.
30. Maier, A.; Tomaselli, F.; Matzi, V.; Rehak, P.; Pinter, H.; Smolle-Juttner, F.M. Photosensitization with hematoporphyrin derivative compared to 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy of esophageal carcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* **2001**, *72*, 1136–1140.
31. Maier, A.; Tomaselli, F.; Matzi, V.; Rehak, P.; Pinter, H.; Smolle-Juttner, F.M. Does new photosensitizer improve photodynamic therapy in advanced esophageal carcinoma? *Lasers Surg. Med.* **2001**, *29*, 323–327.
32. Tomaselli, F.; Maier, A.; Pinter, H.; Stranzl, H.; Smolle-Juttner, F.M. Photodynamic therapy enhanced by hyperbaric oxygen in acute endoluminal palliation of malignant bronchial stenosis (clinical pilot study in 40 patients). *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2001**, *19*, 549–554.
33. Tomaselli, F.; Maier, A.; Sankin, O.; Anegg, U.; Stranzl, U.; Pinter, H.; Kapp, K.; Smolle-Juttner, F.M. Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer – A clinical pilot study. *Lasers Surg. Med.* **2001**, *28*, 399–403.
34. Schouwink, H.; Ruevekamp, M.; Oppelaar, H.; van Veen, R.; Baas, P.; Stewart, F.A. Photodynamic therapy for malignant mesothelioma: Preclinical studies for optimization of treatment protocols. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 410–417.
35. Asimov, M.M. The biomedical effect of laser-induced photodissociation of oxyhemoglobin in vivo. *Opt. Spectrosc.* **2013**, *115*, 774–778.
36. Luo, Z.Y.; Zheng, M.B.; Zhao, P.F.; Chen, Z.; Siu, F.M.; Gong, P.; Gao, G.H.; Sheng, Z.H.; Zheng, C.F.; Ma, Y.F.; et al. Self-monitoring artificial red cells with sufficient oxygen supply for enhanced photodynamic therapy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23393.
37. Chen, Z.K.; Liu, L.L.; Liang, R.J.; Luo, Z.Y.; He, H.M.; Wu, Z.H.; Tian, H.; Zheng, M.B.; Ma, Y.F.; Cai, L.T. Bioinspired hybrid protein oxygen nanocarrier amplified photodynamic therapy for eliciting anti-tumor immunity and abscopal effect. *ACS Nano* **2018**, *12*, 8633–8645.
38. Tang, W.; Zhen, Z.P.; Wang, M.Z.; Wang, H.; Chuang, Y.J.; Zhang, W.Z.; Wang, G.D.; Todd, T.; Cowger, T.; Chen, H.M.; et al. Red blood cell-facilitated photodynamic therapy for cancer treatment. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 1757–1768.
39. Wang, P.Y.; Li, X.M.; Yao, C.; Wang, W.X.; Zhao, M.Y.; El -Toni, A.M.; Zhang, F. Orthogonal near-infrared upconversion co-regulated site-specific O₂ delivery and photodynamic therapy for hypoxia tumor by using red blood cell microcarriers. *Biomaterials* **2017**, *125*, 90–100.
40. Cao, H.Q.; Wang, L.; Yang, Y.; Li, J.; Qi, Y.F.; Li, Y.; Li, Y.; Wang, H.; Li, J.B. An assembled nanocomplex for improving both therapeutic efficiency and treatment depth in photodynamic therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7759–7763.
41. Guo, X.M.; Qua, J.X.; Zhu, C.Q.; Li, W.; Luo, L.H.; Yang, J.; Yin, X.Y.; Li, Q.P.; Du, Y.Z.; Chen, D.W.; et al. Synchronous delivery of oxygen and photosensitizer for alleviation of hypoxia tumor microenvironment and dramatically enhanced photodynamic therapy. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 585–599.
42. Liu, L.; Li, T.W.; Ruan, Z.; Yan, L.F. Polypeptide-based artificial erythrocytes conjugated with near infrared photosensitizers for imaging-guided photodynamic therapy. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*, 9368–9381.
43. Xu, X.; Cui, Y.C.; Bu, H.X.; Chen, J.M.; Li, Y.; Tang, G.P.; Wang, L.Q. A photosensitizer loaded hemoglobin-polymer conjugate as a nanocarrier for enhanced photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 1825–1833.
44. Liu, W.L.; Liu, T.; Zou, M.Z.; Yu, W.Y.; Li, C.X.; He, Z.Y.; Zhang, M.K.; Liu, M.D.; Li, Z.H.; Feng, J.; et al. Aggressive man-made red blood cells for hypoxia-resistant photodynamic therapy. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1802006.
45. Gao, S.T.; Zheng, P.L.; Li, Z.H.; Feng, X.C.; Yan, W.X.; Chen, S.Z.; Guo, W.S.; Liu, D.D.; Yang, X.J.; Wang, S.X.; et al. Biomimetic O₂-Evolving metal-organic framework nanoplatfor for highly efficient photodynamic therapy against hypoxic tumor. *Biomaterials* **2018**, *178*, 83–94.
46. Rapoport, N.; Nam, K.H.; Gupta, R.; Gao, Z.; Mohan, P.; Payne, A.; Todd, N.; Liu, X.; Kim, T.; Shea, J.; et al. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. *J. Control. Release* **2011**, *153*, 4–15.
47. Young, L.H.; Jaffe, C.C.; Revkin, J.H.; McNulty, P.H.; Cleman, M. Metabolic and functional effects of perfluorocarbon distal perfusion during coronary angioplasty. *Am. J. Cardiol.* **1990**, *65*, 986–990.

48. Cheng, Y.H.; Cheng, H.; Jiang, C.X.; Qiu, X.F.; Wang, K.K.; Huan, W.; Yuan, A.; Wu, J.H.; Hu, Y.Q. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8785.
49. Day, R.A.; Estabrook, D.A.; Logan, J.K.; Sletten, E.M. Fluorous photosensitizers enhance photodynamic therapy with perfluorocarbon nanoemulsions. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 13043–13046.
50. Liu, C.H.; Dong, H.F.; Wu, N.Q.; Cao, Y.; Zhang, X.J. Plasmonic resonance energy transfer enhanced photodynamic therapy with Au@SiO₂@Cu₂O/perfluorohexane nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 6991–7002.
51. Que, Y.R.; Liu, Y.J.; Tan, W.; Feng, C.; Shi, P.; Li, Y.J.; Huang, X. Enhancing photodynamic therapy efficacy by using fluorinated nanoplatform. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 168–173.
52. Sheng, D.L.; Liu, T.Z.; Deng, L.M.; Zhang, L.; Li, X.L.; Xu, J.; Hao, L.; Li, P.; Ran, H.T.; Chen, H.R.; et al. Perfluorooctyl bromide & indocyanine green co-loaded nanoliposomes for enhanced multimodal imaging-guided phototherapy. *Biomaterials* **2018**, *165*, 1–13.
53. Song, X.J.; Feng, L.Z.; Liang, C.; Yang, K.; Liu, Z. Ultrasound triggered tumor oxygenation with oxygen-shuttle nanoparfluorocarbon to overcome hypoxia-associated resistance in cancer therapies. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 6145–6153.
54. Tang, W.; Yang, Z.; Wang, S.; Wang, Z.T.; Song, J.B.; Yu, G.C.; Fan, W.P.; Dai, Y.L.; Wang, J.J.; Shan, L.L.; et al. Organic semiconducting photoacoustic nanodroplets for laser-activatable ultrasound imaging and combinational cancer therapy. *ACS Nano* **2018**, *12*, 2610–2622.
55. Tang, X.L.; Cheng, Y.H.; Huang, S.T.; Zhi, F.; Yuan, A.H.; Hu, Y.Q.; Wu, J.H. Overcome the limitation of hypoxia against photodynamic therapy to treat cancer cells by using perfluorocarbon nanodroplet for photosensitizer delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *487*, 483–487.
56. Tao, D.L.; Feng, L.Z.; Chao, Y.; Liang, C.; Song, X.J.; Wang, H.R.; Yang, K.; Liu, Z. Covalent organic polymers based on fluorinated porphyrin as oxygen nanoshuttles for tumor hypoxia relief and enhanced photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1804901.
57. Wang, J.P.; Liu, L.; You, Q.; Song, Y.L.; Sun, Q.; Wang, Y.D.; Cheng, Y.; Tan, F.P.; Li, N. All-in-one theranostic nanoplatform based on hollow mosx for photothermally-maneuvered oxygen self-enriched photodynamic therapy. *Theranostics* **2018**, *8*, 955–971.
58. Wang, Q.; Li, J.M.; Yu, H.; Deng, K.; Zhou, W.; Wang, C.X.; Zhang, Y.; Li, K.H.; Zhuo, R.X.; Huang, S.W. Fluorinated polymeric micelles to overcome hypoxia and enhance photodynamic cancer therapy. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 3096–3107.
59. Yu, M.; Xu, X.L.; Cai, Y.J.; Zou, L.Y.; Shuai, X.T. Perfluorohexane-cored nanodroplets for stimulations-responsive ultrasonography and O₂-potentiated photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *175*, 61–71.
60. Yuan, P.; Ruan, Z.; Jiang, W.; Liu, L.; Dou, J.X.; Li, T.W.; Yan, L.F. Oxygen self-sufficient fluorinated polypeptide nanoparticles for NIR imaging-guided enhanced photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2323–2331.
61. Zhang, L.; Wang, D.; Yang, K.; Sheng, D.L.; Tan, B.; Wang, Z.G.; Ran, H.T.; Yi, H.J.; Zhong, Y.X.; Lin, H.; et al. Mitochondria-targeted artificial “nano-RBCs” for amplified synergistic cancer phototherapy by a single NIR irradiation. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1800049.
62. Zhao, C.Y.; Tong, Y.J.; Li, X.L.; Shao, L.H.; Chen, L.; Lu, J.Q.; Deng, X.W.; Wang, X.; Wu, Y. Photosensitive nanoparticles combining vascular-independent intratumor distribution and on-demand oxygen-depot delivery for enhanced cancer photodynamic therapy. *Small* **2018**, *14*, 1703045.
63. Hu, D.R.; Zhong, L.; Wang, M.Y.; Li, H.H.; Qu, Y.; Liu, Q.Y.; Han, R.X.; Yuan, L.P.; Shi, K.; Peng, J.R.; et al. Perfluorocarbon-loaded and redox-activatable photosensitizing agent with oxygen supply for enhancement of fluorescence/photoacoustic imaging guided tumor photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1806199.
64. Hu, H.M.; Yan, X.F.; Wang, H.; Tanaka, J.; Wang, M.Z.; You, W.; Li, Z.B. Perfluorocarbon-based O₂ nanocarrier for efficient photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 1116–1123.
65. Ma, S.N.; Zhou, J.; Zhang, Y.X.; Yang, B.; He, Y.Y.; Tian, C.; Xu, X.H.; Gu, Z.W. An oxygen self-sufficient fluorinated nanoplatform for relieved tumor hypoxia and enhanced photodynamic therapy of cancers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 7731–7742.

66. Khan, M.S.; Hwang, J.; Lee, K.; Choi, Y.; Kim, K.; Koo, H.J.; Hong, J.W.; Choi, J. Oxygen-carrying micro/nanobubbles: Composition, synthesis techniques and potential prospects in photo-triggered theranostics. *Molecules* **2018**, *23*, 2210.
67. Huang, W.C.; Shen, M.Y.; Chen, H.H.; Lin, S.C.; Chiang, W.H.; Wu, P.H.; Chang, C.W.; Chiang, C.S.; Chiu, H.C. Monocytic delivery of therapeutic oxygen bubbles for dual-modality treatment of tumor hypoxia. *J. Control. Release* **2015**, *220*, 738–750.
68. Song, R.Y.; Hu, D.H.; Chung, H.Y.; Sheng, Z.H.; Yao, S.H. Lipid-polymer bilaminar oxygen nanobubbles for enhanced photodynamic therapy of cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 36805–36813.
69. Niu, N.; Zhang, Z.; Gao, X.; Chen, Z.J.; Li, S.J.; Li, J. Photodynamic therapy in hypoxia: Near-infrared-sensitive, self-supported, oxygen generation nano-platform enabled by upconverting nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **2018**, *352*, 818–827.
70. Castells, M.; Thibault, B.; Delord, J.P.; Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: Tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9545–9571.
71. Sztatowski, T.P.; Nathan, C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 794–798.
72. Chen, Q.; Chen, J.; Liang, C.; Feng, L.; Dong, Z.; Song, X.; Song, G.; Liu, Z. Drug-induced co-assembly of albumin/catalase as smart nano-theranostics for deep intra-tumoral penetration, hypoxia relieve, and synergistic combination therapy. *J. Control. Release* **2017**, *263*, 79–89.
73. Liu, C.-P.; Wu, T.-H.; Liu, C.-Y.; Chen, K.-C.; Chen, Y.-X.; Chen, G.-S.; Lin, S.-Y. Self-Supplying O₂ through the Catalase-Like Activity of Gold Nanoclusters for Photodynamic Therapy against Hypoxic Cancer Cells. *Small* **2017**, *13*, 1700278.
74. Policastro, L.; Molinari, B.; Larcher, F.; P. Blanco; Podhajcer, O.L.; Costa, C.S.; Rojas, P.; Duran, H. Imbalance of antioxidant enzymes in tumor cells and inhibition of proliferation and malignant features by scavenging hydrogen peroxide. *Mol. Carcinog.* **2004**, *39*, 103–113.
75. Onumah, O.E.; Jules, G.E.; Zhao, Y.; Zhou, L.; Yang, H.; Guo, Z. Overexpression of catalase delays G0/G1- to S-phase transition during cell cycle progression in mouse aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 1658–1667.
76. Xu, X.L.; Shao, J.; Chen, Q.Y.; Li, C.H.; Kong, M.Y.; Fang, F.; Ji, L.; Boison, D.; Huang, T.; Gao, J.; et al. A Mn(II) complex of boradiazaindacene (BODIPY) loaded graphene oxide as both LED light and H₂O₂ enhanced anticancer agent. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *159*, 1–6.
77. Zhu, W.W.; Dong, Z.L.; Fu, T.T.; Liu, J.J.; Chen, Q.; Li, Y.G.; Zhu, R.; Xu, L.G.; Liu, Z. Modulation of hypoxia in solid tumor microenvironment with MnO₂ nanoparticles to enhance photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 5490–5498.
78. Chu, C.C.; Lin, H.R.; Liu, H.; Wang, X.Y.; Wang, J.Q.; Zhang, P.F.; Gao, H.Y.; Huang, C.; Zeng, Y.; Tan, Y.Z.; et al. Tumor microenvironment-triggered supramolecular system as an in situ nanotheranostic generator for cancer phototherapy. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1605928.
79. Gao, S.; Wang, G.H.; Qin, Z.N.; Wang, X.Y.; Zhao, G.Q.; Ma, Q.J.; Zhu, L. Oxygen-generating hybrid nanoparticles to enhance fluorescent/photoacoustic/ultrasound imaging guided tumor photodynamic therapy. *Biomaterials* **2017**, *112*, 324–335.
80. Hao, Y.W.; Zhang, B.X.; Zheng, C.X.; Niu, M.Y.; Guo, H.C.; Zhang, H.L.; Chang, J.B.; Zhang, Z.Z.; Wang, L.; Zhang, Y. Multifunctional nanoplatform for enhanced photodynamic cancer therapy and magnetic resonance imaging. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2017**, *151*, 384–393.
81. Kim, J.; Cho, H.R.; Jeon, H.; Kim, D.; Song, C.; Lee, N.; Choi, S.H.; Hyeon, T. Continuous O₂-evolving MnFe₂O₄ nanoparticle-anchored mesoporous silica nanoparticles for efficient photodynamic therapy in hypoxic cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10992–10995.
82. Liu, H.; Liu, Y.; Chu, C.C.; Tong, H.P.; Xue, W.; Wang, J.Q.; Liu, G.; Zhang, W.G. Intelligent albumin-stabilized manganese dioxide nanocomposites for tumor microenvironment responsive phototherapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2017**, *13*, 1321–1332.
83. Ma, Z.F.; Jia, X.D.; Bai, J.; Ruan, Y.D.; Wang, C.; Li, J.M.; Zhang, M.C.; Jiang, X. MnO₂ Gatekeeper: An intelligent and O₂-evolving shell for preventing premature release of high cargo payload core, overcoming tumor hypoxia, and acidic H₂O₂-sensitive MRI. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1604258.

84. Ai, X.Z.; Hu, M.; Wang, Z.M.; Lyu, L.N.; Zhang, W.M.; Li, J.; Yang, H.H.; Lin, J.; Xing, B.G. Enhanced cellular ablation by attenuating hypoxia status and reprogramming tumor-associated macrophages via NIR light-responsive upconversion nanocrystals. *Bioconj. Chem.* **2018**, *29*, 928–938.
85. Gu, T.X.; Cheng, L.; Gong, F.; Xu, J.; Li, X.; Han, G.R.; Liu, Z. Upconversion composite nanoparticles for tumor hypoxia modulation and enhanced near-infrared-triggered photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 15494–15503.
86. Chen, S.Q.; Jia, Q.Y.; Zheng, X.L.; Wen, Y.M.; Liu, W.M.; Zhang, H.Y.; Ge, J.C.; Wang, P.F. PEGylated carbon dot/MnO₂ nanohybrid: A new pH/H₂O₂-driven, turn-on cancer nanotheranostics. *Sci. China Mater.* **2018**, *61*, 1325–1338.
87. He, Z.M.; Xiao, Y.; Zhang, J.R.; Zhang, P.H.; Zhu, J.J. In situ formation of large pore silica-MnO₂ nanocomposites with H⁺/H₂O₂ sensitivity for O₂-elevated photodynamic therapy and potential MR imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2962–2965.
88. Kapri, S.; Bhattacharyya, S. Molybdenum sulfide-reduced graphene oxide p-n heterojunction nanosheets with anchored oxygen generating manganese dioxide nanoparticles for enhanced photodynamic therapy. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 8982–8989.
89. Liang, R.J.; Liu, L.L.; He, H.M.; Chen, Z.K.; Han, Z.Q.; Luo, Z.Y.; Wu, Z.H.; Zheng, M.B.; Ma, Y.F.; Cai, L.T. Oxygen-boosted immunogenic photodynamic therapy with gold nanocages@manganese dioxide to inhibit tumor growth and metastases. *Biomaterials* **2018**, *177*, 149–160.
90. Zhou, L.H.; Wu, Y.Y.; Meng, X.Q.; Li, S.P.; Zhang, J.L.; Gong, P.; Zhang, P.F.; Jiang, T.; Deng, G.J.; Li, W.J.; et al. Dye-anchored MnO nanoparticles targeting tumor and inducing enhanced phototherapy effect via mitochondria-mediated pathway. *Small* **2018**, *14*, 1801008.
91. Lin, T.S.; Zhao, X.Z.; Zhao, S.; Yu, H.; Cao, W.M.; Chen, W.; Wei, H.; Guo, H.Q. O₂-generating MnO₂ nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bladder cancer by ameliorating hypoxia. *Theranostics* **2018**, *8*, 990–1004.
92. Wang, R.G.; Zhao, M.Y.; Deng, D.; Ye, X.; Zhang, F.; Chen, H.; Kong, J.L. An intelligent and biocompatible photosensitizer conjugated silicon quantum dots-MnO₂ nanosystem for fluorescence imaging-guided efficient photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 4592–4601.
93. Zhu, H.J.; Li, J.C.; Qi, X.Y.; Chen, P.; Pu, K.Y. Oxygenic hybrid semiconducting nanoparticles for enhanced photodynamic therapy. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 586–594.
94. Zhu, W.; Zhang, L.; Yang, Z.; Liu, P.; Wang, J.; Cao, J.; Shen, A.; Xu, Z. An efficient tumor-inducible nanotheranostics for magnetic resonance imaging and enhanced photodynamic therapy. *Chem. Eng. J.* **2019**, *358*, 969–979.
95. Liu, J.; Du, P.; Liu, T.; Cordova Wong, B.J.; Wang, W.; Ju, H.; Lei, J. A black phosphorus/manganese dioxide nanoplatfrom: Oxygen self-supply monitoring, photodynamic therapy enhancement and feedback. *Biomaterials* **2019**, *192*, 179–188.
96. Cao, Y.; Meng, X.D.; Wang, D.D.; Zhang, K.; Dai, W.H.; Dong, H.F.; Zhang, X.J. Intelligent MnO₂/Cu₂-xS for multimode imaging diagnostic and advanced single-laser irradiated photothermal/photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 17732–17741.
97. Yin, Z.H.; Chen, D.P.; Zou, J.H.; Shao, J.J.; Tang, H.; Xu, H.; Si, W.L.; Dong, X.C. Tumor microenvironment responsive oxygen-self-generating nanoplatfrom for dual-imaging guided photodynamic and photothermal therapy. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 4366–4373.
98. Liu, X.; Tian, K.; Zhang, J.; Zhao, M.; Liu, S.; Zhao, Q.; Huang, W. Smart NIR-light-mediated nanotherapeutic agents for enhancing tumor accumulation and overcoming hypoxia in synergistic cancer therapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 1225–1232.
99. Chen, Q.; Feng, L.Z.; Liu, J.J.; Zhu, W.W.; Dong, Z.L.; Wu, Y.F.; Liu, Z. Intelligent albumin-MnO₂ nanoparticles as pH-/H₂O₂-responsive dissociable nanocarriers to modulate tumor hypoxia for effective combination therapy. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 7129–7136.
100. Zhang, W.T.; Li, S.H.; Liu, X.N.; Yang, C.Y.; Hu, N.; Dou, L.N.; Zhao, B.X.; Zhang, Q.Y.; Suo, Y.R.; Wang, J.L. Oxygen-generating MnO₂ nanodots-anchored versatile nanoplatfrom for combined chemo-photodynamic therapy in hypoxic cancer. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706375.
101. Fan, W.P.; Bu, W.B.; Shen, B.; He, Q.J.; Cui, Z.W.; Liu, Y.Y.; Zheng, X.P.; Zhao, K.L.; Shi, J.L. Intelligent MnO₂ nanosheets anchored with upconversion nanoprobles for concurrent pH-/H₂O₂-responsive UCL imaging and oxygen-elevated synergetic therapy. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 4155–4161.

102. He, D.G.; Hai, L.; He, X.; Yang, X.; Li, H.W. Glutathione-activatable and O₂/Mn²⁺-evolving nanocomposite for highly efficient and selective photodynamic and gene-silencing dual therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1704089.
103. Jia, Q.Y.; Ge, J.C.; Liu, W.M.; Zheng, X.L.; Chen, S.Q.; Wen, Y.M.; Zhang, H.Y.; Wang, P.F. A magnetofluorescent carbon dot assembly as an acidic H₂O₂-driven oxygenerator to regulate tumor hypoxia for simultaneous bimodal imaging and enhanced photodynamic therapy. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706090.
104. Chen, H.C.; Tian, J.W.; He, W.J.; Guo, Z.J. H₂O₂-Activatable and O₂-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1539–1547.
105. Zhang, Y.; Shen, T.T.; Kirillov, A.M.; Liu, W.S.; Tang, Y. NIR light/H₂O₂-triggered nanocomposites for a highly efficient and selective synergistic photodynamic and photothermal therapy against hypoxic tumor cells. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7939–7942.
106. Hu, D.H.; Chen, Z.W.; Sheng, Z.H.; Gao, D.Y.; Yan, F.; Ma, T.; Zheng, H.R.; Hong, M. A catalase-loaded hierarchical zeolite as an implantable nanocapsule for ultrasound-guided oxygen self-sufficient photodynamic therapy against pancreatic cancer. *Nanoscale* **2018**, *10*, 17283–17292.
107. Cheng, H.; Zhu, J.Y.; Li, S.Y.; Zeng, J.Y.; Lei, Q.; Chen, K.W.; Zhang, C.; Zhang, X.Z. An O₂ self-sufficient biomimetic nanoplatform for highly specific and efficient photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 7847–7860.
108. Yang, G.B.; Xu, L.G.; Xu, J.; Zhang, R.; Song, G.S.; Chao, Y.; Feng, L.Z.; Han, F.X.; Dong, Z.L.; Li, B.; et al. Smart nanoreactors for pH-responsive tumor homing, mitochondria-targeting, and enhanced photodynamic-immunotherapy of cancer. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 2475–2484.
109. Yang, G.B.; Xu, L.G.; Xu, J.; Zhang, R.; Song, G.S.; Chao, Y.; Feng, L.Z.; Han, F.X.; Dong, Z.L.; Li, B.; et al. Smart nanoreactors for pH-responsive tumor homing, mitochondria-targeting, and enhanced photodynamic-immunotherapy of cancer. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 2475–2484.
110. Shen, L.Y.; Huang, Y.; Chen, D.; Qiu, F.; Ma, C.; Jin, X.; Zhu, X.Y.; Zhou, G.Y.; Zhang, Z.Y. pH-Responsive aerobic nanoparticles for effective photodynamic therapy. *Theranostics* **2017**, *7*, 4537–4550.
111. Zhao, H.J.; Li, L.; Zheng, C.X.; Hao, Y.W.; Niu, M.Y.; Hu, Y.J.; Chang, J.B.; Zhang, Z.Z.; Wang, L. An intelligent dual stimuli-responsive photosensitizer delivery system with O₂-supplying for efficient photodynamic therapy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2018**, *167*, 299–309.
112. Wu, P.; Cai, Z.; Chen, J.; Zhang, H.; Cai, C. Electrochemical measurement of the flux of hydrogen peroxide releasing from RAW 264.7 macrophage cells based on enzyme-attapulgit clay nanohybrids. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4012–4017.
113. Lu, K.Y.; Lin, P.Y.; Chuang, E.Y.; Shih, C.M.; Cheng, T.M.; Lin, T.Y.; Sung, H.W.; Mi, F.L. H₂O₂-Depleting and O₂-generating selenium nanoparticles for fluorescence imaging and photodynamic treatment of proinflammatory-activated macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 5158–5172.
114. Ouyang, J.; Wang, L.Q.; Chen, W.S.; Zeng, K.; Han, Y.J.; Xu, Y.; Xu, Q.F.; Deng, L.; Liu, Y.N. Biomimetic nanothylakoids for efficient imaging-guided photodynamic therapy for cancer. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 3468–3471.
115. Sheptovitsky, Y.G.; Brudvig, G.W. Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry (Mosc)* **1996**, *35*, 16255–16263.
116. Wang, H.R.; Chao, Y.; Liu, J.J.; Zhu, W.W.; Wang, G.L.; Xu, L.G.; Liu, Z.G. Photosensitizer-crosslinked in-situ polymerization on catalase for tumor hypoxia modulation & enhanced photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *181*, 310–317.
117. Ruan, Y.D.; Jia, X.D.; Wang, C.; Zhen, W.Y.; Jiang, X. Mn-Fe layered double hydroxide nanosheets: A new photothermal nanocarrier for O₂-evolving phototherapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11729–11732.
118. Yang, Y.; Zhu, W.J.; Feng, L.Z.; Chao, Y.; Yi, X.; Dong, Z.L.; Yang, K.; Tan, W.H.; Liu, Z.; Chen, M.W. G-Quadruplex-based nanoscale coordination polymers to modulate tumor hypoxia and achieve nuclear-targeted drug delivery for enhanced photodynamic therapy. *Nano Lett.* **2018**, *18*, 6867–6875.
119. Ruan, Y.D.; Jia, X.D.; Wang, C.; Zhen, W.Y.; Jiang, X. Mn-Fe layered double hydroxide nanosheets: A new photothermal nanocarrier for O₂-evolving phototherapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11729–11732.
120. Wang, D.D.; Shi, R.H.; Zhou, J.J.; Shi, S.X.; Wu, H.H.; Xu, P.P.; Wang, H.; Xia, G.L.; Barnhart, T.E.; Cai, W.B.; et al. Photo-enhanced singlet oxygen generation of prussian blue-based nanocatalyst for augmented photodynamic therapy. *iScience* **2018**, *9*, 14–26.

121. Yang, Z.L.; Tian, W.; Wang, Q.; Zhao, Y.; Zhang, Y.L.; Tian, Y.; Tang, Y.X.; Wang, S.J.; Liu, Y.; Ni, Q.Q.; et al. Oxygen-evolving mesoporous organosilica coated prussian blue nanoplatfom for highly efficient photodynamic therapy of tumors. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1700847.
122. Ma, Z.F.; Zhang, M.C.; Jia, X.D.; Bai, J.; Ruan, Y.D.; Wang, C.; Sun, X.P.; Jiang, X. FeIII-doped two-dimensional C3N4 nanofusiform: A new O₂-evolving and mitochondria-targeting photodynamic agent for mri and enhanced antitumor therapy. *Small* **2016**, *12*, 5477–5487.
123. Zhen, W.Y.; Bai, J.; Jia, X.D.; Wu, L.; Jiang, X.E. H₂O₂-Responsive MB-BSA-Fe(III) nanoparticles as oxygen generators for MRI-guided photodynamic therapy. *J. Anal. Test.* **2018**, *2*, 69–76.
124. Hu, F.; Mao, D.; Kenry; Wang, Y.X.; Wu, W.B.; Zhao, D.; Kong, D.L.; Liu, B. Metal-organic framework as a simple and general inert nanocarrier for photosensitizers to implement activatable photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707519.
125. Lan, G.X.; Ni, K.Y.; Xu, Z.W.; Veroneau, S.S.; Song, Y.; Lin, W.B. Nanoscale metal-organic framework overcomes hypoxia for photodynamic therapy primed cancer immunotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5670–5673.
126. Liu, J.T.; Du, P.; Mao, H.; Zhang, L.; Ju, H.X.; Lei, J.P. Dual-triggered oxygen self-supply black phosphorus nanosystem for enhanced photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *172*, 83–91.
127. Zhang, Y.; Wang, F.M.; Liu, C.Q.; Wang, Z.Z.; Kang, L.H.; Huang, Y.Y.; Dong, K.; Ren, J.S.; Qu, X.G. Nanozyme decorated metal-organic frameworks for enhanced photodynamic therapy. *ACS Nano* **2018**, *12*, 651–661.
128. Wei, J.P.; Li, J.C.; Sun, D.; Li, Q.; Ma, J.Y.; Chen, X.L.; Zhu, X.; Zheng, N.F. A novel theranostic nanoplatfom based on Pd@Pt-PEG-Ce6 for enhanced photodynamic therapy by modulating tumor hypoxia microenvironment. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706310.
129. Wang, X.S.; Zeng, J.Y.; Zhang, M.K.; Zeng, X.; Zhang, X.Z. A versatile Pt-based core-shell nanoplatfom as a nanofactory for enhanced tumor therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1801783.
130. Cai, X.L.; Luo, Y.A.; Song, Y.; Liu, D.; Yan, H.Y.; Li, H.; Du, D.; Zhu, C.Z.; Lin, Y.H. Integrating in situ formation of nanozymes with three-dimensional dendritic mesoporous silica nanospheres for hypoxia-overcoming photodynamic therapy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 22937–22945.
131. Ouyang, J.; Deng, Y.Y.; Chen, W.S.; Xu, Q.F.; Wang, L.Q.; Liu, Z.J.; Tang, F.Y.; Deng, L.; Liu, Y.N. Marriage of artificial catalase and black phosphorus nanosheets for photodynamic antitumor therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2057–2064.
132. Li, J.J.; Wei, K.; Zuo, S.; Xu, Y.X.; Zha, Z.S.; Ke, W.D.; Chen, H.B.; Ge, Z.S. Light-triggered clustered vesicles with self-supplied oxygen and tissue penetrability for photodynamic therapy against hypoxic tumor. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1702108.
133. Wang, B.; Lin, W.M.; Mao, Z.W.; Gao, C.Y. Near-infrared light triggered photothermal therapy and enhanced photodynamic therapy with a tumor-targeting hydrogen peroxide shuttle. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 3145–3155.
134. Manifold, R.N.; Anderson, C.D. Increased cutaneous oxygen availability by topical application of hydrogen peroxide cream enhances the photodynamic reaction to topical 5-aminolevulinic acid-methyl ester. *Arch. Dermatol. Res.* **2011**, *303*, 285–292.
135. Zhen, W.Y.; Liu, Y.; Jia, X.D.; Wu, L.; Wang, C.; Jiang, X. Reductive surfactant-assisted one-step fabrication of a BiOI/BiOI₃ heterojunction biophotocatalyst for enhanced photodynamic theranostics overcoming tumor hypoxia. *Nanoscale Horiz.* **2019**, *4*, 720–726.
136. Wu, X.; Yan, P.J.; Ren, Z.H.; Wang, Y.F.; Cai, X.J.; Li, X.; Deng, R.R.; Han, G.R. Ferric hydroxide-modified upconversion nanoparticles for 808 nm NIR-triggered synergetic tumor therapy with hypoxia modulation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 385–393.
137. Jafari, T.; Moharreri, E.; Amin, A.S.; Miao, R.; Song, W.; Suib, S.L. Photocatalytic water splitting-The untamed dream: A review of recent advances. *Molecules* **2016**, *21*, 900.
138. Hu, L.D.; Wang, P.Y.; Zhao, M.Y.; Liu, L.; Zhou, L.; Li, B.H.; Albaqami, F.H.; El-Toni, A.M.; Li, X.M.; Xie, Y.; et al. Near-infrared rechargeable “optical battery” implant for irradiation-free photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *163*, 154–162.
139. Liu, L.H.; Zhang, Y.H.; Qiu, W.X.; Zhang, L.; Gao, F.; Li, B.; Xu, L.; Fan, J.X.; Li, Z.H.; Zhang, X.Z. Dual-stage light amplified photodynamic therapy against hypoxic tumor based on an O₂ self-sufficient nanoplatfom. *Small* **2017**, *13*, 1701621

140. Sheng, Y.; Nesbitt, H.; Callan, B.; Taylor, M.A.; Love, M.; McHale, A.P.; Callan, J.F. Oxygen generating nanoparticles for improved photodynamic therapy of hypoxic tumours. *J. Control. Release* **2017**, *264*, 333–340.
141. Zheng, D.W.; Li, B.; Li, C.X.; Fan, J.X.; Lei, Q.; Li, C.; Xu, Z.S.; Zhang, X.Z. Carbon-dot-decorated carbon nitride nanoparticles for enhanced photodynamic therapy against hypoxic tumor via water splitting. *ACS Nano* **2016**, *10*, 8715–8722.
142. Li, R.Q.; Zhang, C.; Xie, B.R.; Yu, W.Y.; Qiu, W.X.; Cheng, H.; Zhang, X.Z. A two-photon excited O₂-evolving nanocomposite for efficient photodynamic therapy against hypoxic tumor. *Biomaterials* **2019**, *194*, 84–93.
143. Yang, D.; Yang, G.X.; Gai, S.L.; He, F.; Li, C.X.; Yang, P.P. Multifunctional theranostics for dual-modal photodynamic synergistic therapy via stepwise water splitting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 6829–6838.
144. Zheng, D.W.; Li, B.; Xu, L.; Zhang, Q.L.; Fan, J.X.; Li, C.X.; Zhang, X.Z. Normalizing tumor microenvironment based on photosynthetic abiotic/biotic nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12*, 6218–6227.
145. Zhou, Y.; Zhang, Y.; Lin, M.; Long, J.; Zhang, Z.; Lin, H.; Wu, J.C.S.; Wang, X. Monolayered Bi₂WO₆ nanosheets mimicking heterojunction interface with open surfaces for photocatalysis. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8340.
146. Zhang, C.; Ren, J.; Hua, J.S.; Xia, L.Y.; He, J.; Huo, D.; Hu, Y. Multifunctional Bi₂WO₆ nanoparticles for CT-guided photothermal and oxygen-free photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 1132–1146.
147. Fan, J.X.; Liu, M.D.; Li, C.X.; Hong, S.; Zheng, D.W.; Liu, X.H.; Chen, S.; Cheng, H.; Zhang, X.Z. A metal-semiconductor nanocomposite as an efficient oxygen-independent photosensitizer for photodynamic tumor therapy. *Nanoscale Horiz.* **2017**, *2*, 349–355.
148. Gong, H.; Chao, Y.; Xiang, J.; Han, X.; Song, G.S.; Feng, L.Z.; Liu, J.J.; Yang, G.B.; Chen, Q.; Liu, Z. Hyaluronidase to enhance nanoparticle-based photodynamic tumor therapy. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 2512–2521.
149. Liu, J.J.; Tian, L.L.; Zhang, R.; Dong, Z.L.; Wang, H.R.; Liu, Z. Collagenase-encapsulated pH-responsive nanoscale coordination polymers for tumor microenvironment modulation and enhanced photodynamic nanomedicine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 43493–43502.
150. Song, X.J.; Feng, L.Z.; Liang, C.; Gao, M.; Song, G.S.; Liu, Z. Liposomes co-loaded with metformin and chlorin e6 modulate tumor hypoxia during enhanced photodynamic therapy. *Nano Res.* **2017**, *10*, 1200–1212.
151. Zuo, H.Q.; Tao, J.X.; Shi, H.; He, J.; Zhou, Z.Y.; Zhang, C. Platelet-mimicking nanoparticles co-loaded with W₁₈O₄₉ and metformin alleviate tumor hypoxia for enhanced photodynamic therapy and photothermal therapy. *Acta Biomater.* **2018**, *80*, 296–307.
152. Yang, Z.; Chen, Q.; Chen, J.; Dong, Z.; Zhang, R.; Liu, J.; Liu, Z. Tumor-pH-responsive dissociable albumin-tamoxifen nanocomplexes enabling efficient tumor penetration and hypoxia relief for enhanced cancer photodynamic therapy. *Small* **2018**, *14*, 1803262.
153. Xia, D.L.; Xu, P.P.; Luo, X.Y.; Zhu, J.F.; Gu, H.Y.; Huo, D.; Hu, Y. Overcoming hypoxia by multistage nanoparticle delivery system to inhibit mitochondrial respiration for photodynamic therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1807294.
154. Gui, L.; Zhou, J.H.; Zhou, L.; Wei, S.H. A smart copper-phthalocyanine framework nanoparticle for enhancing photodynamic therapy in hypoxic conditions by weakening cells through ATP depletion. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 2078–2088.
155. Lv, W.; Zhang, Z.; Zhang, K.Y.; Yang, H.R.; Liu, S.J.; Xu, A.Q.; Guo, S.; Zhao, Q.; Huang, W. A mitochondria-targeted photosensitizer showing improved photodynamic therapy effects under hypoxia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9947–9951.
156. Bayat Mokhtari, R.; Homayouni, T.S.; Baluch, N.; Morgatskaya, E.; Kumar, S.; Das, B.; Yeager, H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 38022–38043.
157. Brodin, N.P.; Guha, C.; Tome, W.A. Photodynamic therapy and its role in combined modality anticancer treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2015**, *14*, 355–368.
158. Liu, Y.Y.; Liu, Y.; Bu, W.B.; Cheng, C.; Zuo, C.J.; Xiao, Q.F.; Sun, Y.; Ni, D.L.; Zhang, C.; Liu, J.A.; et al. Hypoxia induced by upconversion-based photodynamic therapy: Towards highly effective synergistic bioreductive therapy in tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8105–8109.
159. Guo, D.B.; Xu, S.T.; Wang, N.; Jiang, H.Y.; Huang, Y.; Jin, X.; Xue, B.; Zhang, C.; Zhu, X.Y. Prodrug-embedded angiogenic vessel-targeting nanoparticle: A positive feedback amplifier in hypoxia-induced chemo-photo therapy. *Biomaterials* **2017**, *144*, 188–198.
160. Li, S.Y.; Cheng, H.; Qiu, W.X.; Zhang, L.; Wan, S.S.; Zeng, J.Y.; Zhang, X.Z. Cancer cell membrane-coated biomimetic platform for tumor targeted photodynamic therapy and hypoxia-amplified bioreductive therapy. *Biomaterials* **2017**, *142*, 149–161.

161. Wang, Y.Z.; Xie, Y.; Li, J.; Peng, Z.H.; Sheinin, Y.; Zhou, J.P.; Oupicky, D. Tumor-penetrating nanoparticles for enhanced anticancer activity of combined photodynamic and hypoxia-activated therapy. *ACS Nano* **2017**, *11*, 2227–2238.
162. Chen, J.; Liu, L.; Motevalli, S.M.; Wu, X.L.; Yang, X.H.; Li, X.L.; Han, L.; Magrini, A.; Guo, W.S.; Chang, J.; et al. Light-triggered retention and cascaded therapy of albumin-based theranostic nanomedicines to alleviate tumor adaptive treatment tolerance. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707291.
163. Liu, M.; Wang, L.; Zheng, X.H.; Liu, S.; Xie, Z.G. Hypoxia-triggered nanoscale metal-organic frameworks for enhanced anticancer activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 24638–24647.
164. Yang, Y.; Yang, X.; Li, H.; Li, C.; Ding, H.; Zhang, M.; Guo, Y.; Sun, M. Near-infrared light triggered liposomes combining photodynamic and chemotherapy for synergistic breast tumor therapy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2019**, *173*, 564–570.
165. Zhang, K.; Zhang, Y.D.; Meng, X.D.; Lu, H.T.; Chang, H.; Dong, H.F.; Zhang, X.J. Light-triggered theranostic liposomes for tumor diagnosis and combined photodynamic and hypoxia-activated prodrug therapy. *Biomaterials* **2018**, *185*, 301–309.
166. Wang, Q.; Tian, L.; Xu, J.; Xia, B.; Li, J.; Lu, F.; Lu, X.; Wang, W.; Huang, W.; Fan, Q. Multifunctional supramolecular vesicles for combined photothermal/photodynamic/hypoxia-activated chemotherapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 10328–10331.
167. Qian, C.G.; Yu, J.C.; Chen, Y.L.; Hu, Q.Y.; Xiao, X.Z.; Sun, W.J.; Wang, C.; Feng, P.J.; Shen, Q.D.; Gu, Z. Light-activated hypoxia-responsive nanocarriers for enhanced anticancer therapy. *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 3313–3320.
168. Hu, D.R.; Chen, L.J.; Qu, Y.; Peng, J.R.; Chu, B.Y.; Shi, K.; Hao, Y.; Zhong, L.; Wang, M.Y.; Qian, Z.Y. Oxygen-generating hybrid polymeric nanoparticles with encapsulated doxorubicin and chlorin e6 for trimodal imaging-guided combined chemo-photodynamic therapy. *Theranostics* **2018**, *8*, 1558–1574.
169. Luo, Z.Y.; Tian, H.; Liu, L.L.; Chen, Z.K.; Liang, R.J.; Chen, Z.; Wu, Z.H.; Ma, A.Q.; Zheng, M.B.; Cai, L.T. Tumor-targeted hybrid protein oxygen carrier to simultaneously enhance hypoxia-dampened chemotherapy and photodynamic therapy at a single dose. *Theranostics* **2018**, *8*, 3584–3596.
170. Xu, J.; Han, W.; Yang, P.; Jia, T.; Dong, S.; Bi, H.; Gulzar, A.; Yang, D.; Gai, S.; He, F.; et al. Tumor microenvironment-responsive mesoporous MnO₂-coated upconversion nanoplatform for self-enhanced tumor theranostics. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1803804.
171. Xie, Z.; Cai, X.; Sun, C.; Liang, S.; Shao, S.; Huang, S.; Cheng, Z.; Pang, M.; Xing, B.; Kheraif, A.A.A.; et al. O₂-Loaded pH-responsive multifunctional nanodrug carrier for overcoming hypoxia and highly efficient chemo-photodynamic cancer therapy. *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 483–490.
172. He, H.; Zhu, R.Y.; Sun, W.; Cai, K.M.; Chen, Y.B.; Yin, L.C. Selective cancer treatment via photodynamic sensitization of hypoxia-responsive drug delivery. *Nanoscale* **2018**, *10*, 2856–2865.
173. Yang, Y.; Wang, C.; Tian, C.; Guo, H.L.; Shen, Y.H.; Zhu, M.Z. Fe₃O₄@MnO₂@PPy nanocomposites overcome hypoxia: Magnetic-targeting-assisted controlled chemotherapy and enhanced photodynamic/photothermal therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 6848–6857.
174. Deng, J.; Liu, F.; Wang, L.N.; An, Y.; Gao, M.; Wang, Z.; Zhao, Y.J. Hypoxia- and singlet oxygen-responsive chemo-photodynamic micelles featured with glutathione depletion and aldehyde production. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 429–441.
175. Feng, L.; Cheng, L.; Dong, Z.; Tao, D.; Barnhart, T.E.; Cai, W.; Chen, M.; Liu, Z. Theranostic liposomes with hypoxia-activated prodrug to effectively destruct hypoxic tumors post-photodynamic therapy. *ACS Nano* **2017**, *11*, 927–937.
176. Luan, X.; Guan, Y.Y.; Liu, H.J.; Lu, Q.; Zhao, M.; Sun, D.X.; Lovell, J.F.; Sun, P.; Chen, H.Z.; Fang, C. A tumor vascular-targeted interlocking trimodal nanosystem that induces and exploits hypoxia. *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1800034.
177. He, Z.; Dai, Y.; Li, X.; Guo, D.; Liu, Y.; Huang, X.; Jiang, J.; Wang, S.; Zhu, G.; Zhang, F.; et al. Hybrid nanomedicine fabricated from photosensitizer-terminated metal-organic framework nanoparticles for photodynamic therapy and hypoxia-activated cascade chemotherapy. *Small* **2019**, *15*, 1804131.
178. Guo, D.B.; Xu, S.T.; Huang, Y.; Jiang, H.Y.; Yasen, W.; Wang, N.; Su, Y.; Qian, J.W.; Li, J.; Zhang, C.; et al. Platinum (IV) complex-based two-in-one polyprodrug for a combinatorial chemo-photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *177*, 67–77.
179. Xu, S.; Zhu, X.; Zhang, C.; Huang, W.; Zhou, Y.; Yan, D. Oxygen and Pt (II) self-generating conjugate for synergistic photo-chemo therapy of hypoxic tumor. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2053.

180. Wang, H.R.; Zhu, W.W.; Feng, L.Z.; Chen, Q.; Chao, Y.; Dong, Z.L.; Liu, Z. Nanoscale covalent organic polymers as a biodegradable nanomedicine for chemotherapy-enhanced photodynamic therapy of cancer. *Nano Res.* **2018**, *11*, 3244–3257.
181. Chen, W.H.; Lecaros, R.L.G.; Tseng, Y.C.; Huang, L.; Hsu, Y.C. Nanoparticle delivery of HIF1 alpha siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. *Cancer Lett.* **2015**, *359*, 65–74.
182. Sun, S.J.; Xu, Y.X.; Fu, P.; Chen, M.; Sun, S.H.; Zhao, R.R.; Wang, J.R.; Liang, X.L.; Wang, S.M. Ultrasound-targeted photodynamic and gene dual therapy for effectively inhibiting triple negative breast cancer by cationic porphyrin lipid microbubbles loaded with HIF1 alpha-siRNA. *Nanoscale* **2018**, *10*, 19945–19956.
183. Broekgaarden, M.; Weijer, R.; Krekorian, M.; van den Ijssel, B.; Kos, M.; Alles, L.K.; van Wijk, A.C.; Bikadi, Z.; Hazai, E.; van Gulik, T.M.; et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 with acriflavine sensitizes hypoxic tumor cells to photodynamic therapy with zinc phthalocyanine-encapsulating cationic liposomes. *Nano Res.* **2016**, *9*, 1639–1662.
184. Weijer, R.; Broekgaarden, M.; Krekorian, M.; Alles, L.K.; van Wijk, A.C.; Mackaaij, C.; Verheij, J.; van der Wal, A.C.; van Gulik, T.M.; Storm, G.; et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinomas to photodynamic therapy. *Oncotarget* **2016**, *7*, 3331–3346.
185. Ferrario, A.; von Tiehl, K.F.; Rucker, N.; Schwarz, M.A.; Gill, P.S.; Gomer, C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4066–4069.
186. Zhou, Q.Y.; Olivo, M.; Lye, K.Y.K.; Moore, S.; Sharma, A.; Chowbay, B. Enhancing the therapeutic responsiveness of photodynamic therapy with the antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 in murine nasopharyngeal carcinoma models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 569–577.
187. Weiss, A.; van Beijnum, J.R.; Bonvin, D.; Jichlinski, P.; Dyson, P.J.; Griffioen, A.W.; Nowak-Sliwinska, P. Low-dose angiostatic tyrosine kinase inhibitors improve photodynamic therapy for cancer: Lack of vascular normalization. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 480–491.
188. Lecaros, R.L.G.; Huang, L.; Lee, T.C.; Hsu, Y.C. Nanoparticle delivered VEGF-A siRNA enhances photodynamic therapy for head and neck cancer treatment. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 106–116.
189. Liang, P.P.; Huang, X.Y.; Wang, Y.; Chen, D.P.; Ou, C.J.; Zhang, Q.; Shao, J.J.; Huang, W.; Dong, X.C. Tumor-microenvironment-responsive nanoconjugate for synergistic antivasculature activity and phototherapy. *ACS Nano* **2018**, *12*, 11446–11457.
190. Ferrario, A.; Fisher, A.M.; Rucker, N.; Gomer, C.J. Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9473–9478.
191. Tuncel, S.; Trivella, A.; Atilla, D.; Bennis, K.; Savoie, H.; Albrieux, F.; Delort, L.; Billard, H.; Dubois, V.; Ahsen, V.; et al. Assessing the dual activity of a chalcone-phthalocyanine conjugate: Design, synthesis, and antivasculature and photodynamic properties. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3706–3716.
192. Li, Y.J.; Sui, H.; Jiang, C.L.; Li, S.M.; Han, Y.; Huang, P.; Du, X.X.; Du, J.W.; Bai, Y.X. Dihydroartemisinin increases the sensitivity of photodynamic therapy via NF-kappa B/HIF-1 alpha/VEGF pathway in esophageal cancer cell in vitro and in vivo. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *48*, 2035–2045.
193. Li, Y.J.; Zhou, J.H.; Du, X.X.; Jia, D.X.; Wu, C.L.; Huang, P.; Han, Y.; Sui, H.; Wei, X.L.; Liu, L.; et al. Dihydroartemisinin accentuates the anti-tumor effects of photodynamic therapy via inactivation of NF-kappa B in Eca109 and Ec9706 esophageal cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1527–1536.
194. Jung, H.S.; Han, J.; Shi, H.; Koo, S.; Singh, H.; Kim, H.J.; Sessler, J.L.; Lee, J.Y.; Kim, J.H.; Kim, J.S. Overcoming the limits of hypoxia in photodynamic therapy: A carbonic anhydrase IX-targeted approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7595–7602.
195. Jin, C.S.; Lovell, J.F.; Chen, J.; Zheng, G. Ablation of hypoxic tumors with dose-equivalent photothermal, but not photodynamic, therapy using a nanostructured porphyrin assembly. *ACS Nano* **2013**, *7*, 2541–2550.
196. Zhu, W.; Liu, Y.; Yang, Z.; Zhang, L.; Xiao, L.J.; Liu, P.; Wang, J.; Yi, C.F.; Xu, Z.S.; Ren, J.H. Albumin/sulfonamide stabilized iron porphyrin metal organic framework nanocomposites: Targeting tumor hypoxia by carbonic anhydrase IX inhibition and T-1-T-2 dual mode MRI guided photodynamic/photothermal therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 265–276.

197. Hu, D.H.; Sheng, Z.H.; Gao, G.H.; Siu, F.M.; Liu, C.B.; Wan, Q.; Gong, P.; Zheng, H.R.; Ma, Y.F.; Cai, L.T. Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* **2016**, *93*, 10–19.
198. Feng, L.Z.; Tao, D.L.; Dong, Z.L.; Chen, Q.; Chao, Y.; Liu, Z.; Chen, M.W. Near-infrared light activation of quenched liposomal Ce6 for synergistic cancer phototherapy with effective skin protection. *Biomaterials* **2017**, *127*, 13–24.
199. Im, S.; Lee, J.; Park, D.; Park, A.; Kim, Y.M.; Kim, W.J. Hypoxia-triggered transforming immunomodulator for cancer immunotherapy via photodynamically enhanced antigen presentation of dendritic cell. *ACS Nano* **2018**, *13*, 476–488.
200. Zhou, Z.; Song, J.; Nie, L.; Chen, X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6597–6626.
201. Ding, H.Y.; Yu, H.J.; Dong, Y.; Tian, R.H.; Huang, G.; Boothman, D.A.; Sumer, B.D.; Gao, J.M. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. *J. Control. Release* **2011**, *156*, 276–280.
202. Li, M.L.; Xia, J.; Tian, R.S.; Wang, J.Y.; Fan, J.L.; Du, J.J.; Long, S.; Song, X.Z.; Foley, J.W.; Peng, X.J. Near-infrared light-initiated molecular superoxide radical generator: Rejuvenating photodynamic therapy against hypoxic tumors. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14851–14859.
203. Liu, Y.; Zhen, W.Y.; Jin, L.H.; Zhang, S.T.; Sun, G.Y.; Zhang, T.Q.; Xu, X.; Song, S.Y.; Wang, Y.H.; Liu, J.H.; et al. All-in-one theranostic nanoagent with enhanced reactive oxygen species generation and modulating tumor microenvironment ability for effective tumor eradication. *ACS Nano* **2018**, *12*, 4886–4893.
204. Lv, Z.; Wei, H.J.; Li, Q.; Su, X.L.; Liu, S.J.; Zhang, K.Y.; Lv, W.; Zhao, Q.; Li, X.H.; Huang, W. Achieving efficient photodynamic therapy under both normoxia and hypoxia using cyclometalated Ru(II) photosensitizer through type I photochemical process. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 502–512.
205. Wang, X.X.; Xu, J.T.; Yang, D.; Sun, C.Q.; Sun, Q.Q.; He, F.; Gai, S.L.; Zhong, C.N.; Li, C.X.; Yang, P.P. Fe₃O₄@MIL-100(Fe)-UCNPs heterojunction photosensitizer: Rational design and application in near infrared light mediated hypoxic tumor therapy. *Chem. Eng. J.* **2018**, *354*, 1141–1152.
206. Tian, N.; Sun, W.Z.; Guo, X.S.; Lu, J.; Li, C.; Hou, Y.J.; Wang, X.S.; Zhou, Q.X. Mitochondria targeted and NADH triggered photodynamic activity of chloromethyl modified Ru(ii) complexes under hypoxic conditions. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 2676–2679.
207. Lazic, S.; Kaspler, P.; Shi, G.; Monro, S.; Sainuddin, T.; Forward, S.; Kasimova, K.; Hennigar, R.; Mandel, A.; McFarland, S.; et al. Novel osmium-based coordination complexes as photosensitizers for panchromatic photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 1248–1258.
208. Babii, O.; Afonin, S.; Garmanchuk, L.V.; Nikulina, V.V.; Nikolaienko, T.V.; Storozhuk, O.V.; Shelest, D.V.; Dasyukevich, O.I.; Ostapchenko, L.I.; Iurchenko, V.; et al. Direct photocontrol of peptidomimetics: An alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5493–5496.
209. Fadhel, A.A.; Yue, X.L.; Zadeh, E.H.G.; Bondar, M.V.; Belfield, K.D. Pegylated and nanoparticle-conjugated sulfonium salt photo triggers necrotic cell death. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 6161–6168.
210. Yue, X.L.; Yanez, C.O.; Yao, S.; Belfield, K.D. Selective cell death by photochemically induced pH imbalance in cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2112–2115.
211. Yu, W.Y.; Liu, T.; Zhang, M.K.; Wang, Z.X.; Ye, J.J.; Li, C.X.; Liu, W.L.; Li, R.Q.; Feng, J.; Zhang, X.Z. O₂ economizer for inhibiting cell respiration to combat the hypoxia obstacle in tumor treatments. *ACS Nano* **2019**, *13*, 1784–1794.
212. Heinrich, T.A.; Tedesco, A.C.; Fukuto, J.M.; da Silva, R.S. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex as a strategy for cancer treatment. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 4021–4025.
213. Wan, S.S.; Zeng, J.Y.; Cheng, H.; Zhang, X.Z. ROS-induced NO generation for gas therapy and sensitizing photodynamic therapy of tumor. *Biomaterials* **2018**, *185*, 51–62.
214. Deng, Y.Y.; Jia, F.; Chen, S.Y.; Shen, Z.D.; Jin, Q.; Fu, G.S.; Ji, J. Nitric oxide as an all-rounder for enhanced photodynamic therapy: Hypoxia relief, glutathione depletion and reactive nitrogen species generation. *Biomaterials* **2018**, *187*, 55–65.
215. Yuan, Z.; Yu, S.; Cao, F.Y.; Mao, Z.W.; Gao, C.Y.; Ling, J. Near-infrared light triggered photothermal and photodynamic therapy with an oxygen-shuttle endoperoxide of anthracene against tumor hypoxia. *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 2124–2133.

216. Han, Y.; Chen, Z.P.; Zhao, H.; Zha, Z.S.; Ke, W.D.; Wang, Y.H.; Ge, Z.S. Oxygen-independent combined photothermal/photodynamic therapy delivered by tumor acidity-responsive polymeric micelles. *J. Control. Release* **2018**, *284*, 15–25.
217. Lv, Z.; Zou, L.; Wei, H.J.; Liu, S.J.; Huang, W.; Zhao, Q. Phosphorescent starburst Pt(II) porphyrins as bifunctional therapeutic agents for tumor hypoxia imaging and photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 19523–19533.
218. Pinto, A.; Mace, Y.; Drouet, F.; Bony, E.; Boidot, R.; Draoui, N.; Lobysheva, I.; Corbet, C.; Polet, F.; Martherus, R.; et al. A new ER-specific photosensitizer unravels ¹O₂-driven protein oxidation and inhibition of deubiquitinases as a generic mechanism for cancer PDT. *Oncogene* **2016**, *35*, 3976–3985.
219. Sun, J.; Li, X.; Du, K.; Feng, F.D. A water soluble donor-acceptor-donor conjugated oligomer as a photosensitizer for mitochondria-targeted photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9194–9197.
220. Wieczorek, E.; Mlynarczyk, D.T.; Kucinska, M.; Dlugaszewska, J.; Piskorz, J.; Popena, L.; Szczolko, W.; Jurga, S.; Murias, M.; Mielcarek, J.; et al. Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 64–73.
221. Zhang, X.L.; Wu, M.; Li, J.; Lan, S.Y.; Zeng, Y.Y.; Liu, X.L.; Liu, J.F. Light-enhanced hypoxia-response of conjugated polymer nanocarrier for successive synergistic photodynamic and chemo-therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 21909–21919.
222. Huang, C.X.; Zheng, J.; Ma, D.D.; Liu, N.; Zhu, C.; Li, J.S.; Yang, R.H. Hypoxia-triggered gene therapy: A new drug delivery system to utilize photodynamic-induced hypoxia for synergistic cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 6424–6430.
223. Piao, W.; Hanaoka, K.; Fujisawa, T.; Takeuchi, S.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Tahara, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Development of an azo-based photosensitizer activated under mild hypoxia for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13713–13719.
224. Li, J.J.; Meng, X.; Deng, J.; Lu, D.; Zhang, X.; Chen, Y.R.; Zhu, J.D.; Fan, A.P.; Ding, D.; Kong, D.L.; et al. Multifunctional micelles dually responsive to hypoxia and singlet oxygen: Enhanced photodynamic therapy via interactively triggered photosensitizer delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 17117–17128.
225. Li, Z.B.; Wu, M.; Bai, H.Z.; Liu, X.G.; Tang, G.P. Light-enhanced hypoxia-responsive nanoparticles for deep tumor penetration and combined chemo-photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13127–13130.
226. Wang, W.L.; Lin, L.; Ma, X.J.; Wang, B.; Liu, S.R.; Yan, X.X.; Li, S.R.; Tian, H.Y.; Yu, X.F. Light-induced hypoxia-triggered living nanocarriers for synergistic cancer therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 19398–19407.
227. Chen, H.C.; Bi, Q.R.; Yao, Y.R.; Tan, N.H. Dimeric BODIPY-loaded liposomes for dual hypoxia marker imaging and activatable photodynamic therapy against tumors. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 4351–4359.
228. Evans, C.L.; Abu-Yousif, A.O.; Park, Y.J.; Klein, O.J.; Celli, J.P.; Rizvi, I.; Zheng, X.; Hasan, T. Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23434.
229. Guan, S.Y.; Yang, D.; Weng, Y.Z.; Lu, H.; Meng, X.M.; Qu, X.Z.; Zhou, S.Y. Excitation-dependent theranostic nanosheet for cancer treatment. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701123.
230. Guan, M.R.; Qin, T.X.; Ge, J.C.; Zhen, M.M.; Xu, W.; Chen, D.Q.; Li, S.M.; Wang, C.R.; Su, H.M.; Shu, C.Y. Amphiphilic trimethylpyridylporphyrin-fullerene (C-70) dyad: An efficient photosensitizer under hypoxia conditions. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 776–783.
231. Vangeel, I.P.J.; Oppelaar, H.; Marijnissen, J.P.A.; Stewart, F.A. Influence of fractionation and fluence rate in photodynamic therapy with photofrin or mTHPC. *Radiat. Res.* **1996**, *145*, 602–609.
232. Klimenko, V.V.; Bogdanov, A.A.; Knyazev, N.A.; Dubina, M.V. Pulse mode irradiation at Radachlorin PDT shifted cell death to apoptosis in vitro. In *Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions Vii*; Lilge, L.D., Sroka, R., Eds.; Optical Society of America: California, CA, USA, 2015; Volume 9542, p. 95421.
233. Klimenko, V.V.; Knyazev, N.A.; Moiseenko, F.V.; Rusanov, A.A.; Bogdanov, A.A.; Dubina, M.V. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 101–107.
234. Kawachi, S.; Morimoto, Y.; Sato, S.; Arai, T.; Seguchi, K.; Asanuma, H.; Kikuchi, M. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: Study of oxygen consumption and photobleaching. *Lasers Med. Sci.* **2004**, *18*, 179–183.
235. Turan, I.S.; Yildiz, D.; Turksoy, A.; Gunaydin, G.; Akkaya, E.U. A bifunctional photosensitizer for enhanced fractional photodynamic therapy: Singlet oxygen generation in the presence and absence of light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2875–2878.

CHAPITRE II : LA PDT CIBLEE ET INDEPENDANTE DE L'OXYGENE : UNE PREUVE DE CONCEPT

I. Ciblage du récepteur NRP-1 par des peptides

Notre équipe s'est intéressé depuis plus de 15 ans au ciblage de NRP-1. Dans un premier temps, nous avons utilisé un heptapeptide (ATWLPPR). Dans cette étude, le peptide a été couplé à un PS (TPC, (chlorine 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl) par l'intermédiaire d'un bras espaceur (Ahx, acide aminohexanoïque). *In vitro*, le conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR synthétisé a été mis en contact avec des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), exprimant le récepteur NRP-1, en comparaison avec la TPC seule. Il a été montré que l'accumulation du conjugué était 25 fois supérieure à celle de la TPC seule et une incorporation du conjugué médiée par la fixation du peptide à NRP-1. De plus, le conjugué a montré une phototoxicité environ 10 fois supérieure à celle de la TPC seule.¹²⁷ L'augmentation de l'accumulation cellulaire de la TPC par association avec ce peptide dans le conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR a été confirmée par des études sur des cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) surexprimant fortement le récepteur NRP-1. Des études *in vivo*, sur des souris greffées avec des cellules de gliome malin humain, ont montré une accumulation du conjugué au niveau des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux tumoraux ainsi qu'une réduction de la vascularisation de la tumeur au cours du traitement par PDT.¹²⁸ En revanche, d'autres études *in vivo* ont ensuite montré une dégradation du peptide.¹²⁹

L'étude de nouveaux peptides pouvant cibler NRP-1 a alors été effectuée par docking moléculaire et tests d'affinité. Les peptides étudiés ont été déterminés à partir des ligands de NRP-1 décrits dans la littérature et l'affinité d'un nouveau peptide (DKPPR) pour celui-ci a pu alors être mise en évidence. De plus, il a été montré que l'extrémité C-terminale était importante pour l'affinité du peptide pour NRP-1.¹³⁰ L'ajout d'une lysine sur l'extrémité N-terminale pour le greffage d'un PS a été effectuée par la suite et il a été prouvé que cet ajout ne diminuait pas l'affinité pour NRP-1 mais au contraire l'améliorait ($CE_{50} = 46 \mu\text{M}$ pour DKPPR et $CE_{50} = 2 \mu\text{M}$ pour KDKPPR).¹³¹

Ce dernier peptide (KDKPPR) étant bien connu par notre équipe, nous avons choisi de l'utiliser afin d'établir la preuve de concept de cette thèse.

II. Les alcoxyamines photoactivables

La dissociation des alcoxyamines par différents procédés a été largement étudiée. La méthode la plus reportée et utilisée concerne la décomposition contrôlée par la température bien que plus récemment, d'autres amorceurs aient été reportés : la protonation de la partie alkyle et l'illumination par la lumière UV-visible.¹²² Ce dernier amorceur est largement étudié depuis le développement d'alcoxyamines photoactivables par Scaiano *et al.* en 1997.¹³²

L'influence de différents paramètres sur la photodissociation des alcoxyamines a été étudié par Gimes *et al.*¹³³⁻¹³⁵ Ils ont tout d'abord évalué l'influence de l'intensité lumineuse (illumination UV) sur la photolabilité d'alcoxyamines portant un chromophore de type benzophénone. La vitesse de dissociation (k_d) de la liaison C-ON de l'alcoxyamine a été déterminée à différentes intensités lumineuses et une corrélation linéaire entre la vitesse de dissociation et l'intensité lumineuse a été observée. De plus, suivant la structure de la partie nitroxyde, la quantité de nitroxyde générée maximale baisse avec la diminution de l'intensité lumineuse, qui peut s'expliquer par une instabilité du nitroxyde généré.¹³⁵

Ils ont ensuite étudié l'influence de la position du chromophore sur la photodissociation des alcoxyamines. Une compétition entre l'homolyse de la liaison C-ON et celle de la liaison CO-N a été observée. Cette compétition peut être expliquée par la BDE. En effet, plus la différence entre les BDE des deux liaisons est élevée ($\geq 50 \text{ kJ.mol}^{-1}$), plus la probabilité d'obtenir préférentiellement l'homolyse de la liaison C-ON est importante. De plus, la BDE de cette liaison doit être faible. Il a été également mis en évidence que la liaison directe du système π du chromophore au groupement aminoxyl (Figure 25A), c'est-à-dire en position R₁ ou R₂, conduisait à une compétition entre les photodissociations CO-N et C-ON. En revanche, lorsque le chromophore est séparé de la partie contenant la liaison N-O (Figure 25B) par deux liaisons, une forte sélectivité pour la photodissociation de la liaison C-ON est observée conduisant à la formation de nitroxyde.^{133,134}

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

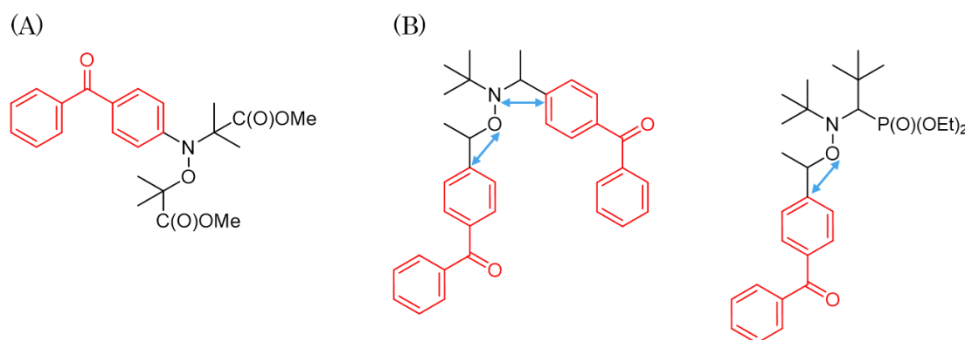


Figure 25 : Exemples d'alkoxyamines portant un chromophore, indiqué en rouge, (A) directement lié au groupement aminoxyl et (B) séparé du groupement aminoxyl par une distance deux liaisons indiquée par une double flèche.¹³³

D'après ces différentes études, il apparaît donc que la structure de l'alkoxyamine ainsi que la source d'illumination jouent un rôle important dans l'efficacité de la photodissociation de la liaison C–ON.

III. Contexte et objectifs

Afin de répondre aux objectifs de cette thèse, nous avons développé une plateforme trimodale, applicable en PDT, sélective pour le récepteur NRP–1 et efficace à la fois en milieu hypoxique et normoxique. La structure de cette plateforme, notée Alc1'–K(Pyro–a)DKPPR), est donnée en Figure 26.

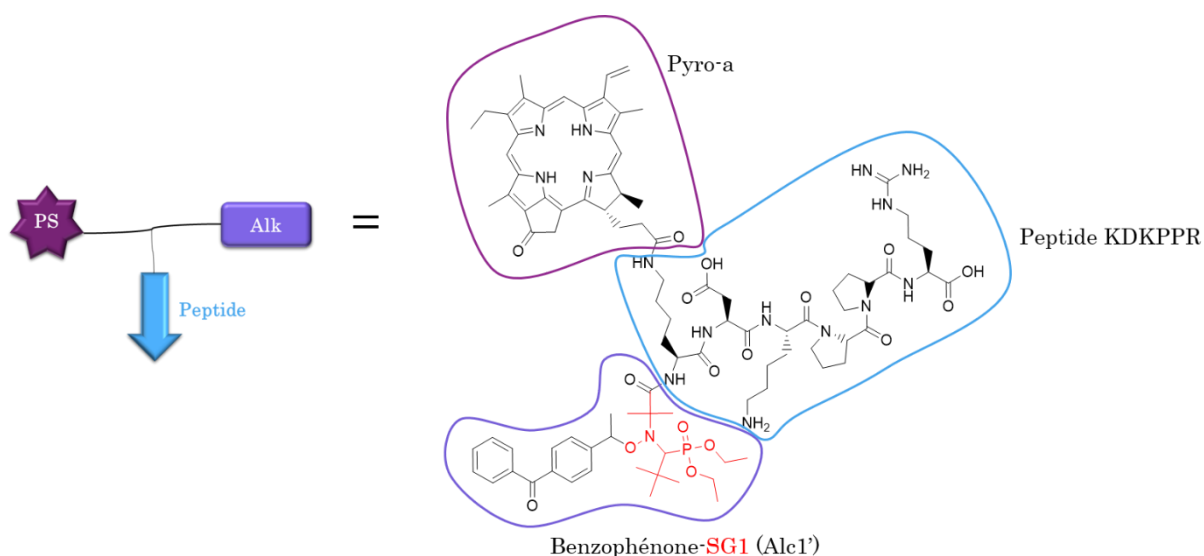


Figure 26 : Structure chimique de la plateforme synthétisée (notée Alc1'–K(Pyro–a)DKPPR).

Le choix du PS s'est porté sur la pyrophéophorbide a (Pyro–a), un PS naturel dérivé de la chlorophylle, présentant une bande Q_I d'absorption intense à 670 nm permettant son excitation dans le rouge et de bons Φ_f et Φ_Δ (Tableau 4). De plus, ce PS contient dans sa structure chimique une fonction acide carboxylique permettant le couplage à un peptide.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Tableau 4 : Rendements quantiques de fluorescence (Φ_f) et d'oxygène singulet (Φ_Δ) de la Pyro-a dans différents solvants. ¹³⁶

Solvant	Φ_f	Φ_Δ
Toluène	0,39	0,49
EtOH	0,39	0,53
MeOH	0,31	0,42

Le peptide KDKPPR, dont l'affinité pour le récepteur NRP-1 a été prouvée par notre équipe, a été utilisée. Le choix de l'alcoxyamine s'est porté sur une alcoxyamine de type benzophénone-SG1, notée Alc1, homolysable sous une illumination par lumière UV, permettant ainsi de générer des radicaux alkyles cytotoxiques. L'alcoxyamine fonctionnalisée par une fonction acide carboxylique sera notée Alc1' dans ce chapitre.

Afin de vérifier l'influence du PS et de l'alcoxyamine sur leurs propriétés respectives, il a également été nécessaire de synthétiser deux composés de référence, le composé alcoxyamine-peptide (Alc1'-KDKPPR) et le composé PS-peptide (K(Pyro-a)DKPPR).

Dans la suite, nous nous intéresserons à la synthèse des composés, puis à l'étude des propriétés photophysiques du PS, de la photolabilité de l'alcoxyamine et de l'affinité du peptide pour le récepteur NRP-1.

IV. Synthèse et purification des composés

IV.1. Synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

IV.1.1. Principe

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) est un procédé, développé par Merrifield en 1963,¹³⁷ consistant en l'assemblage d'un peptide par l'accrochage de l'extrémité C-terminale de ce dernier sur un polymère insoluble (résine), suivi d'une succession d'additions (couplages) d'acides aminés éventuellement protégés constituant la séquence, de l'extrémité C- à N-terminale (Figure 27).

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

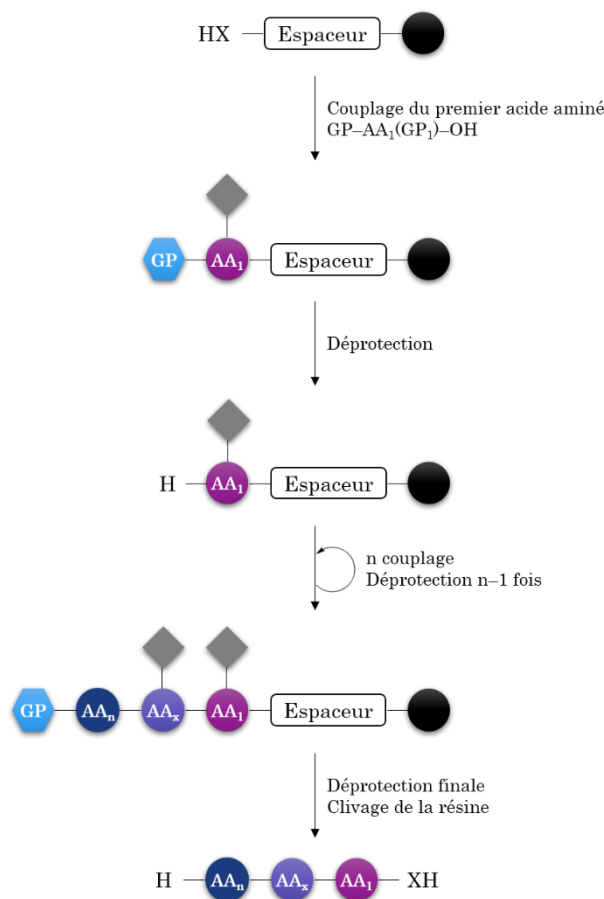


Figure 27 : Principe de l'élongation peptidique en SPPS. AA_n = acide aminé avec n le nombre d'acide aminé, X = O ou NH, ♦ = groupement protecteur permanent, ● = Résine.¹³⁸

L'addition de chaque acide aminé se fait selon un cycle de quatre étapes :

- Déprotection : clivage du groupement protecteur de l'extrémité N^α-terminale ;
- Etapes de lavage afin d'éliminer la solution de déprotection ;
- Couplage d'un acide aminé C-terminal activé N-terminal protégé et éventuellement protégé sur sa chaîne latérale et pré-activé par un agent de couplage ;
- Etapes de lavage pour éliminer les excès de réactifs et les sous-produits.

La chaîne peptidique en élongation étant fixée sur le support solide (résine), les excès de réactifs et les sous-produits solubles sont éliminés simplement par filtration lors des étapes de lavage avec des solvants appropriés. Lors des étapes de déprotection et couplage, seuls des solvants permettant de gonfler la résine (dichlorométhane, DCM ou diméthylformamide, DMF) sont utilisés alors que lors des lavages, des solvants rétractant la résine (MeOH ou éthanol, EtOH) peuvent être employés. Le peptide assemblé restant

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

ancré à la résine, cette technique permet de s'affranchir de toutes les étapes d'extraction et de purification à chaque couplage.¹³⁹

Cette technique permet de travailler avec des excès de réactifs et par conséquent d'augmenter la vitesse des réactions afin d'atteindre des rendements proches de 100% à chaque étape.

IV.1.2. Stratégies de synthèse et résines utilisées

En SPPS, il est essentiel d'utiliser des protections appropriées pour pouvoir contrôler la réactivité des fonctions susceptibles de réagir. Il existe deux types de groupements protecteurs, ceux dits temporaires en position *N*-terminale sur la chaîne principale et ceux dits permanents portés par les chaînes latérales des différents acides aminés qui doivent être stables tout au long de la synthèse pour éviter des réactions secondaires. Les protections « temporaires » sont donc retirées avant chaque couplage alors que les protections « permanentes » le sont seulement à la fin de la synthèse lors du clivage du peptide de la résine. Il est nécessaire que ces deux types de protection soient orthogonales afin qu'il n'y ait pas de déprotection des chaînes latérales lors de la déprotection de l'extrémité *N*-terminale.^{140,141}

Le choix des protections est déterminé par la stratégie utilisée. Il existe plusieurs stratégies en SPPS dont les deux principales sont la stratégie Boc/Bzl et la stratégie Fmoc/tBu (Tableau 5). La stratégie Boc/Bzl est la plus ancienne et repose sur l'utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) pour l'élimination des groupements protecteurs temporaires (Boc) et d'un acide fort (acide hydrofluorique, HF) pour le clivage final. Cette stratégie n'est pas préconisée en synthèse de routine en raison de l'utilisation de HF, nécessitant un équipement spécial. La stratégie Fmoc/tBu, plus récente, est moins contraignante : les groupements protecteurs temporaires basolabile sont éliminés avec de la pipéridine et le clivage final est effectué à l'aide de TFA.^{141,142} Cette stratégie a été retenue dans le cadre de cette thèse.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Tableau 5 : Comparaison entre les deux principales stratégies utilisées en SPPS. Adapté de¹³⁸.

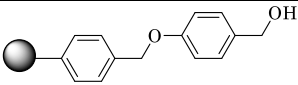
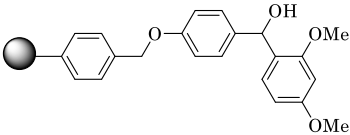
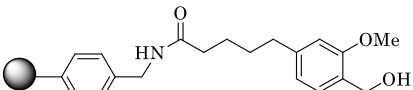
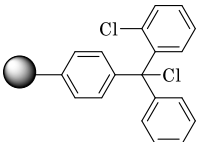
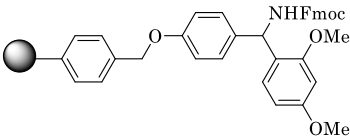
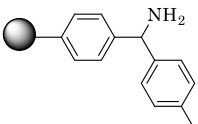
	Fmoc/tBu	Boc/Bzl
Utilisation	Synthèse de routine	Équipement spécial nécessaire
Protections de l'extrémité N-terminale et des chaînes latérales	Orthogonales	En milieu acide
Déprotection de l'extrémité N-terminale	Milieu basique (Pipéridine)	Milieu acide (TFA)
Déprotection des chaînes latérales et clivage de la résine	Milieu acide (TFA)	Milieu acide fort (HF)
Echelle	Pas de limitation, y compris pour le clivage final	Limité pour le clivage final avec HF
Étapes de synthèse	Déprotection, lavages, couplage, lavages	Étape de neutralisation supplémentaire

Le support solide utilisé en SPPS, aussi nommée résine, est généralement composé d'une matrice polymère et d'un espaceur. Chaque résine est caractérisée par sa charge (« *loading* ») qui indique le nombre de sites d'accrochage disponibles et qui est donnée en mmol.g⁻¹ de résine. Il existe de nombreux types de résines commercialement disponibles dont les résines à base de polystyrène réticulé qui sont les plus utilisées en synthèse de routine. Ces dernières sont caractérisées par des billes ayant une taille comprise entre 200 et 400 mesh, soit un diamètre d'environ 50 µm et une charge comprise entre 0,5 et 0,8 mmol.g⁻¹. Elles présentent des propriétés de gonflement importantes dans le DMF et le DCM. Il existe également d'autres types de résines plus hydrophiles que les résines polystyrène, les résines à base de polyamide réticulé et les résines composites à base de polystyrène-polyéthylène glycol (PEG). Ces résines présentent une charge généralement moins importante mais peuvent être une alternative pour les grandes séquences peptidiques (plus de 25 acides aminés) ou les séquences difficiles.¹⁴³

Le type de polymère et l'espaceur vont être déterminés par la stratégie choisie ainsi que par la nature de l'extrémité C-terminale (acide carboxylique ou amide) souhaitée pour le peptide à synthétiser. Le Tableau 6 récapitule les principales résines polystyrène utilisées en SPPS.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

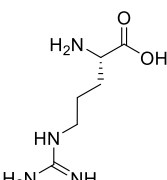
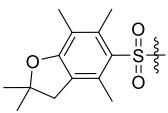
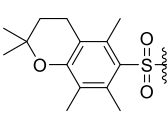
Tableau 6 : Types de résines polystyrène utilisées en SPPS. Adapté de Palomo et al.¹³⁹

Résine polystyrène	Structure chimique	Conditions de clivage	Nature de l'extrémité C-terminale du peptide final
Wang		TFA	Acide carboxylique
Rink acide		TFA	Acide carboxylique
HMPB		TFA	Acide carboxylique
2-chlorotrityl chloride		TFA	Acide carboxylique
Rink amide		TFA	Amide
MBHA		HF	Amide

Fmoc, fluorénylméthoxycarbonyl ; HMPB, acide 4-(4-Hydroxyméthyl-3-méthoxyphénoxy)butyrique ; MBHA, 4-méthylbenzhydrylamine.

Le choix de groupements protecteurs « permanents » est important. Dans le cas de la stratégie Fmoc/tBu, les groupements protecteurs orthogonaux sont éliminés lors du clivage final du peptide par le TFA. Le Tableau 7 récapitule les différents groupements protecteurs acido-labiles utilisés pour l'ensemble des acides aminés protéinogènes.

Tableau 7 : Liste des acides aminés protéinogènes nécessitant une protection « permanente » sur leur chaîne latérale et des groupements protecteurs acido-labile associés. Adapté d'Amblard et al.¹⁴³

L- Acide aminé	Structure	Groupement protecteur acido-labile
Arginine (Arg, R)		  Pbf Pmc

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Asparagine (Asn, N)			
		Trt	Mtt
Acide aspartique (Asp, D)			
		tBu	
Cystéine (Cys, C)		Trt, Mtt	
Acide Glutamique (Glu, E)		tBu	
Glutamine (Gln, Q)		Trt, Mtt	
Histidine (His, H)		Trt, Mtt	
Lysine (Lys, K)			
		Boc	
Sérine (Ser, S)		tBu,	
Thréonine (Thr, T)		tBu,	
Tryptophane (Trp, W)		Boc	
Tyrosine (Tyr, Y)		tBu	

Boc, tert-butoxycarbonyl; tBu, tert-butyl ; Mtt, 4-méthyltrityl; Pbf, pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl ; Pmc, 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl ; Trt, triphénylméthyl.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

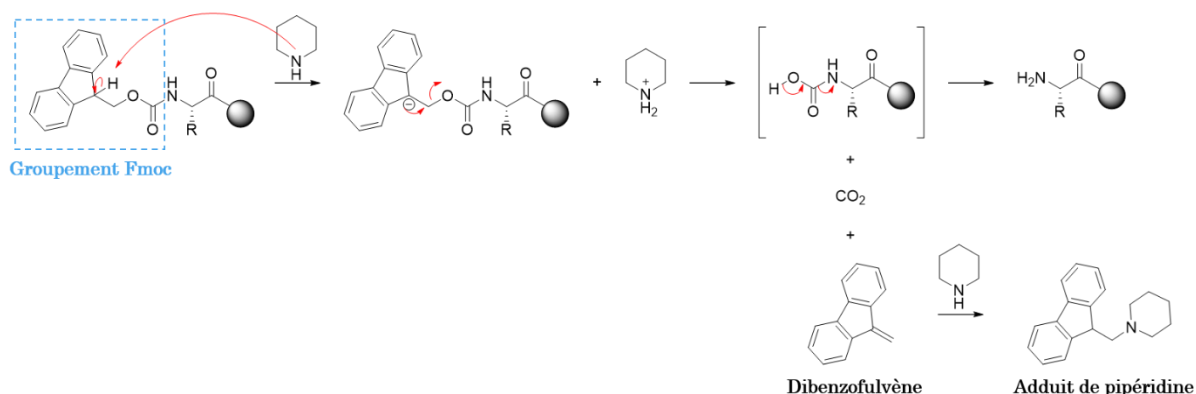
Dans le cas de certaines stratégies de synthèse, il est également possible de déprotéger sélectivement un acide aminé en utilisant des groupements protecteurs appropriés. Par exemple, pour la lysine, il est possible d'utiliser un groupement allyloxycarbonyl (Alloc) clivé en présence de Palladium ou un groupement 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidène)éthyl (Dde) clivé en présence de 2% d'hydrazine dans le DMF.^{141,144}

IV.1.3. Suivi de la SPPS

Le suivi des réactions de couplage est plus compliqué que pour les synthèses classiques en solution. Plusieurs techniques permettent cependant de suivre les étapes de déprotection et de couplage.

IV.1.3.1. Dosage du groupement Fmoc

La première de ces techniques consiste à déterminer la charge de la résine par un dosage du groupement Fmoc porté par l'extrémité *N*-terminale. Elle est souvent utilisée lors de l'accrochage du premier acide aminé sur la résine afin de vérifier quelle quantité d'acide aminé a été accrochée. Pour cela, une petite quantité pesée de résine est mise en présence d'une solution de déprotection contenant de la pipéridine. La réaction de déprotection du groupement Fmoc est une β -élimination induite en milieu basique. Lors de cette réaction, le Fmoc est éliminé en dibenzofulvène et dioxyde de carbone (Figure 28). Le dibenzofulvène formé peut alors réagir avec une seconde molécule de pipéridine pour former un adduit dont le dosage est effectué à 301 nm par spectroscopie UV.^{139,145} Cette seconde réaction permet d'éviter une réaction irréversible du dibenzofulvène avec l'amine *N*-terminale libérée. La quantification de l'adduit formé permet de déterminer indirectement la quantité en acide aminé accroché à la résine et par conséquent la charge de la résine.



IV.1.3.2. Tests colorimétriques

De nombreux tests colorimétriques qualitatifs ont été développés pour évaluer le succès des réactions de couplage et de déprotection. Ces tests permettent d'évaluer s'ils restent des amines libres en position *N*-terminale, indiquant un couplage incomplet. Une fonction amine déprotégée correspondra ainsi à un test positif alors qu'une fonction amine protégée correspondra à un test négatif. Il existe plusieurs tests notamment les tests de Kaiser et TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique) permettant de détecter préférentiellement les amines primaires, et le test chloranil permettant de détecter les amines secondaires. Lors de ces tests, quelques billes de résines sont soumises à quelques gouttes de solutions spécifiques et l'observation de la couleur des billes permet de déterminer la réussite du couplage.¹⁴⁶

Le test de Kaiser est basé sur la réaction des amines avec la ninhydrine. Une coloration bleue de la résine et de la solution correspond à un test négatif alors qu'une coloration jaunâtre correspond à la présence d'amines déprotégées.¹⁴⁷

Le TNBS réagit avec les amines primaires libres pour conduire à la formation d'un dérivé trinitré qui conduit à une coloration rouge-orange des billes de résine. Dans ce cas, seule une coloration des billes de résine, et non de la solution, est observée. Un test positif correspond à des billes rouges-orange et un test négatif correspond à des billes incolores.¹⁴⁸

Dans le test chloranil, comme pour le test TNBS, seule une coloration des billes de résine est observée. Un test positif correspond à des billes bleues foncé-vertes et un test négatif correspond à des billes incolores ou jaunâtre.¹⁴⁹

Ces tests sont plus adaptés pour des petites séquences peptidiques (< 25 acides aminés). En effet, lors de la synthèse de long peptides, l'extrémité *N*-terminale du peptide devient moins accessible et ces tests peuvent se révéler inefficaces.

IV.1.3.3. Micro-clivage

L'outil qui reste le plus fiable pour visualiser le bon déroulement de la SPPS est le micro-clivage. Celui-ci consiste à prélever quelques billes de résine et de les soumettre aux conditions de clivage puis d'analyser le peptide clivé obtenu par LC-MS.¹⁴⁵

IV.1.3.4. Capping

S'il n'est pas possible de vérifier le bon déroulement de la synthèse ou si malgré des étapes de couplage répétées, le couplage reste incomplet, des étapes de capping peuvent être effectuées à l'issue de celui-ci. Cette étape consiste en l'acétylation des fonctions amines n'ayant pas réagi au cours de la synthèse afin de les neutraliser et ainsi éviter la formation de peptides de délétion.¹⁴⁶

IV.1.4. Agents de couplage

Lors du couplage peptidique, il est nécessaire d'activer la fonction acide carboxylique en position C-terminale de l'acide aminé à coupler sur la résine. Cette activation rend cette fonction plus réactive, ce qui permet de réduire les temps de couplage et d'augmenter les rendements de couplage. Pour cela, des agents de couplage sont utilisés pour activer *in situ* l'acide aminé. Il existe deux catégories principales d'agents de couplage : les carbodiimides et les sels de phosphonium et d'uronium.¹⁵⁰

IV.1.4.1. Les carbodiimides

L'utilisation de carbodiimides pour la synthèse peptide a été introduite en 1955 par Sheelan et Hess.¹⁵¹ Ces composés permettent la formation d'une O-acylisourée par réaction du carbodiimide avec la fonction acide carboxylique de l'acide aminé. L'O-acylisourée ainsi formée est en principe capable de réagir avec l'amine libre en position N-terminale sur le peptide en croissance accroché à la résine. Ce couplage peptidique engendre la libération d'un dérivé urée (Figure 29).

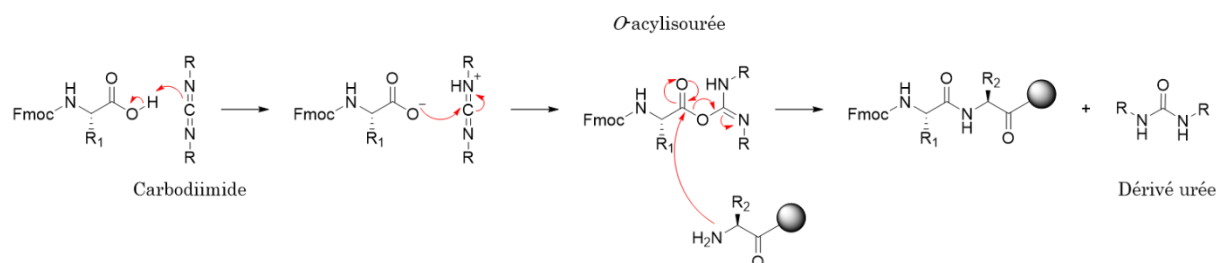


Figure 29 : Mécanisme de la réaction d'activation par les carbodiimides suivi du couplage du Fmoc-acide aminé au peptide en elongation.

Le Tableau 8 récapitule quelques exemples de carbodiimides utilisés en SPPS.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Tableau 8 : Exemples de carbodiimides utilisés en SPSS.

Carbodiimide	Structure
DCC ¹⁵¹	
DIC ¹⁵²	
EDCI ¹⁵²	

DCC, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide ; DIC, *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide ; EDCI, *N*-Ethyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide.

Cependant, l'utilisation de carbodiimides présente l'inconvénient de générer plusieurs réactions secondaires. En effet, la réaction de couplage avec ce type de composé est généralement lente et peut alors se traduire par la migration de l'aminoacyle du O vers le N de l'*O*-acylisourée conduisant à un dérivé inactif (Figure 30A) ou par la formation significative d'une oxazolone entraînant une racémisation (Figure 30B).¹⁵³

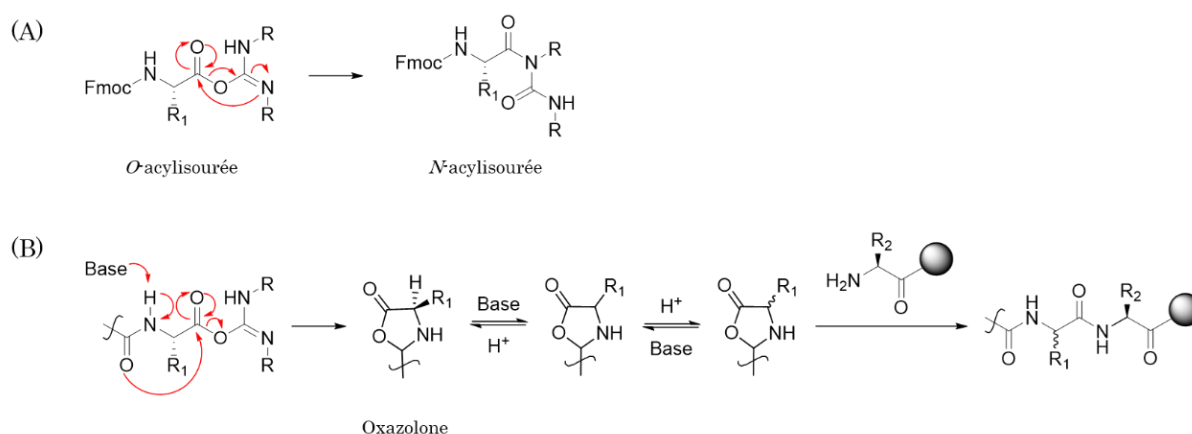


Figure 30 : Mécanismes des réactions pouvant se produire lors de l'activation d'un Fmoc-acide aminé par un carbodiimide. (A) Formation de la *N*-acylisourée et (B) Racémisation par la formation d'une oxazolone.¹⁵³

L'ajout d'un nucléophile auxiliaire plus réactif tel que l'1-hydroxybenzotriazole (HOBt) peut permettre de réduire la probabilité de ces réactions secondaires. Ce nucléophile auxiliaire va réagir plus rapidement avec l'*O*-acylisourée pour former un ester activé plus réactif (Figure 31).¹⁵³

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

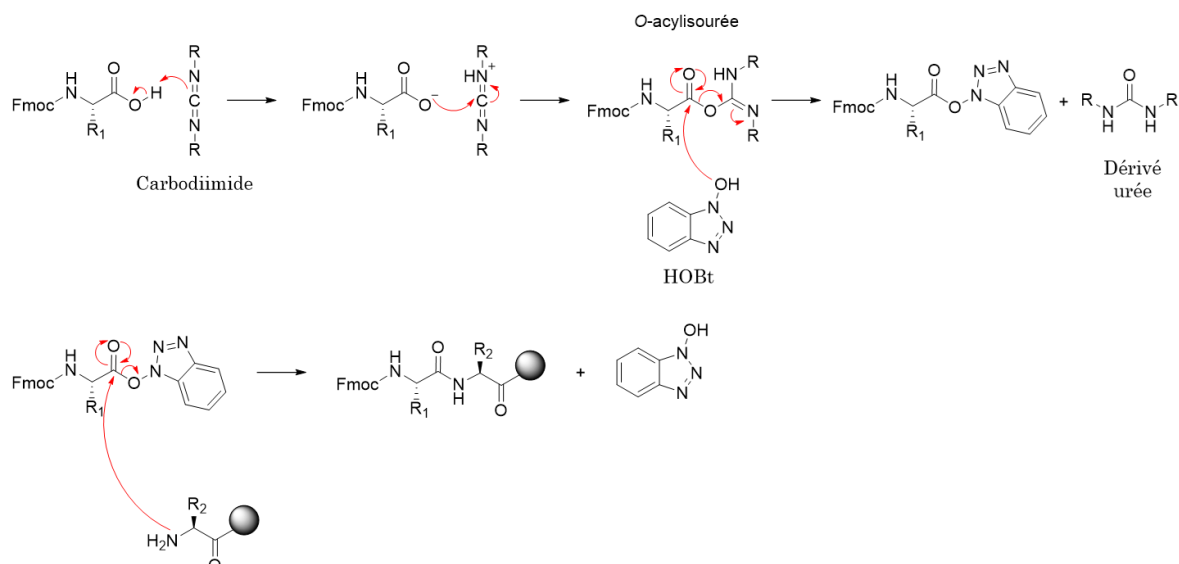


Figure 31 : Mécanisme de la réaction d'activation par les carbodimides et l'HOBt suivi du couplage du Fmoc-acide aminé au peptide en élévation.¹⁵⁰

IV.1.4.2. Sels de phosphonium

Les sels de phosphonium, tout comme les sels d'uronium, sont des sels d'oniums dérivés de l'HOBt et sont très largement utilisés en SPPS. L'un des premiers décrits est le BOP (Hexafluorophosphate de 1-*H*-benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino) phosphonium), aussi appelé réactif de Castro.¹⁵⁴

L'utilisation de sels de phosphonium nécessite également l'utilisation d'une base afin de former un carboxylate ; c'est cette espèce qui va réagir avec le sel de phosphonium pour former un sel acyloxyphosphonium longtemps considéré comme l'espèce réactive dans ce mécanisme. D'autres études ont montré qu'il était plus probable que l'espèce réactive soit l'ester formée avec l'HOBt libéré lors de la formation de ce sel (Figure 32).¹⁵⁵

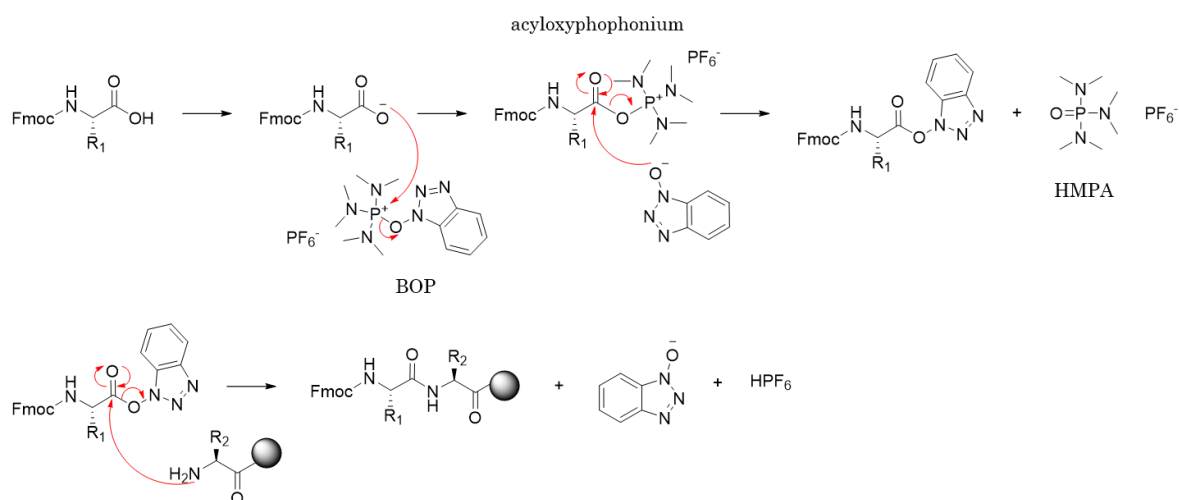
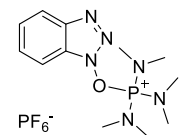
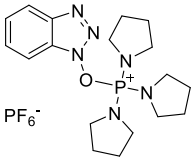
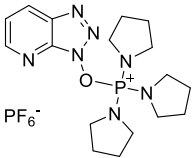
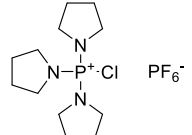


Figure 32 : Mécanisme de la réaction d'activation par le BOP suivi du couplage du Fmoc-acide aminé au peptide en élévation.¹⁵⁵

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

En revanche, bien que très réactif, l'utilisation du BOP conduit à la libération d'une espèce très toxique : l'hexaméthylphosphoramide (HMPA). Pour pallier ce problème, d'autres sels de phosphonium dérivés de la structure du BOP ont été développés : PyBOP, PyAOP, PyCloP (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste de sels de phosphonium utilisés en SPPS.

Sel de phosphonium	Structure
BOP ¹⁵⁴	
PyBOP ¹⁵⁶	
PyAOP ¹⁵⁷	
PyCloP ¹⁵⁸	

BOP, Hexafluorophosphate de 1-*H*-benzotriazol-1-yloxy-tris(diméthylamino) phosphonium ; PyBOP, Hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium; PyAOP, Hexafluorophosphate de (7-azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium ; PyCloP, Hexafluorophosphate de chlorotripyrrolidinophosphonium.

IV.1.4.3. Sels d'uronium

Ces agents de couplages sont également très utilisés en synthèse peptidique. Les sels d'uronium possèdent une charge positive portée par un atome de carbone. Le mécanisme de la réaction d'activation par les sels d'uronium est décrit en Figure 33. Comme pour les sels de phosphonium, cette réaction se fait en présence d'une base conduisant à la formation d'un ion carboxylate qui va réagir avec le sel d'uronium pour former un sel carboxyluronium. L'HOBt libéré va alors réagir avec ce sel pour générer un ester activé qui va pouvoir réagir par couplage peptidique avec l'amine libre en position *N*-terminale sur le peptide en expansion accroché à la résine (Figure 33, Voie A).

Un des inconvénients majeurs dans l'utilisation de ces agents de couplage est la formation d'un dérivé tétraméthylguanidinium bloquant de façon irréversible la fonction *N*-terminale du peptide en expansion (Figure 33 Voie B). Pour éviter cette réaction

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

secondaire, il est donc impératif de générer dans un premier temps l'ion carboxylate de l'acide aminé et d'ajouter ensuite le réactif de couplage et d'ajouter en dernier le peptide possédant une extrémité *N*-terminal libre.¹⁵⁵

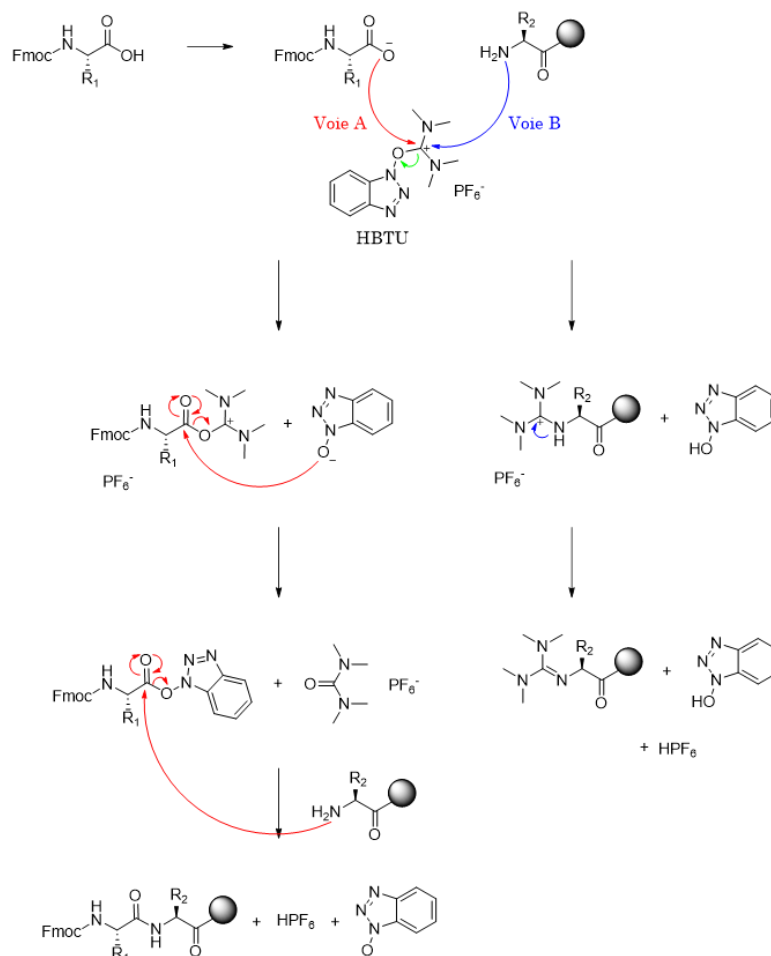


Figure 33 : Mécanisme de la réaction d'activation par l'HBTU suivi du couplage du Fmoc-acide aminé au peptide en élongation (voie a) et la réaction secondaire conduisant à la guanidinylation de la fonction amine *N*-terminale du peptide en expansion (voie b).¹⁵⁵

Le Tableau 10 récapitule quelques exemples de sels d'uronium utilisés en SPPS.¹⁵⁵

Tableau 10 : Exemple de sels d'uronium utilisés en SPPS.

Sel d'uronium	Structure
HATU ¹⁵⁹	
HBTU ¹⁶⁰	

HATU, Hexafluorophosphate de 1-[bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxyle ; HBTU, Hexafluorophosphate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tétraméthyluronium.

IV.1.5. Clivage

En stratégie Fmoc/tBu, le clivage du peptide de la résine s'effectue en milieu acide en présence de TFA, les chaînes latérales sont également déprotégées. En revanche, des carbocations provenant de groupements protecteurs (tels que le groupement tBu) peuvent être formés. Ceux-ci peuvent alors réagir avec les chaînes latérales d'autres acides aminés sur le peptide (par exemple, les chaînes latérales de la méthionine et du tryptophane). Pour éviter cela, des nucléophiles appelés « scavengers » tels que le Triisopropylsilane (TIS) ou certains thiols (éthanedithiol (EDT)) sont utilisés. Le peptide ainsi clivé est ensuite précipité dans l'éther diéthylique à froid.^{143,155}

IV.2. Synthèse des composés

La synthèse des composés a été réalisée entièrement par SPPS.

IV.2.1. Synthèse du composé K(Pyro-a)DKPPR (7)

Afin de coupler la Pyro-a au peptide KDKPPR, deux synthèses en parallèle ont été effectuées, 1) le couplage en solution de la Pyro-a sur l' ϵ -NH₂ de la lysine d'une part et 2) la synthèse du peptide DKPPR d'autre part.

La première étape de cette synthèse a donc consisté au couplage de la Pyro-a sur l' ϵ -NH₂ de la lysine (Figure 34). Pour cela, la fonction acide carboxylique de la Pyro-a a été préalablement activée par un groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence d'EDCI dans un mélange THF/DMF. La Pyro-a ainsi activée sous forme d'ester NHS (**1**) a été couplée sur l' ϵ -NH₂ de la lysine en présence de triéthylamine dans un mélange CHCl₃/DMF. Le composé **2** a été obtenue avec un rendement global de 83% et une pureté en HPLC de 97% après purification par chromatographie sur colonne de silice.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

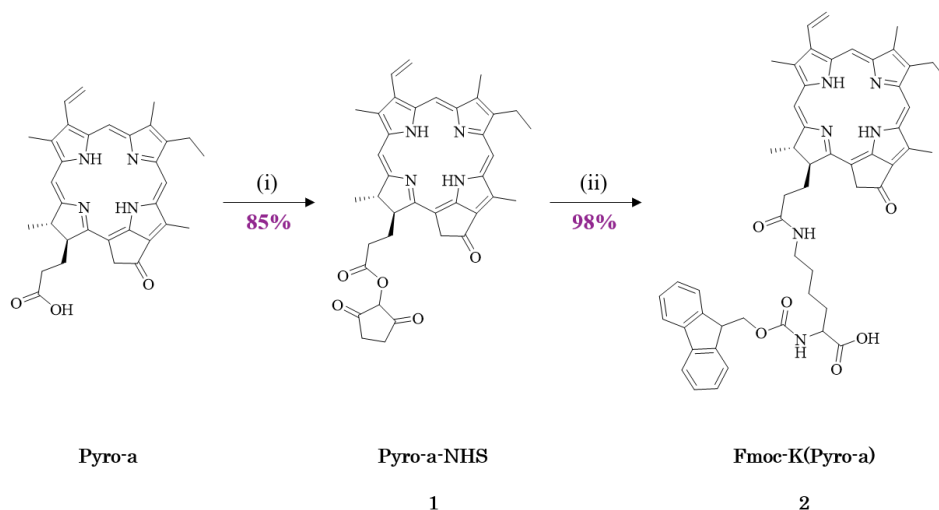


Figure 34 : Synthèse du composé 2. (i) NHS, EDCI, THF/DMF, 12 h, 40°C ; (ii) Fmoc-Lys-OH, Et₃N, CHCl₃/DMF, 12 h, t_{amb} .

D'autre part, le peptide **6**, protégé sur ses chaînes latérales, a été synthétisé (Figure 35). Le peptide **6** a été obtenu par une succession d'étapes de déprotection, couplage et capping.

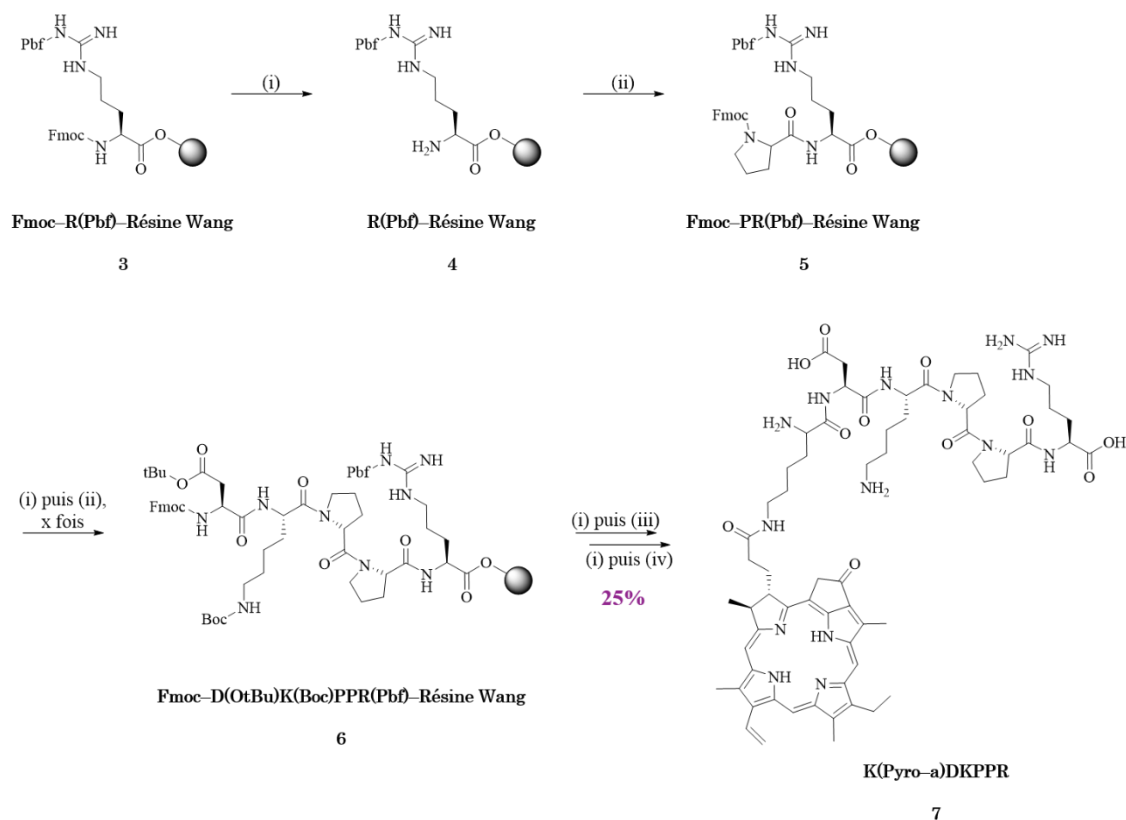


Figure 35 : Synthèse du composé 7. (i) déprotection : 20% pipéridine dans le DMF, 4 min puis 7 min (synthétiseur) ou 4 x 15 min (manuelle), t_{amb} ; (ii) couplage : Fmoc-AA(GP)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 x 18 min, t_{amb} ; (iii) couplage : 2, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 h, t_{amb} et (iv) clivage : TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 h, t_{amb} .

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

A partir du peptide **6** ainsi synthétisé, le composé **2** a ensuite été couplée à ce dernier, après déprotection préalable du groupement Fmoc, dans des conditions de couplage similaire à celles utilisées pour la synthèse du peptide. Après la déprotection de l'extrémité *N*-terminale, le composé a finalement été clivé du support et déprotégé sur ses chaînes latérales en milieu acide pour obtenir le composé **7** avec un rendement global de 25% après purification par HPLC préparative.

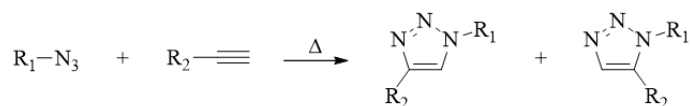
IV.2.2. Synthèse de la plateforme trimodale Alc1'-K(Pyro-a)DKPPR (14)

Concernant le couplage de Alc1', il a été choisi de la greffer sur l'extrémité *N*-terminale libre du peptide et deux stratégies de couplage ont été envisagées, par réaction de chimie click ou par SPPS.

IV.2.2.1. Couplage par chimie click

La réaction de chimie click choisie est la cycloaddition azoture alcyne catalysée par le cuivre (I) (CuAAC) ou cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre. La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen est une réaction non catalysée permettant la synthèse de 1,2,3-triazoles à partir d'un azoture et d'un alcyne sous haute température.^{161,162} Cette réaction est lente et non sélective, conduisant à la synthèse d'un mélange de régioisomères 1,4- et 1,5-disubstitués 1,2,3-triazoles (Figure 36). Le terme de « chimie click » a été introduit en 2001 par Sharpless.¹⁶³ La cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu (I) entre un alcyne et un azoture (CuAAC) a été simultanément découverte en 2002 par les équipes de Medal et Sharpless.^{164,165} L'utilisation de cuivre (I) comme catalyseur permet d'augmenter la vitesse de la réaction et également d'avoir une réaction régiosélective conduisant à l'obtention de l'isomère 1,4-disubstitué. L'utilisation de la CuAAC pour la synthèse de dérivés de PSs tels que les porphyrines, chlorines et phtalocyanines, a été décrite dans la littérature.¹⁶⁶

Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen :



Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre :

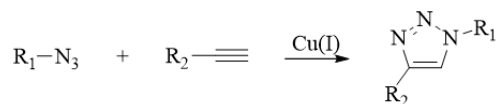


Figure 36 : Synthèse de 1,2,3-triazoles par cycloaddition 1,3-dipolaire d'azoture et d'alcyne.

Pour effectuer le lien triazole entre la Pyro-a et l'Alc1', nous avons choisi de greffer 1) un groupement alcyne sur Alc1' en faisant réagir sa fonction acide carboxylique avec la propargylamine et 2) un groupement azoture sur l'extrémité N-terminale du composé K(Pyro-a)DKPPR-Résine Wang avec l'acide azidohexanoïque.

Afin de greffer le bras alcyne sur Alc1', des conditions similaires à la synthèse du composé **2** ont été utilisées. La fonction acide carboxylique de Alc1' a d'abord été activée sous forme d'ester de NHS en présence de NHS et d'EDCI dans un mélange acétate d'éthyle (AcOEt)/DMF. La propargylamine a ensuite été couplée à Alc1' ainsi activée en présence de triéthylamine dans un mélange CHCl₃/DMF (Figure 37). Le composé **9** a alors été obtenu après plusieurs lavages et extraction avec un rendement quantitatif et utilisé sans purification dans l'étape suivante.

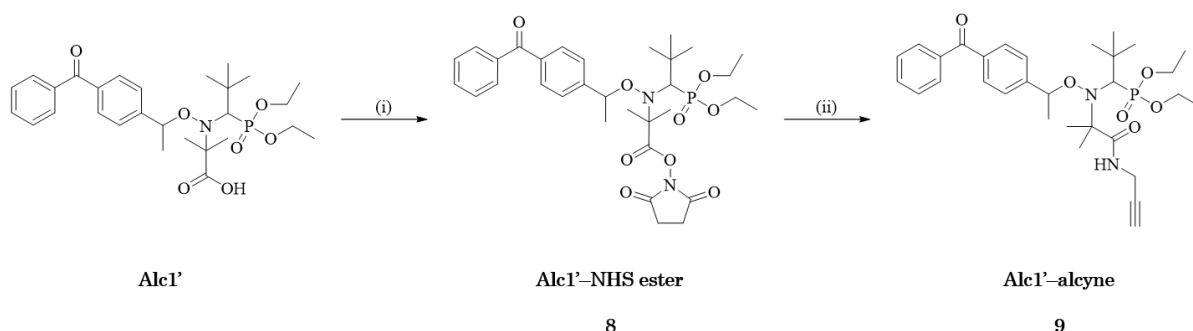


Figure 37 : Synthèse de l'Alc1' fonctionnalisée par un bras alcyne, **9**. (i) NHS, EDCI, AcOEt/DMF, 24 h, 35°C et (ii) propargylamine, Et₃N, CHCl₃/DMF, 30 h, t_{amb}.

Le bras azoture azidohexanoïque a été couplé au peptide en croissance dans les mêmes conditions de couplage que celles décrites pour la synthèse du peptide. Le composé ainsi obtenu a ensuite été clivé de la résine et déprotégé sur ses chaînes latérales pour conduire à l'obtention du composé **11** après centrifugation dans l'éther à froid et utilisé sans purification pour l'étape suivante. Pour éviter une insertion du cuivre au centre du cycle

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

du motif Pyro-a lors de la réaction de CuAAC suivante, le composé **11** a été zingué à l'aide d'acétate de zinc dans le DMF pour conduire au composé **12** utilisé sans purification pour l'étape suivante (Figure 38).¹⁶⁷

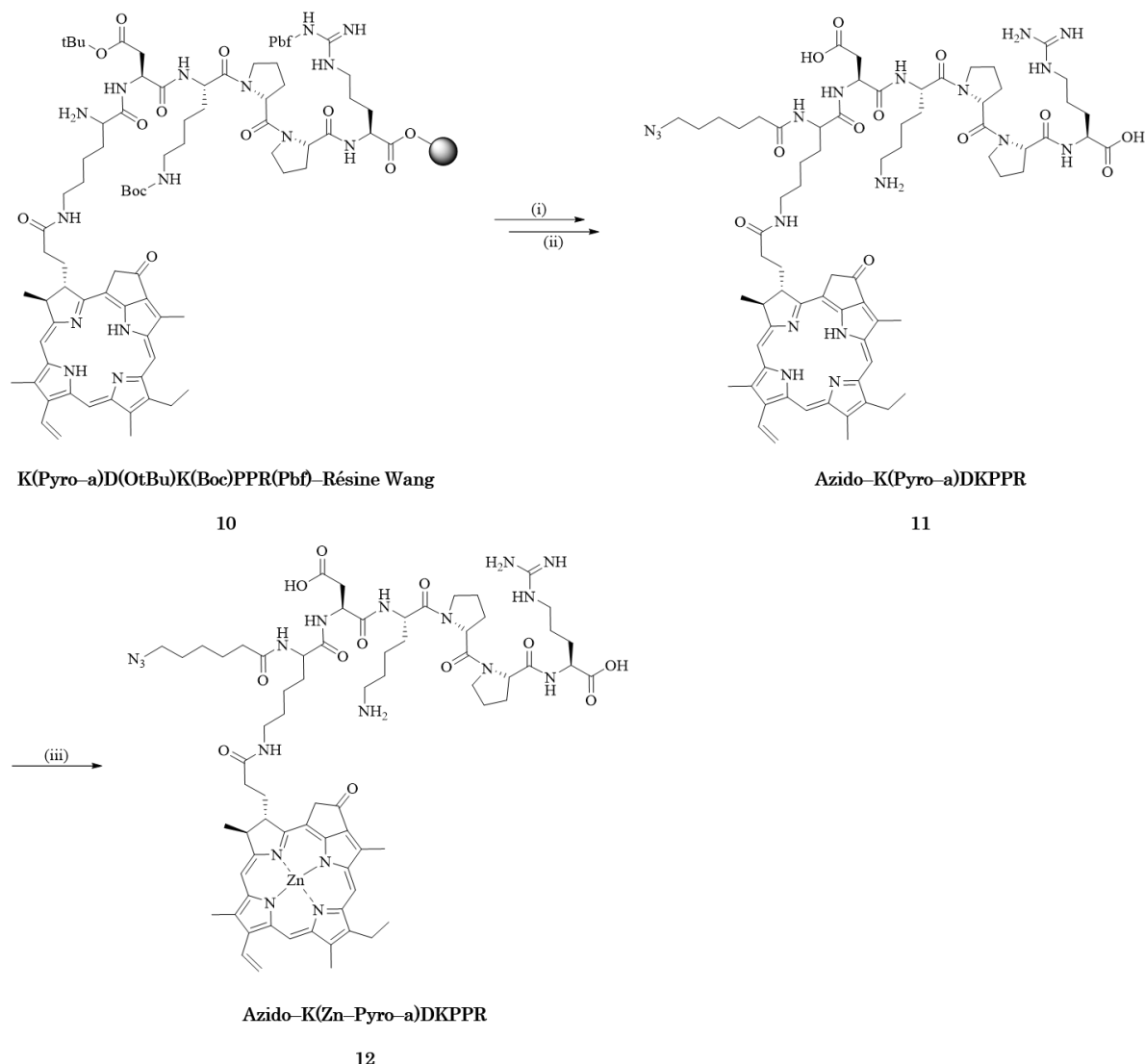


Figure 38 : Synthèse du composé **12** possédant un bras azoture. (i) couplage : Acide azidohexanoïque, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 h, t_{amb} , (ii) clivage : TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 h, t_{amb} et (iii) Zn(OAc)₂, DMF, 2,5 h, 40°C.

En revanche, après l'ajout du zinc, des problèmes de solubilité dans la majorité des solvants organiques, à l'exception du DMF, et aqueux ont été rencontrés rendant difficile la caractérisation du produit par les techniques d'analyse classiques (HPLC, MS, RMN ¹H et ¹³C). La formation du composé **12** a pu être confirmée par spectroscopie UV visible dans le DMF (Figure 39). En effet, lors de l'insertion du zinc, il apparaît un décalage des pics caractéristiques du spectre d'absorption de la Pyro-a.

Plusieurs changements ont pu alors être observés :

- Un déplacement bathochrome de la bande de Soret de 412 nm à 428 nm ;

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

- Une disparition des bandes Q₃ et Q₄ ;
- Un déplacement hypsochrome de la bande Q₂ de 609 nm à 615 nm et de la bande Q₁ de 670 nm à 661 nm.

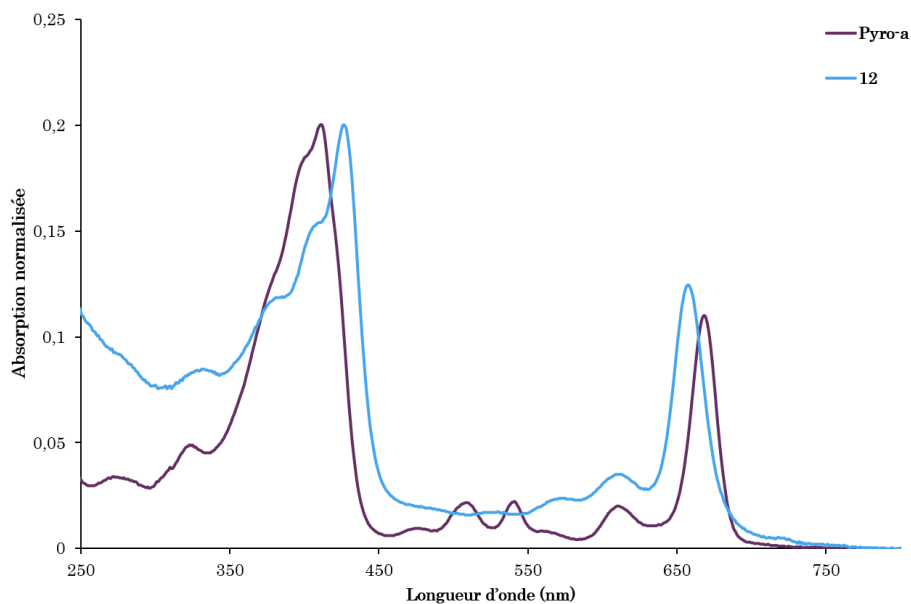


Figure 39 : Spectre d'absorption UV-visible normalisé de la Pyro-a et du composé 12 dans le DMF.

La réaction de CuAAC entre les composés **9** et **12** a été ensuite effectuée dans un mélange DMF/H₂O (Figure 40) en présence de CuSO₄ et d'ascorbate de sodium. Les problèmes de solubilité ont persisté. Le composé obtenu a été traité en milieu acide afin d'éliminer le zinc.¹⁶⁸ Après analyse par HPLC, l'apparition d'un nouveau pic n'a pas été détecté et le pic correspondant au composé **9** de départ a été observé indiquant que la réaction de CuAAC n'a pas eu lieu.

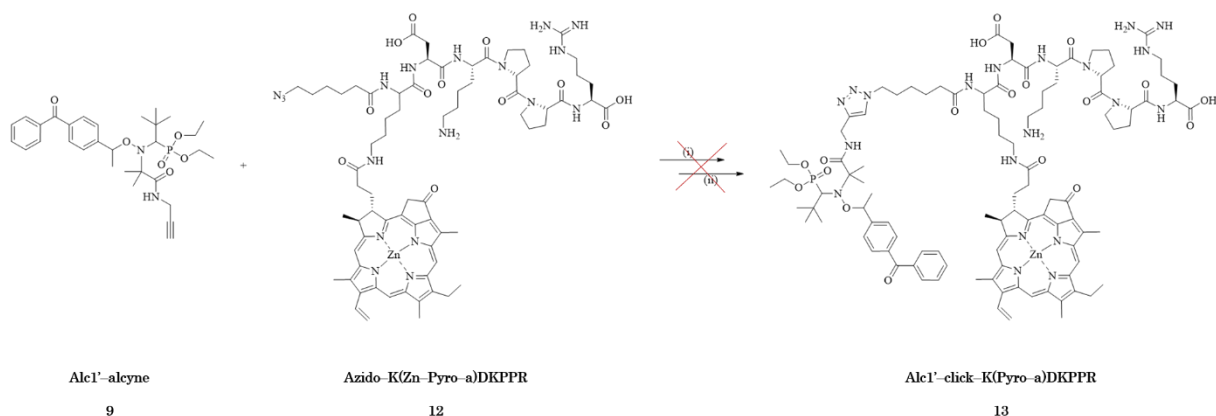


Figure 40 : Tentative de synthèse de la plateforme trimodale 13. (i) CuSO₄, Ascorbate de sodium, DMF/H₂O, 24 h, t_{amb} et (ii) TFA, 5 min, 0°C.

Il nous a alors fallu opter pour une autre stratégie.

IV.2.2.2. Couplage par SPPS

Le couplage de l'Alc1' au peptide et au PS directement par SPPS a été envisagé (Figure 41). Un premier essai a été effectué en utilisant les conditions classiques de couplage (HBTU, NMM, NMP) mais malgré la disparition des produits de départ et l'apparition de deux nouveaux pics en HPLC, le produit attendu n'a pas été observé.

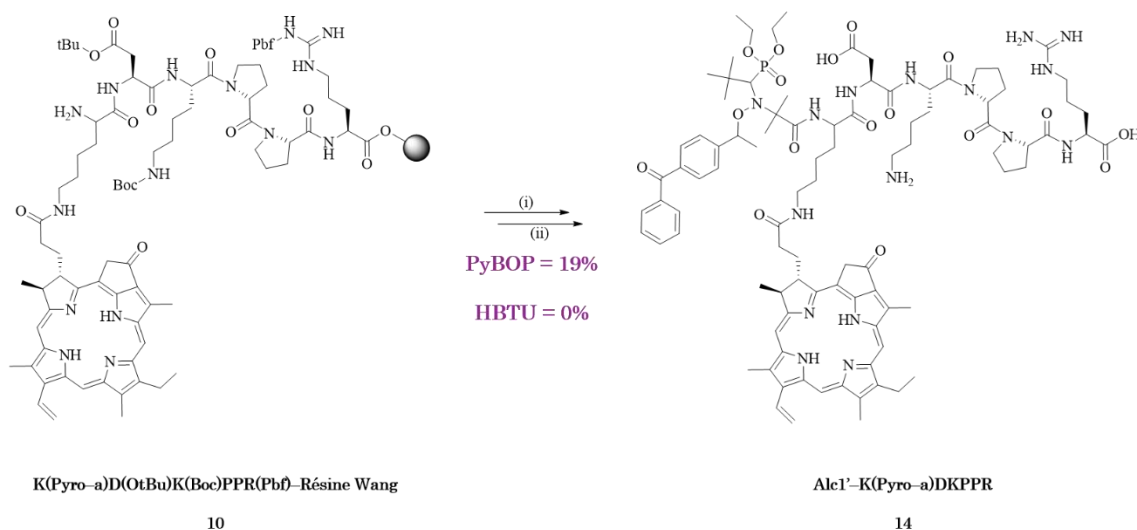


Figure 41 : Tentative de couplage de l' Alc1' au composé 10 par SPPS. (i) couplage : HBTU, NMM, NMP, DMF ou PyBOP, DIPEA, DMF, 12 h, t_{amb} et (ii) clivage : TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 h, t_{amb} .

De nouvelles conditions de couplage ont été testées, d'après Trimaille *et al.*,¹⁶⁹ utilisant cette fois-ci le PyBOP comme agent de couplage et la DIPEA comme base dans le DMF. Avec ces conditions, le produit souhaité a été obtenu mais le couplage n'a pas été total, un second couplage a été par conséquent effectué. La répétition de cette dernière étape n'a, cependant, pas entraîné une amélioration significative du ratio entre le produit de départ et le produit souhaité (Figure 42).

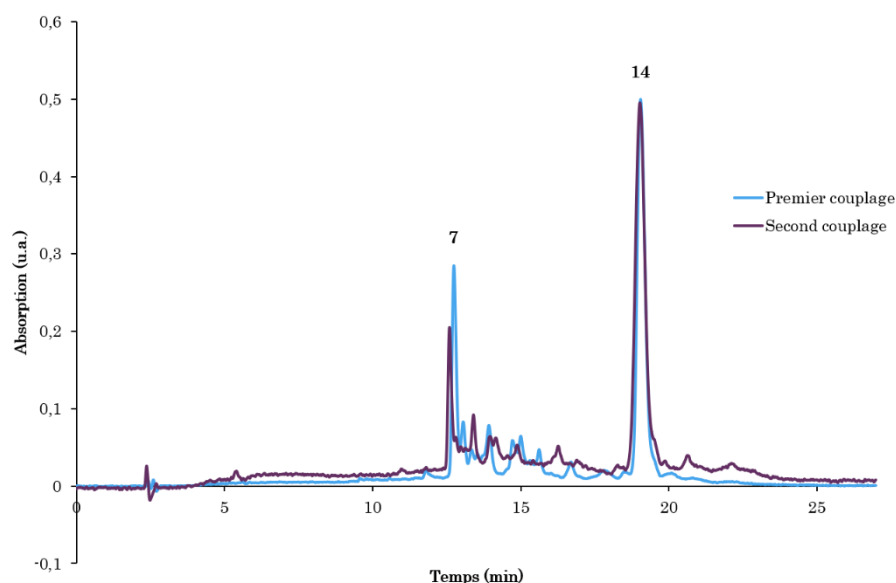


Figure 42 : Chromatogramme HPLC du composé 14 à l'issue des premier et second couplages entre l'Alc1' et 10 suivi d'un clivage de la résine. Gradient de 10 à 100% acétonitrile (ACN) dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min (détection UV : 415 nm).

Le peptide a ensuite été clivé de la résine et déprotégé sur ses chaînes latérales pour conduire, après purification par HPLC préparative, à la plateforme trimodale 14 avec un rendement global de 19%.

IV.2.3. Synthèse du composé Alc1'–KDKPPR (16)

Le peptide Fmoc–KDKPPR–Résine Wang a été synthétisé selon les mêmes stratégie et méthode que pour le peptide DKPPR décrites dans la partie IV.2.1. Après déprotection du groupement Fmoc, l'Alc1' a été couplée au peptide en présence de PyBOP et DIPEA dans le DMF (Figure 43). Le couplage s'est révélé total (Figure 44).

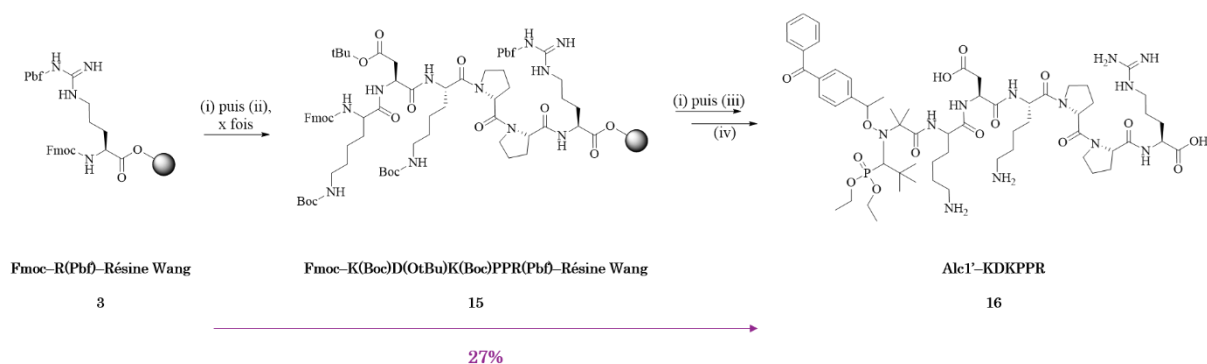


Figure 43 : Synthèse du composé 16. (i) déprotection : 20% pipéridine dans le DMF, 7 min puis 14 min (synthétiseur) ou 4 x 15 min (manuelle), t_{amb} , (ii) couplage : Fmoc-AA(GP)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 2 x 18 min, t_{amb} , (iii) couplage : Alc1', PyBOP, DIPEA, DMF, 12 h, t_{amb} et (iv) clivage : TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5 ; v/v/v), 2 h, t_{amb} .

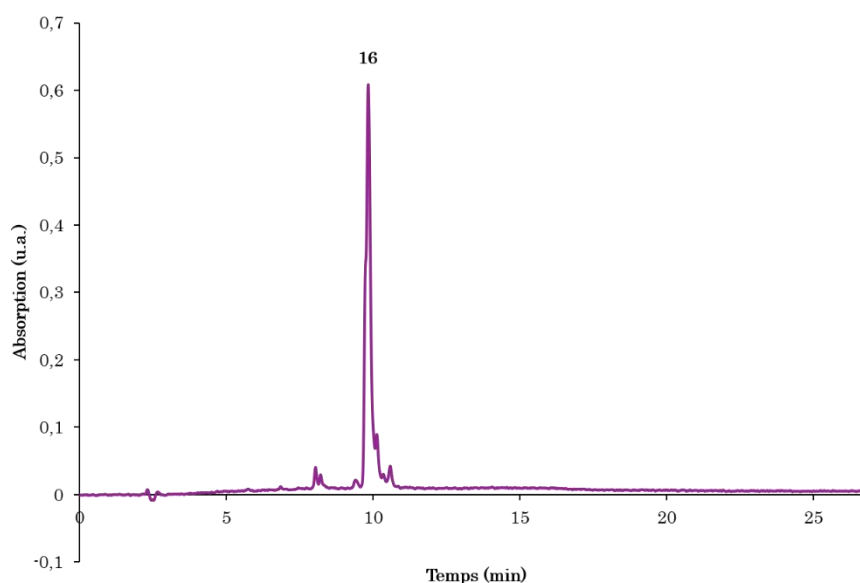


Figure 44 : Chromatogramme HPLC à 260 nm du composé 16 à l'issue du couplage de l'Alc1'. Gradient de 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min (détection UV : 260 nm).

Le produit **16** a pu être obtenu après clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales et purification par HPLC préparative avec un rendement de 27%.

IV.3. Purification par HPLC préparative

IV.3.1. Principe

Les composés synthétisés par SPSS ont été purifiés par HPLC préparative. Le principe de cette méthode est de séparer des composés en fonction de leurs interactions avec une phase solide dite stationnaire. Le composé solubilisé est injecté puis entraîné par une phase liquide (phase mobile) dans une colonne contenant la phase stationnaire. Un débit élevé est imposé à la phase mobile augmentant ainsi la pression du système et permettant une séparation plus rapide des composés. Ce sont les interactions entre les composés et la phase stationnaire qui vont définir l'ordre de sortie des différentes espèces. La phase stationnaire est le plus souvent constituée de gel de silice, préparé sous forme de microsphères et comportant des pores de tailles différentes. Ce gel de silice présente une forte polarité qui peut être réduite par certaines modifications de ce gel, conduisant à l'obtention de silice greffée. Ce greffage permet d'obtenir des phases stationnaires peu polaires et hydrophobes. Parmi ces silices greffées, il existe les phases RP-C8 (*Reverse Phase*) et RP-C18 pour lesquelles des chaînes carbonées de 8 et 18 atomes de carbones sont greffées sur le gel de silice. En opposition à une phase apolaire, une phase mobile polaire est généralement utilisée. Ce procédé est appelé chromatographie en phase inverse

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

(RPLC). Dans ce cas-là, il est généralement utilisé un mélange d'eau et d'ACN ou MeOH. Les composés polaires sont élués les premiers et les composés apolaires seront plus facilement retenus par la colonne et donc élués plus tard.

IV.3.2. Purification des composés

Dans le cas de la purification de nos composés, nous avons utilisé la RPLC et une colonne RP-C18 avec pour solvants l'eau (A) et l'ACN (B) contenant 0,1% de TFA. Les composés **7** et **16** ont été purifiés facilement en suivant un gradient de 10% B à 100% B en 15 min suivi d'un isocratique pendant 10 min pour **7** et un gradient de 10% B à 100% B en 25 min pour **16** et utilisant un débit de 12 mL.min⁻¹ (Figure 45).

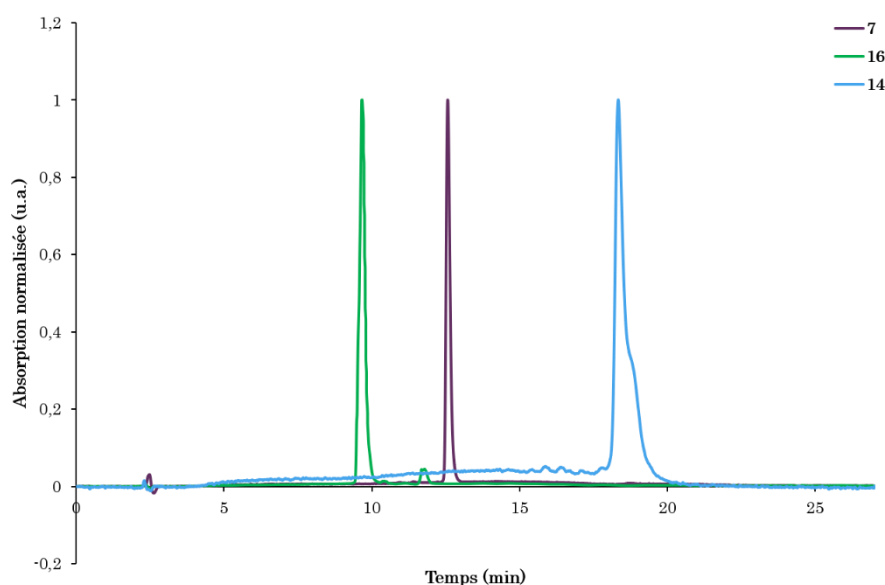


Figure 45 : Chromatogrammes HPLC obtenus pour les composés **7**, **16** et **14** purifiés. Gradient de 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min (détection UV : 260 nm pour **16** et 415 nm pour **7** et **14**).

Concernant la plateforme trimodale **14**, de nombreuses difficultés ont été rencontrées pour sa purification. En effet, une bonne séparation des pics a été observée en HPLC analytique en utilisant le même gradient que pour le composé **7**, mais lors de la transposition de la méthode en HPLC préparative, le produit était élué à 100% d'ACN avec une mauvaise résolution (Tableau 11, Essai 1). Pour remédier à ce problème, il a été choisi de modifier le gradient en commençant à une plus forte quantité d'ACN (50%) suivi d'un palier isocratique plus ou moins long (Tableau 11, Essais 2–3 et Figure 46). Les mêmes observations que pour l'essai 1 ont été effectuées avec l'obtention d'une mauvaise résolution. Nous avons décidé d'augmenter l'acidité de la phase mobile pour réduire la

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

réretention du produit sur la colonne en utilisant les mêmes conditions d'élution que pour l'essai 1 (Tableau 11, Essai 4). Ceci n'a pas amélioré le profil du chromatogramme HPLC.

Tableau 11 : Essais de purification HPLC du composé 14 sur colonne C18.

Essai	Colonne	Solvant A	Solvant B	Gradient	Débit (mL.min ⁻¹)
1	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	10%B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B	12
2	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	50%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B	12
3	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	50%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 100%B	12
4	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,4%TFA	ACN + 0,4%TFA	10%B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100%B	12
5	10*250 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	50%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 100%B	4
6	10*250 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	80%B $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{25 \text{ min}}$ 100%B	4
7	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,1%TFA	ACN + 0,1%TFA	10%B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B	15
8	21,2*150 mm 5 μm	H ₂ O + 0,4%TFA	ACN + 0,4%TFA	10%B $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 100%B $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 100%B	15

Nous avons alors choisi de tester une colonne semi-préparative possédant un diamètre plus faible (10 mm). Deux essais de gradient ont été effectués, un premier identique à celui utilisé pour l'essai 3 et un second plus rapide et démarrant à un plus fort pourcentage d'ACN (80%) (Tableau 11, Essais 5–6 et Figure 46). En plus d'être élué sur un temps très long, le pic d'intérêt était co-élué avec plusieurs autres pics dans ces deux conditions. Cette colonne n'a, par conséquent, pas été retenue.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

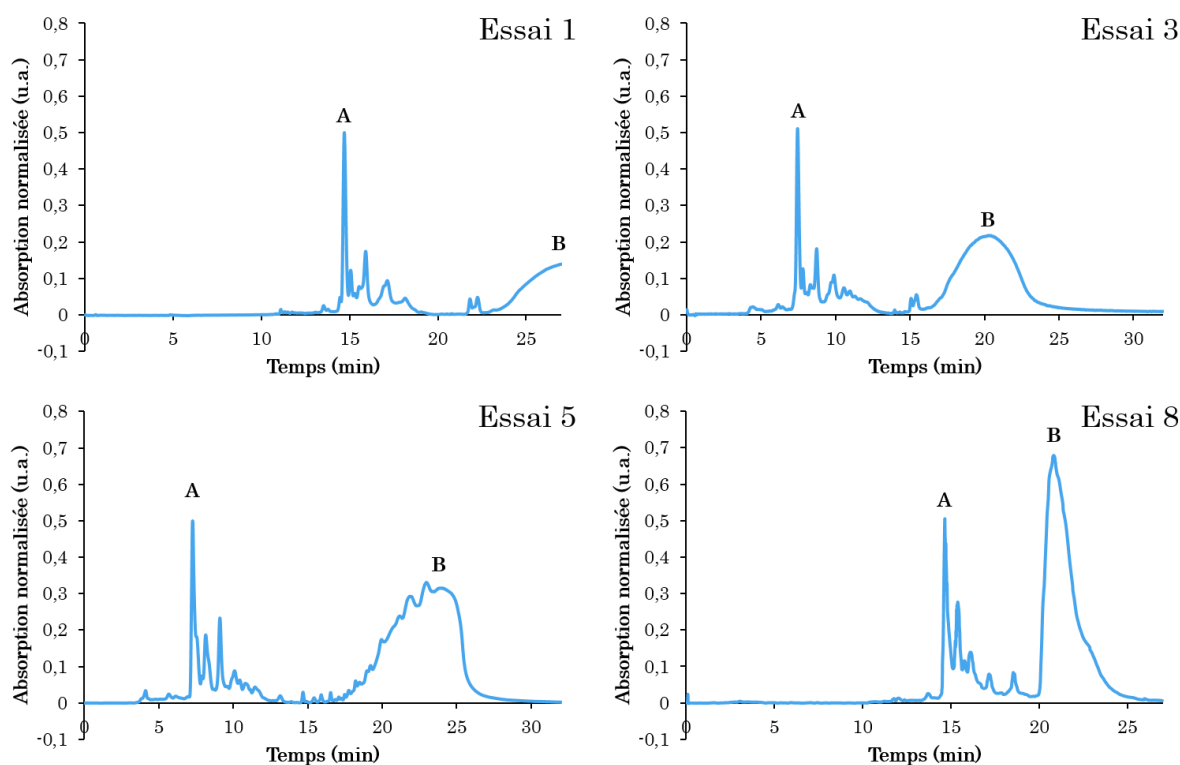


Figure 46 : Chromatogramme HPLC de plusieurs essais de purification du composé 14. A, 7 et B, 14 (Détection UV : 415 nm).

Les derniers essais effectués ont été réalisés en utilisant les mêmes conditions que pour les essais 1 et 4 mais en utilisant cette fois-ci une HPLC permettant d'utiliser un débit plus élevé ($15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) (Tableau 11, Essais 7–8 et Figure 46). En utilisant une phase mobile acidifiée à 0,1% de TFA, un pic beaucoup moins large a été observé mais une mauvaise reproductibilité entre les injections a été mise en évidence. En revanche, l'utilisation d'une phase mobile acidifiée à 0,4% de TFA a permis d'obtenir un profil exploitable, permettant à la fois une bonne séparation des composés et une bonne résolution du pic. De plus, une très bonne reproductibilité a été observée (Tableau 11, Essai 8). Ce sont, par conséquent, ces dernières conditions qui ont été retenues pour la purification du composé 14 (Figure 45).

Le Tableau 12 récapitule les rendements et puretés obtenus après purification des composés dans les conditions décrites précédemment.

Tableau 12 : Récapitulatif des rendements et puretés obtenus pour les différents composés synthétisés.

Composé	Rendement	Pureté HPLC
7	25%	>99%
14	19%	98%
16	27%	95%

V. Détermination des propriétés photophysiques

Les propriétés physiques des composés synthétisés contenant la Pyro-a ainsi que le PS seul ont été évaluées dans plusieurs solvants (diméthylsulfoxyde (DMSO), EtOH, MeOH et eau deutérée (D₂O)).

V.1. Absorption

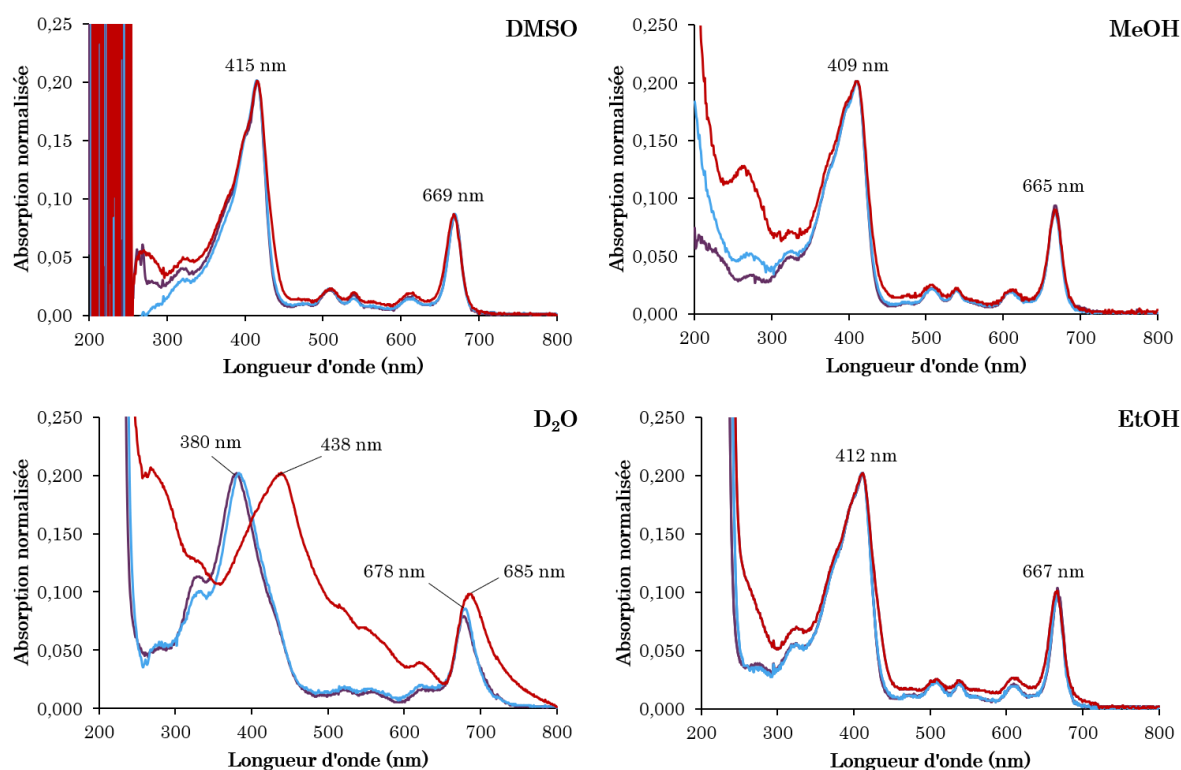
Les spectres d'absorption UV-visible des différents composés ont été déterminés dans le DMSO, tous les composés présentant la meilleure solubilité.

Le spectre d'absorption UV-visible de l'Alc1' seule dans le DMSO a été enregistré et a montré un pic entre 200 et 300 nm avec un maximum à 260 nm.

Les spectres d'absorption de la Pyro-a ainsi que celles des composés **7** et **14** ont été enregistrés dans différents solvants (Figure 47). Dans l'EtOH et le MeOH, une bande de Soret légèrement plus large par rapport au spectre dans le DMSO a été observée. En revanche, dans le D₂O un élargissement très important des pics est observé ainsi qu'un déplacement bathochrome de la bande de Soret et de la bande Q_I. Pour la Pyro-a et le composé **7**, un déplacement hypsochrome a été observé pour la bande de Soret de 415 à 381 nm alors que pour le composé **14**, au contraire, un déplacement bathochrome de 415 à 438 nm a été observé. Ces changements peuvent s'expliquer par une agrégation des composés dans le D₂O.

Les plus faibles coefficients d'extinction molaire ϵ observés pour tous les composés dans le D₂O confirment une faible solubilité. Les ϵ sont similaires pour chaque composé dans l'EtOH et le DMSO et le MeOH fournit les meilleurs résultats, ce qui peut s'expliquer par une meilleure solubilité des composés dans ce solvant.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept



Solvant	Composé	ϵ (10^3) ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)				
		Bande de Soret	Q_{IV}	Q_{III}	Q_{II}	Q_I
DMSO	Pyro-a	59,6	6,0	4,9	4,2	24,7
	7	47,8	4,2	3,3	2,8	19,2
	14	33,9	3,4	3,0	2,9	14,3
EtOH	Pyro-a	51,8	5,6	5,1	4,7	25,5
	7	40,7	4,4	4,1	3,9	19,1
	14	31,0	3,2	2,9	3,2	14,3
MeOH	Pyro-a	91,1	9,8	8,9	8,5	42,8
	7	64,1	6,5	6,0	5,6	27,9
	14	51,8	5,3	5,1	5,1	23,7
D ₂ O	Pyro-a	22,9	2,0	1,8	2,1	9,2
	7	21,5	2,0	1,9	2,1	8,7
	14	16,9	6,5	5,2	3,1	8,3

Figure 47 : Spectres d'absorption UV-visible normalisés et coefficient d'extinction molaire ϵ des composés Pyro-a, 7 et 14 dans différents solvants.

Dans tous les solvants, une diminution significative des ϵ a été mise en évidence lorsque la Pyro-a est couplée au peptide et à l'alcoxyamine.

V.2. Fluorescence et production d'¹O₂

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés après une excitation à 410 nm et ont permis de déterminer les rendements quantiques de fluorescence, Φ_f . Les spectres d'émission de l'¹O₂ ont été effectués dans les mêmes conditions afin de déterminer le rendement quantique d'¹O₂, Φ_Δ (Tableau 13).

Tableau 13 : Rendements quantiques de fluorescence (Φ_f) et d'¹O₂ (Φ_Δ) mesurés après excitation à 410 nm et durée de vie de fluorescence (τ_f), après excitation à 407 nm et d'¹O₂ (τ_Δ), après excitation à 415 nm des composés Pyro-a, 7 et 14 dans différents solvants.

Solvant	Composé	Φ_f (%)	Φ_Δ (%)	τ_f (ns)	τ_Δ (μ s)	$\tau_{\Delta \text{ litt.}}$ (μ s)
DMSO	Pyro-a	47	28	7,2	7,8	5,5 ¹⁷⁰
	7	43	9	7,5	8,1	
	14	40	11	6,8	8,4	
EtOH	Pyro-a	38	61	6,6	15,3	12 ¹⁷¹
	7	38	54	6,8	13,9	
	14	30	44	6,6	13,9	
MeOH	Pyro-a	34	54	6,4	8,0	7 ¹⁷¹
	7	28	50	6,5	8,3	
	14	32	54	6,6	9,0	
D ₂ O	Pyro-a	<1	–	6,0	–	20 ¹⁷¹
	7	<1	–	5,9	–	
	14	<1	–	4,9	–	

Sous excitation lumineuse, la Pyro-a émet un pic de fluorescence très intense vers 670 nm et un second pic beaucoup moins intense vers 720 nm. Pour tous les composés et dans tous les solvants, à l'exception du D₂O, des signaux similaires de fluorescence ont été observés. Pour le D₂O, un signal de fluorescence extrêmement faible a été observé confirmant le manque de solubilité des composés. Globalement, de meilleurs Φ_f ont été observés dans le DMSO sans doute dus à une bonne solubilité dans ce solvant. Dans le MeOH et l'EtOH, des résultats similaires ont pu être observés. Dans l'ensemble des solvants, une faible diminution des Φ_f en présence du peptide et de l'alcoxyamine a été observée.

Concernant le Φ_Δ , de biens meilleurs résultats ont été constatés dans l'EtOH et le MeOH, ce qui est en adéquation avec les résultats inverses des Φ_f . Cependant, des Φ_Δ similaires pour les trois composés ont été observés uniquement dans le MeOH, indiquant peu ou pas d'influence du peptide et de l'alcoxyamine. Dans le DMSO et l'EtOH, une

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

diminution des Φ_{Δ} a été observée en présence de l'alcoxyamine et du peptide. A noter également qu'aucun signal de production d' $^1\text{O}_2$ n'a pu être observé dans le D_2O , en adéquation avec la faible solubilité des composés.

Les solutions ont ensuite été illuminées à 407 nm afin de déterminer les durées de vie de fluorescence (τ_f) et à 415 nm pour évaluer les durées de vie d' $^1\text{O}_2$ (τ_{Δ}). Peu de différences entre les trois composés ont pu être mises en évidence.

La détermination des propriétés photophysiques de la Pyro-a au sein des différents composés a pu montrer que le peptide et l'alcoxyamine avait une influence minimale sur celles-ci.

V.3. Etudes de photoblanchiment

Sous illumination, le PS peut subir une photo-dégradation ou un photo-réarrangement, appelé photoblanchiment. Ceci peut se traduire par une perte d'absorption et de fluorescence. La stabilité de la Pyro-a et des composés **7** et **14** sous illumination à 668 nm (10 mW.cm^{-2}) dans le MeOH a été étudiée. Le Φ_f a été calculé au cours du temps et une stabilité a été observée pour l'ensemble des composés (Figure 48). De même, nous avons pu observer que Φ_{Δ} était constant.

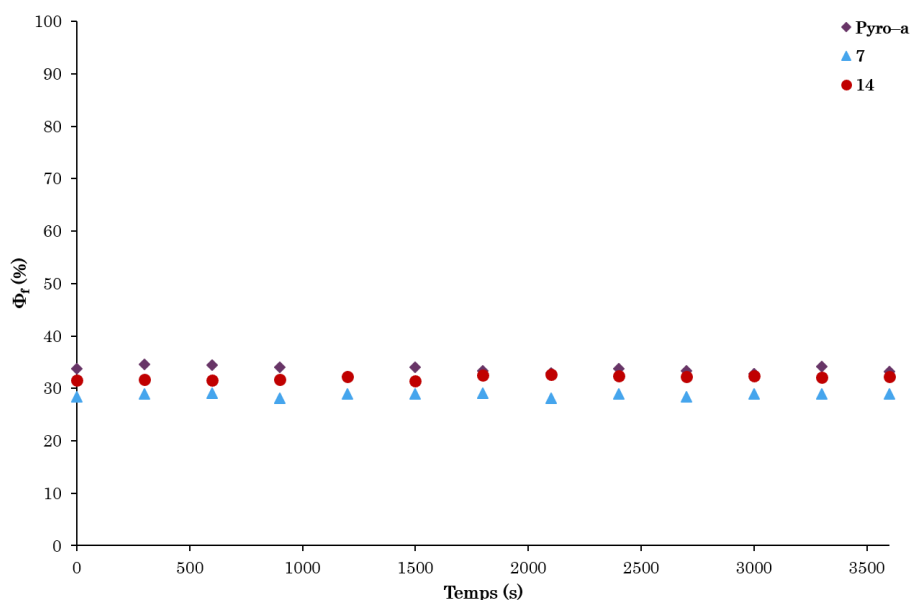


Figure 48 : Evolution du Φ_f au cours du temps pour les composés Pyro-a, 7 et 14 illuminés à 668 nm (10 mW.cm^{-2}) dans le MeOH.

VI. Homolyse de l'Alcoxyamine

L'alcoxyamine choisie pour cette étude est constituée d'un motif benzophénone-SG1' et est capable, sous activation lumineuse, de s'homolyser pour générer d'une part un nitroxyde (SG1') et d'autre part un radical alkyle cytotoxique (Figure 49).

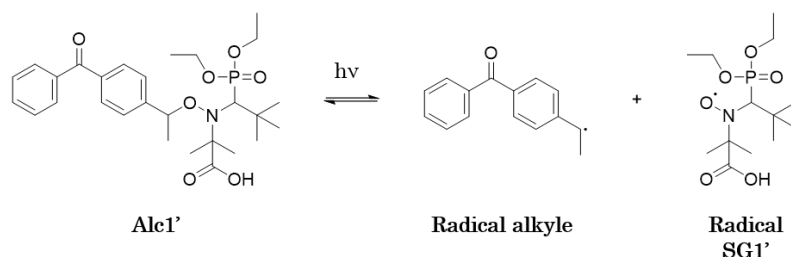


Figure 49 : Homolyse de l'alcoxyamine benzophénone-SG1' sous excitation lumineuse.

Dans cette partie, nous décrivons le suivi de cette homolyse en utilisant différentes techniques d'excitation et d'analyse.

VI.1. Suivi par HPLC

La photolabilité des composés a été, dans un premier temps, suivie par HPLC. En effet, l'Alcl' présentant une absorption dans l'UV, nous avons pu suivre la disparition du pic correspondant au cours de l'excitation. Le choix du solvant utilisé s'est porté sur le DMSO puisque les composés présentaient une bonne solubilité. De plus, ce dernier présente l'avantage d'être beaucoup moins volatile que l'EtOH ou le MeOH et permet donc de garder une concentration stable.

La réaction d'homolyse étant une réaction réversible, nous avons utilisé un quencher (TEMPO) pour réagir avec le radical alkyle généré et ainsi pouvoir suivre la formation de l'adduit formé. En effet, l'absorption de l'Alcl' dépendant essentiellement de la partie alkyle, c'est principalement l'apparition d'un pic correspondant à cet adduit qu'il est possible de détecter en HPLC.

Deux stratégies d'excitation ont été envisagées pour homolyser l'Alcl' :

- Les rayons X ;
- La lumière UV.

VI.1.1. Illumination par rayons X

Dans un premier, nous avons envisagé l'utilisation des rayons X comme source d'illumination pour homolyser l'Alcl'. Sous excitation lumineuse, le chromophore porté par

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

l'Alc1' transfère son énergie à la liaison C–ON et engendre ainsi l'homolyse de cette liaison. L'idée associée à l'utilisation des rayons X était la possibilité d'un transfert d'énergie, non pas seulement à liaison C–ON mais également au PS et ainsi la génération simultanée d' $^1\text{O}_2$ et de radicaux alkyles.

Les premiers tests ont été effectués sur l'Alc1' seule, avec le TEMPO comme quencher des radicaux alkyles produits. Les solutions ont été irradiées par un irradiateur avec une puissance de 160 keV à différentes doses (0, 2, 5, 10 et 20 Gy). Des prélèvements de chaque solution ont été effectués et dilués dans l'ACN avant d'être injectés en HPLC (Figure 50). Aucune différence au niveau de l'intensité des pics n'a pu être observée en HPLC et par conséquent aucune homolyse n'a pu être détectée.

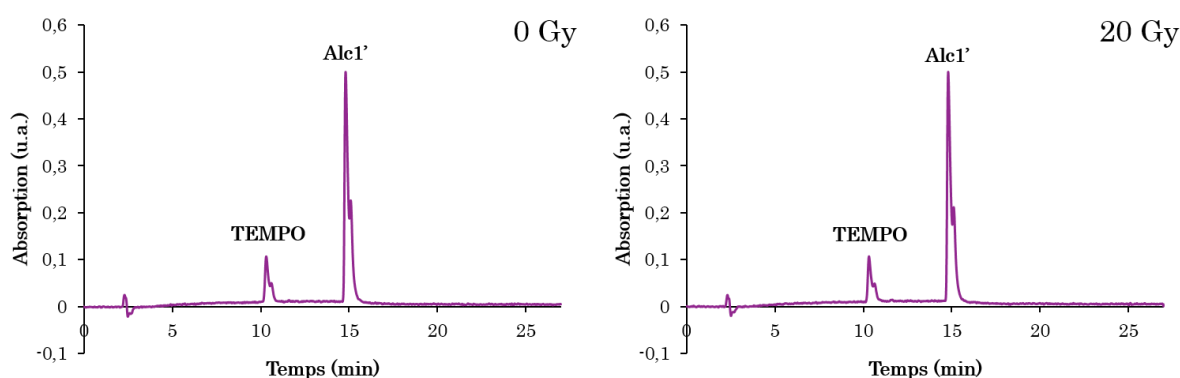


Figure 50 : Chromatogrammes HPLC de l'Alc1' sous excitation par rayons X à des doses de 0 et 20 Gy. Gradient 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA (détection UV : 260 nm).

Des seconds tests ont été réalisés en augmentant la puissance de l'irradiateur à 320 keV et en utilisant des doses de 0, 5, 10, 20 et 30 Gy. Aucune homolyse n'a également été observée. Il a alors été conclu qu'il n'était pas possible d'homolyser notre alcoxyamine par les rayons X dans ces conditions d'excitation.

VI.1.2. Illumination par la lumière UV

La première étape a été de confirmer la photolabilité de l'Alc1' sous illumination UV (254 nm et 365 nm, 125 mW.cm^{-2}). Après illumination de la solution d'Alc1' dans le DMSO pendant 10 min, une disparition presque totale du pic correspondant à l'Alc1' a été observée. Cette disparition a été croissante au cours du temps ainsi que l'apparition d'un produit d'homolyse à 11,7 min confirmant l'homolyse du composé (Figure 51).

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

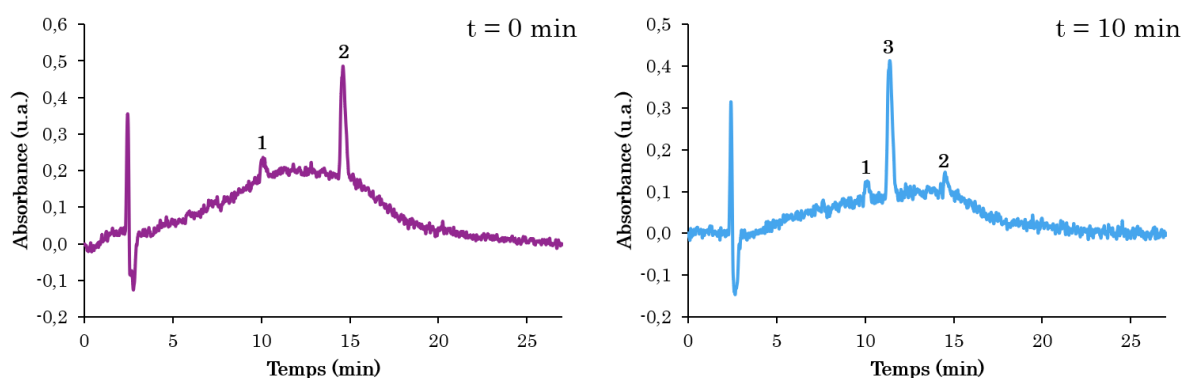


Figure 51 : Chromatogrammes HPLC de Alc1' avant et après 10 min d'illumination UV. Gradient de 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min (détection UV : 260 nm). 1, TEMPO, 2, Alc1' et 3, produit d'homolyse d'Alc1'.

Un bullage d'argon a permis une agitation continue et un dégazage de la solution. Dans ces conditions, une homolyse totale de l'Alc1' en 12 min a encore été observée.

Ces dernières conditions ont ensuite été utilisées pour déterminer la photolabilité des composés **16** et **14**. Comme pour l'alcoxyamine seule, nous avons pu observer pour chacun des composés la disparition du pic du composé de départ et l'apparition d'un nouveau pic à un temps de rétention de 11,7 min pour le composé **16** et de 15,9 min pour le composé **14** (Figure 52). Une homolyse plus rapide que pour l'alcoxyamine seule a été observée pour le composé **16** avec la disparition du pic correspondant après seulement 5 min d'illumination. Cette différence peut s'expliquer par une solubilité plus importante du composé due au peptide. En revanche, un temps d'illumination beaucoup plus long (25 min) a été nécessaire pour observer une disparition totale du composé **14**. Cette différence peut s'expliquer par une possible compétition entre l'alcoxyamine et le PS, ce dernier absorbant également la lumière UV.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

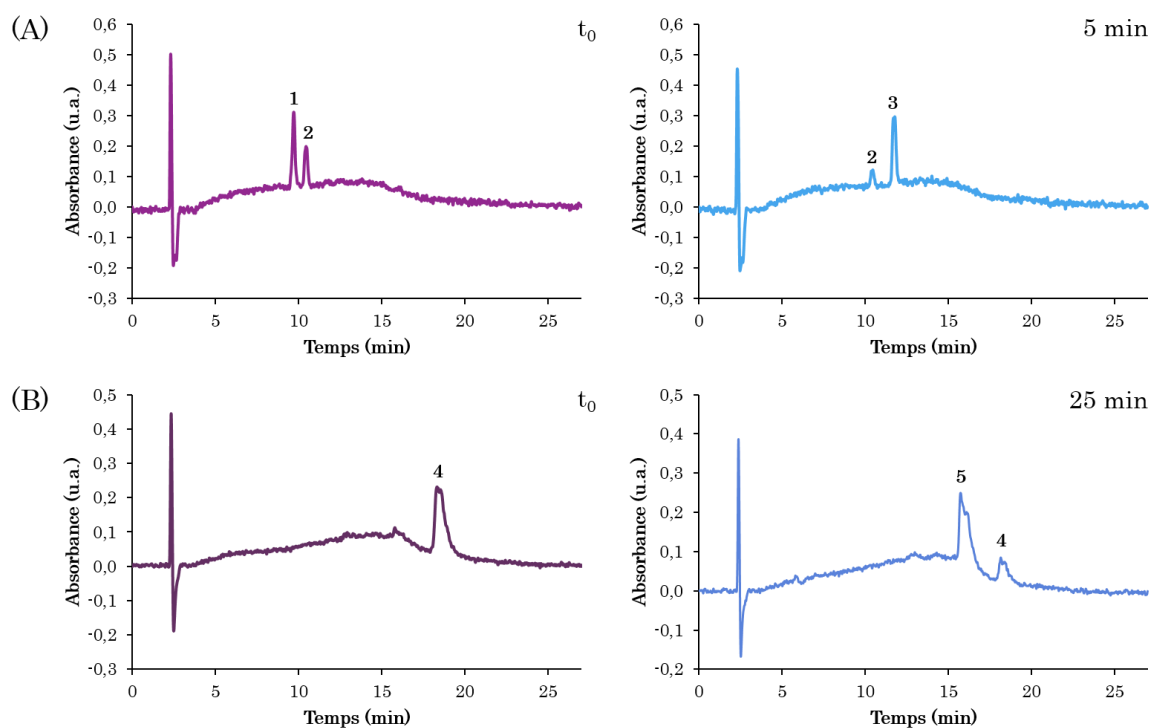


Figure 52 : Chromatogrammes HPLC des composés (A) 16 avant et après 5 min d'illumination UV et (B) 14 avant et après 25 min d'illumination UV. Gradient de 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min (Détection UV : 260 nm pour 16 et 415 nm pour le composé 14. 1, TEMPO ; 2, composé 16 ; 3, produit d'homolyse du composé 16 ; 4, composé 14 et 5, produit d'homolyse du composé 14.

Bien qu'un temps plus long soit observé pour l'homolyse totale du composé 14, ceci ne semble pas problématique pour de potentielles applications en PDT puisque des radicaux sont formés dès les premières minutes d'illumination et qu'il n'est pas forcément nécessaire d'avoir une homolyse totale pour générer un effet cytotoxique.

Pour quantifier les radicaux formés par HPLC, nous avons recherché un étalon interne qui serait introduit dans la solution de départ avant illumination. L'étalon interne devait réunir plusieurs caractéristiques, (i) un temps de rétention différents des composés étudiés, (ii) une stabilité sous illumination UV et (iii) une absorption aux longueurs d'ondes de détection des composés en HPLC. L'étude de plusieurs étalons internes classiques tels que le toluène, l'acétone ou le nitrobenzène et également les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) a été effectuée et aucune des références étudiées n'a rempli tous les critères. Il a alors été choisi d'utiliser une autre méthode pour quantifier les radicaux formés lors de la réaction d'homolyse.

VI.2. Suivi par spectroscopie par Résonance Paramagnétique électronique (RPE)

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) est une technique de spectroscopie utilisée pour la détection d'espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés (espèces paramagnétiques).

VI.2.1. Principe

C'est une technique proche de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) puisque ces deux techniques reposent sur l'interaction d'un champ électromagnétique avec les moments magnétiques de spin. La différence entre les deux techniques est que la RMN concerne les noyaux (spins nucléaires) alors que la RPE concerne les centres paramagnétiques (spins électroniques) tels que les atomes et molécules possédant des électrons non appariés. La RPE présente l'avantage d'être plus sensible que la RMN et permet d'analyser des composés à des concentrations beaucoup plus faibles, de l'ordre du micromolaire.¹⁷²

VI.2.1.1. Moment magnétique de l'électron

Chaque électron non apparié est caractérisé par sa masse et sa charge élémentaire mais également par son moment angulaire intrinsèque également appelé spin de l'électron ou moment cinétique.¹⁷² Le mouvement d'un électron est caractérisé par son spin auquel est associé un moment magnétique $\vec{\mu}_s$. Le nombre quantique de spin possède une valeur $S = \frac{1}{2}$ associé à des composantes magnétiques $m_s = \pm \frac{1}{2}$. Le moment magnétique $\vec{\mu}_s$ est donné par l'équation (11) :

$$\vec{\mu}_s = -g\beta_e\vec{S} \quad (11)$$

Où g est un facteur sans dimension caractérisant le centre paramagnétique appelé facteur de Landé ou facteur g et dépendant de la structure électronique du composé étudié et β_e le magnéton de Bohr ($\beta_e = 9,27401 \cdot 10^{-24} \text{ A.m}^2$).

VI.2.1.2. L'effet Zeeman

La RPE repose sur l'effet Zeeman, qui consiste en la levée de dégénérescence de niveaux d'énergie électronique en présence d'un champ magnétique externe (Figure 53). En effet, en l'absence de champ magnétique, les niveaux électroniques $m_s = \pm \frac{1}{2}$ sont dégénérés. Lors de l'action d'un champ magnétique externe B_0 parallèle à l'axe z , un

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

alignement des électrons selon deux directions dans l'espace (parallèle ou antiparallèle au champ B_0) se produit. Deux états énergétiques peuvent alors être identifiés et l'Hamiltonien Zeeman est utilisé pour caractériser la levée de dégénérescence donné par l'équation (12) :

$$\vec{H}_{\text{Zeeman}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = g\beta_e \vec{S} \cdot \vec{B}_0 = g\beta_e S_z \quad (12)$$

Où S_z correspond à la projection de l'opérateur de spin électronique sur l'axe z.

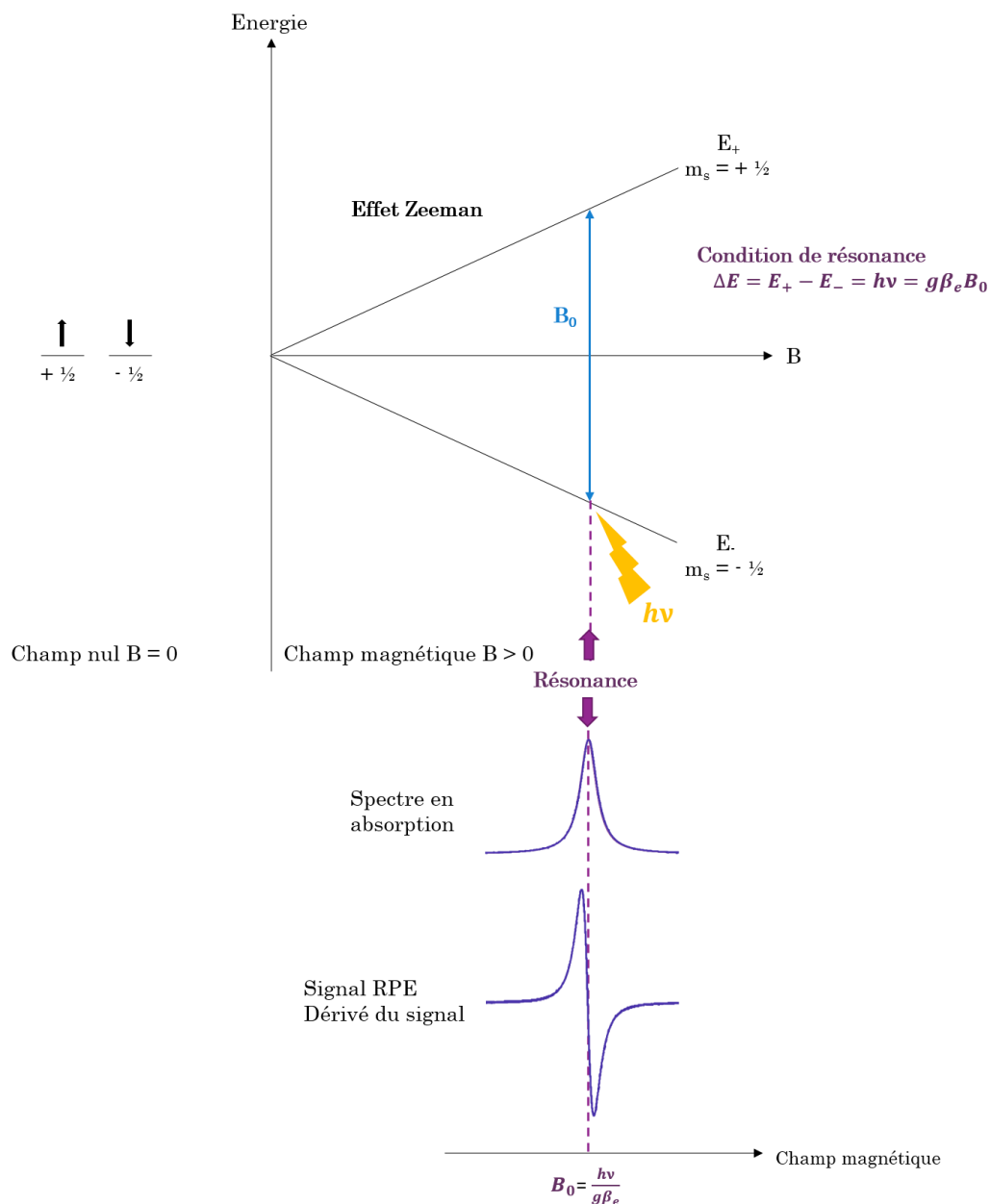


Figure 53 : Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie de spin électronique $S = \frac{1}{2}$ sous l'action d'un champ magnétique B et illustration de la condition de résonance. Adaptée de Sahlî.¹⁷³

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

L'induction d'une transition de spin entre deux niveaux énergétiques, $m_s = -\frac{1}{2}$ vers un niveau $m_s = +\frac{1}{2}$ peut se produire par l'absorption d'une radiation électromagnétique caractérisée par une énergie ΔE ainsi qu'une fréquence ν perpendiculaire au champ magnétique B_0 . Il est nécessaire que l'énergie $h\nu$ fournie soit égale à l'écart entre les deux niveaux énergétiques pour que les photons soient absorbés, c'est ce qui constitue la condition de résonance qui est donnée par l'équation (13) :

$$\Delta E = h\nu = E_+ - E_- = +\frac{1}{2}g\beta_e B_0 - \left(-\frac{1}{2}g\beta_e B_0\right) = g\beta_e B_0 \quad (13)$$

Avec h la constante de Planck ($h = 6,62607015 \cdot 10^{-34}$ J.s).

Le facteur g peut alors être exprimé selon l'équation (14) :

$$g = \frac{h \nu}{\beta_e B_0} = \sim 0,714484 \frac{\nu}{B_0} \quad (14)$$

Où la fréquence ν de l'onde électromagnétique est exprimée en MHz et le champ magnétique B_0 en Gauss (G).

En RPE, une modulation d'un champ magnétique B_0 est effectuée pour des raisons liées à la sensibilité de détection conduisant à l'observation d'un signal RPE correspondant à la dérivé première du signal d'absorption.¹⁷²

VI.2.2. RPE des radicaux nitroxydes en régime isotrope

Les radicaux nitroxydes sont composés d'un groupement fonctionnel où un atome d'oxygène est lié à un atome d'azote (Figure 54). Ils présentent une très forte stabilité et sont par conséquent considérés comme des radicaux persistants. Leur stabilité peut s'expliquer par la délocalisation de l'électron entre les atomes d'azote et d'oxygène qui se fait avec des proportions similaires. La présence de groupements encombrants en α de l'atome d'azote leur confère une grande stabilité en raison de l'encombrement stérique généré.¹⁷⁴

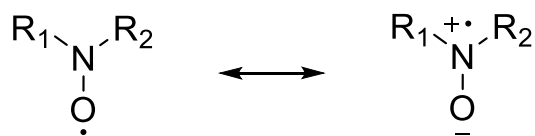


Figure 54 : Formes mésomères du nitroxyde.

VI.2.2.1. Les interactions hyperfines

Lorsqu'un électron non apparié présente dans son environnement proche des noyaux caractérisés par un spin nucléaire $I \neq 0$, une perturbation du champ magnétique perçu par le spin de l'électron se produit. Cette interaction est qualifiée d'interaction hyperfine et dans le cas des radicaux nitroxydes, se traduit par l'interaction de l'électron non apparié avec un noyau ^{14}N possédant un spin nucléaire $I = 1$. L'interaction hyperfine est la résultante de l'interaction entre les moments de spin magnétique S et de spin nucléaire I non nuls et est donnée par l'équation (15) :

$$H_{\text{Hyperfin}} = \vec{S}\tilde{A}\vec{I} \quad (15)$$

Où \tilde{A} est le tenseur hyperfin ou constante de couplage hyperfine et \vec{I} l'opérateur de spin nucléaire.

L'interaction hyperfine dépend de plusieurs paramètres, dont la densité de spin au niveau du noyau et d'autre part le rapport gyromagnétique de l'électron. Plus ces derniers sont importants, plus la valeur du tenseur \tilde{A} est grande.¹⁷⁴

L'interaction d'un électron non apparié avec un noyau ^{14}N , possédant une constante A^{N} d'environ 1,5 mT, conduit à l'observation d'un spectre possédant $2I + 1 = 3$ raies. Placés dans un champ magnétique, les niveaux d'énergie E_{m_s} de ce système peuvent être décrits par l'équation suivante (16) :

$$E_{m_s} = gB_0M_s + A^{\text{N}}M_sM_{I(\text{N})} \quad (16)$$

Les niveaux d'énergie et le spectre RPE résultant dans le cas d'un nitroxyde sont donnés dans la Figure 55.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

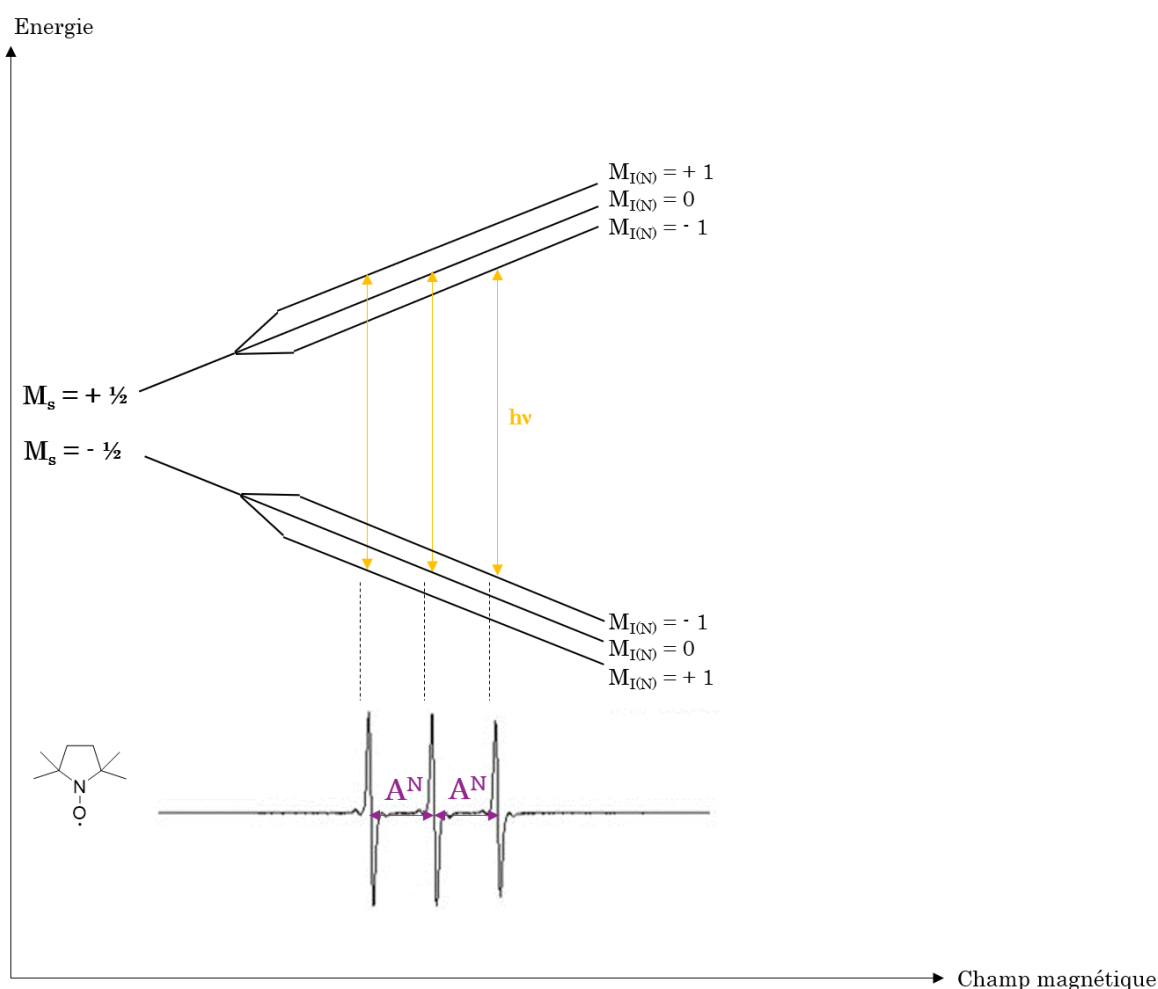


Figure 55 : Niveaux d'énergie pour un nitroxyde en régime isotrope ainsi que le spectre RPE résultant en fonction du champ magnétique. Les flèches représentent les transitions autorisées en RPE. Adaptée de Le Breton.¹⁷⁴

L'électron non apparié sur le nitroxyde peut être délocalisé le long de la liaison NO conduisant à deux formes mésomères (Figure 54). Celle où l'électron non apparié est porté par l'oxygène est une forme neutre tandis qu'une séparation de charge apparaît lorsqu'il est porté par l'atome d'azote. Cette dernière forme est favorisée lorsque la polarité du milieu augmente conduisant à une augmentation de la densité de spin sur le noyau de l'atome d'azote entraînant une augmentation de la constante de couplage hyperfine. Cette constante hyperfine peut donc subir des variations entre 1,4 et 1,7 mT.

Dans le cas de nos alcoxyamines, le nitroxyde généré SG1 est de type β -phosphorylée et une interaction supplémentaire entre l'électron non apparié et le noyau du ^{31}P possédant un spin nucléaire $I = \frac{1}{2}$ a lieu. Celle-ci conduit à l'observation en régime isotrope d'un spectre à $(2I_{\text{(N)}} + 1)(2I_{\text{(P)}} + 1) = 6$ raies. L'interaction entre l'électron non apparié et le noyau de ^{31}P est caractérisé par une A^{P} d'environ 4,0 mT. La même variation en fonction de la polarité du milieu est observée pour la constante hyperfine A^{N} entre 1,3 et 1,7 mT.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

En revanche, l'augmentation de la polarité du solvant conduit à une diminution de la constante d'interaction A^P entre l'électron non apparié et le noyau de ^{31}P .¹⁷⁴

VI.2.3. Conditions d'illumination

Les analyses RPE ont été effectuées en utilisant des capillaires en verre (25 μL , Hirschmann). Une chambre d'illumination UV spécialement conçue pour l'illumination homogène de tubes et capillaires RPE a été utilisée (Figure 56). Les analyses RPE ainsi que les illuminations dans ces nouvelles conditions ont été effectuées à l'institut de Chimie de Strasbourg en collaboration avec les Dr Nolwenn Le Breton et Dr Bertrand Vilenon.

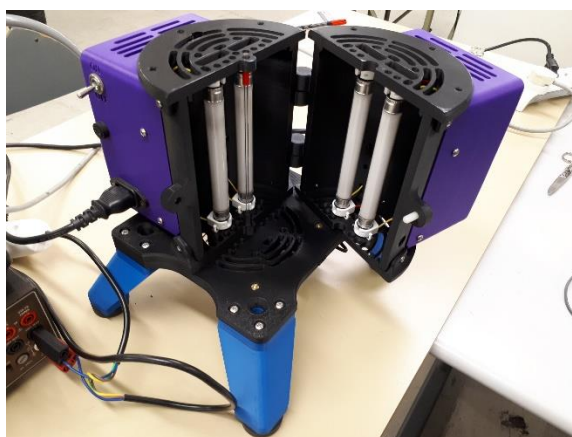


Figure 56 : Dispositif d'illumination UV Adaptée à la géométrie cylindrique des tubes et capillaires.

La source de lumière UV est émise par des néons à une puissance d'environ $4,5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

VI.2.4. Homolyse des composés

L'utilisation des capillaires de 25 μL a conduit à choisir un solvant moins visqueux que le DMSO utilisé dans le § VI.1.2. Le MeOH a été sélectionné compte tenu des bonnes propriétés photophysiques observés dans ce solvant et le problème de volatilité du solvant a pu être résolu en scellant les tubes. Les homolyses ont été effectuées à de faibles concentrations de l'ordre de 10^{-4} M permettant de s'affranchir de l'utilisation du TEMPO (§ VI.1). Il a été montré que l'oxygène du milieu pouvait être utilisé comme scavenger pour piéger les radicaux formés et ainsi de suivre la formation du nitroxyde persistant.¹⁷⁵

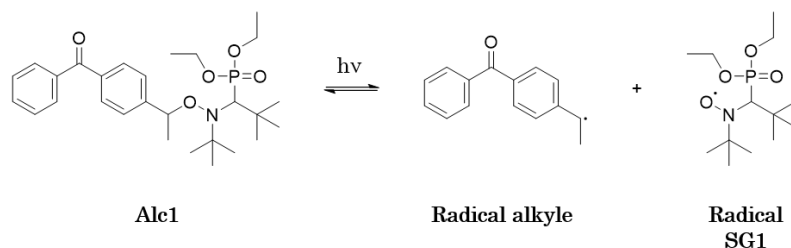


Figure 57 : Homolyse de l'Alc1 sous excitation lumineuse.

Pour l'étude de l'alcoxyamine seule, la forme non fonctionnalisée par une fonction acide carboxylique a été utilisée (Figure 57), le radical SG1' généré lors de l'illumination étant beaucoup moins stable que le radical SG1 seul. La première étape de ces études d'homolyse par suivi RPE a consisté à vérifier la stabilité du radical SG1 seul au cours de l'illumination UV. L'illumination d'une solution de SG1 à 300 μM pendant 1 heure a conduit à une diminution du signal inférieure à 10% indiquant une bonne stabilité du radical.

VI.2.4.1. Influence de la concentration

Nous avons évalué l'influence de la concentration de l'alcoxyamine seule (300 μM dans le MeOH) sur la génération de radicaux au cours de l'illumination UV. La signature RPE de Alc1 consistant en 6 raies d'amplitudes égales, comme décrit dans le § VI.2.2.1, a pu être détectée. Dès les premières secondes d'illumination, le signal RPE associé à SG1 a été observé pour atteindre une intensité RPE maximale à 75 secondes. Après cela, une forte baisse de l'intensité a été observée (Figure 58A). Ce changement notable au niveau de l'évolution de l'intensité RPE peut être défini comme un *turnover* entre les mécanismes de génération et de réduction des radicaux. L'Alc1 a été illuminée à différentes concentrations et une dépendance linéaire du taux initial de production du radical SG1 avec la concentration d'Alc1 a été mise en évidence (Figure 58D). En effet, une cinétique plus rapide a été observée pour la plus forte concentration en Alc1 (300 μM). Une corrélation entre la diminution de la concentration en Alc1 et l'augmentation du temps d'illumination a également été mise en évidence. Celle-ci a été accompagnée d'un déplacement du *turnover* quelle que soit la concentration en alcoxyamine.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

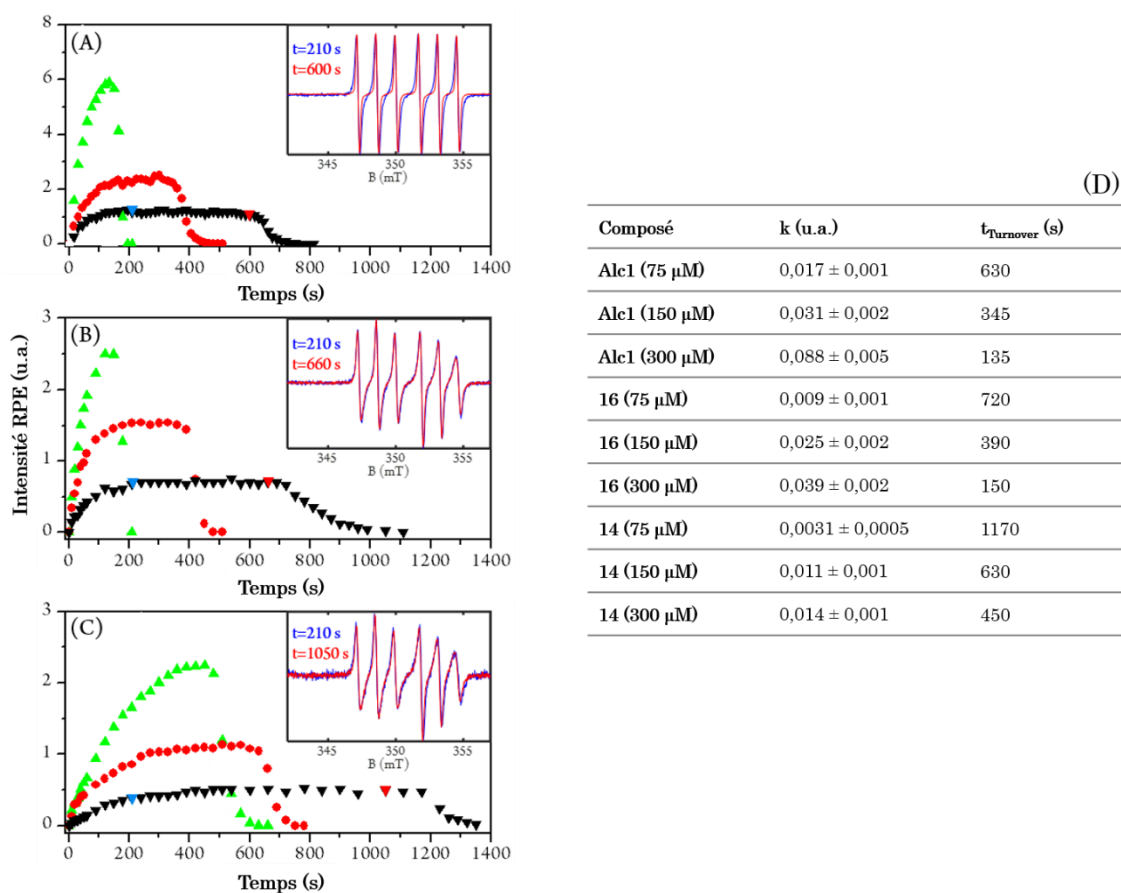


Figure 58 : Intensité RPE du radical généré au cours de l'illumination à température ambiante pour les composés (A) Alc1, (B) 16 et (C) 14 à différentes concentrations dans le MeOH. Encadré : Spectres RPE, normalisés par leur intensité de pic à pic, du radical SG1 dans la solution à 75 μM au début du plateau (bleu) et à la fin du plateau (rouge). (\blacktriangle) 300 μM , (\bullet) 150 μM et (\blacktriangledown) 75 μM . (D) Taux de production initial (k) du radical et temps d'exposition à la lumière UV jusqu'à atteindre le turnover (t_{turnover}) pour les composés Alc1, 16 et 14 à différentes concentrations dans le MeOH.

Des études, dans les mêmes conditions, ont été réalisées pour les composés **16** et **14**. Bien que présentant des tendances similaires avec l'alcoxyamine seule, les résultats sont différents. En effet, les 6 raies présentent des amplitudes différentes témoignant d'un régime de mobilité intermédiaire dû à des molécules plus grosses, qui tournent moins vite ; il n'est plus possible de moyenniser les paramètres RPE. De plus, la dépendance linéaire de la production de radicaux en fonction de la concentration n'a pas été observée (Figure 58B et C).

Le temps d'illumination nécessaire pour atteindre le *turnover* est très différent. En effet, bien que des cinétiques soient similaires, la cinétique est significativement plus longue pour le composé **14**. Compte tenu de l'absorption de la lumière UV par le PS, ce dernier peut concurrencer l'alcoxyamine, partageant ainsi la quantité de photons reçus et augmentant le temps pour atteindre la quantité maximale de génération du nitroxyde.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Il est intéressant de noter que les spectres RPE de SG1 s'affinent au cours du temps lors de l'illumination (Figure 58A Encadré) indiquant une diminution de la concentration en oxygène dans le solvant organique.¹⁷⁶ En revanche, cet effet n'a pas été observé pour les deux autres composés (Figure 58B et C Encadré).

VI.2.4.2. Influence de l'oxygénation

Afin de déterminer l'influence de l'oxygène sur la formation de radicaux, les composés ont été illuminés après dégazage de la solution de l'Alc1 au moyen d'un barbotage doux à l'argon (environ 5 mL.min⁻¹). Dans de telles conditions d'hypoxie, une influence capitale de l'oxygénation a été observée pour l'alcoxyamine seule, puisque presque aucun signal correspondant au radical SG1 n'a pu être détecté (Figure 59A). Cette approche a été également répétée sur les composés **16** et **14**, et de façon étonnante des cinétiques superposables ont été obtenues quelles que soient les conditions d'oxygénation (Figure 59B et C).

Cette absence de différence entre ces derniers résultats peut être due à la présence du peptide et du PS jouant ici le rôle de piègeurs de radicaux alkyles. Dans le cas de l'alcoxyamine seule, une grande quantité de nitroxyde est observée car les radicaux alkyles sont piégés par l'oxygène supprimant la rétro-réaction. En revanche, en l'absence d'oxygène, les radicaux alkyles ne sont pas piégés et la rétro-réaction se produit empêchant ainsi l'augmentation de la quantité de nitroxyde générée.

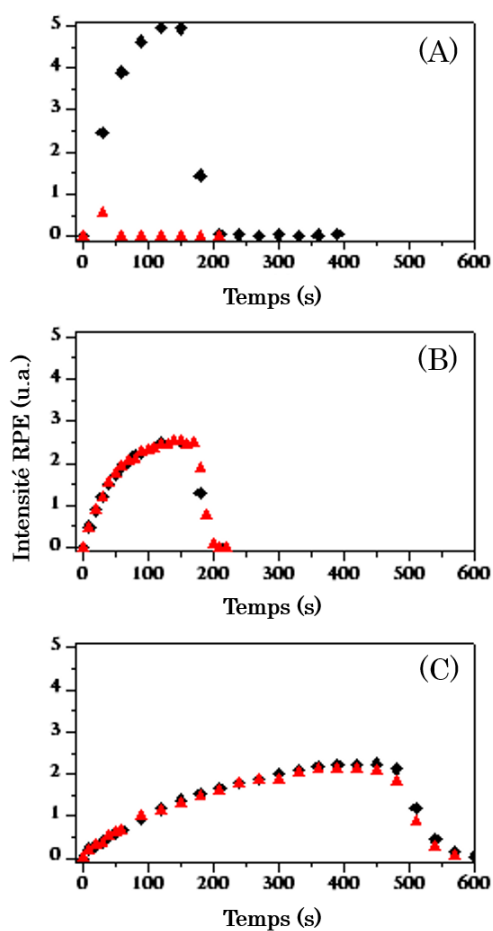


Figure 59 : Intensité RPE du radical généré au cours de l'illumination pour les composés (A) Alc1, (B) 16 et (C) 14 à 300 μM dans du MeOH avec (\blacklozenge) ou sans (\blacktriangle) oxygène.

VI.2.4.3. Influence de l'intensité lumineuse

Nous avons étudié l'influence de la puissance d'illumination sur la génération de radicaux nitroxydes (Figure 60).

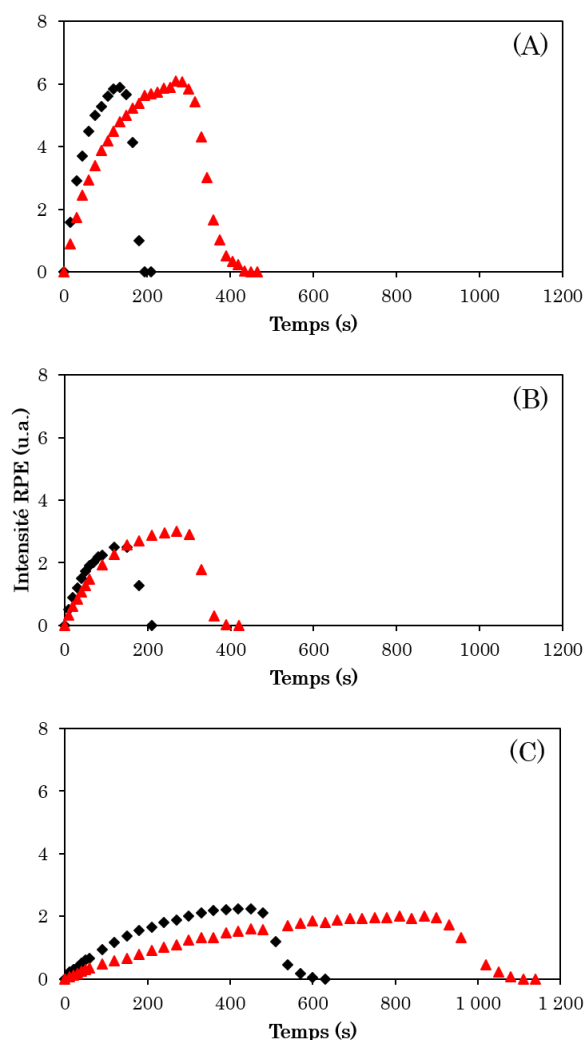


Figure 60 : Intensité RPE du radical généré au cours de l'illumination pour les composés (A) Alc1, (B) 16 et (C) 14 à 300 μM dans du MeOH avec (♦) intensité lumineuse de référence ou (▲) intensité lumineuse diminuée d'un facteur 2.

Pour les trois composés, une diminution d'un facteur 2 de l'intensité lumineuse conduit au doublement du temps d'illumination nécessaire pour atteindre le *turnover* à une intensité RPE similaire. Bien que ralentissant la cinétique, la réduction de l'intensité lumineuse ne modifie que très peu la quantité maximale de nitroxyde générée.

VI.2.4.4. Utilisation d'un piègeur radicalaire

L'observation de la dépendance de la génération de SG1 à l'oxygène nous a conduit à l'hypothèse selon laquelle la réduction du radical SG1 par des intermédiaires radicalaires et la consommation potentielle d'oxygène favorisaient la formation photoinduite d'intermédiaires radicalaires. Pour valider cette dernière, une étude de piégeage de spin a été effectuée en utilisant du 5-(diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DEPMPO) afin de piéger des espèces réactives instables dont la durée de vie est trop

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

courte pour être observée dans nos conditions expérimentales. En effet, la réaction entre le DEPMPO et le radical ciblé R^\bullet a conduit à la formation d'un adduit de spin plus stable qui peut donc être détecté par spectroscopie RPE (Figure 61).¹⁷⁷

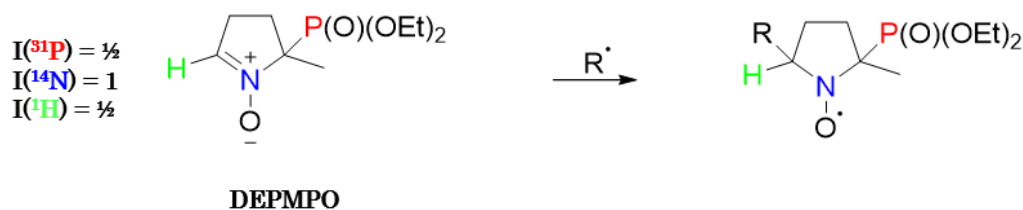


Figure 61 : Schéma de principe du piégeage de spin entre le DEPMPO et un radical R^\bullet .

Comme pour le radical SG1, les adduits de spin de DEPMPO présentent le couplage entre l'électron non apparié et les noyaux de ^{31}P , ^{14}N et ^1H ($I = \frac{1}{2}$). Par conséquent, les spectres RPE de DEPMPO peuvent avoir jusqu'à 12 raies (Figure 62A). Il convient de noter que les constantes de couplage hyperfines liées à l'interaction hyperfine au sein des adduits sont caractéristiques de la nature du radical piégé permettant potentiellement leur identification (par exemple, un radical centré sur le carbone ou l'oxygène).¹⁷⁸

En présence de DEPMPO, une meilleure stabilité du radical SG1 généré au cours du temps d'illumination a pu être observée que ce soit dans les conditions normales d'oxygénation ou dégazées. Un *turnover* était toujours présent mais à un temps d'illumination significativement plus long dans ces conditions et la décroissance du signal correspondant a été significativement ralentie (Figure 62B et C). Ceci s'explique par le fait que le piègeur de spin joue son rôle en piégeant les radicaux responsables de la disparition de SG1. Trois espèces radicales distinctes ont été détectées. Sur la base des interactions hyperfines obtenues, les deux premiers radicaux (ici dénommés rad1 et rad2) ont été caractérisés comme des radicaux oxygénés tandis que le dernier (dénommé rad3) a été identifié comme un radical centré sur le carbone.¹⁷⁹

Pour le composé **16** (300 μM dans le MeOH), un plateau a été atteint dans les deux conditions d'oxygénation et aucun *turnover* n'a été observé, indiquant la grande stabilité du nitroxyde photo-généré (SG1-peptide). Un plateau a été atteint après environ 500 secondes d'illumination et est resté stable après 1 heure d'illumination et ce, dans les deux conditions d'oxygénation (Figure 62B et C). Trois adduits de spin distincts ont également été observés. Cette grande stabilité du nitroxyde généré pourrait s'expliquer par un effet protecteur du peptide.

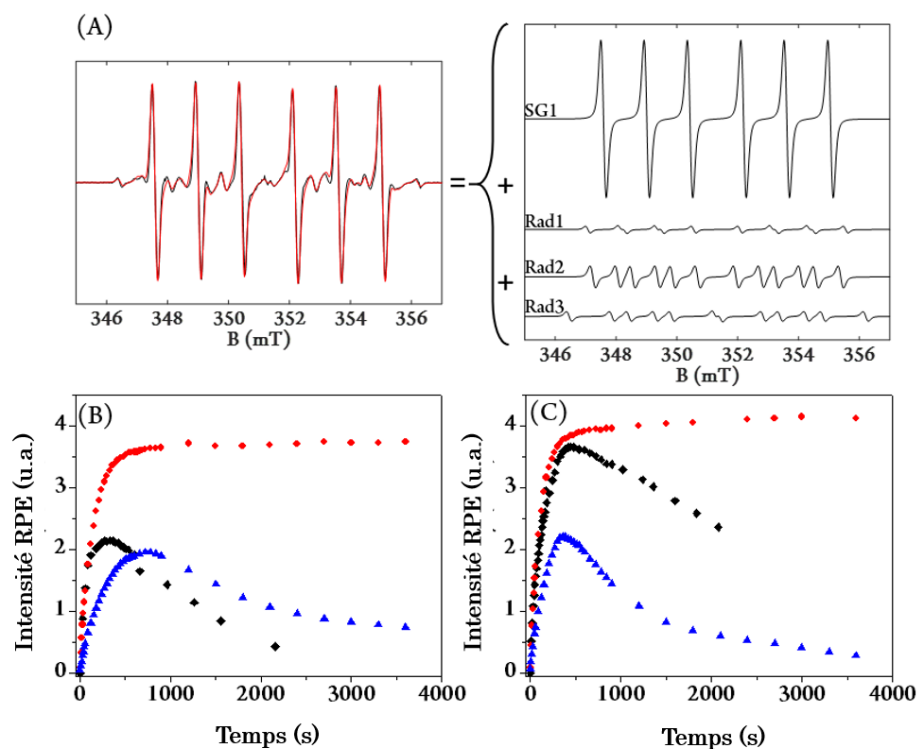


Figure 62 : (A) Gauche : Spectres RPE de simulation (rouge) et expérimental (noir) d'Alc1 en présence de 10 mM de DEPMPO après 960 s d'irradiation. A droite : simulation des spectres RPE de SG1, Rad1, Rad2 et Rad3. (B) et (C) Evolution de la génération de radicaux au cours de l'illumination des composés Alc1, 16 et 14 dans le temps en solution dans du MeOH à 300 μ M en présence de 10 mM de DEPMPO dans la solution oxygénée (B) et la solution dégazée (C). Radicaux formés par l'illumination des composés : (♦) Alc1, (●) 16 et (▲) 14.

En revanche, pour le composé **14** (Figure 62B et C), la même tendance que pour l'alcoxyamine seule a été observée avec un ralentissement de la décroissance du signal du nitroxyde dans les conditions normales d'oxygénation. La génération des mêmes radicaux que pour le composé **16** a également été observée. Cette différence entre les cinétiques des composés **16** et **14** pourrait s'expliquer par le fait que l'introduction du PS, un groupe stériquement encombrant, a modifié la structure 3D du peptide et a modifié ainsi l'effet protecteur observé en son absence.

La forte réactivité avec le milieu environnant du nitroxyde a été mis en évidence par la réduction de son signal. Bien qu'une compétition entre l'alcoxyamine et le PS ait été observée, la génération de radicaux nitroxydes n'a pas été bloquée. Ceci est très intéressant pour les futures applications PDT.

VII. Tests d'affinité

L'affinité des composés **7**, **16** et **14** pour le récepteur NRP-1 a été évaluée par un test de compétition avec le ligand compétitif VEGF₁₆₅ biotinylé (Tableau 14). Les composés **7** et **14** présentent une meilleure affinité pour NRP-1 que le peptide seul ou le composé **16**,

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

probablement en raison des interactions hydrophobes renforcées par la Pyro-a et des interactions stériques stabilisant la conformation 3D du peptide. L'affinité du composé **14** pour NRP-1 (CI_{50} de $0,46 \pm 1 \mu\text{M}$) était encourageante pour envisager une évaluation de cette nouvelle approche thérapeutique multimodale sur des modèles *in vivo* de tumeurs exprimant le NRP-1.

Tableau 14 : Affinité envers NRP-1 des composés estimées à partir des courbes d'affinité.

Composés	CI_{50} (μM)
KDKPPR	$11,5 \pm 1$
16	$9,0 \pm 1$
7	$0,12 \pm 1$
14	$0,46 \pm 1$

VIII. Article

La preuve de concept décrite dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication intitulée « The design of a targeting and Oxygen-independent platform to improve Photodynamic Therapy: A proof of concept » acceptée dans le journal *ACS Applied Biomaterials* en Novembre 2020.

The design of a targeting and Oxygen-independent platform to improve Photodynamic Therapy: A proof of concept

Ludivine Larue,^{†,‡} Tataye MOUSSOUNDA MOUSSOUNDA KOUMBA,[◇] Nolwenn Le Breton,[°],^{||} Bertrand Vilenno,[°],^{||} Philippe Arnoux,[†] Valérie Jouan-Hureau,[⊥] Cédric Boura,[⊥] Gerard Audran,[◇],^{*} Raphael Bikanga,[§] Sylvain R. A. Marque,[◇] Samir Acherar,[‡] and Céline Frochot,[†],^{*}

[†] Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France ; ludivine.larue@univ-lorraine.fr, philippe.arnoux@univ-lorraine.fr, celine.frochot@univ-lorraine.fr

[‡] Université de Lorraine, CNRS, LCPM, F-54000 Nancy, France ; samir.acherar@univ-lorraine.fr

[◇] Aix Marseille Univ, CNRS, ICR, UMR 7273, case 551, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France; g.audran@univ-amu.fr, sylvain.marque@univ-amu.fr, tataye.mousskoumb@gmail.com

[°] Institut de Chimie, UMR 7177, CNRS, Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, F-67000 Strasbourg, France; nlebreton@unistra.fr, vilenno@unistra.fr

^{||} French EPR Federation of Research, REseau NAtional de Rpe interDisciplinaire, RENARD, Fédération IR-RPE CNRS 3443, France

[⊥] Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France ; valerie.jouan-hureau@univ-lorraine.fr, cedric.boura@univ-lorraine.fr

[§] Laboratoire de Substances Naturelles et de Synthèse Organométalliques, Université des Sciences et Techniques de Masuku, B.P. 943, Franceville, Gabon ; brbikanga@hotmail.fr

^{*} Correspondence: celine.frochot@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-3-72-74-37-80; g.audran@univ-amu.fr; Tel.: +33-4-91-28-88-62

KEYWORDS: *photodynamic therapy, hypoxia, targeting, neuropilin-1, peptide, alkoxyamine, hemolysis, spin trapping*

ABSTRACT:

Photodynamic therapy (PDT) is a promising technique to treat different kinds of disease especially cancer. PDT requires three elements: molecular oxygen, a photo-activatable molecule called the photosensitizer (PS) and appropriate light. Under illumination, the PSs generate, in the presence of oxygen, the formation of reactive oxygen species including singlet oxygen, toxic, which then destroys the surrounding tissues. Even if PDT is used with success to treat actinic keratosis or prostate cancer for example, PDT suffers from two major drawbacks: the lack of selectivity of most of the PSs currently used clinically as well as the need for oxygen to be effective. To remedy the lack of selectivity, targeting the tumor neovessels is a promising approach to destroy the vascularization and cause asphyxia of the tumor. KDPPR peptide affinity for the NRP-1 receptor overexpressed on endothelial cells has already been proven. To compensate for the lack of oxygen, we focused on photoactivatable alkoxyamines, molecules capable of generating toxic radicals by light activation. In this paper we describe the synthesis of a multifunctional platform combining three units: a PS for an oxygen-dependent PDT, a peptide to target tumor neovessels and an alkoxyamine for an oxygen-independent activity. The synthesis of the compound was successfully carried out, the study of the photophysical properties showed that the PS retained its capacity to form singlet oxygen, the affinity tests confirmed the affinity of the compound for NRP-1. Thanks to the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy, a technique of choice for radical investigation, the radicals generated by the illumination of the alkoxyamine could be detected. The proof of concept was thus successfully established.

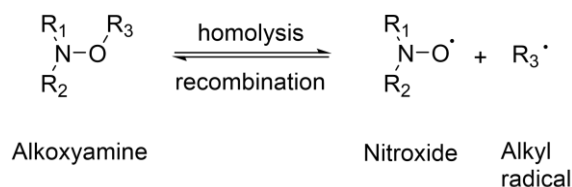
CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is applied to treat many diseases¹ such as age-related macular degeneration (AMD), actinic keratoses, Barrett's esophagus, prostate cancer. PDT is a simple and efficient approach requiring three components to be effective: the light, the molecular oxygen (triplet oxygen $^3\text{O}_2$) and a photosensitizer (PS). All these components are non-toxic taken apart but taken together, they are able to destroy cells at a specific location. This modality of treatment requires the illumination of the PS by light. Thus, the PS moves from the ground state to singlet excited state ($^1\text{PS}^*$). After intersystem-crossing a triplet excited state ($^3\text{PS}^*$) is formed. $^3\text{PS}^*$ reacts with surrounding molecular $^3\text{O}_2$ to generate radical oxygen species (ROS) by two main types of reactions: (i) type I which conducts at the generation of superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) (ii) type II where $^3\text{PS}^*$ transfers its energy to $^3\text{O}_2$ to produce reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$).¹

Although PDT presents many well-known advantages, we can report, as well as for radiotherapy, the requirement of $^3\text{O}_2$ to be efficient.² Indeed, the PDT leads to the consumption of $^3\text{O}_2$ inside the tumor and thus PDT-induced hypoxia as well as tumor pre-existing hypoxia limit its efficiency. To fight tumor hypoxia, six strategies from literature have been reported by us in a recent review³: (1) the use of $^3\text{O}_2$ cargo to directly supply additional $^3\text{O}_2$ inside the tumor (oxyhemoglobin, perfluorocarbon...), (2) the modification of tumor microenvironment (H_2O_2 decomposition, decrease of tumor $^3\text{O}_2$ consumption...), (3) the use of combined therapies to have an additional effect to PDT (chemo-PDT, PTT-PDT...), (4) the fractional PDT to regulate tumor $^3\text{O}_2$ consumption, (5) the hypoxia-dependent PDT by using hypoxia-activated compounds (azobenzene) and (6) hypoxia-independent PDT by using compounds which do not need $^3\text{O}_2$ to be cytotoxic (PDT type I, NO or $^1\text{O}_2$ donor and photoactivatable compounds). The use of photoactivatable compounds that do not require $^3\text{O}_2$ to be effective appeared to be particularly interesting.

Alkoxyamines (Alks), with $\text{R}_1\text{R}_2\text{NO}-\text{R}_3$ (R_1 , R_2 and R_3 as alkyl chains) as general structure, are interesting molecules for therapeutic aspects. Indeed, as depicted in the Scheme 1, alks having weak energy bond of $\text{NO}-\text{R}_3$ could release two radical species: a stable nitroxide ($\text{R}_1\text{R}_2\text{NO}\cdot$) and a transient alkyl radical ($\text{R}_3\cdot$). Moreover, both radicals could be coupled together to reform an alk.⁴ Thus, this radical reactivity of alks has been intensely investigated in NMP (Nitroxide Mediated Polymerization).⁵ Several relationships were developed linking the rate constants of homolysis k_d to polarity, bulkiness, and stability parameters of both the nitroxide ($\text{R}_1\text{R}_2\text{NO}\cdot$) and alkyl fragments ($\text{R}_3\cdot$).⁶ In 2014, we reported a proof of concept for a new application of alks as theranostic agents against cell tumours.⁷ Thus, the release radical as therapeutic agent triggered the apoptosis of cancer cells *in vitro* and the nitroxide as diagnostic probe in imaging by Overhauser MRI. Recently, we optimized the efficiency of these reactive species to destroy malignant cells *in vitro*⁸ and reported *in vivo* experiments in mouse.⁹



Scheme 1. Reversible NO-R₃ bond in alks.

Another limit of PDT is the low selectivity of the majority of the commercial PSs. The selectivity is therefore due to the possibility to confine the PS by restricting the light illumination to a specific region. However, this strategy is limited in some cases (spread metastases for example) needing a broader illumination. It is necessary to develop modified PSs able to target effectively the cancer cells by a specific accumulation into the tumor or the neovessels surrounding the tumor.¹⁰ The

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

destruction of the vascular system allows the eradication of the tumor, following the O₂ deprivation and nutrients essential to life.¹¹ Therefore, the tumor vascular system is a promising target for creating damage by PDT. Specific receptors of endothelial cells, such as vascular endothelial growth factor receptors (VEGF) or neuropilin-1 co-receptor (NRP-1) can be used as molecular targets.¹²

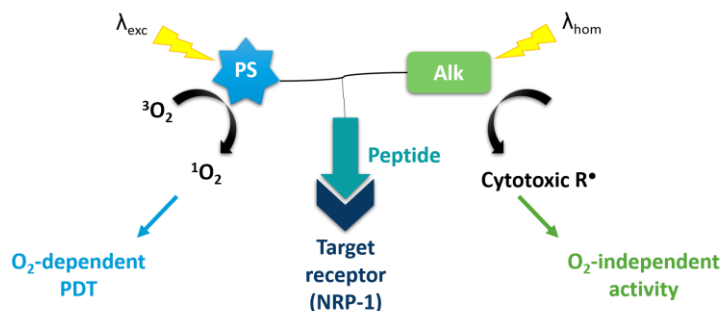


Figure 1. Schematic representation of trimodal platform.

Herein, we design trimodal platform for a targeted-PDT treatment efficient in both normoxic and hypoxic conditions. The designed platform, named Alk-K(Pyro-a)DKPPR, is based on three unities: (1) pyropheophorbide-a (**Pyro-a**) as a PS, which could be illuminated in the red region ($Q_1 = 668$ nm) to have an O₂-dependent PDT, (2) KDKPPR, a NRP-1-targeted peptide has already been proven by our team and (3) a homolyzable alk, under UV illumination, to produce alkyl radicals in order to have an O₂-independent PDT (Figure 1). For the evaluation of the relevance of these new platforms, the synthesis of the following compounds is necessary: the bimodal platform without Alk (i.e. K(Pyro-a)DKPPR) on the one hand and the bimodal platform without **Pyro-a** (i.e. Alk-KDKPPR) on the other hand. In this study, we aim to establish the proof of concept that the combination of these three unities is possible without any disruption of their proper properties.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis

Alk (*RS/SR*)-**6** was prepared in 4 steps in 37% overall yield. First, allylic bromination of 4-ethylbenzophenone **1** using *N*-bromosuccinimide (NBS) in CCl₄ afforded the bromide derivative (*R/S*)-**2** in 92 % yield (Scheme 2).¹³ Then, the alkyl radical was generated *in situ* by the action of copper catalysts to the nitroxide (*R/S*)-**3**¹⁴ with the bromide derivative yielded the alk **4** as a 4:1 mixture of diastereoisomers (55%).

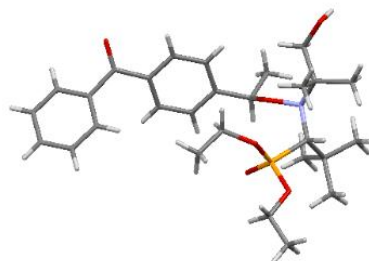
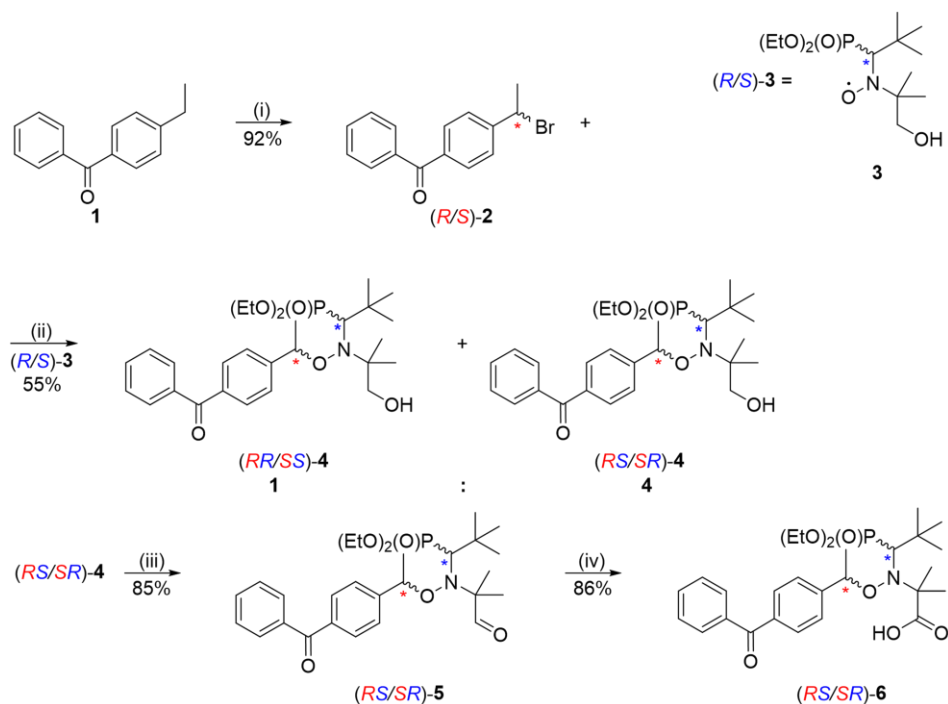


Figure 2. X-Ray structure of alk (*RS/SR*)-**4**.¹⁵

At this stage, the two diastereoisomers in racemic form were separated using column chromatography to afford 2.95 g of (*RS/SR*)-**4** and 0.80 g of (*RR/SS*)-**4**. Thanks to recrystallization of (*RS/SR*)-**4**¹⁵ in diethyl ether white crystals suitable for X-ray analysis were obtained (Figure 2). Finally, alk (*RS/SR*)-**6** was obtained through two successive oxidations with Dess-Martin periodinane (DMP)¹⁶ and Pinnick oxidation procedure in 73% yield.¹⁷



Scheme 2. Synthesis of alk (RS/SR)-6. (i) NBS, CCl₄, reflux, 5h, (ii) Cu/CuBr, rt, 12h, PMDTA, benzene, (iii) DMP, DCM, 0°C, 5h, and (iv) NaClO₂/NaH₂PO₄, *t*-BuOH, rt, 1.5h.

The amino acid lysine was chosen to link the three units (peptide, Alk and PS) together in our trimodal platform. First, the coupling reaction of the **Pyro-a** with the (ϵ)-amino group of lysine was done separately and performed in two steps in liquid phase to afford **Fmoc-K(Pyro-a)** as described previously by our team (Figure 3).¹⁸

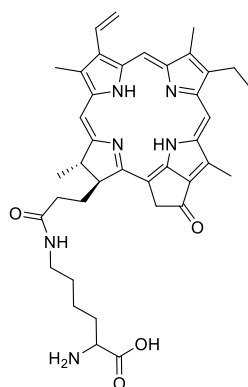


Figure 3. Structure of Fmoc-K(Pyro-a).

All the platforms, Alk-KDKPPR (**9**), K(Pyro-a)DKPPR (**12**) and Alk-K(Pyro-a)DKPPR (**13**) were prepared using a Fmoc/*t*Bu solid phase peptide synthesis (SPPS) on 4-benzyloxybenzyl alcohol (Wang) resin (Scheme 3) and characterized by HRMS and ¹H NMR (See Supporting information). First, the peptide Fmoc-KDKPPR-wang resin **8** and Fmoc-DKPPR-wang resin **10** with protected lateral chains was synthesized. From these peptides, the bimodal platforms without Pyro-a (i.e. Alk-KDKPPR, **9**) and without Alk (i.e. K(Pyro-a)DKPPR, **12**), and the trimodal platform Alk-K(Pyro-a)DKPPR **13** were generated. The bimodal platform **9** was obtained after coupling reaction at the N-terminal extremity of peptide **8** with (RS/SR)-6, followed by both cleavages under acidic conditions (27% overall yield from **7** with a HPLC purity of 95%) of the peptide from the resin and of the lateral chains. The other bimodal platform **12** was isolated after

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

a coupling reaction at the N-terminal extremity of peptide **10** with **Fmoc-K(Pyro a)** to afford **11**, then resin-cleaved and fully deprotected (25% overall yield from **7** with a HPLC purity of 100%). Finally, the trimodal platform **13** was obtained after similar procedure as **9** from **11** with *(RS/SR)*-**6**, (19% overall yield from **7** with a HPLC purity of 98%) (Figure 4).

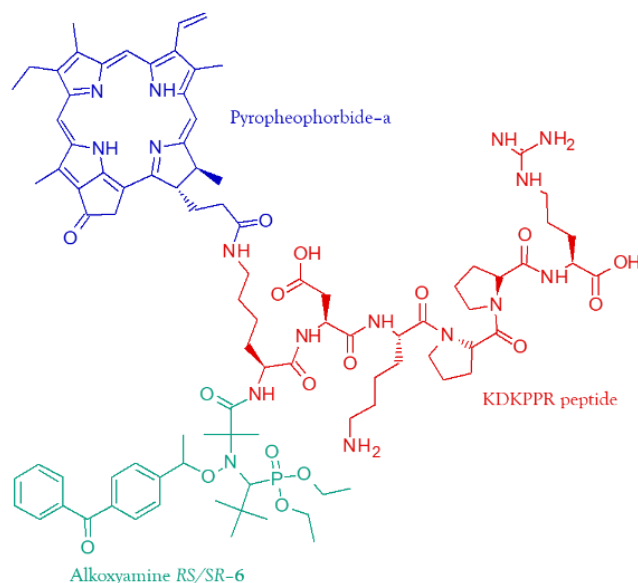
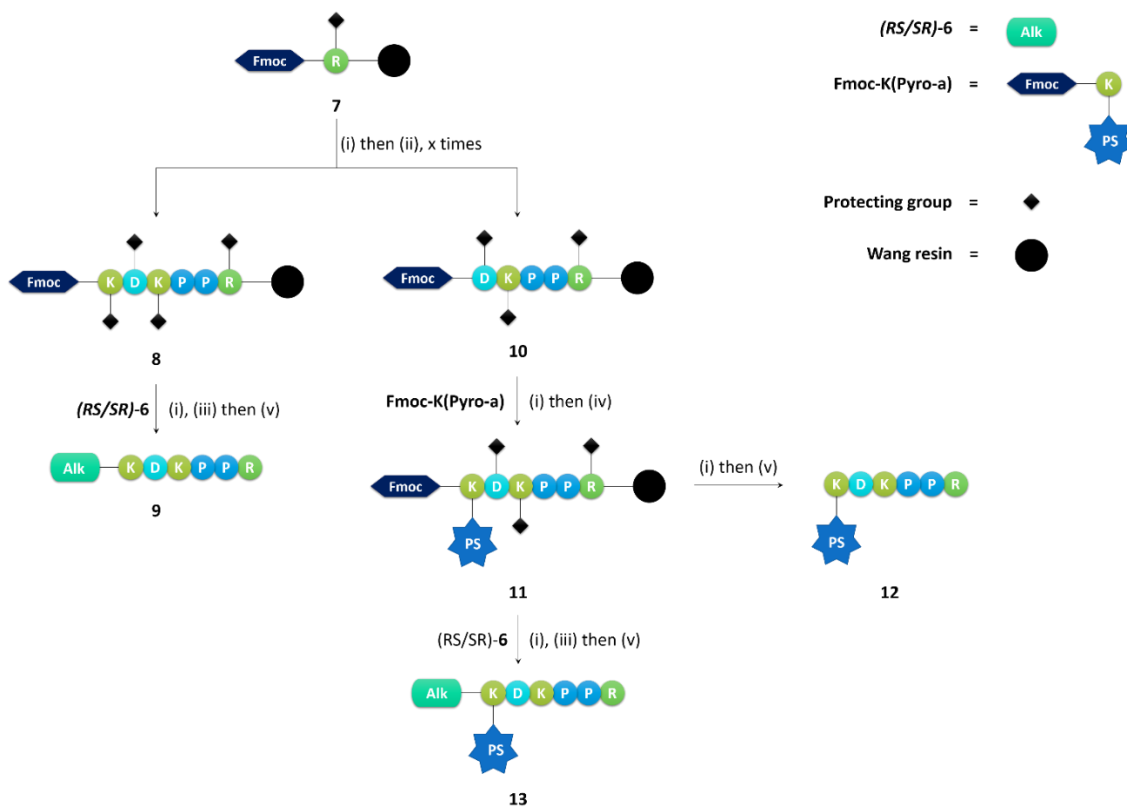


Figure 4. Structure of the trimodal platform **13**.



Scheme 3. Solid phase peptide synthesis of bimodal (9 and 12) and trimodal (13) platforms: (i) *N*-Deprotection: DMF/Pip (80:20, v:v), rt, 4 then 7 min (synthesizer) or 4x15 min (manually) (ii) Coupling: Fmoc-AA(P)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, rt, 2 x 18 min, (iii) Coupling: HBTU, NMM, NMP, DMF, rt, 12 h, (iv) Coupling: PyBOP, DIPEA, DMF, rt, 12 h and (iv) TFA/TIPS/water (92.5:2.5:5.0, v:v:v), rt, 1h30. Legend: x, number of amino acid.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Photophysical properties

The photophysical properties of the synthesized platforms (**9**, **12** and **13**) as well as those of (RS/SR)-**6** and **Pyro-a** alone were evaluated. These last two were used as references to test the influence of each moiety on the photophysical properties of **Pyro-a**. The photophysical studies were performed in methanol in which all the compounds were soluble. The absorption spectra of each compound were recorded at several concentrations to determine the ϵ values (Figure 5A). A slight decrease of the ϵ of **Pyro-a** was observed for the Soret and Q_I bands after conjugation with the peptide and alk moieties, but it remained high for PDT applications.

The absorption spectrum showed the typical absorption bands of **Pyro-a** at 410 (Soret band), 508 (Q_{IV}), 539 (Q_{III}), 609 (Q_{II}) and 666 (Q_I) nm. Moreover, the coupling of the peptide and alk led to the apparition of a band at 214 and 270 nm, respectively (Figure 5B).

Solutions of **Pyro-a**, (RS/SR)-**6**, **9**, **12** and **13** were prepared at a concentration allowing an absorbance of about 0.2. The fluorescence spectra were performed at an excitation wavelength at 410 nm for compounds containing **Pyro-a** (Figure 5C) and at 280 nm for compounds containing (RS/SR)-**6** (data not shown). The fluorescence quantum yields, Φ_f , could then be calculated (Figure 5A). No fluorescence was observed for compounds that do not contain **Pyro-a** (i.e. (RS/SR)-**6** and **9**). The 1O_2 emission spectra were carried out under the same conditions in order to determine the quantum yield of 1O_2 , Φ_Δ (Figure 5A and Figure 5D).

As for the fluorescence, no 1O_2 production was highlighted for compounds (RS/SR)-**6** and **9**. It could be observed that there was a slight decrease of both quantum yields for **12** in comparison with **Pyro-a**. Moreover, for **13**, no change was observed. These results indicated that alk and peptide were not found to affect the photophysical properties of **Pyro-a**.

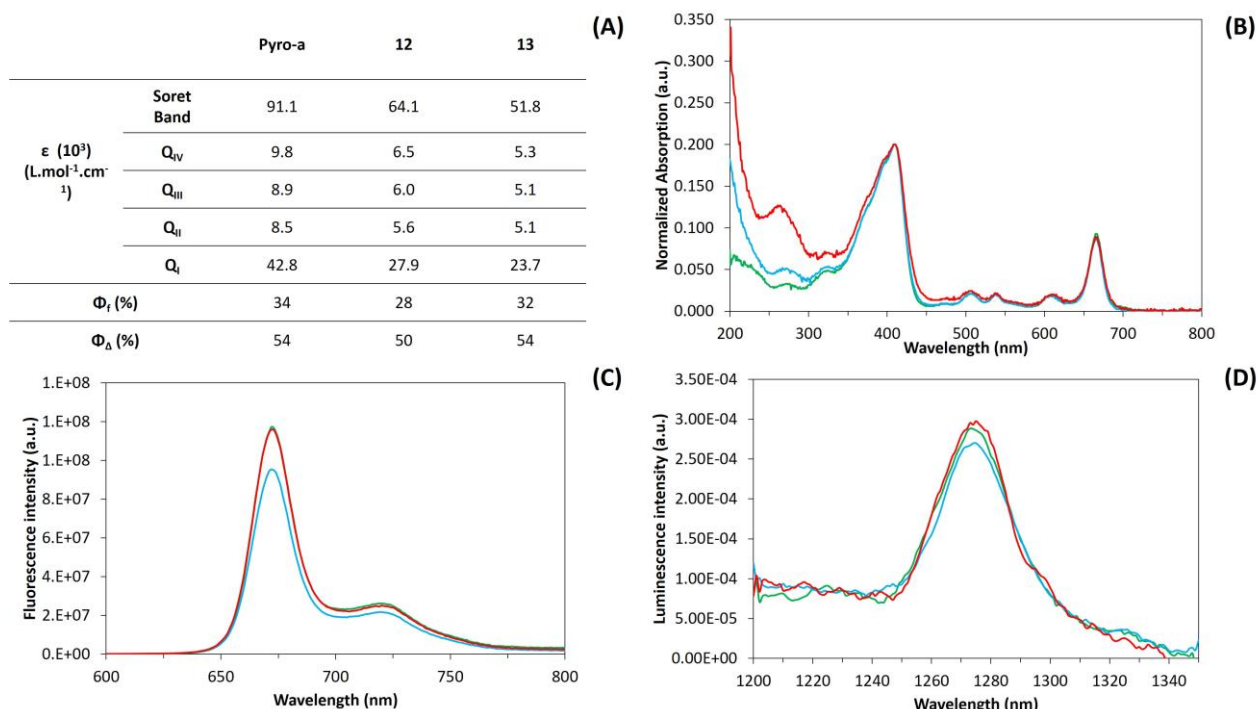


Figure 5. Photophysical properties of compounds with **Pyro-a** in methanol: (A) Absorption coefficient, Φ_f and Φ_Δ (B) Normalized UV-Visible Absorption spectra, (C) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{exc} = 410$ nm) and (D) 1O_2 emission spectra ($\lambda_{exc} = 410$ nm) of **Pyro-a**, **12** and **13**. Legend: (—) **Pyro-a**, (—) **12** and (—) **13**.

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Photobleaching studies

The stability of **Pyro-a**, **12** and **13** under light illumination (668 nm, 10 mW.cm⁻²) in methanol was studied to check the non-photobleaching of the PS over time. The Φ_f was evaluated every 5 min and a significant stability was observed for all the compounds (Figure 6). Moreover, we could observe that Φ_Δ was the same at the beginning and at the end of the illumination.

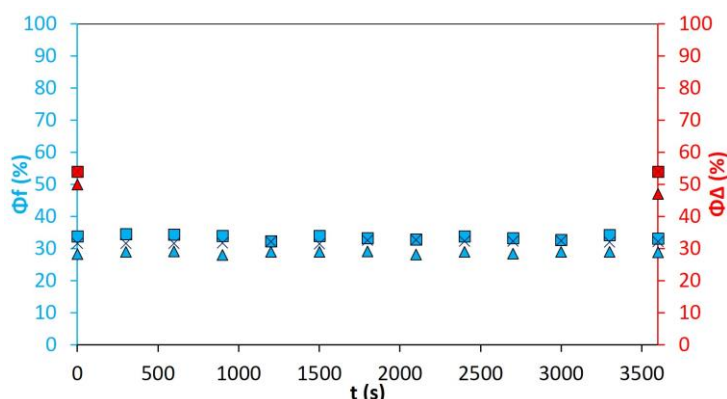
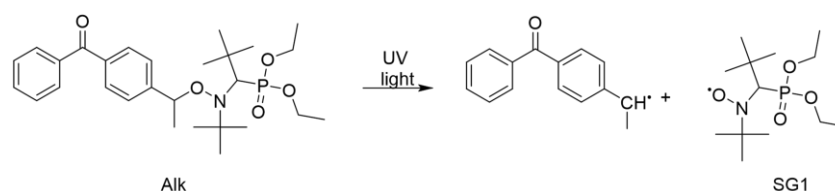


Figure 6. Evolution of Φ_f and Φ_Δ quantum yields of compounds **Pyro-a**, **12** and **13** under light irradiation (668 nm, 10 mW.cm⁻²) over time. Legend: (□) **Pyro-a**, (△) **12**, (×) **13**.

Photolability studies

Scheme 4 showed the radicals production from the alk used in our model. To evaluate the effective homolysis of our compounds, we followed the generation of SG1 radical by Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. A high stability of this radical was observed after more than 1 hour of irradiation with a decrease of intensity from 100% to 93% (data not shown).



Scheme 4. Alk homolysis under UV light irradiation.

First, we opted to evaluate the influence of **Alk** concentration and oxygenation of the solution on the SG1 generation through spin-trapping investigations upon UVA-light illumination ($\lambda = 365\text{nm}$) of **Alk**. We used, as reference conditions, a 300 μM solution of **Alk** in methanol under normal conditions of oxygenation and illumination (see Material and Methods section). While doing so, EPR fingerprint of the **Alk** was detected. It consisted of 6 lines of equal intensity arising from the coupling between the single unpaired electron and both ³¹P and ¹⁴N nuclear spin of 1/2 and 1 respectively (hyperfine coupling values are given in Supporting Information).¹⁹ From the very first seconds of illumination a fast production of SG1 was observed reaching a maximum EPR intensity after ca. 75 s of illumination. After this, a sharp decline of the intensity was observed (Figure 7A). The marked change in the evolution of the EPR intensity is also referred to as turnover between the radical generation (or spin adduct) and their reduction. The illumination of **Alk** at different concentration exhibited a linear dependence of the initial rate of SG1 production (Table 1) together with the **Alk** concentration. This trend was accompanied with a shift of the turnover towards higher illumination time (Figure 7A), yet such turnover was observed whatever was the **Alk** concentration. Similar investigations were performed on the compounds **9** and **13** (Figure 7B and 7C, respectively). Doubling the compounds concentrations were not sufficient here to double the corresponding initial

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

rates while the presence of a well-defined turnover was also detected. The major difference was the time of illumination necessary to reach the turnover. Indeed, if the kinetics were comparable for the **Alk** alone and the compound **9**, the kinetic was significantly longer for the compound **13** which may be due to the presence of the PS. Considering the significant UV light absorption of PS, this latter may compete with the **Alk**, sharing the amount of photons received and increasing the time to reach the maximal quantity of nitroxide. However, some unexpected kinetic effect may account for these observations (vide infra).

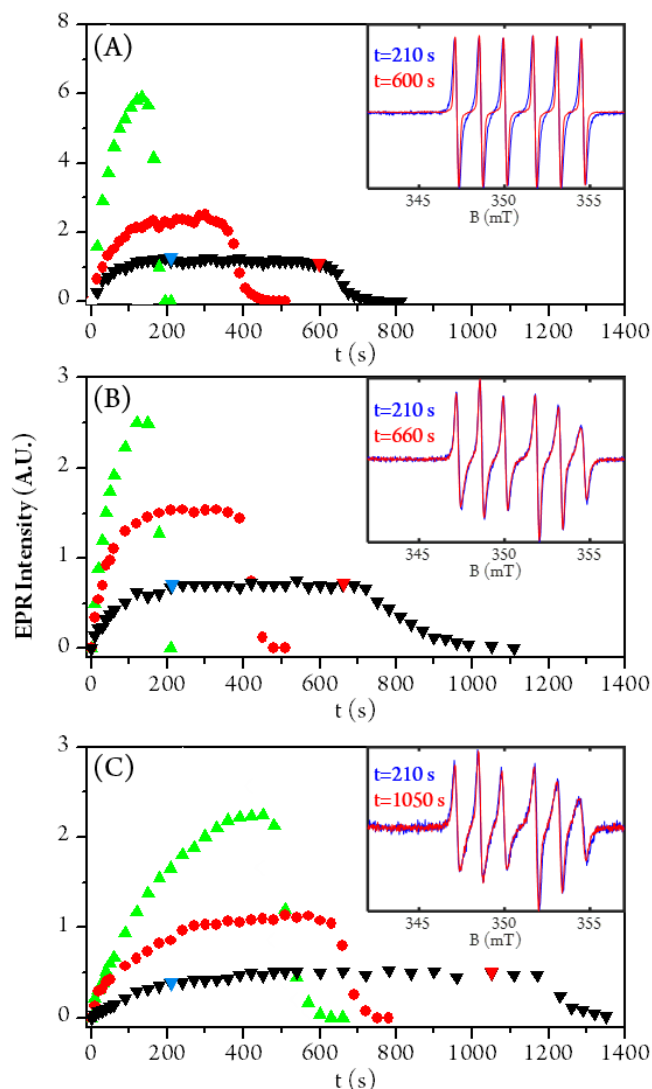


Figure 7. EPR intensity of radical generated after different irradiation time at room temperature for **Alk** (A), **9** (B) and **13** (C) at different concentrations in methanol. Inset: EPR spectra, normalized by their peak to peak intensity, of SG1 of the solution at 75 μM at the beginning of the plateau (blue) and at the end of the plateau (red). Legend: (\blacktriangle) 300 μM , (\bullet) 150 μM and (\blacktriangledown) 75 μM .

Worthy of note, EPR spectra of **Alk** sharpen upon irradiation (Figure 7A, inset), pointing to a decrease in O_2 concentration within the organic solvent.²⁰ Interestingly this effect wasn't observed neither for **9** nor **13**. The utmost importance of $^3\text{O}_2$ for the formation of radicals after irradiation of **Alk** was even strengthened by degassing the alk solution by mean of soft Argon bubbling (*ca.* 5 min/mL) prior to EPR investigations. In such hypoxic conditions, close to no SG1 was observed (Figure 8A). Identical approach was performed on both **9** and **13** compounds yet stackable kinetics were obtained regardless of the oxygenation conditions (Figure 8B and 8C). The absence of

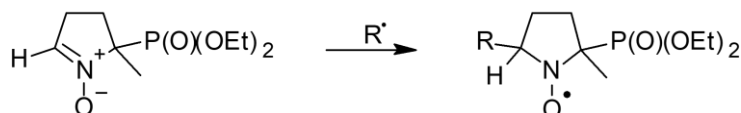
CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

difference in Figure 8B and 8C is due to the presence of peptide and PS which play the role of alkyl radical scavengers. Indeed, in Figure 8A, a large amount of nitroxide is observed because alkyl radicals are scavenged by $^3\text{O}_2$ and back reaction is suppressed (S1) whereas in absence of $^3\text{O}_2$ back reaction occurs impeding the growth of nitroxide.

Table 1. Initial production rate (k) of radical and UV exposition time until reaching the turnover (t_{turnover}) for compound Alk, 9 and 13 at different concentrations in methanol.

Compound	k (A.U.)	t_{Turnover} (s)
Alk (75 μM)	0.017 ± 0.001	630
Alk (150 μM)	0.031 ± 0.002	345
Alk (300 μM)	0.088 ± 0.005	135
9 (75 μM)	0.009 ± 0.001	720
9 (150 μM)	0.025 ± 0.002	390
9 (300 μM)	0.039 ± 0.002	150
13 (75 μM)	0.0031 ± 0.0005	1170
13 (150 μM)	0.011 ± 0.001	630
13 (300 μM)	0.014 ± 0.001	450

The SG1 reduction together with the potential consumption of $^3\text{O}_2$ is in favour of the photo-induced formation of radical intermediates. To validate such hypothesis a spin-trapping investigation was performed, using 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO) to trap unstable reactive species too short-lived to be observed in our experimental conditions.²¹ Indeed, the reaction between DEPMPO and targeted radical led to the formation of a more stable spin-adduct which could hence be detected by EPR spectroscopy (Scheme 5).



Scheme 5. Reaction between DEPMPO (EPR silent) and a short-lived radical leading to its corresponding spin adduct (EPR active).

As for SG1, DEPMPO spin-adducts exhibited the coupling between ^{31}P and ^{14}N and the unpaired electron, yet with an additional ^1H having a nuclear spin of $\frac{1}{2}$. Consequently, EPR spectra of DEPMPO can have up to 12 lines. Noteworthy, the hyperfine coupling constants (*hfccs*) related to the hyperfine interaction within the adducts were characteristic of the nature of the trapped adduct, potentially allowing their identification (*e.g.* carbon- or oxygen-centred radical) (Figure 9A).²²

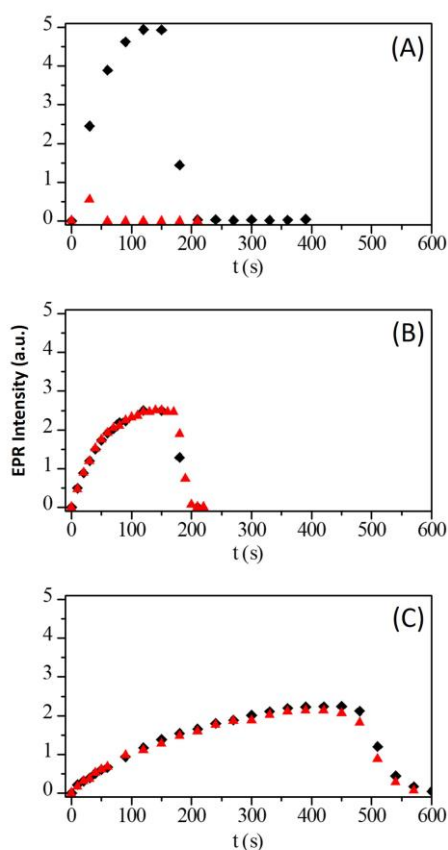


Figure 8. EPR intensity of radical generated after different irradiation time for **Alk** (A), **9** (B) and **13** (C) at 300 μM in methanol with (♦) or without (▲) oxygen.

In presence of DEPMPO, a better stability of the radical SG1 generated over illumination time was observed in both oxygenated and degassed conditions: a break was still present at significantly longer illumination time and the corresponding signal decay was significantly slowed down (Figure 9B and 9C). Quite possibly, the spin-trap shielded the SG1 nitroxide site from potential reduction due to radical intermediates. Indeed, three distinct radical species were detected and identified. Based on the obtained hyperfine interactions, the first two radicals (herein referred as to rad1 and rad2) were identified as oxygenated radicals while the latter one (denoted as rad3) pointed towards carbon centred radical (See Supporting Information).

For the compound **9** (Figure 9B and 9C), a plateau was reached pointing to the high stability of the photo-generated nitroxide radical (SG1-peptide). For a methanol solution of **9** at 300 μM , a plateau around 500 seconds was which remained stable after 1 hour of illumination and that in both conditions of oxygenation. In these conditions, three distinct spin-adducts were also observed (see Supporting Information). This high stability of the nitroxide radical generated could be explained by a protecting effect due to the peptide.

Interestingly enough, for the compound **13** (Figure 9B and 9C), the same trend as for **Alk** alone was observed with a slower decay of the nitroxide signal in normal conditions of oxygenation. The generation of the same radicals as for **9** was also observed (see Supporting Information). This difference between the kinetics of compounds **9** and **13** might be explained by the fact that the introduction of the PS, a sterically large group, changed the structure of the peptide and changed the protective effect observed in its absence.

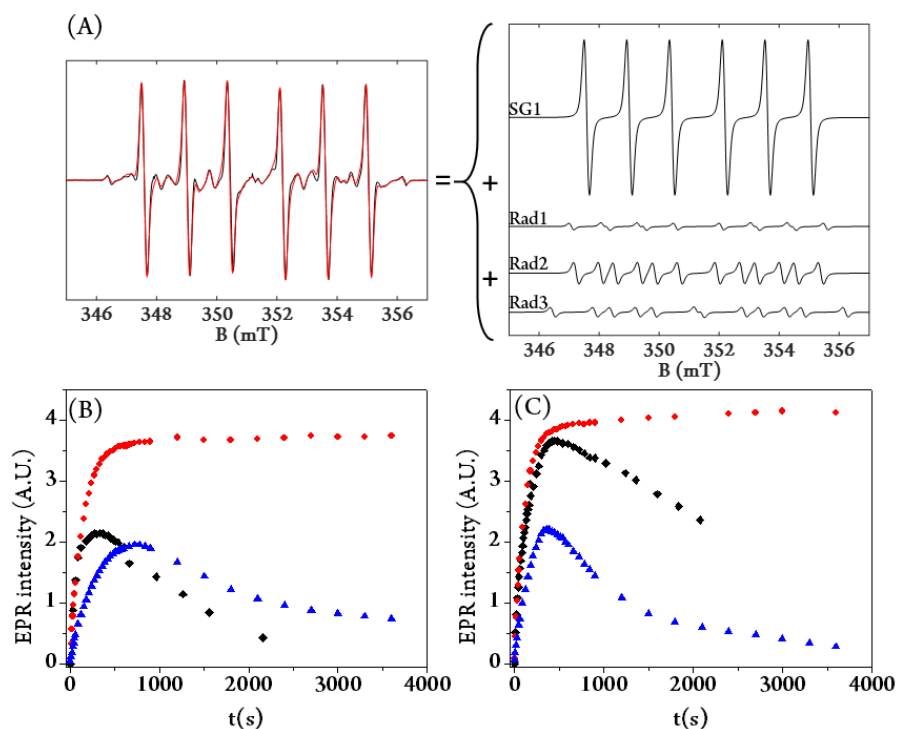


Figure 9. (A) Left: Simulation (red) and experimental (black) spectra of alk in presence of 10 mM of DEPMPPO after 960 s of irradiation. Right: simulation of EPR spectra of SG1, Rad1, Rad2 and Rad3. Simulation parameters are given in Supplementary information. (B) and (C) Evolution of radical generation after illumination of **Alk**, **9** and **13** over time in solution in MeOH at 300 μ M in presence of 10 mM of DEPMPPO in (B) oxygenated solution and (C) degassed solution. Legend: Radicals formed by illumination of: (\blacklozenge) **Alk**, (\bullet) **9** and (\blacktriangle) **13**.

The reduction of the nitroxide radical signal highlighted its strong reactivity with the surrounding environment and although there was competition between **Alk** and PS, the generation of nitroxide radicals was far from being blocked. This is very interesting for future biological applications for the destruction of cancer cells.

Affinity studies

The affinity of **9**, **12** and **13** to neuropilin-1 was evaluated by competitive ligand binding assay in comparison with the peptide KDKPPR alone. The binding of **12** and **13** to NRP-1 showed a better specificity than the peptide alone or **9** probably due to hydrophobic interactions enhanced by **Pyro-a** and steric interactions stabilizing the 3D conformation of the peptide (Figure 10). The affinity of **13** to NRP-1 (IC_{50} of $0.46 \pm 1 \mu$ M) was relatively encouraging to envisage an evaluation of this new multimodal therapeutic approach on *in vivo* models of tumors expressing NRP-1.

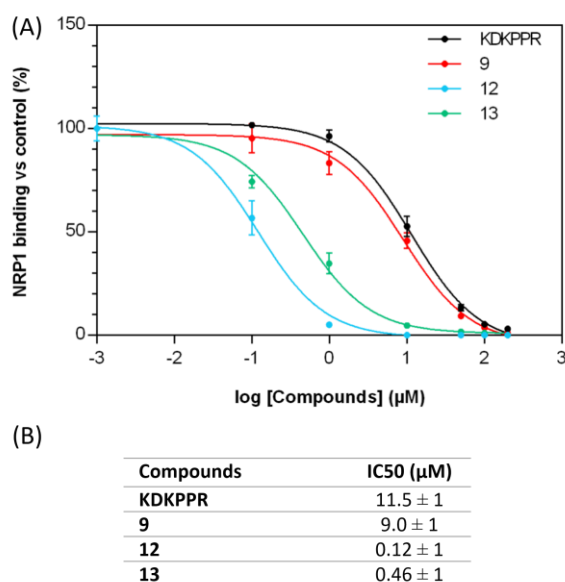


Figure 10. (A) Affinity of **9**, **12** and **13** to NRP-1 evaluated by Binding Ligand Assay. (B) IC₅₀ values of compounds estimated from affinity fitting curves.

CONCLUSION

Herein, we established the proof of concept that we can combine three entities, with their own properties, a PS, an alk and a peptide without any perturbations of their properties to overcome two major barriers of PDT. We report the effective synthesis of this innovative trimodal platform using SPPS with acceptable yield and high purities. The photophysical properties (quantum yields of fluorescence and ¹O₂) of **Pyro-a** were maintained even coupled with peptide and the alk. The peptide KDKPPR still targeted NRP-1 after the coupling of **Pyro-a** and/or alk, even with a better affinity. The illumination of alk alone or coupled to the peptide or the PS led to the formation of radicals.

Concerning the photolability property of alks, compounds **9** and **13** presented two different kinetics. As an explanation, it might be suggested that the introduction of the bulky **Pyro-a** induced a change in the conformation of the peptide that lost its protective effect. This could be confirmed by the affinity studies where we can observe a better affinity for peptides coupling with **Pyro-a** than the peptide coupling only with (*RS/SR*)-**6**.

Although established, this proof of concept does not currently allow *in vitro* and *in vivo* applications due to the use of UV light for alk homolysis. We have to confirm our concept *in vitro* by developing others models of alk homolysable at higher wavelength.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of compounds

Chemicals

All commercially chemicals were used without further purifications. (3*S*-trans)-9-ethenyl-14-ethyl-4,8,13,18-tetramethyl-20-oxo-3-phorbinepropanoic acid (pyropheophorbide a, **Pyro-a**) was purchased from BOC Sciences (Shirley, NY, USA). The Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (**PyBOP**) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-aminoacid-OH and

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany). The Fmoc-Lys-OH hydrochloride, N-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDCI), acetic anhydride and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The *N*-methylmorpholine (NMM), *N*-methylpyrrolidinone (NMP), *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) and triisopropylsilane (TIPS) were purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA). Piperidine was purchased from Acros Organics. Ultrapure water (Milli-Q, $\rho > 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used for the aqueous solution preparation.

Instruments

Analytical thin layer chromatographies (TLC) were performed using Merck Kieselgel 60 F254 plates; spots were detected after UV light illumination and a phosphomolybdic acid solution in EtOH as a stain revealed by heating. Purifications of **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6** were done on a Reveleris® X2 flash chromatography system (BUCHI, Switzerland) on Merck Kieselgel 60 (230–400 mesh). The synthesis of **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6** were realized under anhydrous conditions and an inert atmosphere of argon and, except where stated, using dried apparatus and employing standard techniques for handling air-sensitive materials.

The peptides were synthesized with an automated ResPepXL peptide synthesizer (Intavis AG, Bioanalytical Instruments). The compounds were purified using Shimadzu LC-10ATvp, column Agilent Pursuit C18, 5 mm column (5 μm , 150 \times 21.2 mm) equipped by an UV photodiode array detector (Varian Prostar 335–190–950 nm) and a spectrofluometric detector (Shimadzu RF-10AXL–200–650 nm). The UV detection was performed at 415 and 260 nm. Fluorescence detection at 650 nm was realized after an excitation at 415 nm. The analysis by HPLC were performed with the same equipment but with a column Agilent Pursuit 5 C18 (5 μm , 150 \times 4.6 mm).

^1H , ^{13}C , and ^{31}P NMR spectra of **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6** were recorded in CDCl_3 on a 300 or 400 MHz spectrometer at Marseille and ^1H , COSY and TOCSY NMR spectra of **9**, **12** and **13** were recorded in $\text{DMSO}-d_6$ solvent at room temperature ($T = 298 \text{ K}$) on a BRUKER AVANCE spectrometer at 300 MHz at Nancy. Chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) and using residual non-deuterated solvents as the internal reference for ^1H and ^{13}C -NMR spectra, and as an internal capillary filled with 85% H_3PO_4 for ^{31}P -NMR spectra for **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6** and using DMSO residual peak ($\delta = 2.5 \text{ ppm}$) as internal reference for **9**, **12** and **13**. Coupling constants (J) are given in hertz (Hz) and multiplicities are reported as follow: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet and br = broad.

High-resolution mass spectra (HRMS) of **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6** were recorded on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) spectrometer equipped with a pneumatically assisted atmospheric pressure ionization source (API). Positive mode electro-spray ionization was used on samples: electrospray voltage (ISV): 2800 V; opening voltage (OR): 20 V; nebulizer gas pressure (nitrogen): 800 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) of compounds **9**, **12** and **13** were recorded on a Bruker MicroTof-Q HR spectrometer in the "Service commun de Spectrométrie de Masse", Faculté des Sciences et Technologies (Vandoeuvre-lès-Nancy, France).

Alkoxyamine synthesis

Compound **2** has been synthesized by a reported procedure²³ (see SI) by using 10 mol% of azobisisobutyronitrile instead of 1 mol % of benzoyl peroxide.

The new compounds **4**, **5**, **6** have been prepared according to a reported procedure²⁴ (see SI).

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

Solid phase peptide synthesis (SPPS)

The peptides K(Boc)D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin **8** and D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin **10** were first synthesized using the automated ResPepXL peptide synthesizer, with a Fmoc/*t*Bu methodology. The side chains of arginine, lysine and aspartic acid were respectively protected by Pbf, OtBu and Boc groups. We used a Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin swelled in CH₂Cl₂. To remove the Fmoc group we used piperidine (20% in DMF). This step was performed two times, a first during 4 min and a second during 7 min. Then the next amino acid was grafted by adding an excess of Fmoc-aminoacid-OH (6 eq), HBTU (5 eq), NMP (3 eq) and NMM (10 eq) in DMF. This step was repeated two times for 18 min. A last step of capping, using a solution of acetic anhydride (5% in DMF), was performed for 5 min, to trap all functions that did not react. Deprotection, coupling and capping steps were repeated until the end of the synthesis of the peptide.

Alk-KDKPPR, 9.

After Fmoc deprotection, the reaction between (*RS/SR*)-**6** (1.5 eq) and peptide K(Boc)D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin **8** was performed in presence of PyBOP (3 eq) and DIPEA (3 eq) in DMF, and the solution was stirred for 12 h. The resin was dried under vacuum and then cleaved (with full deprotection of lateral chains) using TFA/TIPS/water (92.5/2.5/5%) for 2 h. The acidic resin was filtered and washed with CH₂Cl₂ and EtOH. The filtrate was dried under vacuum and the compound was precipitated in ether by centrifugation. The final product was further purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1% TFA; 10/90) to 100% acetonitrile gradient in 25 min at a flow of 12 mL.min⁻¹. *R*_t =13.2 min. **9** was isolated as a white powder with a yield of 27% (8.60 mg) and a HPLC purity of 95%.

K(Pyro)DKPPR, 12.

After Fmoc deprotection, the reaction between Fmoc-K(Pyro-a) (1.5 eq) and peptide D(OtBu)K(Boc)PPR(Pbf)-Wang resin **10** was performed with HBTU (3 eq), NMP (3 eq) and NMM (9 eq) in DMF and the mixture was stirred for 12h to conduct to the Fmoc and lateral protected compound **11**. The final Fmoc protection was removed using piperidine. The resin was dried under vacuum and then cleaved (with full deprotection of lateral chains) using TFA/TIPS/water (92.5/2.5/5%) for 2 h. The acidic resin was filtered and washed with CH₂Cl₂ and EtOH. The filtrate was dried under vacuum and the compound was precipitated in ether by centrifugation. The final product was purified by preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1% TFA; 10/90) to 100% acetonitrile gradient in 15 min, followed by isocratic acetonitrile for 10 min at a flow of 12 mL.min⁻¹. *R*_t =12.9 min. **12** was isolated as a dark green powder with a yield of 25% (15.57 mg) and a HPLC purity of 100%.

Alk-K(Pyro-a)DKPPR, 13.

Following the synthesis of the product **11** on resin, the coupling reaction with (*RS/SR*)-**6** (1.5 eq) was performed in presence of PyBOP (3 eq) and DIPEA (3 eq) in DMF, and the reaction mixture was stirred for 12 h. The resin obtained was dried under vacuum and then cleaved (with full deprotection of lateral chains) using TFA/TIPS/water (92.5/2.5/5%) for 2 h then filtered and washed with CH₂Cl₂ and EtOH. The filtrate was dried under vacuum and the compound was precipitated in ether by centrifugation. The final product was purified using an Armen SPOT Prep system (high pressure, preparative liquid chromatography) using a column, using acetonitrile/water (0.1% TFA; 10/90) to 100% acetonitrile gradient in 15 min, followed by isocratic acetonitrile for 10 min at a flow of 15 mL.min⁻¹. *R*_t =18.3 min. **13** was isolated as a dark green powder with a yield of 19% (8.25 mg) and a HPLC purity of 98%.

Photophysical properties

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

The set ups and the methods have been already described in a previous study.²⁵

Photobleaching of Pyro-a

The studies of photobleaching were performed with a red laser ($\lambda = 668$ nm and $P = 10$ mW.cm⁻²). The solutions of **Pyro-a**, **12** and **13** were prepared in order to have an absorbance around 0.2 to follow the evolution of fluorescence and singlet oxygen emission. The solutions were irradiated and the photophysical properties of each compound were evaluated at different times of irradiation: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 min with the same instruments as described below.

Homolysis of Alk

EPR spectra were recorded as previously described²⁶ except the microwave power was at 4.5 mW, modulation amplitude et 2 G, a sweep time of 30 s for a single scan and 25 μ L capillaries (Hirschmann) were used. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPMPO) was synthesized as reported in the literature.²¹ DEPMPO was stored in a stock solution at 0.5 M in acetonitrile. The intensity of the EPR spectra was obtained by calculating the double integral of the EPR spectra. In case of multiple component spectra, spectra were simulated using Easyspin toolbox under Matlab (Mathworks) environment.²⁷ The parameters used for simulation are presented in Supporting information table S2. The double integral of each component of the simulated spectra was used to get the intensity of each component. Initial rates were calculated by performing a linear fit on the 4 first points of the kinetics using OriginPro, version 8, fitting tool.

Affinity tests

Competitive binding to recombinant NRP-1 protein

The binding of compounds for NRP-1 protein was evaluated in terms of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ values) through a competitive assay as previously described²⁸. (See SI)

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. "This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>." S1. Synthesis and analytical characterizations of **2**, (*RR/SS*)-**4**, (*RS/SR*)-**4**, (*RS/SR*)-**5** and (*RS/SR*)-**6**, **9**, **12** and **13**. S2. Photophysical properties. S3. Homolysis studies. S4. Competitive binding to recombinant NRP-1 protein.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* celine.frochot@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-3-72-74-37-80; g.audran@univ-amu.fr; Tel.: +33-4-91-28-88-62

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

This research received no external funding.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge François Courtier, Marc Basler and Dr. David Martel (Institut Charles Sadron, Strasbourg, France) for designing & building of the illumination chamber. The authors thank the French Ministry of Research and the REseauNational de Rpeinter-Disciplinaire

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

(RENARD, Fédération IR-RPE CNRS #3443). Dr. Elena Gimenez-Arnau (Dermatochemistry Laboratory, University of Strasbourg, France) is acknowledged for providing us with DEPMPO. We also acknowledge André Merlin, LERMAB, CNRS, Université de Lorraine for his help with the RPE experiments, Olivier Fabre, LCPM, CNRS, Université de Lorraine, for the NMR experiments and Serge Mordon, ONCOTHA, INSERM, Université de Lille, CHU for the loan of the lighting equipment.

ABBREVIATIONS

Alk, alkoxyamine; AMD, age-related macular degeneration; DCM, dichloromethane; DIPEA, Diisopropylethylamine; DMF, diméthylformamide; DMP, Dess-Martin periodinane; DO, optical density; EDCI, *N*-Ethyl-*N*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride; EPR, Electronic paramagnetic resonance; HBTU, *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate); HO \cdot , hydroxyl radical; HPLC, high performance liquid chromatography; HRMS, high-resolution mass spectrometry; NBS, *N*-bromosuccinimide; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; NMM, *N*-methylmorpholine; NMP, Nitroxide Mediated Polymerization; NMR, nuclear magnetic resonance; NO, nitric oxide; NRP-1, neuropilin-1; O $_2$, molecular oxygen; $^1\text{O}_2$, singlet oxygen; O $_2^{\cdot-}$, superoxide anion; PDT, photodynamic therapy; pip, piperidine; PS, photosensitizer; PTT, photothermal therapy; PyBOP, Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate; Pyro-a, pyropheophorbide-a; ROS, reactive oxygen species; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; TIPS, triisopropylethylamine; TLC, thin layer chromatography; UV, ultra-violet; VEGF, vascular endothelial growth factor.

REFERENCES

- (1) Hamblin, M. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*. Artech House, 2008.
- (2) See, K. L.; Forbes, I. J.; Betts, W. H. Oxygen Dependency of Photocytotoxicity with Haematoporphyrin Derivative. *Photochemistry and Photobiology* **1984**, *39* (5), 631–634. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb03902.x>.
- (3) Larue; Myrzakhmetov; Ben-Mihoub; Moussaron; Thomas; Arnoux; Baros; Vanderesse; Acherar; Frochot. Fighting Hypoxia to Improve PDT. *Pharmaceuticals* **2019**, *12* (4), 163. <https://doi.org/10.3390/ph12040163>.
- (4) Kovtun, G. A.; Aleksandrov, A. L.; Golubev, V. A. Interaction of Peroxide Radicals with Esters of Hydroxylamines. *Russ Chem Bull* **1974**, *23* (10), 2115–2121. <https://doi.org/10.1007/BF00921266>.
- (5) Bertin, D.; Gigmes, D.; Marque, S. R. A.; Tordo, P. Kinetic Subtleties of Nitroxide Mediated Polymerization. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2189. <https://doi.org/10.1039/c0cs00110d>.
- (6) Bagryanskaya, E. G.; Marque, S. R. A. Chapter 2: Kinetic Aspects of Nitroxide Mediated Polymerization. In *Nitroxide Mediated Polymerization*; 2015; pp 45–113. <https://doi.org/10.1039/9781782622635-00045>.
- (7) Moncelet, D.; Voisin, P.; Koonjoo, N.; Bouchaud, V.; Massot, P.; Parzy, E.; Audran, G.; Franconi, J.-M.; Thiaudière, E.; Marque, S. R. A.; Brémond, P.; Mellet, P. Alkoxyamines: Toward a New Family of Theranostic Agents against Cancer. *Molecular Pharmaceutics* **2014**, *11* (7), 2412–2419. <https://doi.org/10.1021/mp5001394>.
- (8) Yamasaki, T.; Buric, D.; Chacon, C.; Audran, G.; Braguer, D.; Marque, S. R. A.; Carré, M.; Brémond, P. Chemical Modifications of Imidazole-Containing Alkoxyamines Increase C–ON Bond Homolysis Rate: Effects on Their Cytotoxic Properties in Glioblastoma Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27* (10), 1942–1951. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.029>.
- (9) Popova, N. A.; Sysoeva, G. M.; Nikolin, V. P.; Kaledin, V. I.; Tretyakov, E. V.; Edeeva, M. V.; Balakhnin, S. M.; Lushnikova, E. L.; Audran, G.; Mark, S. Comparative Study of Toxicity of Alkoxyamines In Vitro and In Vivo. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **2017**, *164* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3924-6>.
- (10) Benachour, H.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M. Targeting Strategies in Photodynamic Therapy for Cancers Treatment. In *Brain Cancer, Tumor Targeting and Cervical Cancer*; Salvatti, E., Ed.; Novapublishers, 2011; pp 1–38.
- (11) Krishnamurthy, S.; Witmer, P. Optimal Light Dose for Interstitial Photodynamic Therapy in Treatment for Malignant Brain Tumors. *Lasers Surg. Med.* **2000**, *27*, 224–234. [https://doi.org/10.1002/1096-9101\(2000\)27:3<224::AID-LSM4>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1096-9101(2000)27:3<224::AID-LSM4>3.0.CO;2-%23).

CHAPITRE II : La PDT ciblée et indépendante de l'oxygène : une preuve de concept

- (12) Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.-L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A Peptide Competing with VEGF165 Binding on Neuropilin-1 Mediates Targeting of a Chlorin-Type Photosensitizer and Potentiates Its Photodynamic Activity in Human Endothelial Cells. *Journal of Controlled Release* **2006**, *111* (1–2), 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.017>.
- (13) Corbin, T. F.; Hahn, R. C.; Shechter, H. Cyclopropylbenzene. *Organic Syntheses* **2003**, 30–30. <https://doi.org/10.1002/0471264180.os044.10>.
- (14) Audran, G.; Bikanga, R.; Brémond, P.; Edeleva, M.; Joly, J.-P.; Marque, S. R. A.; Nkolo, P.; Roubaud, V. How Intramolecular Hydrogen Bonding (IHB) Controls the C–ON Bond Homolysis in Alkoxyamines. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (39), 8425–8439. <https://doi.org/10.1039/C7OB02223A>.
- (15) Home – The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) <https://www.ccdc.cam.ac.uk/> (accessed Oct 1, 2019).
- (16) Dess, D. B.; Martin, J. C. A Useful 12–I–5 Triacetoxyperiodinane (the Dess–Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12–I–5 Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (19), 7277–7287. <https://doi.org/10.1021/ja00019a027>.
- (17) Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. Oxidation of α,β -Unsaturated Aldehydes. *Tetrahedron* **1981**, *37* (11), 2091–2096. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97963-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97963-3).
- (18) Youssef, Z.; Yesmurzayeva, N.; Larue, L.; Jouan-Hureau, V.; Colombeau, L.; Arnoux, P.; Acherar, S.; Vanderesse, R.; Frochot, C. New Targeted Gold Nanorods for the Treatment of Glioblastoma by Photodynamic Therapy. *Journal of Clinical Medicine* **2019**, *8* (12), 2205. <https://doi.org/10.3390/jcm8122205>.
- (19) Bertrand, P. Hyperfine Structure of a Spectrum in the Isotropic Regime. In *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Fundamentals*; Bertrand, P., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 31–59. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39663-3_2.
- (20) Pryor, W. A. *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*; Elsevier, 2012.
- (21) Barbati, S.; Clément, J. L.; Olive, G.; Roubaud, V.; Tuccio, B.; Tordo, P. 31P Labeled Cyclic Nitrones: A New Class of Spin Traps for Free Radicals in Biological Milieu. In *Free Radicals in Biology and Environment*; Nato Science Partnership Subseries: 3; Springer Netherlands, 1997; pp 39–47.
- (22) Lauricella, R.; Tuccio, B. Detection and Characterisation of Free Radicals After Spin Trapping. In *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Applications*; Bertrand, P., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 51–82. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39668-8_3.
- (23) Cauble, D. F.; Lynch, V.; Krische, M. J. Studies on the Enantioselective Catalysis of Photochemically Promoted Transformations: “Sensitizing Receptors” as Chiral Catalysts. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (1), 15–21. <https://doi.org/10.1021/jo020630e>.
- (24) Audran, G.; Brémond, P.; Marque, S. R. A.; Yamasaki, T. C–ON Bond Homolysis of Alkoxyamines, Part 11: Activation of the Nitroxyl Fragment. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (5), 1981–1988. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02790>.
- (25) Stallivieri, A.; Colombeau, L.; Jetpisbayeva, G.; Moussaron, A.; Myrzakhmetov, B.; Arnoux, P.; Acherar, S.; Vanderesse, R.; Frochot, C. Folic Acid Conjugates with Photosensitizers for Cancer Targeting in Photodynamic Therapy: Synthesis and Photophysical Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.004>.
- (26) Twardoch, M.; Messai, Y.; Vileno, B.; Hoarau, Y.; Mekki, D. E.; Felix, O.; Turek, P.; Weiss, J.; Decher, G.; Martel, D. Development of an Electron Paramagnetic Resonance Methodology for Studying the Photo-Generation of Reactive Species in Semiconductor Nano-Particle Assembled Films. *Molecular Physics* **2018**, *116* (12), 1558–1564. <https://doi.org/10.1080/00268976.2018.1433882>.
- (27) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (28) Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, R.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; François, A.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Photodynamic Therapy Targeting Neuropilin-1: Interest of Pseudopeptides with Improved Stability Properties. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *80* (2), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.03.036>.

IX. Conclusion

Nous avons établi une preuve de concept basée sur le développement d'une plateforme trimodale pour une application PDT anticancéreuse ciblant le récepteur NRP-1 efficace à la fois en milieu normoxique et hypoxique.

La première étape, effectuée avec succès, a consisté à synthétiser la plateforme composée d'un peptide (KDKPPR), d'une alcoxyamine (SG1-benzophénone) et d'un PS (Pyro-a), ainsi que des composés de référence. Une fois ces composés obtenus, leurs propriétés photophysiques ainsi que leur photolabilité ont été évalués. Une très faible interaction des différentes unités sur les propriétés photophysiques du PS a été observée. Concernant les propriétés de photolabilité de l'alcoxyamine sous illumination UV, un effet protecteur du peptide a pu être observée ainsi qu'une compétition entre le PS et l'alcoxyamine. Bien que ralentissant la photodissociation de l'alcoxyamine, la présence du PS ne bloque pas la génération de radicaux et ne présente par conséquent pas d'interférences majeures sur les propriétés de cette dernière. La plateforme a également prouvé avoir une très bonne affinité pour le récepteur NRP-1 ($CI_{50} = 0,46 \mu\text{M}$) meilleure que celle du peptide seul ($CI_{50} = 11,5 \mu\text{M}$).

Bien que prometteuse, il n'est pas possible d'évaluer l'efficacité de notre plateforme *in vitro* ou *in vivo* en raison de l'utilisation de la lumière UV pour l'homolyse de l'alcoxyamine. Dans la suite de cette thèse, nous nous sommes tournés vers l'amélioration de cette plateforme.

CHAPITRE III :

AMELIORATION DES

PLATEFORMES POUR

LE TRAITEMENT DU

GLIOBLASTOME

I. Contexte et objectifs

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'amélioration de nos plateformes selon différents aspects :

- i) L'amélioration du ciblage, en utilisant le peptide tLyp-1, forme tronquée du peptide Lyp-1 connu pour se fixer sur le récepteur NRP-1 et être ensuite internalisé ;
- ii) L'augmentation de la solubilité de la plateforme grâce au greffage d'une β -cyclodextrine.
- iii) L'utilisation d'une nouvelle alcoxyamine homolysable à une longueur d'onde UV-visible compatible avec une application PDT *in vitro*.

Dans ce contexte, nous avons envisagé de nouvelles plateformes comprenant cette fois-ci quatre unités :

- La Pyro-a comme PS ;
- Une nouvelle alcoxyamine, notée Alc2, cette fois-ci liée au peptide par l'intermédiaire d'une lysine supplémentaire permettant d'avoir une fonction terminale libre sur le peptide ;
- Une β -cyclodextrine (β -CD) ;
- Le peptide tLyp-1. La plateforme avec le peptide KDKPPR est également synthétisée afin de pouvoir comparer les deux plateformes (affinité, efficacité).

La structure schématique des plateformes quadrimodales envisagées est donnée en Figure 63.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

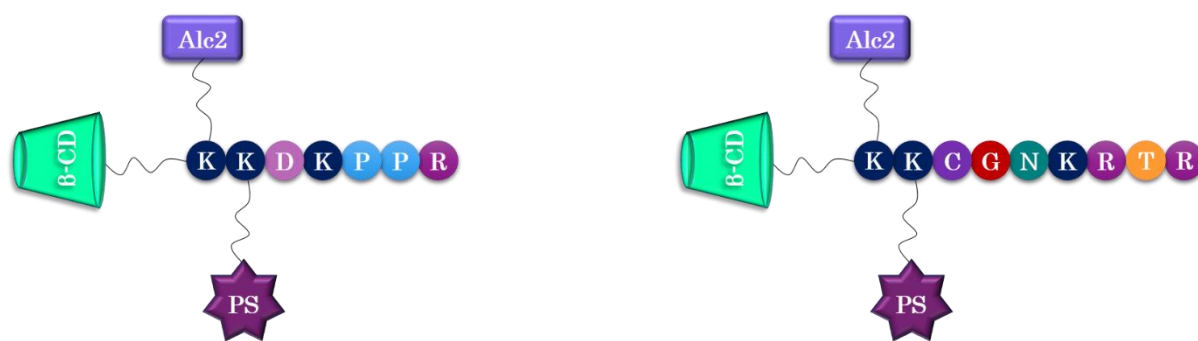


Figure 63 : Nouvelles plateformes quadrimodales envisagées.

Nous avons également envisagé les structures « témoin » à savoir les plateformes trimodales sans β -CD, sans Alc2 ou sans PS.

II. Amélioration du ciblage

II.1. Tumor-homing peptides

Les *tumor-homing* peptides sont des peptides reconnaissant des marqueurs spécifiques de certains types de tumeurs. Ces peptides sont capables de cibler la vascularisation tumorale, les vaisseaux lymphatiques, les cellules tumorales. En plus de leurs propriétés de ciblage, ils sont également capables d'internalisation au sein des cellules et de transporter des molécules afin de les délivrer au sein des tissus tumoraux.

¹⁸⁰ Plusieurs bibliothèques de *phage display* ont permis d'identifier de nombreux *tumor-homing* peptides.¹⁸¹

Teesalu *et al.*¹⁸² ont identifié une séquence d'internalisation commune aux peptides capable de pénétration vasculaire, cellulaire et dans les tissus, nommée « C-end rule » (CendR). Cette séquence contient une arginine ou une lysine en C-terminale souvent précédée par une autre lysine ou arginine correspondant à un motif de type R/KXXR/K avec X est un acide aminé aléatoire. La voie d'internalisation se produit par fixation du peptide sur son récepteur spécifique, son extrémité C-terminale est alors exposée et subit un clivage protéolytique libérant ainsi le motif de reconnaissance CendR. La pénétration du fragment CendR dans les cellules est ensuite initiée par sa fixation au récepteur NRP-

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

1. Les *tumor-homing* peptides possédant le motif CendR peuvent se lier à des récepteurs primaires différents mais l'internalisation se fait *via* le récepteur NRP-1 (Figure 64).

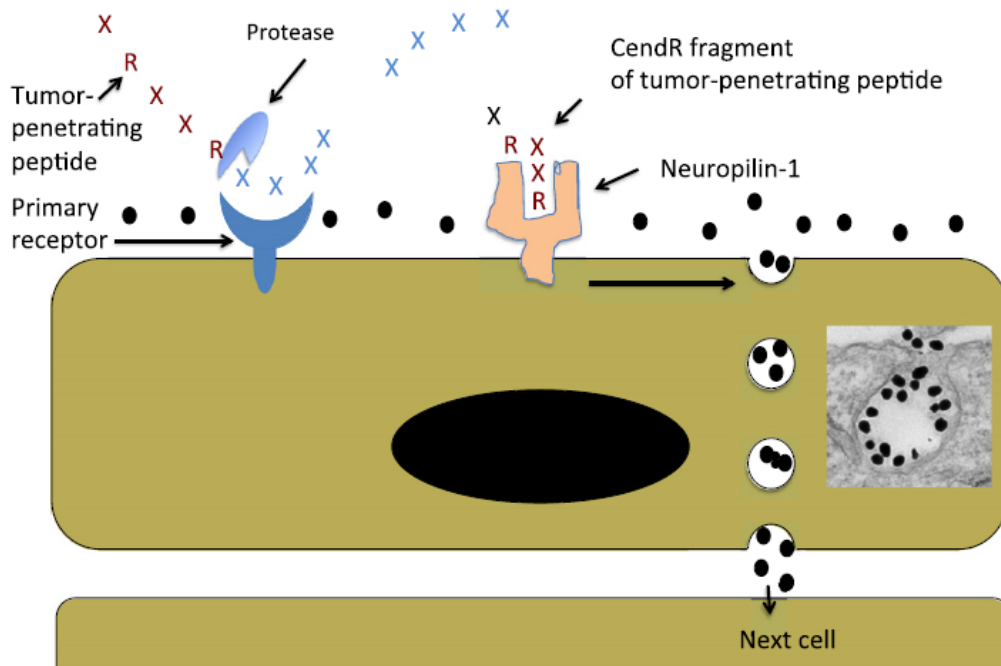


Figure 64 : Représentation schématique de la voie d'internalisation du CendR. La pénétration d'un peptide, possédant un motif CendR, dans les cellules tumorales se produit en 3 étapes, (i) la liaison du peptide à un récepteur primaire sur l'endothélium de la tumeur, (ii) le clivage du peptide par des protéases exposant ainsi le motif CendR à l'extrémité C-terminale et (iii) la liaison à NRP-1 médiée par le motif CendR, conduisant à la perméabilité vasculaire et tissulaire. X, des acides aminés aléatoires. Les ronds noirs correspondent aux molécules pouvant être transportées par l'intermédiaire du motif CendR. Extraite de Ruoslahti.¹⁸³

Le motif CendR est internalisé par endocytose formant ainsi de larges vésicules endocytosiques (diamètre de 200 nm) permettant le transport d'autres molécules soit par conjugaison au motif CendR soit par co-administration avec le peptide sans conjugaison. Le transport de molécule associée au CendR peut se faire d'une cellule à l'autre selon un mécanisme qui n'a pas été clairement identifié.¹⁸³

Les *tumor-homing* peptides présentent l'avantage de pouvoir augmenter la concentration de la molécule transportée dans la tumeur mais également sa distribution au sein de la tumeur.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

II.1.1. Les peptides Lyp-1 et tLyp-1

Le peptide Lyp-1 est un *tumor-homing* peptide cyclique constitué de 9 acides aminés (CGNKRTRGC) capable de cibler les cellules tumorales, les cellules endothéliales lymphatiques et les macrophages associés aux tumeurs. Le récepteur du Lyp-1 est une protéine mitochondriale appelée gC1qR/p32 surexprimée à la surface de nombreuses cellules cancéreuses issues notamment des cancers du sein, du pancréas, du colon, du corps utérin, du mélanome et du glioblastome.¹⁸³ Après combinaison du Lyp-1 avec p32, un clivage protéolytique a alors lieu libérant le motif CendR du peptide (CGNKRTR, appelé tLyp-1) pouvant alors se fixer au récepteur NRP-1, pour être ensuite internalisé dans les cellules (Figure 65). C'est cette forme tronquée (tLyp-1) qui permet l'internalisation de molécules.¹⁸⁴

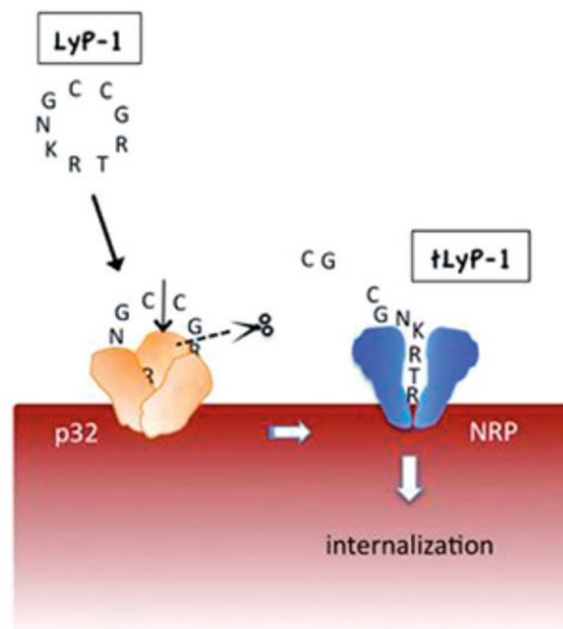


Figure 65 : Fixation du peptide Lyp-1 à la protéine p32 suivi de son internalisation à travers NRP-1. Extraite de Song et al.¹⁸⁴

Laakkonen *et al.* ont montré que le peptide Lyp-1 ciblait les cellules tumorales ainsi que les vaisseaux lymphatiques associés à la tumeur sur plusieurs modèles de cancer *in vivo* (sein, ostéosarcome, prostate). Une accumulation du Lyp-1 dans le noyau de ces

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

cellules a également été observée.¹⁸⁵ Ils ont également montré que les zones tumorales ciblées par Lyp-1 sont des microenvironnements tumoraux hypoxiques.¹⁸⁶

Une mort cellulaire a été observée *in vitro* sur des cellules de cancer du sein liant le Lyp-1 alors que sur des cellules de mélanome ne liant pas le Lyp-1, aucune apoptose n'a été observée.¹⁸⁶ Ces constatations ont également été faites *in vivo* sur le même modèle de cancer du sein sur des souris avec une inhibition de la croissance tumorale associée au Lyp-1 et une réduction du nombre de vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs. Le mécanisme associé à ce phénomène n'est pas clairement défini mais pourrait être associée à son récepteur p32.¹⁸⁴

II.1.2.Applications diagnostics et thérapeutique

Les capacités de ciblage et d'internalisation de ces peptides en font des candidats de choix pour la détection et le traitement de tumeurs par combinaison à d'autres molécules. De nombreuses applications diagnostiques et thérapeutiques ont été reportées dans la littérature.¹⁸⁴

En 2018, Abulrob *et al.*¹⁸⁷ ont développé un nouveau agent de contraste (Lyp-1-Fe₃O₄-Cy5.5) pour l'IRM conjuguant le peptide Lyp-1 à des NPs d'oxide de fer fluorescentes sur un modèle *in vivo* de cancer du sein triple-négatif. Un signal de fluorescence en imagerie optique dans les glandes mammaires des souris 2,6 fois plus important a été observé pour les souris traitées avec ce composé, 2 heures après injection, contrairement à celles traitées avec un peptide contrôle. Une augmentation du contraste au niveau des berges et du cœur de la tumeur en IRM a également pu être observée pour les souris traitées avec Lyp-1-Fe₃O₄-Cy5.5.

En 2020, Wu *et al.*¹⁸⁸ ont développé une sonde moléculaire pour l'imagerie par IRM de gliomes. Cette sonde a été conçue pour cibler NRP-1 et a consisté en la combinaison de NPs USPIOs (*ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) avec le peptide tLyp-1. Des études *in vivo* sur des souris portant deux types de cellules de gliomes U87

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

(grade IV) ou CHG-5 (grade II) ont été effectuées. Une expression relative de NRP-1 significativement plus importante a été observée pour les cellules U87. La concentration de NPs chez les souris portant des tumeurs U87, déterminée par IRM et par microscopie électronique en transmission (TEM) est 2,5 fois plus élevée dans les cellules U87 (+) que CHG-5 (-) dû à la plus forte expression du récepteur NRP-1 dans les cellules U87.

En 2014, Xu *et al.*¹⁸⁹ ont développé des nano-bâtonnets d'or recouvert de silice mésoporeuse sur lesquels a été greffé le peptide tLyp-1 marqué avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et chargé en camptothécine (CPT-loaded AuNR@SiO₂-tLyp-1) pour une thérapie bimodale chimiothérapie et photothermie. Des études *in vitro* sur des cellules de cancer de l'utérus (HeLa) et de cancer du sein (MCF-7) ont confirmé l'internalisation des NPs dans ces cellules alors qu'aucune internalisation n'a été observée sur des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) et des cellules d'ostéosarcome (MG63). Après incubation des cellules avec les NPs pendant 24 heures et illumination sous un laser proche IR, une diminution importante de la viabilité cellulaire a été mise en évidence sur les deux types de cellules (HeLa, 65% et MCF-7, 75%) en comparaison avec les cellules non traitées.

II.1.3. Applications en PDT

Peu d'applications des peptides Lyp-1 et tLyp-1 ont été décrites pour le ciblage tumoral en PDT. Nous avons recensé trois publications en 2016¹⁹⁰⁻¹⁹² et une en 2020¹⁹³. Ainsi, en 2016, Jiang *et al* ont développé des NPs TGPS-PLA (*D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-poly(lactic acid)*) incorporant dans leur cœur un agent de chimiothérapie (doxorubicine) et dans leur enveloppe un PS (Ce6), décorées en surface par le peptide tLyp-1 (tLyp-1-NPs) pour une thérapie chimio-photodynamique combinée. Des études *in vitro* sur des cellules MCF-7/ADR, résistante à la doxorubicine, et HUVEC ont montré que l'accumulation cellulaire des tLyp-1-NPs était améliorée (1,57 et 1,62 fois plus élevée pour les cellules HUVEC et MCF-7/ADR respectivement) sous illumination,

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

due à la production de ROS par la Ce6, qui pourrait favoriser la perméabilité des membranes par oxydation de celles-ci. En l'absence d'illumination, une CI_{50} 75,6 fois plus faible pour les tLyp-1-NPs en comparaison avec la doxorubicine seule a été observée sur les cellules MCF-7 et 31,5 fois plus faible pour les NPs sans le tLyp-1. Sous illumination, une nouvelle diminution (6,6 fois) de la CI_{50} des tLyp-1-NPs a été observée. *In vivo*, les capacités de ciblage et d'internalisation des tLyp-1-NPs ont été démontrées. L'efficacité thérapeutique des tLyp-1-NPs a également été montrée *in vivo* avec une diminution de la croissance tumorale jusqu'à 14 jours après traitement.

L'ensemble des caractéristiques décrites font des peptides Lyp-1 et tLyp-1 d'excellents candidats pour le ciblage tumoral. De plus, leur application en PDT a été peu étudiée faisant d'eux des agents d'intérêt. La forme tronquée (tLyp-1) étant la seule partie internalisée, nous nous sommes focalisés sur cette séquence.

II.2. Purification de peptides hydrophiles

Un des problèmes majeurs rencontrés lors de la synthèse de peptides polaires tels que le KDKPPR et le CGNKRTR, est la purification dans les conditions classiques de RPLC. Aussi d'autres méthodes de purification ont dû être envisagées comme la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC).

II.2.1. La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC)

L'HILIC a été définie dans les années 90 par Alpert dans le cadre de la purification de composés hydrophiles tels que les peptides et acides nucléiques.¹⁹⁴ Contrairement à la RPLC, l'HILIC repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire polaire et d'une phase mobile riche en solvant organique.

La chromatographie HILIC présente de nombreuses similarités avec les autres techniques de chromatographie liquide. Elle repose sur l'utilisation d'une phase mobile similaire à celle utilisée en RPLC, d'une phase stationnaire polaire tout comme la

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

chromatographie en phase normale (NPLC) et permet d'analyser des composés chargés comme la chromatographie d'échange d'ion (IEC) (Figure 66).¹⁹⁵

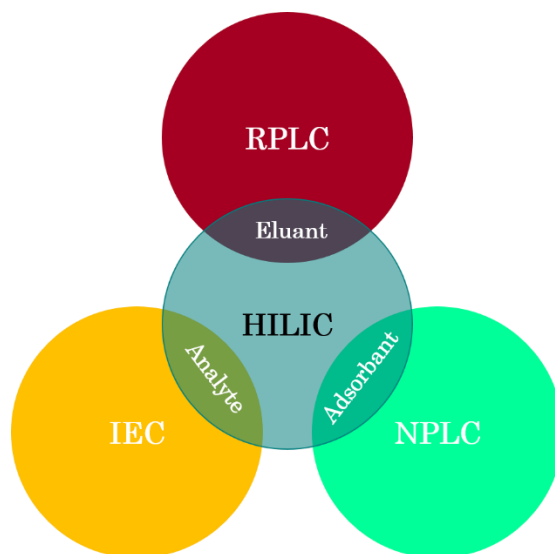


Figure 66 : Comparaison de la chromatographie HILIC avec les autres méthodes HPLC. Adaptée de ¹⁹⁶.

Les phases stationnaires utilisées en HILIC sont des silices greffées avec des groupements fonctionnels polaires tels que des groupements amine, diol ou amide. La phase mobile, quant à elle, se compose d'eau et d'un solvant organique polaire aprotique miscible avec l'eau (ACN).

Les modes isocratique avec une grande proportion de solvant organique ou gradient croissant d'eau sont employés. Le temps de rétention du composé va varier selon le caractère hydrophile du composé élué, la polarité de la phase stationnaire et la concentration en solvant organique (souvent l'ACN) de la phase mobile.

Une augmentation du temps de rétention sera observée pour les composés les plus hydrophiles.¹⁹⁷

II.2.2. Comparaison entre la chromatographie en phase inverse et l'HILIC sur les peptides KDKPPR et tLyp-1

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord choisi d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de la chromatographie HILIC sur les peptides KDKPPR et tLyp-1 en comparaison avec la

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

chromatographie RPLC. En RPLC, ces peptides présentent des profils similaires, avec une élution très rapide dans le volume mort.

L'utilisation d'une colonne HILIC suivant un gradient de 95% ACN dans l'eau + 0,1% TFA à 55 % ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique pendant 15 min a permis d'augmenter considérablement le temps de rétention des peptides (Tableau 15).

Tableau 15 : Comparaison des temps de rétention obtenus pour les peptides KDKPPR et tLyp-1 sur une colonne C18 en RPLC utilisant un gradient de 5% à 100% ACN dans l'eau + 0,1 % TFA en 25 min et sur une colonne Tsk Gel-Amide 80 en HILIC utilisant un gradient de 95% à 55% ACN dans l'eau + 0,1 % TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 55% ACN dans l'eau + 0,1 % TFA pendant 10 min.

Peptides	Temps de rétention	
	RPLC	HILIC
KDKPPR	2,6 min	20,8 min
CGNKRTR	2,6 min	19,9 min

II.3. Alascan

Afin de déterminer l'importance de chaque acide aminé pour l'affinité avec NRP-1, nous avons réalisé un « Alascan » consistant au remplacement successif de chaque acide aminé par une alanine. En parallèle, avec l'équipe du Dr Amirah Mohd Gazzali, School of Pharmaceutical Sciences, Universiti Sains Malaysia, le docking moléculaire de tous les peptides de l'Alascan a été entrepris pour définir les interactions entre ces peptides et le récepteur NRP-1. Tous les résultats sont présentés dans la publication ci-dessous que nous allons soumettre dans « *Bioorganic Chemistry* ».

Brièvement, cet article présente le docking moléculaire, la synthèse et les tests d'affinité de chaque peptide de l'Alascan.

tLYP-1: a peptide suitable to target NRP-1 receptor

Ludivine Larue^a, Muhammad-Amirul-Asyraf Noh^b, Valérie Jouan-Hureau^c, Amirah Mohd-Gazzali^b, Cédric Boura^c, Céline Frochot^a, Samir Acherar^{d*}

^aLaboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UMR 7274, CNRS, Université de Lorraine, 1 rue Granville, F 54000 Nancy, France;

^bSchool of Pharmaceutical Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Panang, Malaysia;

^cUniversité de Lorraine, CNRS, CRAN, Vandoeuvre-les-Nancy, France;

^dLaboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR 7375, CNRS, Université de Lorraine, 1 rue Granville, F-54000 Nancy, France

Abstract

Targeting Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and its co receptor neuropilin-1 (NRP-1) is an interesting vascular strategy. tLyP-1 is a tumor-homing and penetrating peptide of 7 amino-acids (CGNKRTR). It is a truncated form of LyP-1 (CGNKRTRGC), which is known to target neuropilin-1 (NRP-1) receptor, a co-receptor of VEGF receptor, with high affinity and specificity.¹³¹ It is mediated by endocytosis *via* C-end rule internalization pathway. The aim of this study is to synthesize tLyP-1 and to determine the importance of each amino acid in the sequence. To do so, ALA-scan has been realized by synthesizing 7 peptides by replacing in each of them one amino acid by an alanine. The synthesis was done with success. In parallel, docking study of all the peptides on domain b1 of NRP-1 has been performed. The results showed that the peptide CGNKATR has the lowest energy of binding and showed significantly improved binding affinity as compared to tLyP-1. The molecular affinity study proved that the lysine and both arginines are essential for the efficient binding of the peptide to NRP-1. However, it was also observed that the cysteine is not essential for the affinity.

Keywords: peptide; NRP-1; targeting; modeling

List of abbreviations

Boc: tert-Butoxycarbonyl

tBu : Tert-butyl

BSA: Bovine Serum Albumin

DMF: Dimethylformamide

DMSO: Dimethylsulfoxide

FEB: Free energy of binding

Fmoc: Fluorenylmethoxycarbonyl

HBTU: 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

HPLC: High performance liquid chromatography
HRMS: High Resolution Mass Spectrometry
LBA: Ligand Binding Assay
NMM: *N*-Methylmorpholine
NMP: *N*-Methylpyrrolidine
NRP-1: Neuropilin-1
Pbf: Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS: Phosphate Buffer Saline
PDB: Protein Data Bank
PDT: Photodynamic therapy
PS: Photosensitizer
RMSD: Root-mean-square deviation
TFA: Trifluoroacetic acid
TIPS: Triisopropylsilane
Trt: Triphenylmethyl
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

II.3.1. Introduction

Thanks to the development of new therapies or drugs, a decline of incidence and death rates can be observed for all cancers.¹⁹⁸ Nevertheless, progress can still be done. Improvement of drug selectivity could induce a better efficacy of the treatment with lower doses. One strategy consists in targeting the new blood neo-vessels to induce an asphyxia of the tumor by preventing the tumor cells to be supply in oxygen and nutrients. Since years, our team focus on the development of targeted photosensitizers (PSs) for photodynamic therapy (PDT) applications. In particular, we designed PSs coupled to peptides targeting neuropilin-1 (NRP-1) receptor, a co-receptor of VEGF receptor overexpressed on tumors and neo-vessels. We used first ATWLPPR^{199,200} which proved to be not so stable *in vivo*. We developed then KDKPPR.¹³¹

In this new study, we are interested in using tLyP-1, a tumor-homing and penetrating peptide of 7 amino acids (CGNKRTR). It is a truncated form of LyP-1 (CGNKRTRGC), a cyclic 9-amino acid peptide, which is known to target tumor lymphatics as well as tumor cells and associated macrophages especially.^{185,201} It is mediated by endocytosis *via C*-end

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

rule internalization pathway. A receptor known as gC1qR/p32 is the primary site of binding for Lyp-1. The gC1qR/p32 mediates many biological events such as infection, inflammation and immune response. This receptor is abundantly expressed by endothelial cells localized in tumoral environment. It is supposed that Lyp-1 binds first to gC1qR/p32 and then is cleaved to form tLyp-1 that binds to NRP-1 and/or NRP-2 and can be internalized.¹⁸⁰ In 2015, it has been used with success in glioma for drug delivery applications. It has been coupled to 5-carboxyfluorescein (FAM) or ¹⁸F-fluoride and the authors showed in U87MG glioblastoma cells xenografted in nude mice that the distribution of the targeted compounds in the tumor tissue was in relation with the expression of NRP-1.²⁰²

Very recently, a molecular modeling of Lyp-1 in complex with gC1qR/p32 was performed, by using a structure of gC1qR/p32 available in the Protein Data Bank (PDB code: 1P32). It was shown that Asn3, Lys4, Arg5 and Ag7 were important amino acids for the specific binding of gC1qR/p32. The authors also supported their finding with molecular dynamic study, to further determine the interaction pattern between Lyp-1 and p32.²⁰³ As far as we know, no docking simulation study has been done with regards to the tLyp-1 on NRP-1. Our previous experience with docking on NRP-1 receptor was published in 2016, in which a series of peptides was tested.¹³⁰

II.3.2. Materials and methods

II.3.2.1. Molecular docking simulation

Autodock 4.2 was used for the docking simulation of tLyp-1 on the b1 domain of NRP-1 receptor (PDB ID: 5IJR). AutoDockTools (ADT), which is a graphical user interface that is designed to work with Autodock program, was used to remove any unrelated ions and ligands from the receptor. Polar hydrogen and Kollman charges were subsequently added and this file was saved as PDBQT format.²⁰⁴ The amino acid residues in the receptor was maintained as is in the PDB file, without any special protonation state added. The docking

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

area was refined to a grid box set at 60 Å x 60 Å x 60 Å along the X, Y and Z axis respectively at 0.375 Å grid point spacing, to cover the active receptor site based on the location of co-crystallized L-homoarginine ligand (native ligand of the NRP-1 receptor in 5IJR).

The tLyp-1 peptide and the ALA-Scan analogues were prepared by adding Gasteiger's charges, specifying the suitable torsion centres and determining the number of allowed rotation within the molecule. These ligands were then saved as PDBQT files.

Molecular docking simulation was executed by using the Lamarckian genetic algorithm for 150 runs. The results were ranked according to their lowest free energy of binding (FEB) and the molecules with RMSD value of within 0.5 Å from each other were clustered together. The binding conformations were then visualized by using Biovia Discovery Studio to determine the interactions recorded during the simulation process.

II.3.2.2. Chemicals and materials

Ultrapure water (Milli-Q, $\rho >18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) was used in all the experiments. Dichloromethane (DCM), dimethylformamide (DMF) and ethanol (EtOH) were obtained from Sigma-Aldrich and were used without further purification.

The synthesis of all peptides required HBTU (Iris Biotech GmbH, Germany), acetic anhydride and piperidine (Sigma-Aldrich, Germany) and *N*-methylmorpholine (NMM), *N*-methylpyrrolidinone (NMP) (Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) as reagents. Fmoc-*L*-Cys (Trt)-OH, Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH, Fmoc-*L*-Gly-OH, Fmoc-*L*-Thr(tBu)-OH and Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH were obtained from Iris Biotech GmbH (Germany). Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-Wang resin (100-200 mesh) and Fmoc-*L*-Asn(Trt)-OH were obtained from Novabiochem (Germany). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Sigma Aldrich (Germany) and triisopropylsilane (TIPS) from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA).

II.3.2.3. Instruments

The peptides were synthesized using an automated ResPepXL peptide synthesizer (Intavis AG, Bioanalytical Instruments) and operated with a Multiple-Parallel Peptide Synthesis Program and were purified by HPLC using Shimadzu LC-20AT, column TSK gel amide-80 (3 μm , 300 x 7.8 mm) equipped by an UV photodiode array detector (SPD-M20A). The UV detection was performed at 214 nm. The analysis by HPLC were performed using the same equipment with a column TSK gel amide-80 (3 μm , 150 x 4.6 mm).

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III 400 MHz spectrophotometer. The spectra were recorded in $\text{DMSO}-d_6$ at room temperature ($T = 298\text{ K}$) and residual peak of DMSO ($\delta = 2.5\text{ ppm}$) was used as internal reference. The chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm). High resolution mass spectrometry (HRMS) experiments were performed on a micrOTOF Bruker (electrospray ionization ESI+, 50–1000 in low and 50–2500 in width).

II.3.2.4. Synthesis

All the peptides were synthesized using the automated ResPepXL peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology. The side chains of arginine, asparagine, cysteine, lysine and threonine were protected by Pbf, Trt, tBu or Boc groups (see III.3.2.2 section). A Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin or Fmoc-Ala-Wang resin was used as the starting material and swelled in CH_2Cl_2 . The Fmoc groups were removed by piperidine (20% in DMF). This step was performed three times, a first during 4 min and the next two for 7 min. The next amino acid was then grafted with the coupling step by adding an excess of Fmoc-aminoacid-OH (6 eq), HBTU (5 eq), NMP (3 eq) and NMM (10 eq) in DMF. This step was repeated two times for 18 min and three times for the last amino acid. A last step of capping, using a solution of acetic anhydride (5% in DMF), was performed for 5 min, to trap all functions that did not react. The process of deprotection,

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

coupling and capping were repeated until the desired sequences of amino acids were grafted on the resin. At the end of each step, all soluble reagents on the resin and the protecting group at the *N*-terminus of the peptide were removed by filtration and washing process with CH₂Cl₂, EtOH and DMF. The final Fmoc protection was removed using piperidine performed 4 times for 15 min. The resin was dried under vacuum and then cleaved (with full deprotection of lateral chains) using TFA/TIPS/water (92.5/2.5/5%) for 2 h. The acidic resin was filtered and washed with TFA and CH₂Cl₂. The filtrate was dried under vacuum and the compound was precipitated in ether by centrifugation. The crude product was further purified by semi-preparative HPLC using acetonitrile/water (0.1% TFA; 95/5) to 55% acetonitrile gradient in 25 min, followed by isocratic acetonitrile for 10 min at a flow of 1.7 mL.min⁻¹.

tLyp-1, CGNKRTR (17).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGNKRTR (17)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Cys	–	4.02	3.01 2.90	–	–
Gly	8.84	3.93 3.78	–	–	–
Asn	8.26	4.59	2.54 2.43	7.45 6.96	–
Lys	8.04	4.21	1.67	1.51	ε-NH= 7.72; ε-CH ₂ = 2.74; γ-CH ₂ = 1.31
Arg ₁	8.17	4.30	1.74 1.58	3.08	γ-CH ₂ = 1.52; ε-NH= 7.75
Thr	7.71	4.21	3.97	–	γ-CH ₃ = 1.05
Arg ₂	7.99	4.17	1.74 1.50	3.09	γ-CH ₂ = 1.36; ε-NH= 7.64

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₁H₅₉N₁₅O₁₀S [M + H]⁺ 834.4363, [M + 2H]²⁺ 417.7218; found [M + H]⁺ 834.4315, [M + 2H]²⁺ 417.7281.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

CGNKRTA (18).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGNKRTA (18)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Cys	–	4.06	3.19 2.93	–	–
Gly	8.78 or 8.62	3.83 3.71	–	–	–
Asn	8.17	4.52	2.48 2.37	7.37 6.88	–
Lys	7.94	4.13	1.61	1.46	ε-NH= 7.58; ε-CH ₂ = 2.69; γ-CH ₂ =1.25
Arg ₁	8.08	4.20	1.67 1.48	3.02	γ-CH ₂ = 1.41; ε-NH= 7.54
Thr	7.57	4.11	3.89	–	γ-CH ₃ = 0.97
Ala	7.89	4.13	1.20	–	–

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₈H₅₂N₁₂O₁₀S [M + H]⁺ 749.3723, [M + 2H]²⁺ 375.1898; found [M + H]⁺ 749.3658, [M + 2H]²⁺ 375.1988.

CGNKRAR (19).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGNKRAR (19)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Cys	–	3.96	2.90 2.84	–	–
Gly	8.80 or 8.64	3.84 3.70	–	–	–
Asn	8.20	4.52	2.49 2.36	7.41 6.90	–
Lys	8.03	4.07	1.60	1.45	ε-NH= 7.63; ε-CH ₂ = 2.67; γ-CH ₂ = 1.23
Arg ₁	8.01	4.07	1.65	3.02	γ-CH ₂ = 1.44; ε-NH= 7.58
Ala	7.74	4.20	1.14	–	–
Arg ₂	7.99	4.14	1.68	2.99	γ-CH ₂ = 1.49; ε-NH= 7.67

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₅₇N₁₅O₉S [M + H]⁺ 804.4257, [M + 2H]²⁺ 402.7165; found [M + H]⁺ 804.4164, [M + 2H]²⁺ 402.7213.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

CGNKATR (**20**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGNKATR (20)					
	NH	α -H	β -H	δ -H	Others
Cys	–	4.04	2.99 2.99	–	–
Gly	8.87 or 8.72	3.91 3.79	–	–	–
Asn	8.25	4.57	2.53 2.47	7.45 6.96	–
Lys	8.04	4.18	1.67	1.52	ϵ -NH= 7.7; ϵ -CH ₂ = 2.75; γ -CH ₂ = 1.31
Ala	8.12	4.31	1.23	–	–
Thr	7.63	4.20	3.95	–	γ -CH ₃ = 1.05
Arg ₂	7.93	4.21	1.75 1.60	3.09	γ -CH ₂ = 1.50; ϵ -NH= 7.68

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₈H₅₂N₁₂O₁₀S [M + H]⁺ 749.3723, [M + 2H]²⁺ 375.1898; found [M + H]⁺ 749.3717, [M + 2H]²⁺ 375.1991.

CGNARTR (**21**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGNARTR (21)					
	NH	α -H	β -H	δ -H	Others
Cys	–	3.97	2.92 2.83	–	–
Gly	8.87 or 8.72	3.84 3.71	–	–	–
Asn	8.20	4.51	2.50 2.36	7.39 6.88	–
Ala	8.06	4.19	1.15	–	–
Arg ₁	7.92	4.12	1.67 1.52	3.02	γ -CH ₂ = 1.42; ϵ -NH= 7.58
Thr	7.50	4.14	3.88	–	γ -CH ₃ = 0.97
Arg ₂	8.05	4.19	1.68 1.49	3.01	γ -CH ₂ = 1.39; ϵ -NH= 7.58

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₂₈H₅₂N₁₄O₁₀S [M + H]⁺ 777.3784, [M + 2H]²⁺ 389.1929; found [M + H]⁺ 777.3720, [M + 2H]²⁺ 389.2008.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

CGAKRTR (**22**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CGAKRTR (22)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Cys	–	4.04	2.98 2.89	–	–
Gly	8.84 or 8.68	3.92 3.77	–	–	–
Ala	8.15	4.34	1.18	–	–
Lys	8.08	4.23	1.65	1.51	ε-NH= 7.72; ε-CH ₂ = 2.74; γ-CH ₂ = 1.30
Arg ₁	8.05	4.33	1.71 1.51	3.08	γ-CH ₂ = 1.46; ε-NH= –
Thr	7.75	4.22	3.95	–	γ-CH ₃ = 1.04
Arg ₂	8.00	4.21	1.73 1.60	3.09	γ-CH ₂ = 1.50; ε-NH= –

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₀H₅₈N₁₄O₁₀S [M + H]⁺ 791.4305, [M + 2H]²⁺ 396.2189; found [M + H]⁺ 791.4306, [M + 2H]²⁺ 396.2263.

CANKRTR (**23**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

CANKRTR (23)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Cys	–	4.03	3.13 2.92	–	–
Ala	8.09	4.35	1.16	–	–
Asn	8.27	4.50	2.47 2.35	7.43 6.91	–
Lys	7.79	4.17	1.59	1.42	ε-NH= 7.60; ε-CH ₂ = 2.65; γ-CH ₂ = 1.21
Arg ₁	8.10	4.23	1.68 1.48	3.01	γ-CH ₂ = 1.42; ε-NH= –
Thr	7.64	4.14	3.90	–	γ-CH ₃ = 0.97
Arg ₂	7.90	4.10	1.67 1.54	3.02	γ-CH ₂ = 1.41; ε-NH= –

HRMS (ESI): *m/z* calcd. for C₃₂H₆₁N₁₅O₁₀S [M + 2H]²⁺ 424.7296; found [M + 2H]²⁺ 424.7388.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

AGNKRTR (24).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ):

AGNKRTR (24)					
	NH	α-H	β-H	δ-H	Others
Ala	8.81	4.15	1.49	–	–
Gly	8.53	3.81 3.73	–	–	–
Asn	8.11	4.48	2.47 2.38	7.37 6.89	–
Lys	7.95	4.11	1.61	1.44	ε-NH= 7.55 ; ε-CH ₂ = 2.67 ; γ-CH ₂ = 1.26
Arg ₁	8.05	4.22	1.67 1.49	3.00	γ-CH ₂ = 1.42 ; ε-NH= 7.38
Thr	7.56	4.13	3.87	–	γ-CH ₃ = 0.98
Arg ₂	8.16	4.35	1.67 1.60	3.01	γ-CH ₂ = 1.42 ; ε-NH= 7.45

HRMS (ESI): m/z calcd. for C₃₁H₅₉N₁₅O₁₀ [M + 2H]²⁺ 401.7357; found [M + 2H]²⁺ 401.7397.

II.3.2.5. Biological test-binding study of the peptides on recombinant NRP-1 receptor

The affinity of peptides for NRP-1 was assessed as previously described. Briefly, the surface of the high protein-binding capacity polystyrene 96 well ELISA plate (NUNC MaxiSorp™, Sigma-Aldrich, France) was coated with NRP-1 at a concentration of 2 μg mL⁻¹ in phosphate buffer saline (PBS) and kept overnight at room temperature. The plate was then blocked with a solution of PBS containing 0.5 % bovine serum albumin (BSA) during 1 h at 37 °C, to inhibit non-specific interactions. Binding of the tested peptides to NRP-1 was evaluated using 5 ng mL⁻¹ of biotinylated VEGF-A165 in blocking buffer containing 2 μg mL⁻¹ of heparin. Biotinylated VEGF-A165 was added to the coated wells, in competition, or not, with different concentration of peptide. The plates were further incubated for 2 h at room temperature. After that, the plates were washed 3 times and the amount of bound biotinylated VEGF-A165 was assayed as it was stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate and its substrate (tetramethylbenzidine and H₂O₂). After 20 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped by the addition of 2N sulfuric acid. The corresponding optical densities were then measured at a wavelength of 450 nm. The obtained results were expressed as relative absorbance to

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

wells containing only blocking buffer. For this assay, three wells were used per condition.^{129,131}

II.3.3. Results and Discussion

II.3.3.1. Validation of docking calculations

The validation of docking protocol was conducted by re-docking the co-crystallized L-homoarginine found in the NRP-1 structure in PDB within its native binding site in the receptor. This was done by using the same software for docking simulation; the Autodock 4.2. The docked conformation with the lowest FEB was compared to the native ligand structure in term of the RMSD value. It was found that the RMSD value of the re-docked L-homoarginine was 1.47 Å and this showed that the docking protocol used in this study is valid. A RMSD value of less than 2.0 Å is necessary to confirm the validity of a docking protocol.

II.3.3.2. Molecular docking

The tLyp-1 peptide CGNKRTR (17) and its ALA-scan analogues (CGNKRTA (18), CGNKRAR (19), CGNKATR (20), CGNARTR (21), CGAKRTR (22), CANKRTR (23), AGNKRTR (24)) were used in this docking simulation study. The FEB, predicted K_i , and number of hydrogen bonds from each docking is shown in Tableau 16.

Tableau 16 : FEB, predicted K_i and number of hydrogen bonds of all ligands tested.

Docking Results	Peptides							
	CGNKRTR 17	CGNKRTA 18	CGNKRAR 19	CGNKATR 20	CGNARTR 21	CGAKRTR 22	CANKRTR 23	AGNKRTR 24
ΔG_i^a	-1.60	-4.81	-3.24	-6.17	-3.59	-2.98	-4.84	-4.41
K_i^b (mM)	67.70	298.72 x10 ⁻³	419	29.89 x10 ⁻³	2.35	6.55	285.57 x10 ⁻³	581.80 x10 ⁻³
HB ^c	9	7	10	7	9	6	12	7

Notes: ^aFEB (kcal.mol⁻¹); ^bdocking predicted inhibition constant; ^cnumber of hydrogen bond interactions (K_i : inhibition constant; HB: hydrogen bond).

From the results obtained, CGNKATR (20) showed the lowest FEB. The docking conformation of this analogue is presented in Figure 67.

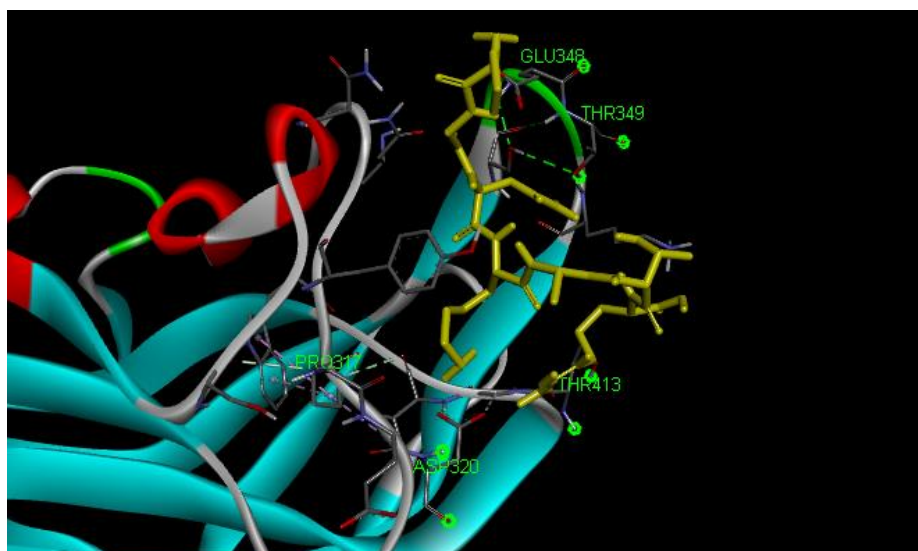


Figure 67: Ligand–protein complex of peptide CGNKATR. Ligands are shown in yellow while hydrogen bonds are shown in green.

The original peptide CGNKRTR (**17**) (Figure 68) interacted with Tyr–297, Gly–318, Glu–348, and Thr–413 through hydrogen bonding, Asp–301 through attractive electrostatic charge and Asp–320 through π –sulphur interaction. This peptide also has hydrophobic interactions with the receptor through Gln–296, Asn–300, Pro–317, Glu–319, Tyr–353, and Gly–414.

In comparison to the analogue CGNKATR (**20**) (Figure 69), this analogue interacted with Pro–317, Glu–348, Thr–349, and Thr–413 through hydrogen bonding, Asp–320 through attractive electrostatic charge and Asp–320 through π –sulphur interaction. It also interacted with the following residues through hydrophobic interactions, Tyr–297, Gln–298, Asn–300, Trp–301, Thr–316, Pro–317, Ser–346, Lys–351, Tyr–353, and Ile–415.

The amino acid residues involved in the interaction between the CGNKRTR (**17**) and the NRP–1 resemble similarly with the result that we obtained in our previous publication.¹³⁰ The TKPPR peptide analysed in the publication also interacted with Tyr297, Asp320, Glu348 and Tyr353, and it was found that the peptide was stacked between Tyr297 and Tyr 353, similar to the tLyp–1 peptide. The CGNKATR (**20**) analogue that gave a lower FEB, showed interactions that are more similar with TKPPR. It

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

interacted with all amino acids reported to be interacting with TKPPR, proving its higher affinity towards NRP-1 as compared to the tLyp-1.¹³⁰

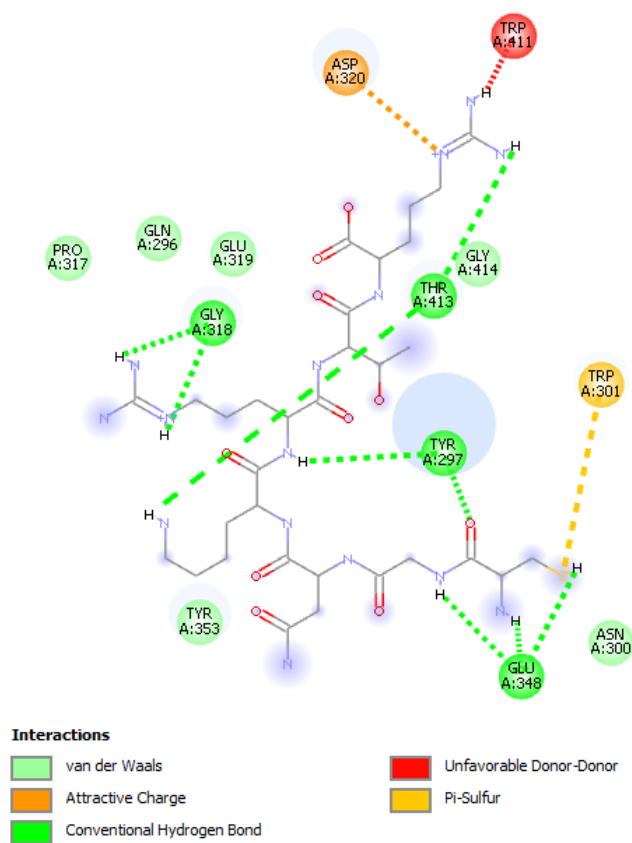


Figure 68: 2D diagram of ligand-protein complex of peptide CGNKRTR (tLyp-1), 17.

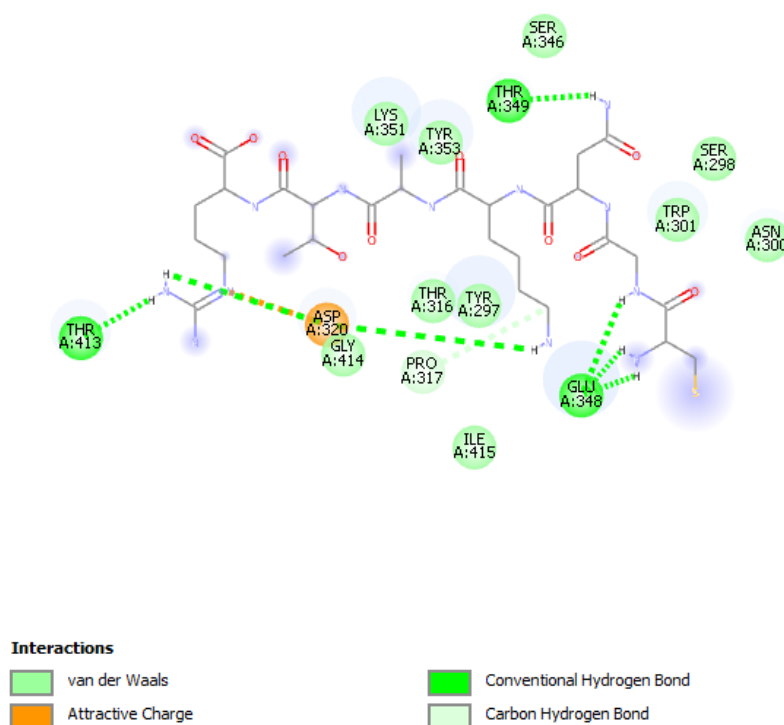


Figure 69: 2D diagram of ligand–protein complex of peptide CGNKATR, 20.

The conformation of these two ligands were different in the binding pocket of NRP–1, which lead to the difference in term of their interactions with specific amino acids. This is because the presence of alanine (A) in CGNKATR (20), which is the simplest amino acid, has caused changes in the torsion of the molecule as compared to the tLyp–1 peptide. The absence of a longer side chain in the middle of CGNKATR (20) may have allowed it to bind more tightly at the binding site of NRP–1, thus allowing the terminal arginine of CGNKATR (20) to avoid the hydrogen donor–donor interaction with residue Trp–411. This situation may be the reason for the lower FEB of this analogue as compared to CGNKRTR (17).

The difference between these two peptides are also reflected in their K_i values. The K_i of CGNKATR (20) analogue is much lower than the tLyp–1 peptide, showing that the analogue has a higher affinity towards NRP–1 receptor.

II.3.3.3. Synthesis and characterization of the peptides

The peptides CGNKRTR (17) and its ALA-scan analogues (CGNKRTA (18), CGNKRAR (19), CGNKATR (20), CGNARTR (21), CGAKRTR (22), CANKRTR (23), AGNKRTR (24)) were synthesized on solid phase and purified by HPLC leading to a final purity superior to 95%. The structures of the peptides were confirmed by NMR and mass spectrometry (see materials and methods section). The ^1H NMR spectra revealed, for all the peptides of Alascan containing the glycine, a doubling of the signal of NH^α of this last amino acid was observed indicating the existence of two conformations for this amino acid. Surprisingly, this doubling of the signal was not observed for the original peptide, indicating a change in the conformation of the peptide. Moreover, at this same position, when the glycine was replaced by an alanine, only one signal was observed for NH^α . The signal corresponding to the NH^α of the cysteine was not observed probably due to the position *N*-terminal of this amino acid and thus a protonation of this amine function for all the peptides.

II.3.3.4. Affinity for NRP-1

The affinity of the peptides was determined using ligand binding assay (LBA). VEGF165 has a high affinity for NRP-1²⁰⁵ and was chosen as a competitor of the synthesized peptides (Figure 70). We observed a value of IC_{50} similar for the peptides KDKPPR and tLyp-1 indicating the efficient potential of this last one for NRP-1 targeting. The results highlighted that the *C*-terminal arginine is essential for the affinity of NRP-1 according to the CendR motif. Moreover, the importance of the other arginine and the lysine was also observed. However, it appeared that the cysteine and the glycine are not involved in the good affinity of the tLyp-1.

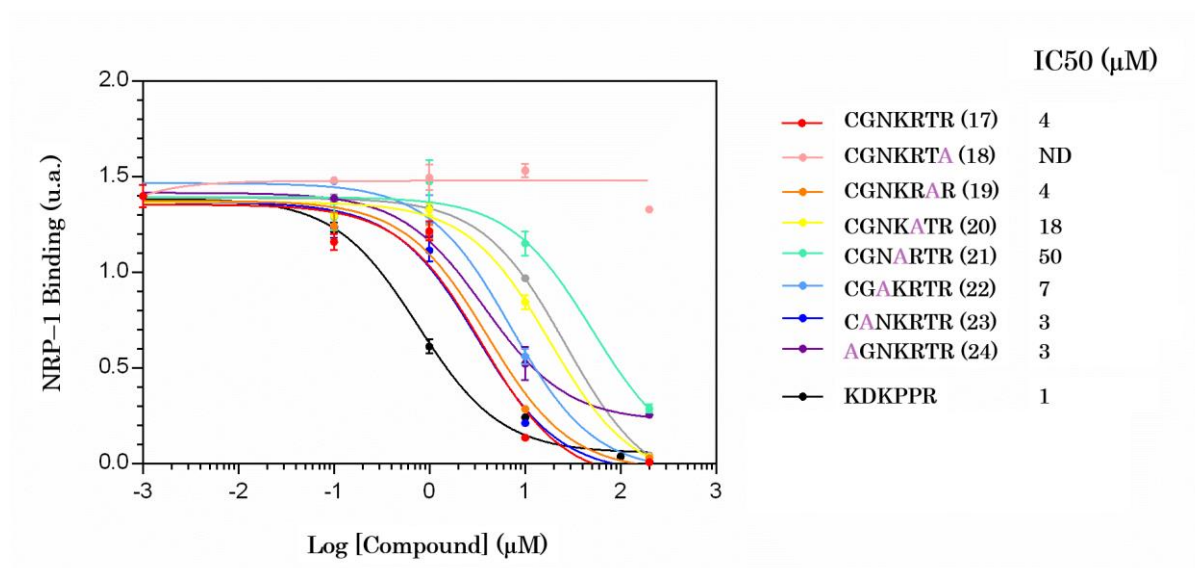


Figure 70 : NRP-1 binding of peptides obtained using a competitive binding assay.

II.3.4. Conclusion

In this paper, we reported the molecular docking, the synthesis and the binding affinity tests of the Alaskan of the peptide tLyp-1. The molecular docking and the affinity studies seem to give opposite observations. In fact, docking gives an idea on the “possible” interacting amino acids with the receptor, but it is not conclusive. Docking results alone are not strong enough to confirm the interaction between peptides and NRP-1 and *in vitro* study is needed to proof the finding. Nowadays, there is a reverse approach in docking. We do the experiment first, then the best results/ligand(s) obtained will be docked on the receptor, to explain why it/they have good interactions. It is very tricky to relate the results, at times. Because in docking, there are lots of receptor protein in the protein data bank. Each has different resolution, with potential missing amino acids residues in each of the model. So, based on our understanding, it is important to compare the docking results with the LBA/*in vitro* study, but the results from experiments are stronger and conclusive.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

Concerning the affinity study, the fact that the cysteine is not essential could be useful for future synthesis. Indeed, the fixation of this last amino acid to the peptide is difficult and thus it could be removed or replaced by another amino acid.

III. Amélioration de la solubilité

III.1. Utilisation des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) appartiennent à la famille des oligosaccharides cycliques constituées d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par des liaisons α -1,4. Elles sont produites naturellement par la dégradation enzymatique de l'amidon. Ces composés présentent de nombreux avantages : ils sont biocompatibles, solubles dans l'eau et non hygroscopiques. Trois familles de CDs naturelles sont parmi les plus utilisées : les α -, β - et γ -CDs constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités D-glucopyranoses (Figure 71).

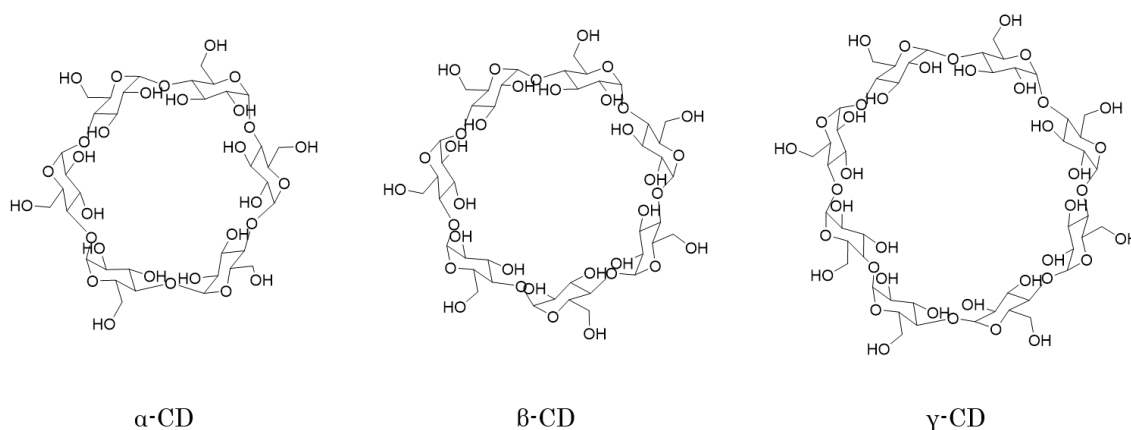


Figure 71 : Structures chimiques des CDs naturelles.

Les CDs ont une forme conique et possèdent une cavité hydrophobe et une surface hydrophile.²⁰⁶ Grâce à cette cavité, les CDs sont capables de servir d'hôtes pour des molécules hydrophobes et ainsi améliorer leur solubilité par formation de complexes d'inclusion.

La β -CD présente le meilleur compromis en termes de taille de sa cavité pour l'inclusion de PSs. En revanche la γ -CD est la plus efficace, en raison de sa plus forte solubilité dans l'eau, pour améliorer la solubilité par la formation de conjugués par liaison covalente avec des PSs. En revanche, son coût est relativement élevé en comparaison avec la β -CD.²⁰⁷

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

Nous avons décrit, dans une revue, leur utilisation en PDT pour des applications antitumorales et notamment la formation de systèmes CD-PS afin d'améliorer la solubilité et les propriétés photophysiques du PS en milieu aqueux.²⁰⁷ Une première stratégie consiste en la formation de complexe d'inclusion (lien non covalent), c'est-à-dire l'encapsulation du PS dans la cavité hydrophobe de la CD. Une seconde stratégie repose sur la formation de conjugués CD-PS par liaison covalente entre les deux unités.

L'utilisation de la β -CD pour améliorer la solubilité de la P1-COOH et de la 5,10,15,20-Tétrakis(méso-hydroxyphényl)porphyrine (*m*THPP) dans l'eau et leur efficacité PDT a déjà été étudiée par notre équipe.²⁰⁸ Les deux PSs ont été liés à la β -CD par complexes d'inclusion et la P1-COOH a également été conjuguée de manière covalente par chimie click. Les deux systèmes ont montré une diminution de l'agrégation des PSs. Les études *in vitro* sur des cellules U87 ont montré une meilleure phototoxicité lorsque le PS est conjugué à la β -CD par liaison covalente (Figure 72). De ce fait, nous avons choisi de coupler la β -CD de manière covalente à notre système.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

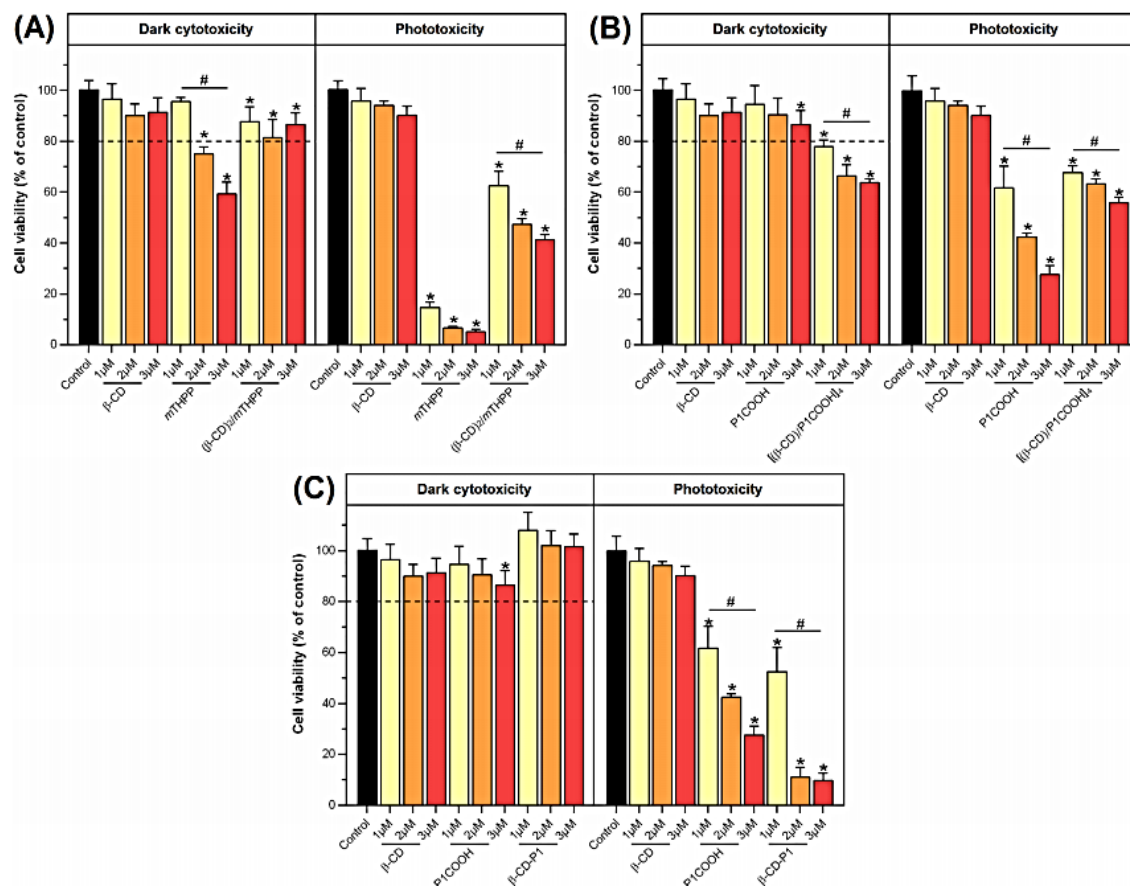


Figure 72 : Viabilité cellulaire de cellules U87 traitée avec les complexes d'inclusion formé avec *m*-THPP (A) et la P1-COOH (B) et le conjugué (C). Extraite de Ben Mihoub et al.²⁰⁸

III.2. Couplage de la β-CD au peptide et PS

III.2.1. Synthèse du composé β-CD-KK(Pyro-a)DKPPR (28)

La stratégie sélectionnée repose sur le couplage de la β-CD au peptide, préalablement couplé au PS, par chimie click et plus particulièrement par addition de Michael thiol-maléimide. Pour cela, un bras maléimide a été greffé sur l'extrémité *N*-terminale du peptide et une fonction hydroxyle de la β-CD a été substituée par un thiol (β-CD-SH).²⁰⁹

Nous avons choisi de réaliser cette conjugaison, dans un premier temps, sur le PS couplé au peptide KDKPPR sans l'Alc2 afin d'optimiser les conditions de synthèse.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

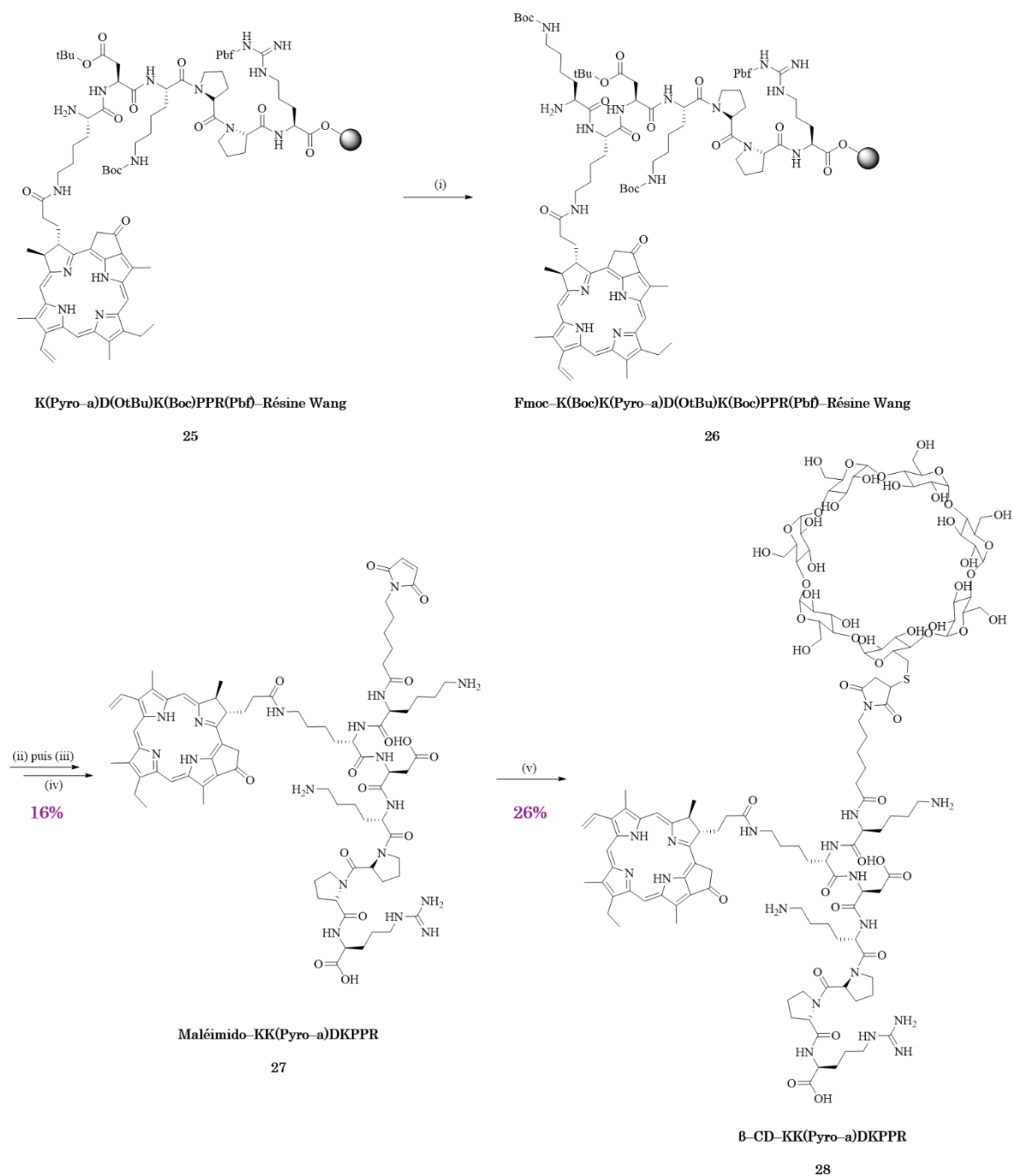


Figure 73 : Synthèse du composé 28. (i) Couplage : Fmoc-Lys(Boc)-OH, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 h, T_a (ii) déprotection : 20% pipéridine dans le DMF, 4 x 15 min, t_{amb} , (iii) Couplage : Acide 6-Maléimidohexanoïque, HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 h, t_{amb} , (iv) TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5), 2 h, t_{amb} et (v) β-CD-SH, PBS, DMF, 24 h, 40°C.

En ce qui concerne la conjugaison de la β-CD, une lysine supplémentaire a été couplée au composé **25** dans les mêmes conditions de couplage (HBTU, NMM, NMP, DMF) que celles utilisées pour la synthèse de ce dernier décrites dans le Chapitre II. Toujours selon

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

le même mode opératoire et après déprotection de la fonction amine en position *N*-terminale, le bras acide 6-Maléimidohéxanoïque a été couplé au composé **26** pour conduire au composé **27** après clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales. La réaction de chimie click avec la β -CD-SH (préalablement synthétisée au cours d'un autre projet et disponible au sein du laboratoire) a ensuite été réalisée dans un mélange PBS/DMF et conduit à la formation du composé **28** avec un rendement de 26% après purification par HPLC préparative (Figure 73).

III.2.2. Amélioration de la solubilité

L'amélioration de l'hydrophilie de la Pyro-a a été démontrée en RPLC avec un gradient de 10 à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min. Le temps de rétention de la Pyro-a est de 18,9 min et de 11,4 min, couplée au peptide et à la β -CD (Tableau 17).

Tableau 17 : Récapitulatif des propriétés de solubilité dans l'eau des composés Pyro-a et β -CD-KK(Pyro-a)DKPPR.

Composés	Temps de rétention	Log P
Pyro-a	18,9 min	0,97
28	11,4 min	-0,68

La solubilité des composés dans l'eau a été déterminée à l'aide du coefficient de partage log P. Une diminution significative de sa valeur lorsque la Pyro-a est couplée au peptide et à la β -CD a pu être mise en évidence prouvant ainsi l'efficacité de la β -CD pour améliorer la solubilité de la Pyro-a (Tableau 17).

III.2.3. Propriétés photophysiques

L'influence du couplage de la β -CD sur les propriétés photophysiques de la Pyro-a a également été évaluée. Une augmentation importante de l' ϵ de la bande de Soret a pu être observée pour le composé couplé à la β -CD. Une augmentation du Φ_f a pu être observé,

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

une légère différence a été déterminée pour la τ_f . En revanche, une amélioration significative de Φ_Δ a été mise en évidence.

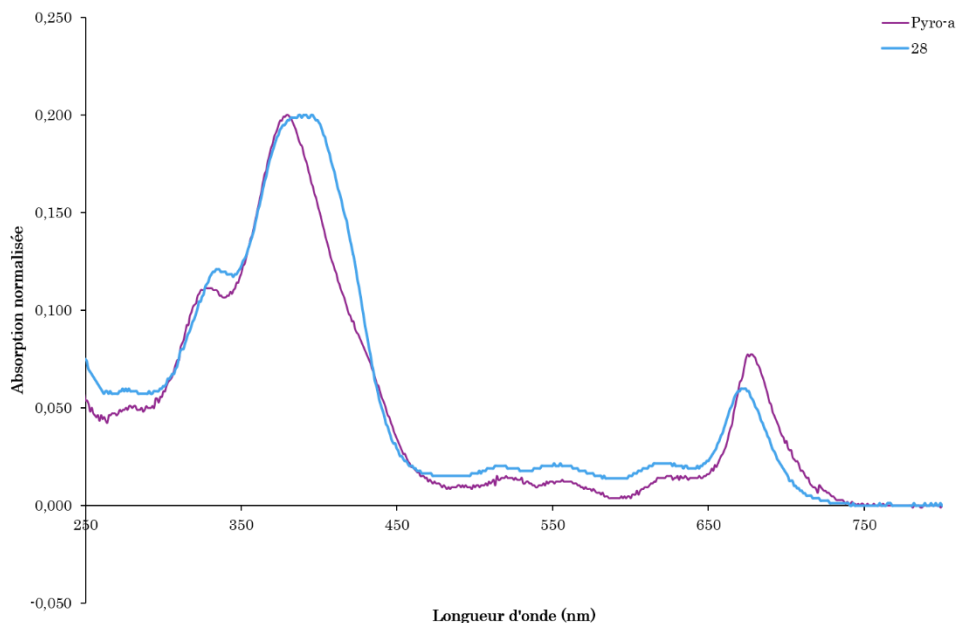


Figure 74 : Spectres d'absorption UV-visible normalisés des composés Pyro-a et 28 dans le D_2O .

Tableau 18 : Coefficients d'extinction molaire ϵ , rendements quantiques de fluorescence (Φ_f) et de $d^{17}O_2$ (Φ_Δ) des composés Pyro-a et 28, mesurés après excitation à 388 nm et durée de vie de fluorescence (τ_f) mesurée à 407 nm et $d^{17}O_2$ (τ_Δ) mesurée à 415 nm mesurés dans le D_2O .

Composé	Bande de Soret	ϵ (10^3) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)				Φ_f (%)	Φ_Δ (%)	τ_f (ns)	τ_Δ (μ s)
		Q_{IV}	Q_{III}	Q_{II}	Q_I				
Pyro-a	22,9	2,0	1,8	2,1	9,2	< 1	–	6,7	–
28	33,3	3,4	3,6	3,6	10,0	6	16	7,5	19,6

Ces résultats, combinés à l'augmentation de l'hydrophilie du composé, font de la β -CD un composé prometteur.

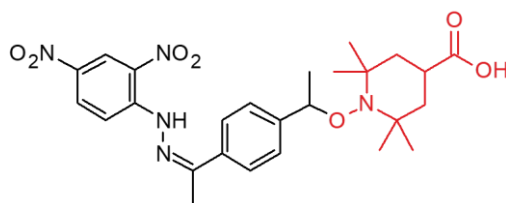
IV. Amélioration de l'alcoxyamine

L'alcoxyamine (Alc1) étudiée dans le chapitre II présentait l'inconvénient de ne pas absorber la lumière dans le domaine visible et rendait par conséquent son application pour des études *in vitro* impossible. Nous avons, par conséquent, étudié un nouveau modèle.

IV.1. Choix de la structure

Outre le problème de la longueur d'onde d'illumination, un problème de stabilité de nos plateformes a été observé. En effet, après que les composés soient restés deux jours en solution dans le DMSO pour le besoin des analyses RMN, une apparition du composé d'homolyse a été observée en HPLC pour les composés **16** et **14**. Ceci peut s'expliquer par une force de liaison (BDE) C–ON trop faible dans le cas d'une alcoxyamine avec le motif R–SG1. En effet, Gaudel–Siri *et al.*²¹⁰ ont étudié l'évolution de la valeur de la BDE pour différentes alcoxyamines. Ils ont notamment évalué sa valeur pour la liaison C–ON d'alcoxyamines contenant un nitroxyde SG1 ou TEMPO lié à différents groupements alkyles. Ils ont constaté que, quelque soit la nature du groupement alkyle, la valeur de la BDE de la liaison C–ON était plus faible pour les alcoxyamines contenant le nitroxyde SG1. Pour pallier ce problème de stabilité, nous avons choisi de modifier la nature du nitroxyde de Alc1 en remplaçant le motif SG1 par un motif 4–carboxy–TEMPO possédant, par conséquent, une BDE plus importante.

Concernant la partie alkyle, elle a été choisie afin de décaler le spectre d'absorption dans le domaine du visible à 475 nm. Le motif choisi est un dérivé du DNPH (2,4–Dinitrophenylhydrazine), l'Ethanone, 1–(4–éthylphényl)–, 2–(2,4–dinitrophényl) hydrazone. La molécule alors obtenue est donnée en Figure 75 et sera notée Alc2 dans la suite de ce chapitre.



R-Carboxy-TEMPO

Figure 75 : Structure chimique de Alc2.

Cette molécule présente une absorption entre 320 et 500 nm (Figure 76). De plus, elle possède une fonction acide permettant son couplage à un peptide.

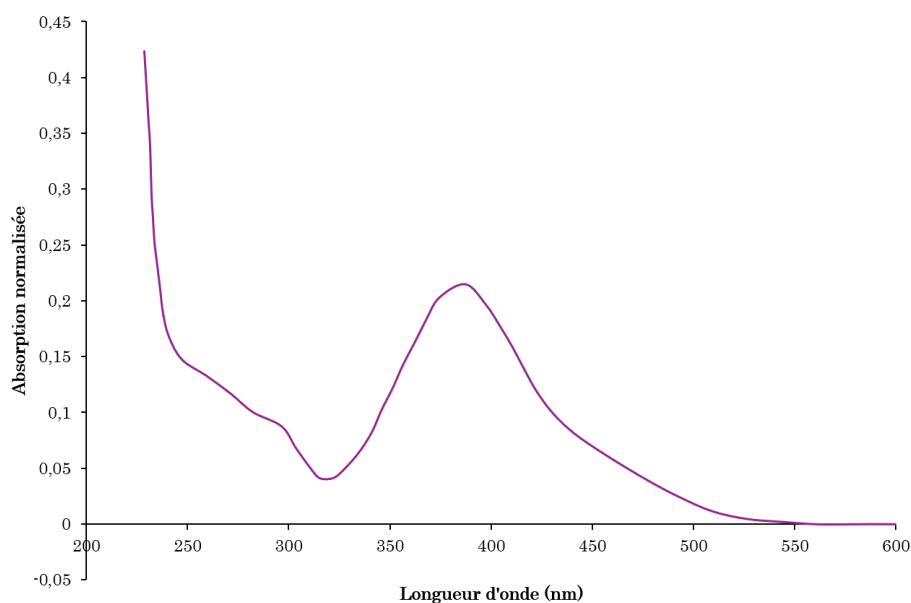


Figure 76 : Spectre d'absorption UV-visible normalisée de Alc2 dans le DCM.

IV.2. Couplage d'Alc2 aux différents peptides

IV.2.1. Synthèse du composé Fmoc-K(Alc2) (30)

Afin de conserver l'extrémité *N*-terminale du peptide disponible pour le greffage d'une β -CD, il a été choisi d'utiliser la même technique que celle utilisée pour le greffage du PS au peptide, à savoir le couplage en solution à une lysine. L'Alc2 a donc été couplée sur la

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

chaîne latérale d'une lysine, après activation préalable de sa fonction acide en présence de NHS comme décrit dans le Chapitre II (Figure 77).

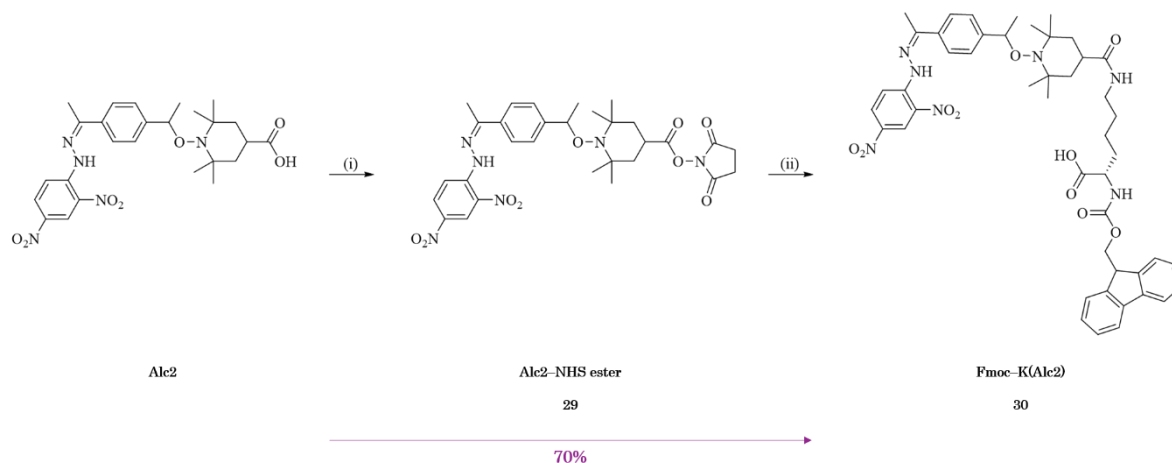


Figure 77 : Couplage de Alc2 à la lysine. (i) NHS, EDCI, DCM/DMF, 12 h, 40°C et (ii) Fmoc-Lys-OH, Et₃N, CHCl₂/DMF, 12 h, *t_{amb}*.

Cette synthèse a permis d'obtenir le composé **30** avec un rendement global de 70% et une pureté supérieure à 98% après purification par chromatographie sur colonne de silice.

IV.2.2. Essais de couplage de Alc2 au peptide

Le couplage du composé **30** au peptide a tout d'abord été testé en l'absence du PS pour optimiser les conditions de couplage dans un environnement présentant un encombrement stérique réduit.

Le couplage du composé **30** au peptide KDKPPR a été effectué dans deux types de conditions (i) celles du couplage de Alc1 au peptide KDKPPR, à savoir en présence de PyBOP et DIPEA et (ii) celle du couplage du Fmoc-K(Pyro-a) au peptide DKPPR, à savoir en présence de HBTU, de NMM et de NMP.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

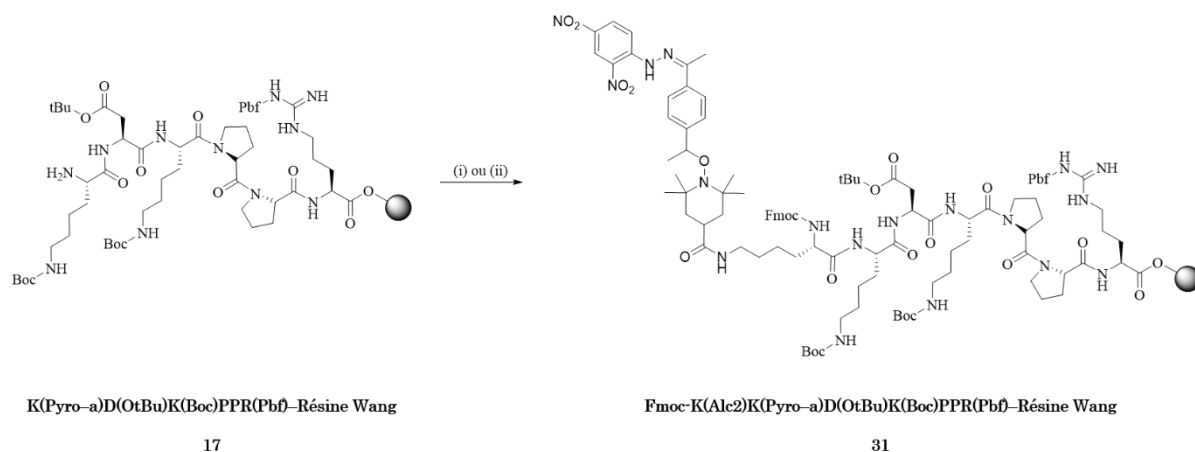


Figure 78 : Couplage du composé 30 au peptide 17. (i) PyBOP, DIPEA, DMF, 12 h, t_{amb} et (ii) HBTU, NMM, NMP, DMF, 12 h, t_{amb} .

A l'issue de ces deux essais de couplage, un micro-clivage a été effectué et une disparition totale du produit de départ a été observé en LC-MS. En revanche, bien que le produit attendu ait été observé, il était minoritaire et d'autres produits se sont formés (Figure 79). Il est intéressant de noter que les mêmes produits secondaires sont détectés dans les deux conditions réactionnelles, avec des proportions différentes.

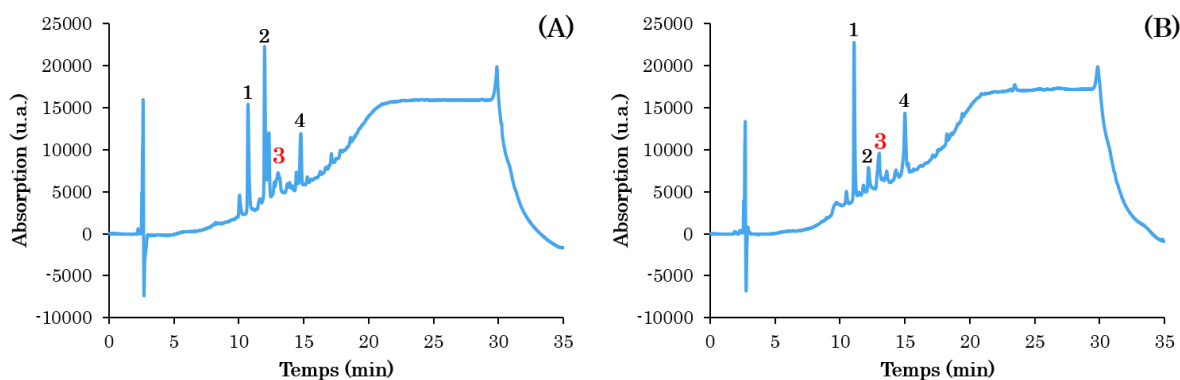


Figure 79 : Chromatogramme HPLC obtenu, selon un gradient de 10 à 100% de ACN dans l'eau + 0,1% HCOOH en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% HCOOH pendant 10 min à un débit de 0,8 mL.min⁻¹, à l'issue des essais de couplage du composé 30 au peptide KDKPPR en présence de (A) PyBOP, DIPEA, DMF ou (B) HBTU, NMM, NMP, DMF. 1, $[M+H]^+ = 1420$ Da ; 2, $[M+H]^+ = 1518$ Da ; 3, $[M+H]^+ = 1601$ Da (produit attendu) et 4, produit non ionisé en masse.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

En effet, dans le cas du couplage (A), le pic majoritaire est le pic 2 correspondant à une perte de masse de 83 ($[M+H]^+$ observée= 1518 Da) par rapport au produit attendu ($[M+H]^+$ observée= 1601 Da). La nature de ce composé n'a pas été identifiée.

En revanche, dans le cas du couplage (B), le pic majoritaire est le pic 1 correspondant à une perte de masse de 181 ($[M+H]^+$ observée= 1420 Da) par rapport au produit attendu. Ce produit secondaire formé correspond au composé d'hydrolyse en milieu acide de la fonction hydrazone du composé **31**, déprotégé sur ses chaînes latérales et clivé de la résine, dont le mécanisme est décrit en Figure 80. Cette observation nous indique que le produit souhaité a pu être formé majoritairement, mais s'est ensuite dégradé lors du clivage du support et la déprotection des chaînes latérales du peptide, en milieu acide.

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

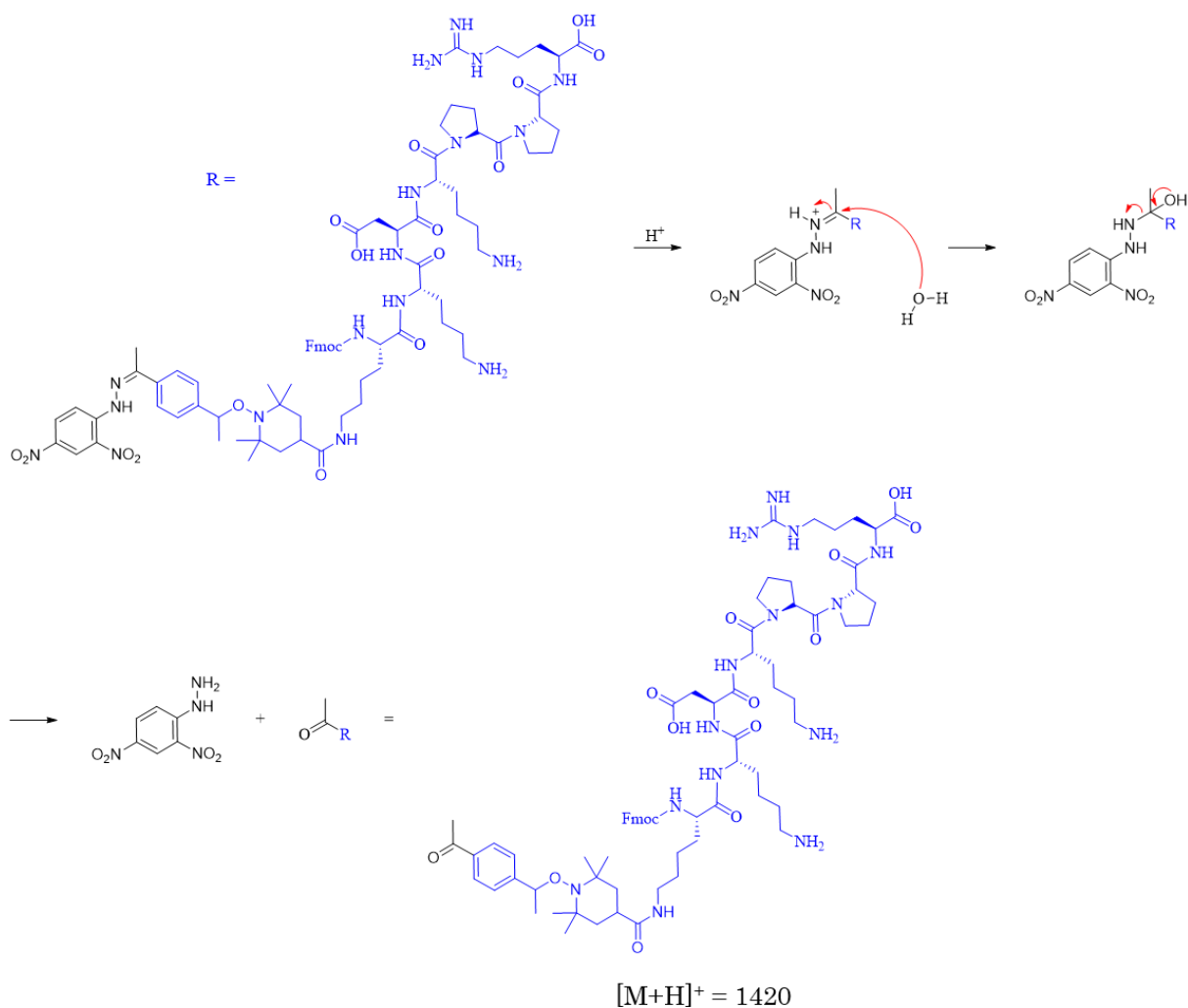


Figure 80 : Mécanisme de l'hydrolyse du composé 31, déprotégé sur ses chaînes latérales et clivé de la résine, durant le clivage. Adaptée de Kalia et al.²¹¹

Ces observations nous indiquent que le motif DNP n'est peut-être pas le plus indiqué en terme de stabilité dans nos conditions de synthèse.

IV.3. Homolyse

Sous illumination, cette alcoxyamine doit être capable de générer d'une part un radical alkyle et d'autre part le carboxy-TEMPO comme nitroxyde (Figure 81).

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

Ayant observé précédemment une homolyse rapide de Alc1 aux grandes concentrations, nous avons augmenté la concentration pour tenter d'observer l'homolyse de Alc2. Malheureusement, le manque de solubilité d'Alc2 dans le MeOH ne nous a pas permis d'étudier son homolyse. Par conséquent, il a été décidé d'utiliser un autre solvant, le DMSO. Une solution à 3 mM dans le DMSO a alors été illuminée. Un début d'homolyse a pu être mis en évidence après 1 heure d'illumination (Figure 83). En revanche, un signal correspondant à seulement 0,2% de nitroxyde généré a pu être observé.

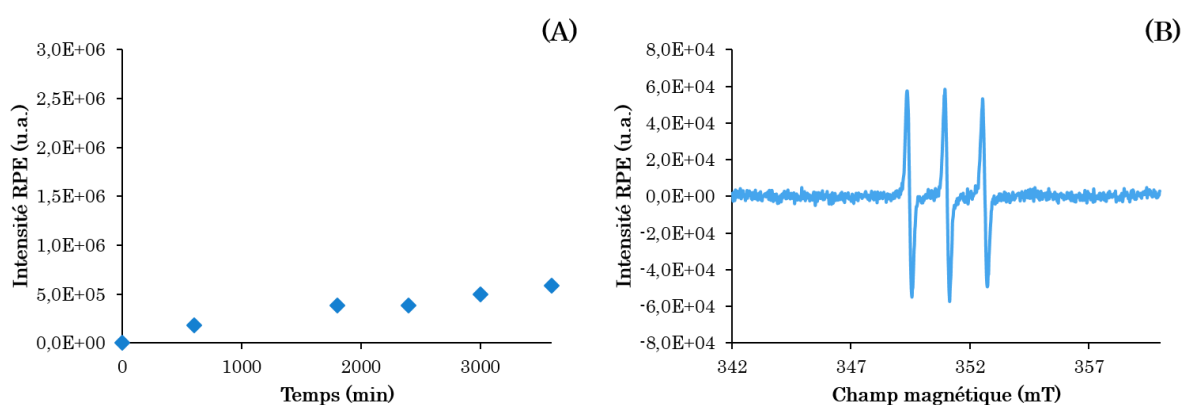


Figure 83 : (A) Evolution de l'intensité RPE du 4-carboxy-TEMPO au cours de l'illumination à 475 nm dans le DMSO à 3 mM et (B) Signal RPE du nitroxyde généré après une heure d'illumination.

Selon l'équation (9) décrite dans le Chapitre I, $E = \frac{h\nu}{\lambda}$, l'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. En effet, plus la longueur d'onde utilisée est élevée, moins le rayonnement est énergétique et nous pouvons donc supposer qu'à une longueur d'onde de 475 nm, l'énergie envoyée sur l'Alc2 n'est pas suffisante pour générer une homolyse rapide du composé. Pour vérifier cette hypothèse, la solution d'alcoxyamine dans le DMSO a été illuminée à 360 nm à une puissance similaire ($17,2 \text{ mW.cm}^{-2}$) pendant une heure. Comme précédemment, un faible signal a été observé. La génération de nitroxyde est plus rapide dans ces conditions avec une concentration en nitroxyde de l'ordre de 0,7% généré au bout d'une heure d'illumination (Figure 84).

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

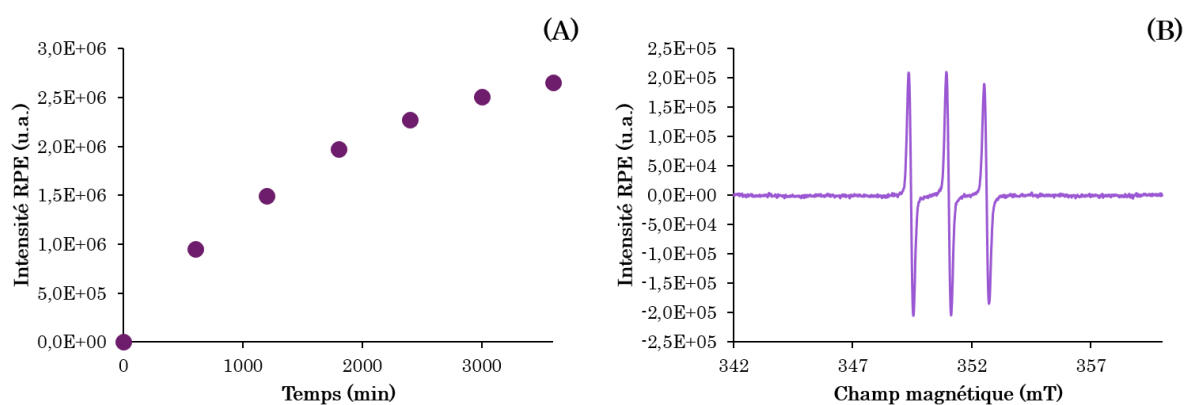


Figure 84 : (A) Evolution de l'intensité RPE du 4-carboxy-TEMPO au cours de l'illumination à 360 nm dans le DMSO à 3 mM et (B) Signal RPE du nitroxyde généré après une heure d'illumination.

Les résultats obtenus indiquent que le modèle d'alcoxyamine choisie n'est pas optimal pour des applications *in vitro* puisqu'il nécessite de fortes concentrations de composé pour générer l'homolyse du composé à une puissance faible au bout d'un temps d'illumination long. L'utilisation d'une source lumineuse possédant une plus forte puissance pourrait permettre d'accélérer cette homolyse mais ne serait pas souhaitable pour des applications biologiques.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'amélioration des plateformes décrites dans le chapitre précédent selon trois aspects : (i) le ciblage par internalisation de nos plateformes dans les cellules, (ii) l'amélioration de la solubilité par utilisation de β -CDs et (iii) le développement d'une alcoxyamine homolysable sous l'illumination dans le domaine du visible compatible avec des applications PDT *in vitro*.

La première partie de ce chapitre a consisté en l'étude d'un nouveau peptide, le tLyp-1 (CGNKRTR), présentant l'avantage d'être un *tumor-homing* peptide ainsi que d'être internalisé dans le noyau des cellules et présentant une toxicité pour les cellules cancéreuses. L'Alascan de ce peptide a été effectué pour évaluer l'importance de chaque acide aminé et l'importance des deux arginines et de la lysine a été mise en évidence. En

CHAPITRE III : Amélioration des plateformes pour le traitement du glioblastome

revanche, la cystéine et la glycine ne se sont pas révélées essentielles. Ce constat nous permettrait de retirer ces acides aminés ou d'utiliser la cystéine comme point d'ancrage afin de coupler un PS ou une autre molécule par chimie click thiol-maléimide.

Dans un second temps, la β -CD a été couplée avec succès sur le peptide et le PS et a permis d'améliorer la solubilité du composé. En effet, un plus faible temps de rétention en RPLC a été observé pour le composé **28** ainsi qu'un plus faible log P (log P (Pyro-a) = 0,97 et log P (composé **28**) = -0,68). De plus, le rendement quantique de production d' $^1\text{O}_2$ dans le D_2O est de 16 % alors qu'aucune production n'était observée pour le PS seul.

La dernière partie a consisté en l'étude d'une nouvelle alcoxyamine (Alc2). Après greffage d'Alc2 sur une lysine en solution, des essais de couplage du composé formé sur le peptide KDKPPR ont été effectués par SPPS et ont révélé une instabilité de la structure d'Alc2 dans les conditions de clivage en milieu acide. De plus, la photolabilité de Alc2 a été évaluée sous illumination à 475 nm dans le MeOH et aucun signal d'homolyse n'a pu être observé dans ces conditions. Un changement de solvant (DMSO) permettant une augmentation considérable de la concentration a permis d'observer 0,2% d'homolyse après 1 heure d'illumination à 475 nm (22 mW.cm^{-1}) et 0,7% à 360 nm ($17,2 \text{ mW.cm}^{-2}$). Ces dernières observations ont conduit à rejeter ce modèle d'alcoxyamine pour de futures études *in vitro* puisque les temps d'illumination et les concentrations utilisées sont beaucoup trop élevés. Deux hypothèses peuvent expliquer cette constatation, d'une part le changement du nitroxyde de SG1 au 4-carboxy-TEMPO conduisant à une force de la liaison C-ON plus importante et donc plus difficile à homolyser et, d'autre part par le fait que la lumière à 475 nm ne possède pas assez d'énergie pour induire une coupure efficace de l'alcoxyamine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis les années 70, l'intérêt pour la PDT ne cesse de croître pour le traitement de nombreux cancers. En revanche, bien que grandement étudiée, elle continue de présenter des inconvénients limitant son développement. En effet, de nombreux PS ont été commercialisés dans le monde mais la plupart d'entre eux ne sont pas ou peu sélectifs des tissus tumoraux. De plus, la PDT présente une nécessité en oxygène pour être efficace. Cette thèse a consisté en l'amélioration de ces deux aspects.

Pour cela, la preuve de concept reposant sur le développement d'une plateforme trimodale (14), spécifique des néovaisseaux tumoraux, par fixation sur le récepteur NRP-1, et présentant une efficacité à la fois en milieux hypoxique et normoxique, a été développée. Cette plateforme, combinant un PS (Pyro-a) pour une PDT dépendante de l'oxygène, une alcoxyamine (SG1-benzophénone) pour une action indépendante de l'oxygène et un peptide (KDKPPR) pour cibler NRP-1, a été synthétisée avec succès ainsi que les plateformes bimodales servant de références. Les propriétés de chacune des unités ont ensuite été évaluées à savoir les propriétés photophysiques de la Pyro-a, la photolabilité de l'alcoxyamine et l'affinité de KDKPPR pour NRP-1. L'étude des propriétés photophysiques n'a pas montré d'interférences majeures de l'alcoxyamine et du peptide sur les capacités d'émission de fluorescence et de production d' $^1\text{O}_2$ de la Pyro-a. L'étude de photolabilité de l'alcoxyamine a montré un effet protecteur du peptide mais également une compétition entre le PS et l'alcoxyamine, ces derniers absorbant tous les deux la lumière UV. La génération de radicaux médiée par l'homolyse de l'alcoxyamine a été ralentie mais n'a pas été bloquée par la compétition avec la Pyro-a ne modifiant pas ainsi les propriétés de photolabilité de l'alcoxyamine. Une très bonne affinité de la plateforme trimodale (14) pour le récepteur NRP-1 a été mise en évidence ($\text{CI}_{50} = 0,46 \mu\text{M}$) en comparaison avec le peptide seul ($\text{CI}_{50} = 11,5 \mu\text{M}$).

Cette preuve de concept n'a, cependant, pas permis l'évaluation biologique *in vitro* de cette plateforme car l'illumination UV utilisée pour l'homolyse de l'alcoxyamine n'est pas compatible avec un traitement PDT *in vitro*.

Le second chapitre a consisté en l'amélioration de la plateforme développée selon trois axes importants i) le ciblage du récepteur NRP-1 par le peptide tLyp-1 connu pour être internalisé au sein de la cellule, ii) l'amélioration de la solubilité en milieu aqueux par ajout d'une β -CD et iii) le développement d'une alcoxyamine homolysable par la lumière visible pouvant être ainsi étudiée dans une application PDT *in vitro*.

Dans une première partie, un *tumor-homing* peptide, le tLyp-1 (CGNKRTR), internalisé dans les cellules cancéreuses a été étudié. L'importance de chaque acide aminé pour l'affinité du peptide envers le récepteur NRP-1 a été déterminée par une étude « Alaskan », c'est-à-dire le remplacement successif de chaque acide aminé par une alanine. Cette étude a démontré l'importance des deux motifs arginine et de la lysine pour la reconnaissance de NRP-1 concordant avec le motif CendR. Le couplage de la cystéine s'étant révélé difficile, son importance révélée négligeable dans la séquence peptidique peut donc permettre de la supprimer, le peptide GNKRTR sera synthétisé et son affinité pour NRP-1 évaluée. Cette cystéine pourrait être sinon utilisée pour le couplage d'un PS par réaction de chimie click thiol-maléimide. La glycine ne s'étant également pas révélée essentielle, il serait intéressant de synthétiser également le peptide NKRTR et mesurer son affinité.

Bien que l'affinité pour NRP-1 ait été déterminée par test LBA, il serait intéressant par la suite de conjuguer un fluorophore sur le peptide à son extrémité *N*-terminale pour étudier l'internalisation du peptide tLyp-1 et des peptides GNKRTR et NKRTR par microscopie de fluorescence pour déterminer leur localisation intracellulaire.

Dans une seconde partie, la conjugaison de la β -CD au peptide et à la Pyro-a a été effectuée afin d'améliorer la solubilité de la Pyro-a dans l'eau et par conséquent, améliorer ses propriétés photophysiques. L'augmentation de la solubilité de la Pyro-a par conjugaison avec la β -CD a été observée en RPLC par un temps de rétention du composé beaucoup plus faible (11,4 min) que pour la Pyro-a (18,9 min) et une diminution du log P ($\log P$ (Pyro-a) = 0,97 et $\log P$ (composé **28**) = -0,68). En effet, une très faible fluorescence et aucune production d' $^1\text{O}_2$ n'ont été observées dans le D_2O pour la Pyro-a seule et conjuguée au peptide KDKPPR. La conjugaison de la β -CD a conduit à une amélioration significative de la production d' $^1\text{O}_2$ avec un Φ_Δ de 16% (Φ_Δ (Pyro-a) = 0%). Il serait intéressant d'évaluer ce composé *in vitro* pour déterminer son impact sur la phototoxicité de la Pyro-a.

Dans la dernière partie, une nouvelle alcoxyamine possédant une partie nitroxyde carboxy-TEMPO et une partie alkyle basée sur la DNPH, notée Alc2, a été étudiée. Alc2 a été couplée avec succès à une lysine en solution pour conduire au composé **30** puis des essais de couplage au peptide KDKPPR ont été effectués par SPPS. Le composé **31**, déprotégé sur ses chaînes latérales et clivé de la résine, a été formé mais avec un rendement très faible et une instabilité du composé en milieu acide a été révélée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En parallèle, Alc2 a été illuminée sous lumière bleue à 475 nm dans le MeOH et aucune homolyse n'a pu être observée dans de telles conditions. Une faible solubilité de Alc2 dans le MeOH ne permettant pas d'étudier des concentrations de l'ordre du mM, un changement de solvant (DMSO) a été effectué et une faible homolyse (0,2% de conversion) a été observée après 1 heure d'illumination à 475 nm à une puissance de 22 mW.cm⁻². Une illumination à 360 nm a révélé une homolyse légèrement plus rapide mais qui reste tout de même faible (0,7%). Cette homolyse insuffisante a permis de conclure que ce modèle d'alcoxyamine n'était pas optimal pour de futures études *in vitro*. Ceci peut s'expliquer par une force de la liaison C–ON trop importante pour être efficacement homolysée due au changement de nitroxyde par rapport au Chapitre II et/ou par le fait que la lumière bleue est moins énergétique que la lumière UV et que l'énergie émise est donc insuffisante pour induire une homolyse.

Pour de futures études, il serait pertinent de garder, dans un premier temps, la même partie alkyle pour l'alcoxyamine (motif basé sur le DNPH) et de remplacer la partie nitroxyde carboxy–TEMPO par le SG1 pour étudier l'influence de la force de liaison sur la photolabilité de l'alcoxyamine. Si ce changement se révélait efficace, il faudrait modifier la stratégie de synthèse utilisée pour le greffage de l'alcoxyamine, la partie alkyle étant dégradé en milieu acide. Pour cela, une idée serait de coupler l'alcoxyamine au peptide par chimie click CuAAC, la réaction thiol–maléimide étant déjà utilisée pour le couplage de la β–CD–SH. Le problème de cette approche est l'utilisation de cuivre pour la cycloaddition azoture–alcyne ayant déjà posé un problème avec la Pyro–a. Pour contourner cette difficulté, la stratégie pourrait être de ne pas greffer la Pyro–a par SPPS mais par chimie click thiol–maléimide à la place de la β–CD–SH (Figure 85).

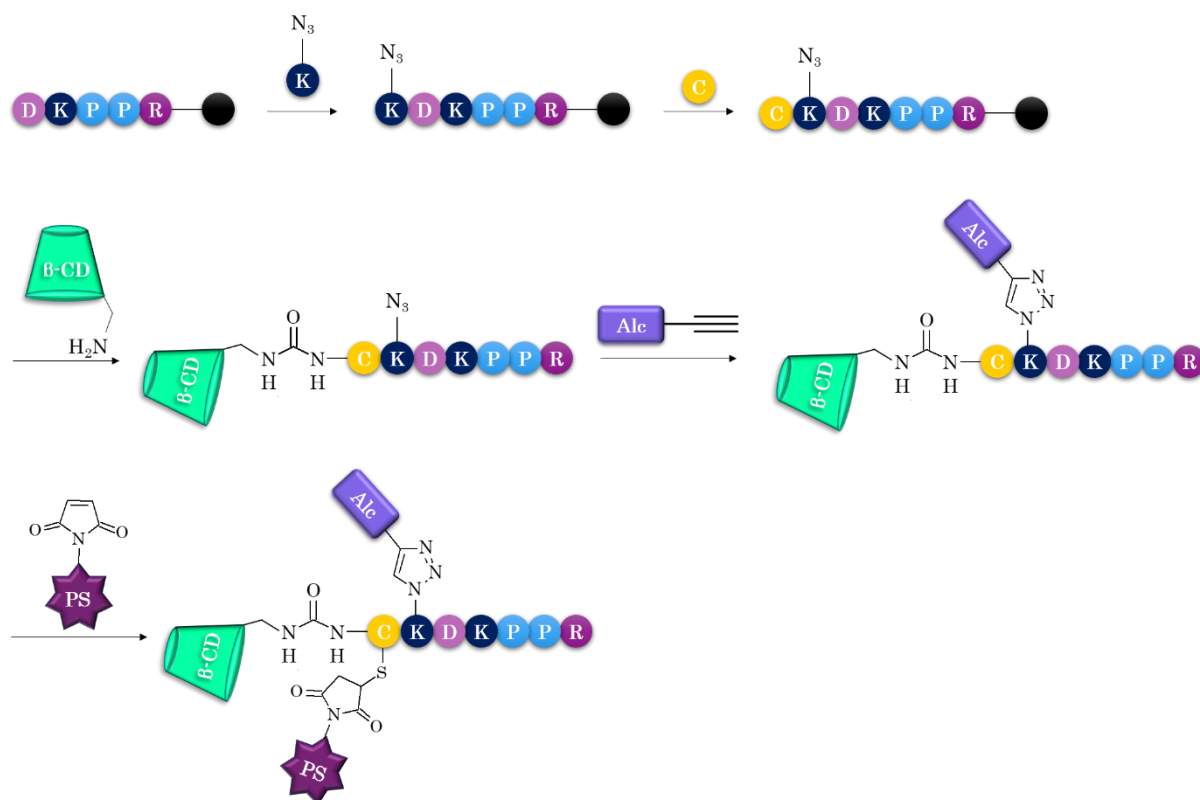


Figure 85 : Nouvelle stratégie de synthèse envisagée.

Pour cela, la β -CD-NH₂ serait synthétisée puis couplée sur le peptide par formation d'un lien urée. Une lysine fonctionnalisée par un bras azoture et une cystéine serait ensuite couplée au peptide. En parallèle, la Pyro-a et l'alcoxyamine seraient fonctionnalisées par un bras maléimide et un bras alcyne respectivement. La réaction CuAAC entre le peptide clivé de la résine et l'alcoxyamine fonctionnalisée serait d'abord effectuée, suivi de la réaction thiol-maléimide avec la Pyro-a.

Si l'homolyse se révélait en revanche inefficace après la modification de la partie nitroxyde, il faudrait envisager une modification des conditions d'illumination pour l'homolyse de l'alcoxyamine. Pour cela, il serait intéressant de greffer notre plateforme à des NPs excitables par les rayons X, beaucoup plus énergétiques que la lumière visible, et pouvant ensuite transférer leur énergie par FRET à la plateforme, à la fois à la Pyro-a et à l'alcoxyamine. L'utilisation de NPs permettrait également de résoudre le problème de solubilité dans l'eau de la plateforme.

Une autre solution serait de développer une alcoxyamine pouvant être excitée par un processus biphotonique.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Synthèse et caractérisations des composés

I.1. Produits chimiques

Tous les produits chimiques commerciaux ont été utilisés sans autre purification. La Pyro-a a été achetée auprès de BOC Sciences (Shirley, NY, USA). Le PyBOP a été acheté auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). La résine Fmoc-Arg(Pbf)-Wang, les Fmoc-acide aminé-OH et le HBTU ont été achetés auprès d'Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Allemagne). L'acétate d'éthyle, l'acétate de zinc, l'anhydride acétique, le DCM, le DMF, le DMSO, l'EDCI, l'éther diéthylique, l'éther de pétrole, l'EtOH, l'hydrochlorure de Fmoc-Lys-OH, le NHS, la propargylamine, le 1-octanol et le TFA ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). La *N*-méthylmorpholine (NMM), la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP), la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) et le triisopropylsilane (TIPS) ont été achetés auprès d'Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA). L'acide 6-maléimidohéxanoïque, l'acétonitrile (ACN), le chloroforme et le MeOH ont été achetés auprès de Biosolve (Dieuze, France). La triéthylamine a été achetée auprès de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, États-Unis). La pipéridine a été achetée auprès d'Acros Organics. Le THF a été acheté auprès de VWR (Radnor, PA, États-Unis). La β -CD-SH a été synthétisée au sein de l'équipe.²¹² De l'eau ultrapure (Milli-Q, $\rho > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) a été utilisée pour la préparation des solutions aqueuses.

I.2. Instruments

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été réalisées en utilisant des plaques Merck Kieselgel 60 F254 ; les tâches ont été détectées par illumination UV et une solution d'acide phosphomolybdique dans l'EtOH a été utilisée comme révélateur par chauffage.

Les analyses HPLC ont été faites à l'aide d'une HPLC Shimadzu LC-10ATvp avec une colonne Agilent Pursuit 5 C18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,6 \text{ mm}$) à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ équipée d'un détecteur UV à réseau de photodiodes (Varian Prostar 335-190-950 nm) et d'un détecteur spectrofluométrique (Shimadzu RF-10AXL-200-650 nm). La détection UV a été effectuée à 415 nm pour la Pyro-a, 260 nm pour Alc, 445 nm pour Alc2, 254 nm pour le groupement Fmoc et 214 nm pour les peptides. La détection de fluorescence à 650 nm de la Pyro-a a été réalisée après une excitation à 415 nm. Les solvants utilisés ont été acidifiés avec 0,1% de TFA.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres RMN ^1H , COSY et TOCSY ont été enregistrés dans le DMSO- d_6 à température ambiante ($T = 298\text{ K}$) sur un spectromètre BRUKER AVANCE à 300 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en parties par million (ppm) et en utilisant le pic résiduel du DMSO ($\delta = 2,5\text{ ppm}$) comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont données en hertz (Hz) et les multiplicités sont indiquées comme suit : s = singulet, d = doublet, dd = doublet dédoublé, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet et br = large.

Les chromatogrammes LC-MS ont été effectués sur une HPLC Shimadzu LC-20AB avec une colonne Agilent Pursuit 5 C18 ($5\ \mu\text{m}$, $150 \times 4,6\text{ mm}$) à un débit de $0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, équipée d'un dégazeur (Shimadzu DGU-20A₃) et d'un détecteur UV à réseau de photodiodes (Shimadzu SPD-M20A) et couplée à un spectromètre de masse (Shimadzu LC-MS-2020). Les solvants utilisés ont été acidifiés avec 0,1% d'acide formique. Les spectres de masse à haute résolution (HRMS) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker MicroTof-Q HR au "Service commun de Spectrométrie de Masse", Faculté des Sciences et Technologies (Vandœuvre-lès-Nancy, France).

I.3. Procédures générales

I.3.1. SPSS

Les peptides ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur de peptides ResPepXL automatisé (Intavis AG, Bioanalytical Instruments) avec une méthodologie Fmoc/tBu. Les chaînes latérales de l'arginine, de l'acide aspartique et de la lysine ont été respectivement protégées par les groupes Pbf, OtBu et Boc. Des résines Fmoc-Arg(Pbf)-Wang et Fmoc-Ala-Wang gonflées dans le DCM ont été utilisées. La déprotection du groupement Fmoc a été effectuée en présence d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Cette étape a été réalisée deux fois, une première fois pendant 4 min et une seconde fois pendant 7 min. L'acide aminé suivant a été couplé en ajoutant un excès de Fmoc-AA-OH (6 éq), HBTU (5 éq), NMP (3 éq) et NMM (10 éq) dans le DMF. Cette étape a été répétée deux fois pendant 18 min. Une dernière étape de capping, utilisant une solution d'anhydride acétique à 5% dans le DMF, a été effectuée pendant 5 min, pour piéger toutes les fonctions amines n'ayant pas réagi par acétylation. Les étapes de déprotection, de couplage et de capping ont été répétées jusqu'à la fin de la synthèse du peptide. Les excès de réactifs et les solutions de pipéridine ont été éliminés par plusieurs lavages avec le DCM, EtOH et DMF. Les micro-clivages et clivages de la résine, ainsi que la déprotection des chaînes latérales du peptide, ont été effectuées en présence d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v) pendant 2 h et 1 h respectivement. La résine a ensuite été filtrée et lavée avec du

PARTIE EXPERIMENTALE

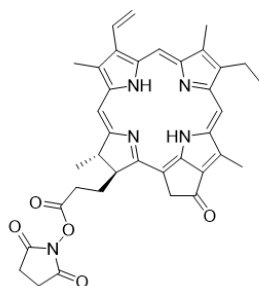
TFA et du DCM. Les filtrats ont ensuite été évaporés sous pression réduite et les composés ont été précipités dans l'éther diéthylique à froid par centrifugation. Les suivis de réaction ont été effectués par LC–MS.

I.3.2. Purification par HPLC préparative

Les composés synthétisés par SPSS ont été purifiés avec le même équipement que pour les HPLC analytiques mais avec une colonne Agilent Pursuit 5 C18 (5 μm , 150 \times 21,2 mm) à un débit de 12 mL.min⁻¹, à l'exception du composé **14** purifié sur une Spot Prep II avec un système intégré d'Armen Instruments, avec une colonne Agilent Pursuit 5 C18 (5 μm , 150 \times 21,2 mm), équipée d'un spectrophotomètre UV/Vis à double longueur d'onde à 415 nm et 214 nm à un débit de 15 mL.min⁻¹.

Les solvants utilisés ont été l'eau et l'ACN respectivement acidifiés avec 0,1% TFA pour la plupart des composés et avec 0,4% TFA pour le composé **14**.

I.4. Synthèse du composé ester Pyro–a–NHS (1)



Formule chimique : C₃₇H₃₇N₅O₅
Masse moléculaire : 631,7330 g.mol⁻¹

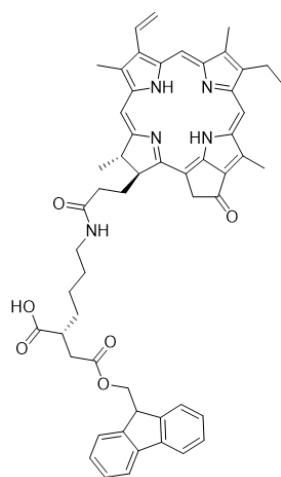
Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte, la Pyro–a (100 mg, 190 μmol , 1 éq) a été solubilisée dans un mélange anhydre de THF/DMF (20 mL, 80/20, v/v), puis le NHS (32,3 mg, 280 μmol , 1,5 éq) et EDCI·HCl (53,8 mg, 280 μmol , 1,5 éq) ont été ajoutés à la solution. Le mélange a été agité à 40°C, pendant 23 h. La solution a ensuite été évaporée sous pression réduite. La purification du produit brut a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice avec un éluant DCM/EtOH (97/3, v/v). Le composé **1** a été obtenu sous forme de solide bleu foncé avec un rendement de 85% et une pureté HPLC de 97%.

R_f = 0,70 (DCM/EtOH = 97/3, v/v). ¹H NMR (300 MHz, DMSO–d₆, δ) : –1,96 (s, 1H, NH pyrrole, interchangeable*), 0,25 (s, 1H, NH pyrrole, interchangeable*), 1,61 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₃CH₂–), 1,76 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH₃CH–), 2,10 (m, 2H, –CH₂CH₂COO–), 2,80 (m, 2H, –CH₂CH₂COO–), 2,85 (m, 4H, CH₂ NHS), 3,20 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable**), 3,42 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable**), 3,59 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable**), 3,68 (m, 2H, CH₃CH₂–), 4,39 (d, J = 12 Hz, 1H, CHCH₂CH₂COO), 4,68 (m, 1H, CH₃CH–), 5,08 (d, J =

PARTIE EXPERIMENTALE

20,1 Hz, 1H, =C-CH₂CO, interchangeable***), 5,21 (d, $J = 20,1$ Hz, 1H, =C-CH₂CO, interchangeable***), 6,20 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, H₂C=CH-, *cis*), 6,37 (d, $J = 17,7$ Hz, 1H, H₂C=CH, *trans*), 8,2 (dd, $J = 18$ Hz et $J = 11,7$ Hz, 1H, H₂C=C-H), 8,87 (s, 1H, β-H, -C-C-H=C-, interchangeable****), 9,42 (s, 1H, β-H, -C-C-H=C-, interchangeable****) et 9,70 (s, 1H, -C-C-H=C-, interchangeable****). **HRMS** (ESI+) : m/z calculée pour C₃₇H₃₇N₅O₅ [M + H]⁺ 632,2867 ; mesurée [M + H]⁺ 632,2822. **UV/Vis** (EtOH) : λ_{max} (log ϵ) = 410 (4,61), 510 (3,63), 539 (3,61), 607 (3,57), 666 nm (4,28).

I.5. Synthèse du composé Fmoc-K(Pyro-a) (2)



Formule chimique : C₅₅H₅₇N₅O₅
Masse moléculaire : 887,0900 g.mol⁻¹

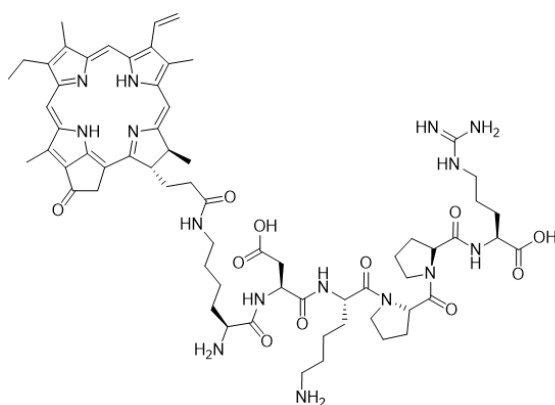
Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte à 0°C, le composé **1** (89 mg, 140 μmol, 1 éq) a été solubilisé dans du chloroforme anhydre (25 mL). La triéthylamine (43 μL, 310 μmol, 2,2 éq) a été ajoutée à la Fmoc-Lys-OH Nε-chlorhydrate (68,5 mg, 170 μmol, 1,2 éq), initialement solubilisée dans du DMF anhydre (2,5 mL), pour être finalement ajoutée à la solution d'ester Pyro-a-NHS. Le mélange a alors été agité à température ambiante, pendant 21 h, sous argon. La solution a ensuite été évaporée sous pression réduite. La purification du produit brut a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice avec un éluant DCM/EtOH (gradient de 90/10 à 60/40, v/v). Le composé **2** a été obtenu sous forme de solide bleu foncé avec un rendement de 98% et une pureté HPLC de 97%.

Rf = 0,40 (DCM/EtOH = 90/10, v/v). **¹H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) : -2,01 (s, 1H, N-H pyrrole, interchangeable*), 0,19 (s, 1H, N-H pyrrole, interchangeable*), 1,27 (m, 2H, γ-CH₂ Lys), 1,54 (m, 4H, β et δ-CH₂ Lys), 1,61 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH₃CH₂C=), 1,77 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH₃CH-), 2,09 (m, 2H, -CHCH₂CH₂COO-), 2,30 (m, 1H, -CHCH₂CH₂COO-, interchangeable**), 2,58 (m, 1H, -CHCH₂CH₂COO-, interchangeable**), 2,97 (m, 2H, ε-CH₂ Lys), 3,19 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable***), 3,42 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable***), 3,58 (s, 3H, CH₃C=, interchangeable***), 3,67 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H,

PARTIE EXPERIMENTALE

$\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\Rightarrow$, 3,79 (m, 2H, $\alpha\text{-}\underline{\text{H}}\text{Lys}$), 3,99 (m, 1H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{Fmoc}$), 4,07 (m, 2H, $\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{Fmoc}$), 4,25 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4,53 (q, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H}}\text{-}$), 5,07 (d, $J = 20,1$ Hz, 1H, $=\text{C}\text{-}\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}$, interchangeable****), 5,21 (d, $J = 20,1$ Hz, 1H, $=\text{C}\text{-}\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}$, interchangeable****), 6,18 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}_2\text{C}=\text{CH}\text{-}$, *cis*), 6,37 (d, $J = 18,0$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}_2\text{C}=\text{CH}\text{-}$, *trans*), 7,20 et 7,60 (m, 8H, $\text{C}\underline{\text{H}}$ phényl-Fmoc), 7,30 (m, 1H, $\epsilon\text{-}\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\text{Lys}$), 7,77 (t, 1H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}\text{Lys}$), 8,18 (dd, $J = 17,7$ Hz et $J = 11,4$ Hz, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}\underline{\text{H}}\text{-}$), 8,84 (s, 1H, $-\text{C}\text{-}\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C}\text{-}$, interchangeable*****), 9,40 (s, 1H, $-\text{C}\text{-}\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C}\text{-}$, interchangeable*****), 9,67 (s, 1H, $-\text{C}\text{-}\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C}\text{-}$, interchangeable*****), 12,52 (br, 1H, $-\text{COO}\underline{\text{H}}$). **HRMS** (ESI+) : m/z calculée pour $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 885,4334 ; mesurée $[\text{M} + \text{H}]^+$ 885,4269. **UV/Vis** (EtOH) : $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon) = 413$ (4,92), 512 (3,92), 543 (3,86), 612 (3,87), 669 nm (4,59).

I.6. Caractérisation du composé K(Pyro-a)DKPPR (7)



Formule chimique : $\text{C}_{65}\text{H}_{89}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$
Masse moléculaire : 1256,5210 g.mol⁻¹

La synthèse de ce composé a déjà été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

PARTIE EXPERIMENTALE

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , δ) :

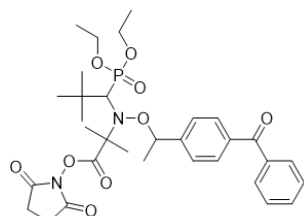
	NH	α -H	β -H	δ -H	Autres
Pyro-a	-	-	-	-	-1,93 (s, 2H, NH pyrrole, interchangeable*), 0,29 (s, 2H, NH pyrrole, interchangeable*), 1,64 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 1,80 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 2,05 (m, 2H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$), 2,39 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$, interchangeable**), 2,62 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$, interchangeable**), 3,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$, interchangeable***), 3,45 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$, interchangeable***), 3,63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$, interchangeable***), 3,76 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 4,31 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4,60 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CH}-$), 5,12 (d, $J=20,1$ Hz, 1H, $=\text{C}-\text{CH}_2\text{CO}$, interchangeable****), 5,24 (d, $J=20,1$ Hz, 1H, $=\text{C}-\text{CH}_2\text{CO}$, interchangeable****), 6,21 (d, $J=11,7$ Hz, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$, <i>cis</i>) et 6,42 (d, $J=18,3$ Hz, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$, <i>trans</i>), 8,23 (m, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$), 8,90 (s, 1H, $-\text{C}-\text{CH}=\text{C}-$, interchangeable*****), 9,46 (s, 1H, $-\text{C}-\text{CH}=\text{C}-$, interchangeable*****), 9,74 (s, 1H, $-\text{C}-\text{CH}=\text{C}-$, interchangeable*****)
Lys ₁	8,08	4,41	1,63	1,34	ϵ -CH ₂ = 3,03 ; γ -CH ₂ = 1,27
Asp	8,66	4,55	2,50 2,68	-	
Lys ₂	7,75	4,41	1,58	1,45	ϵ -CH ₂ = 2,72 ; γ -CH ₂ = 1,31
Pro ₁	-	4,31	1,97 2,16	3,45 3,52	γ -CH ₂ = 1,86
Pro ₂	-	4,48	1,77 2,03	3,41 3,60	γ -CH ₂ = 1,83
Arg	7,98	4,13	1,60 1,73	3,09	γ -CH ₂ = 1,51 ; ϵ -NH = 7,69

HRMS (ESI+) : m/z calculée pour $\text{C}_{65}\text{H}_{89}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1256,6939, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 628,8506 ; mesurée $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1256,6986, $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 628,8562. **UV/Vis** (MeOH) : λ_{max} ($\log \epsilon$) = 410 (4,81), 507 (3,81), 538 (3,78), 608 (3,75), 666 nm (4,44).

I.7. Synthèse de la plateforme trimodale Alc1'-K(Pyro-a)DKPPR (14)

I.7.1. Essai de synthèse par chimie click

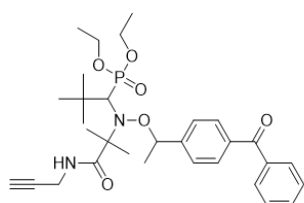
I.7.1.1. Synthèse du composé ester Alc1'-NHS (8)



Formule chimique : $C_{32}H_{43}N_2O_9P$
Masse moléculaire : $632,6748 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte, l'Alc1' (50,7 mg, 93 μmol , 1 éq) a été solubilisée dans un mélange anhydre AcOEt/DMF (16 mL, 15/1, v/v), puis le NHS (16,2 mg, 141 μmol , 1,5 éq) et EDCI·HCl (26,91 mg, 141 μmol , 1,5 éq) ont été ajoutés à la solution. Le mélange a été agité à 35°C, pendant 24 h. Le milieu réactionnel a ensuite été évaporé sous pression réduite. Le composé **8** a été obtenu sous forme d'un solide blanc et utilisé directement dans l'étape suivante sans purification.

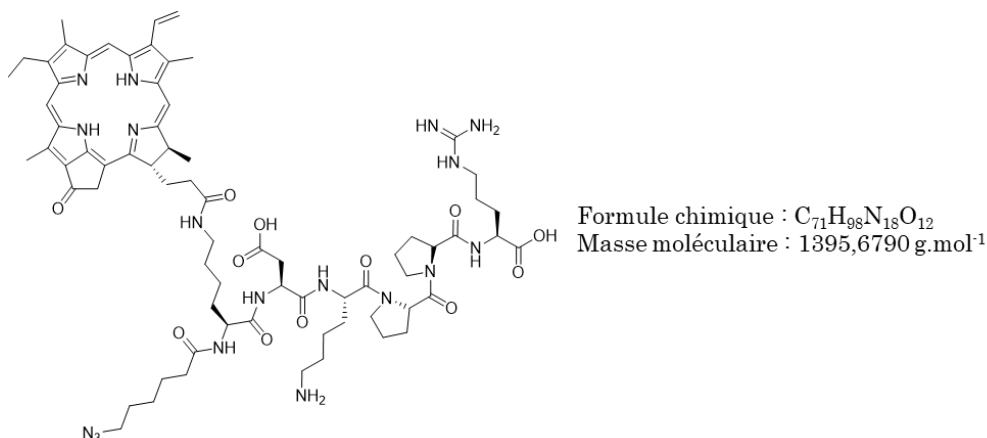
I.7.1.2. Synthèse du composé Alc1'-alcyne (9)



Formule chimique : $C_{31}H_{43}N_2O_6P$
Masse moléculaire : $570,6668 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

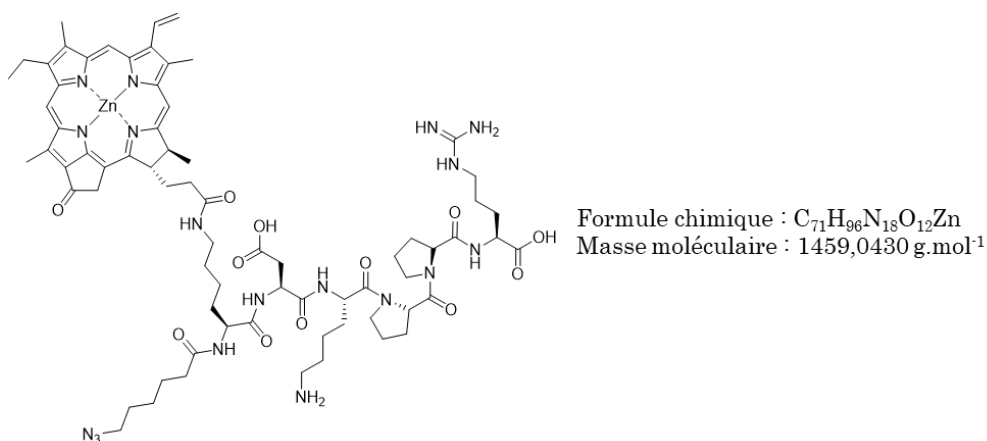
Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte à 0°C, le composé **8** (58,7 mg, 93 μmol , 1 éq) a été solubilisé dans un mélange CHCl_3 /DMF anhydre (10,5 mL, 20/1, v/v). La triéthylamine (19,4 μL , 140 μmol , 1,5 éq) et la propargylamine (8,9 μL , 140 μmol , 1,5 éq) ont ensuite été ajoutées à la solution d'ester Alc1'-NHS. Le mélange a alors été agité à température ambiante pendant 30 h sous argon. Le milieu réactionnel a été lavé avec une solution aqueuse de NaCl (3 x 20 mL) puis les phases aqueuses ont été extraites avec l'AcOEt (3 x 15 mL). Les phases organiques ont été réunies, séchées sur sulfate de magnésium (MgSO_4) et évaporées sous pression réduite. Le composé **9** a été obtenu sous forme d'un solide blanc utilisé directement dans l'étape suivante sans purification.

I.7.1.3. Synthèse du composé azido–K(Pyro–a)DKPPR (11)



La réaction de couplage entre le composé **10** et l'acide azidohexanoïque (3 éq) a été effectuée en présence de HBTU (3 éq), NMP (3 éq) et NMM (9 éq) dans le DMF et le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h. Tous les excès de réactifs solubles ont été éliminés par filtration et lavage avec du DMF, de l'EtOH et du DCM. Le composé **11** brut a ensuite été obtenu après clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales en présence d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v) pendant 2 h puis la résine a été filtrée et lavée avec du TFA et du DCM. Le filtrat a été séché sous vide et le composé **11** a été précipité dans l'éther diéthylique à froid par centrifugation pour obtenir un solide vert. Il a été utilisé dans l'étape suivante sans purification.

I.7.1.4. Synthèse du composé azido–K(Zn–Pyro–a)DKPPR (12)



L'insertion du zinc au sein du composé **11** a été réalisée selon le protocole décrit par Sakai *et al.*¹⁶⁷ Le composé **11** (10,6 mg, 8 μmol, 1 éq) a été solubilisé dans le DMF (10 mL) puis Zn(OAc)₂ (66,7 mg, 304 μmol, 40 éq) a été ajouté à la solution. Le milieu réactionnel a ensuite été agité à 40°C pendant 2h30. Le milieu réactionnel a été repris dans le DCM (30

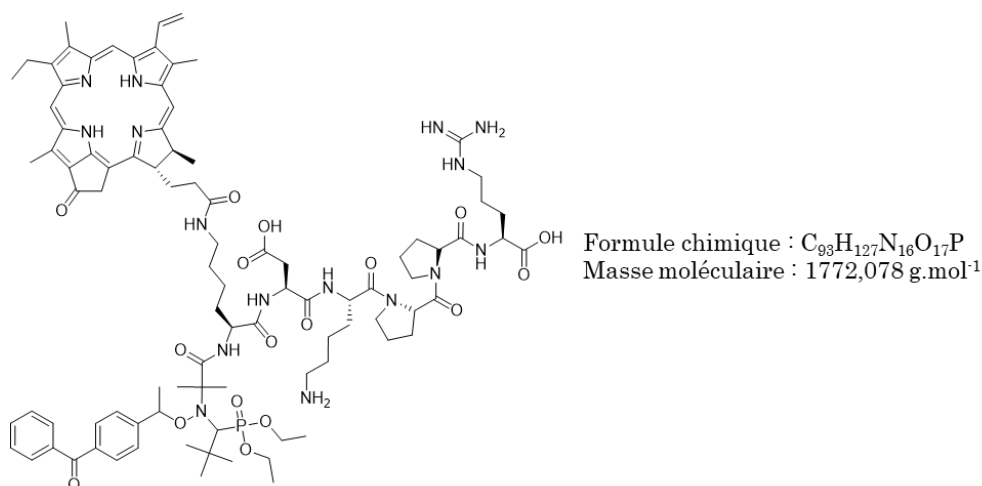
mL) et lavé à l'eau (3 x 30 mL). Les phases aqueuses ont ensuite été extraites avec le DCM (3 x 20 mL) puis les phases organiques ont été réunies et séchées sur MgSO₄ puis évaporées sous pression réduite. Le produit **12** a été obtenu sous forme d'un solide vert sans purification.

I.7.1.5. Tentative de synthèse du composé Alc1'-click-K(Pyro-a)DKPPR (**13**)

Les composés **9** (4,6 mg, 8 μmol, 1 éq) et **12** (18,20 mg, 12 μmol, 1,5 éq) ont été solubilisés dans le DMF (4 mL) et CuSO₄ (0,2 mg, 0,8 μmol, 0,1 éq) et l'ascorbate de sodium (0,8 mg, 4 μmol, 0,5 éq), préalablement solubilisés dans l'eau (1 mL), ont été ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 24 h puis le milieu réactionnel a été évaporé sous pression réduite pour conduire à l'obtention d'un solide vert.

Le solide obtenu a été immédiatement solubilisé dans le TFA (5 mL) à 0°C et la solution ainsi obtenue a été agitée pendant 5 min selon un protocole décrit par Simpson et Smith¹⁶⁸. Le milieu réactionnel a été dilué dans le DCM (40 mL) puis neutralisé avec une solution aqueuse de NaHCO₃ saturée (100 mL). La phase organique a ensuite été lavée avec une solution aqueuse de NaHCO₃ (2 x 50 mL) et de l'eau (2 x 50 mL). Les phases aqueuses ont ensuite été extraites avec du DCM (2 x 50 mL). Les phases organiques ont finalement été combinées, séchées sur MgSO₄ puis évaporées sous pression réduite pour conduire à l'obtention d'un solide vert. La formation du produit **13** n'a pu être observée en LC-MS.

I.7.2. Caractérisation de la plateforme **14** synthétisée par SPPS



La synthèse de ce composé a déjà été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

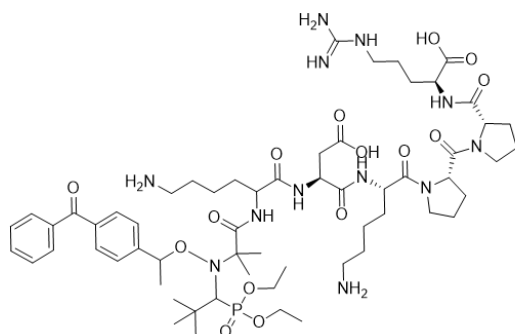
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) :

	NH	α -H	β -H	δ -H	Autres
Alc1'	–	–	–	–	0,80–2,00 (m, 16H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CCH-}$, $-\text{NC}\underline{\text{H}}\text{P-}$ et $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CN-}$), 1,09 (m, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CH}_2\text{O-}$, interchangeable#), 1,18 (m, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CH}_2\text{O-}$, interchangeable#), 1,35 (m, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CH-}$), 3,89 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{O-}$, interchangeable##), 4,08 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{O-}$, interchangeable###), 5,07 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H-}}$), 7,00–7,60 (m, 9H, $\text{C}\underline{\text{H}}$ phényl),
Pyro-a	–	–	–	–	–1,91 (s, 1H, $\text{N}\underline{\text{H}}$ pyrrole, interchangeable*), 0,31 (s, 1H, $\text{N}\underline{\text{H}}$ pyrrole, interchangeable*), 1,65 (m, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CH}_2\text{C=}$), 1,80 (m, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{CH-}$), 2,09 (m, 2H, $-\text{CHC}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{COO-}$), 2,33 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{COO-}$, interchangeable**), 2,61 (m, 1H, $-\text{CHCH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{COO-}$, interchangeable**), 3,24 (s, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C=}$, interchangeable***), 3,44 (s, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C=}$, interchangeable***), 3,63 (s, 3H, $\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C=}$, interchangeable***), 3,72 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C=}$), 4,30 (m, 1H, $-\text{C}\underline{\text{H}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 4,52 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{H-}}$), 5,11 (m, 1H, $=\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}$, interchangeable****), 5,23 (m, 1H, $=\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CO}$, interchangeable****), 6,19 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}_2\text{C}=\text{CH-}$, <i>cis</i>), 6,41 (d, $J = 17,7$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}_2\text{C}=\text{CH-}$, <i>trans</i>), 8,25 (m, 1H, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}\underline{\text{H-}}$), 8,88 (s, 1H, $-\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C-}$, interchangeable*****), 9,48 (s, 1H, $-\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C-}$, interchangeable*****) et 9,78 (s, 1H, $-\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}=\text{C-}$, interchangeable*****).
Lys1	7,82	4,44	1,56	1,43	ϵ - $\text{CH}_2 = 3,00$; γ - $\text{CH}_2 = 1,25$
Asp	8,33	4,55	2,48 2,65	–	
Lys2	7,66	4,44	1,52	1,44	ϵ - $\text{CH}_2 = 2,72$; γ - $\text{CH}_2 = 1,32$
Pro1	–	4,31	1,94 2,15	3,49 3,53	γ - $\text{CH}_2 = 1,83$
Pro2	–	4,48	1,74 2,09	3,42 3,61	γ - $\text{CH}_2 = 1,80$
Arg	7,96	4,14	1,59 1,73	3,11	γ - $\text{CH}_2 = 1,50$; ϵ - $\text{NH} = 7,58$

PARTIE EXPERIMENTALE

HRMS (ESI+) : m/z calculée pour $C_{93}H_{127}N_{16}O_{17}P$ $[M + 2H]^{2+}$ 886,4724 ; mesurée $[M + 2H]^{2+}$ 886,4712. **UV/Vis (MeOH)** : λ_{max} ($\log \epsilon$) = 410 (4,71), 507 (3,73), 539 (3,71), 609 (3,71), 666 nm (4,37).

I.8. Caractérisation du composé Alc1'-KDKPPR (16)



Formule chimique : $C_{60}H_{95}N_{12}O_{15}P$
Masse moléculaire : 1255,4628 $g \cdot mol^{-1}$

La synthèse de ce composé a déjà été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , δ) :

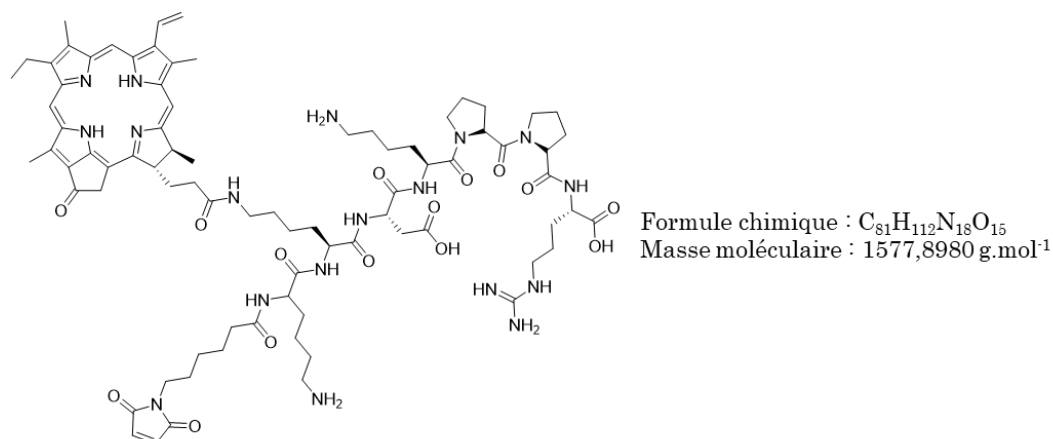
	NH	α -H	β -H	δ -H	Autres
Alc1'	-	-	-	-	1,13 (m, 9H, $C\bar{H}_3$ -CCH-), 1,17 (m, 3H, $C\bar{H}_3$ -CH ₂ O-, interchangeable#), 1,24 (m, 3H, $C\bar{H}_3$ -CH ₂ O-, interchangeable#), 1,48 (m, 3H, $C\bar{H}_3$ -CH-), 1,20-2,0 (m, 7H, -NCH-P- et $C\bar{H}_3$ -CN-), 3,93 (m, 2H, CH ₃ -CH ₂ O-, interchangeable##), 4,03 (m, 2H, CH ₃ -CH ₂ O-, interchangeable##), 5,17 (m, 1H, CH ₃ -C \bar{H} -), 7,45 et 7,58 (m, 9H, C \bar{H} phényle)
Lys ₁	7,92	4,26	1,60	1,47	ϵ -CH ₂ = 2,75 ; γ -CH ₂ = 1,32
Asp	8,40	4,61	2,54 2,71	-	
Lys ₂	7,82	4,44	1,60	1,47	ϵ -CH ₂ = 2,75 ; γ -CH ₂ = 1,32
Pro ₁	-	4,36	1,86 2,05	3,56 3,62	γ -CH ₂ = 1,90
Pro ₂	-	4,56	1,83 2,14	3,48 3,66	γ -CH ₂ = 1,86
Arg	8,02	4,16	1,61 1,76	3,13	γ -CH ₂ = 1,56 ; ϵ -NH = 7,72

HRMS (ESI+) : m/z calculée pour $C_{60}H_{95}N_{12}O_{15}P$ $[M + H]^+$ 1255,6850, $[M + 2H]^{2+}$ 628,3461 ; mesurée $[M + H]^+$ 1255,6750, $[M + 2H]^{2+}$ 628,3450.

I.9. Synthèse du peptide t-Lyp1 et des peptides de l'Alascan

La synthèse et les caractérisations de ces peptides ont déjà été décrites dans la publication incluse dans le Chapitre III § III.2.

I.10. Synthèse du composé Mal-KK(Pyro-a)-DKPPR (27)



La réaction de couplage entre le composé **25** et la Fmoc-Lys(Boc)-OH (3 éq) a été effectuée en présence de HBTU (3 éq), NMP (3 éq) et NMM (9 éq) dans le DMF et le mélange réactionnel a été agité pendant 12 h. Tous les excès de réactifs solubles ont été éliminés par filtration et lavage avec du DMF, de l'EtOH et du DCM. Après déprotection de l'extrémité *N*-terminale du composé **26** ainsi obtenu, en présence d'une solution de pipéridine dans le DMF (20/80, v/v), l'acide malimidohexanoïque (1,2 éq) a été couplé dans les mêmes conditions que la lysine. Le composé **27** brut a ensuite été obtenu après clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales en présence d'une solution de TFA/TIPS/H₂O (92,5/2,5/5, v/v/v) pendant 2 h puis la résine a été filtrée et lavée avec du TFA et du DCM. Le filtrat a été séché sous vide et le composé a été précipité dans l'éther diéthylique à froid par centrifugation. Le composé **27** a été purifié par HPLC préparative avec un gradient de 10% à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min et finalement obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement de 16% et une pureté HPLC > 99%.

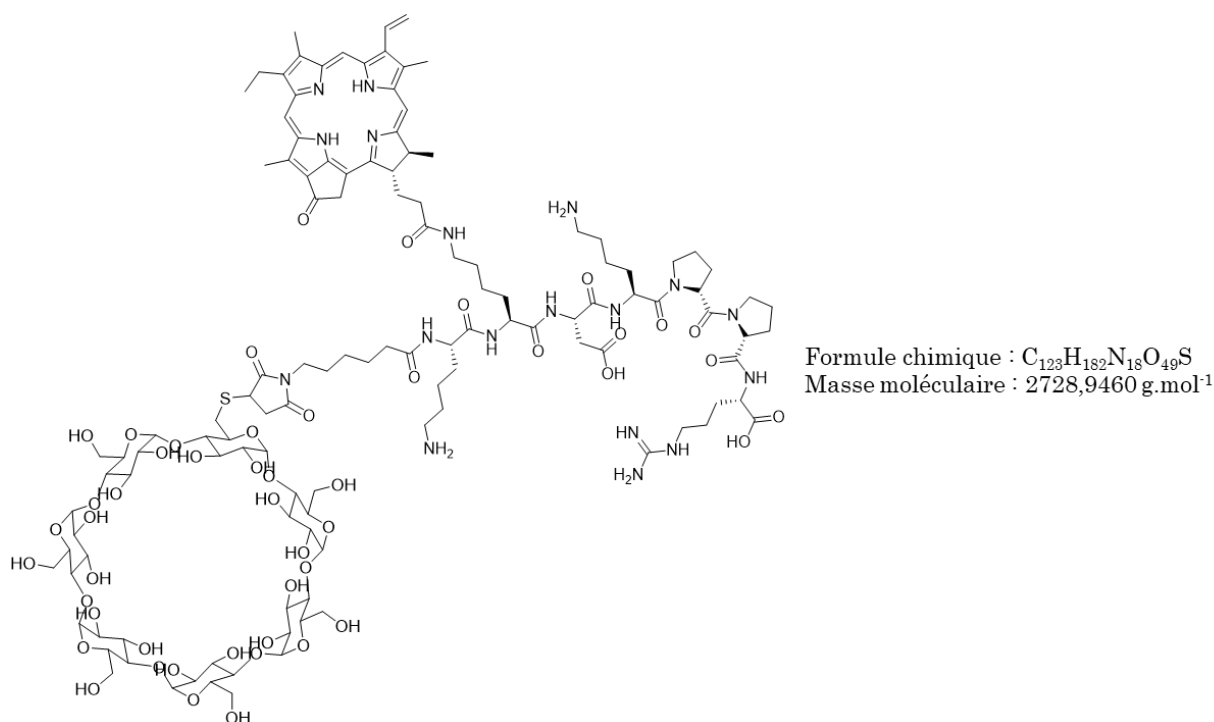
PARTIE EXPERIMENTALE

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) :

	NH	α-H	β-H	δ-H	Autres
Pyro-a	-	-	-	-	-1,90 (s, 2H, <u>NH</u> pyrrole, interchangeable*), 0,33 (s, 2H, <u>NH</u> pyrrole, interchangeable*), 1,65 (m, 3H, <u>CH</u> ₃ CH ₂ C=), 1,81 (m, 3H, <u>CH</u> ₃ CH-), 2,17 (m, 2H, -CHC <u>H</u> ₂ CH ₂ COO-), 2,38 (m, 1H, -CHCH ₂ C <u>H</u> COO-, interchangeable**), 2,61 (m, 1H, -CHCH ₂ C <u>H</u> COO-, interchangeable**), 3,25 (s, 3H, <u>CH</u> ₃ C=, interchangeable***), 3,45 (s, 3H, <u>CH</u> ₃ C=, interchangeable***), 3,64 (s, 3H, <u>CH</u> ₃ C=, interchangeable***), 3,75 (m, 2H, CH ₃ C <u>H</u> C=), 4,30 (m, 1H, -C <u>H</u> CH ₂ CH ₂ COO), 4,58 (m, 1H, CH ₃ C <u>H</u> -), 5,14 (d, <i>J</i> = 20,2 Hz, 1H, =C-C <u>H</u> CO, interchangeable****), 5,24 (d, <i>J</i> = 20,2 Hz, 1H, =C-C <u>H</u> CO, interchangeable****), 6,23 (d, <i>J</i> = 11,7 Hz, 1H, <u>H</u> ₂ C=CH-, <i>cis</i>) et 6,41 (d, <i>J</i> = 16,7 Hz, 1H, <u>H</u> ₂ C=CH-, <i>trans</i>), 8,25 (m, 1H, H ₂ C=C <u>H</u> -), 8,90 (s, 1H, -C-C <u>H</u> =C-, interchangeable*****), 9,49 (s, 1H, -C-C <u>H</u> =C-, interchangeable*****) et 9,78 (s, 1H, -C-C <u>H</u> =C-, interchangeable*****)
Mal	-	-	-	-	6,91 (s, 2H, OC-C <u>H</u> =C <u>H</u> -CO), 3,23 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,37 (m, 4H), 1,08 (m, 2H)
Lys ₁ ^a	7,89	4,18	1,71	1,59	ε-CH ₂ = 2,99 ; γ-CH ₂ = 1,51
Lys ₂ ^a	7,79	4,19	1,59	1,46	ε-CH ₂ = 2,99 ; γ-CH ₂ = 1,29
Asp	8,12	4,50	2,66	-	-
			2,46		
Lys ₃ ^a	7,64	4,43	1,55	1,47	ε-CH ₂ = 2,74 ; γ-CH ₂ = 1,29
Pro ₁	-	4,31	2,61	3,55	γ-CH ₂ = 2,15
			2,36	3,51	
Pro ₂	-	4,49	2,64	3,61	γ-CH ₂ = 2,09
			2,47	3,43	
Arg	7,96	4,14	1,71	3,09	γ-CH ₂ = 1,51 ; ε-NH = 7,54
			1,59		

^aInterchangeables.

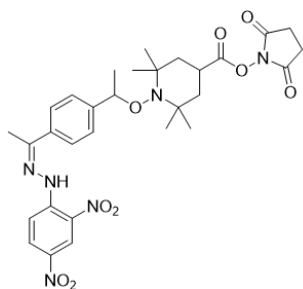
MS (ESI+) : *m/z* calculée pour C₈₁H₁₁₂N₁₈O₁₅ [M + H]⁺ 1579, [M + 2H]²⁺ 790, [M + 3H]³⁺ 527 et [M + 4H]⁴⁺ 395 ; mesurée [M + H]⁺ 1579, [M + 2H]²⁺ 790, [M + 3H]³⁺ 527 et [M + 4H]⁴⁺ 395.

I.11. Synthèse du composé β -CD-KK(Pyro-a)-DKPPR (28)

Le composé β -CD-SH (10,10 mg, 9 μmol , 1,35 eq) a été solubilisé dans un tampon PBS (2 mL) et la solution a été chauffée à 40°C . le composé **27** (10,21 mg, 6 μmol , 1 eq) préalablement solubilisé dans le DMF (1,2 mL), a été ajouté goutte à goutte en 6 portions toutes les 15 min. Le milieu réactionnel a ensuite été agité pendant 24 h puis évaporé sous pression réduite. Un suivi par RMN ^1H a été effectué confirmant la disparition du signal à 6,91 ppm correspondant à la double liaison du maléimide. Le composé **28** a été purifié par HPLC préparative selon un gradient de 10% à 100% ACN dans l'eau + 0,1% TFA en 15 min suivi d'un isocratique à 100% ACN + 0,1% TFA pendant 10 min et finalement obtenu sous forme d'un solide vert avec un rendement de 26% et une pureté HPLC > 99%.

MS (ESI+) : m/z calculée pour $C_{123}H_{182}N_{18}O_{49}S$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 1365, $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 910 et $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 683 ; mesurée $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 1365, $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 910 et $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ 683.

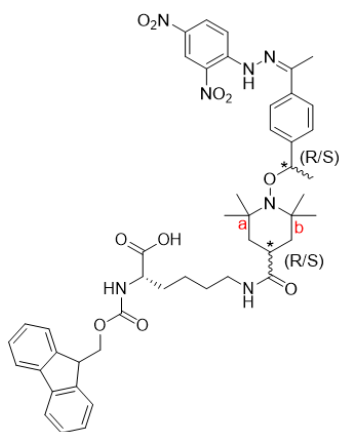
I.12. Synthèse du composé ester Alc2–NHS (29)



Formule chimique : $C_{30}H_{36}N_6O_9$
 Masse moléculaire : $624,6510 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte, l'Alc2 (250 mg, 474 μmol , 1 éq) a été solubilisée dans un mélange anhydre de DCM/DMF (20 mL, 85/15, v/v), puis le NHS (81,8 mg, 711 μmol , 1,5 éq) et EDCI·HCl (136,3 mg, 711 μmol , 1,5 éq) ont été ajoutés à la solution. Le mélange a été agité à 40°C, pendant 20 h. La solution a ensuite été évaporée sous pression réduite. Le composé **29** a été obtenu sans purification avec un rendement quantitatif et utilisé tel quel pour l'étape suivante.

I.13. Synthèse du composé Fmoc–K(Alc2) (30)



Formule chimique : $C_{47}H_{55}N_7O_{10}$
 Masse moléculaire : $877,9960 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

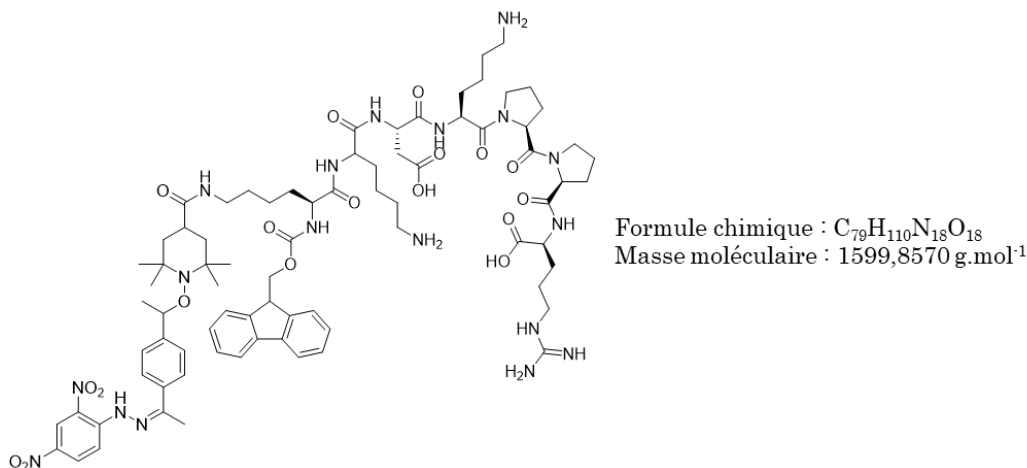
Dans l'obscurité et sous atmosphère inerte à 0°C, le composé **29** (269,8 mg, 433 μmol , 1 éq) a été solubilisé dans du CHCl_3 (18 mL). La triéthylamine (133 μL , 953 μmol , 2,2 éq) a été ajoutée à la Fmoc–Lys–OH Nε–chlorhydrate (210 mg, 520 μmol , 1,2 éq), initialement solubilisé dans du DMF anhydre (2 mL). Cette solution a été ajoutée à la solution du composé **29**. Le mélange réactionnel a alors été agité à température ambiante sous argon pendant 24 h. Les mêmes équivalents de triéthylamine et de Fmoc–Lys–OH Nε–chlorhydrate ont été de nouveau ajoutés et la solution a été agitée pendant encore 24 h. Le milieu réactionnel a ensuite été évaporé sous pression réduite. La purification du produit brut a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice avec un éluant DCM/EtOH (gradient de 95/5 à 85/15, v/v). Le composé **30** a été obtenu sous forme de solide

orange et d'un mélange de 4 stéréoisomères avec un rendement de 70% et une pureté HPLC de 98%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) : 0,62 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ **a**, interchangeable*), 1,01 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ **a**, interchangeable*), 0,85 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ **b**, interchangeable**), 1,23 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ **b**, interchangeable**), 1,35 (m, 2H, $\gamma-\text{CH}_2$ Lys), 1,39 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}$, interchangeable***), 1,53 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}$, interchangeable***), 1,43 (m, 3H, $\text{NO}-\text{CH}-\text{CH}_3$) 1,64 (m, 4H, β et $\delta-\text{CH}_2$ Lys), 2,45 (m, 1H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}$), 2,59 (s, 3H, $\text{N}=\text{C}-\text{CH}_3$) 3,00 (m, 2H, $\varepsilon-\text{CH}_2$ Lys), 3,83 (m, 2H, $\alpha-\text{H}$ Lys), 4,20 (m, 1H, CH Fmoc), 4,29 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4,80 (m, 1H, $\text{NO}-\text{CH}-\text{CH}_3$), 7,28 (m, 1H, $\varepsilon-\text{NH}$ Lys), 7,34 et 7,82 (m, 8H, CH phényl-Fmoc), 7,39 (m, 2H, $\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{C}(\text{=N})$), 7,78 (m, 1H, NH Lys), 7,90 (m, 2H, $\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{C}(\text{=N})$), 8,07 (m, 1H, $\text{C}(\text{NO}_2)-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{NH}$), 8,37 (m, 1H, $\text{C}(\text{NO}_2)-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{NH}$) et 8,88 (m, 1H, $\text{C}(\text{NO}_2)-\text{CH}=\text{C}(\text{NO}_2)$).

MS (ESI+) : m/z calculée pour $\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{10}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ 878$; mesurée $[\text{M} + \text{H}]^+ 878$.

I.14. Essais de synthèse du composé Fmoc-K(Alc2)KDKPPR (31)



La réaction de couplage entre les composés **17** et **30** (1,2 éq) a été effectuée soit en présence de HBTU (3 éq), NMP (3 éq) et NMM (9 éq) dans le DMF soit en présence de PyBOP (3 éq) et DIPEA (3 éq) dans le DMF. Dans les deux cas, le mélange réactionnel a été agité pendant 12 h. Tous les excès de réactifs solubles ont été éliminés par filtration et lavage avec du DMF, de l'EtOH et du DCM. A l'issue de ces synthèses, des micro-clivages en présence de TFA/TIPS/ H_2O (95/2,5/5, v/v/v) ont été effectués pendant 1 h puis la résine a été filtrée et lavée avec du TFA et du DCM. Le filtrat a été séché sous vide et le composé a été précipité dans l'éther diéthylique à froid par centrifugation.

II. Détermination des propriétés photophysiques

Tous les spectres ont été mesurés en utilisant des cuves quartz à 4 faces.

II.1. Absorption

Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec un spectrophotomètre UV-visible double faisceau UV-3600 (Shimadzu, Marne la Vallée, France). Les solutions mères ont été préparées à des concentrations de 1 mg.mL^{-1} dans le DMSO puis diluées dans les solvants étudiés jusqu'à obtenir une absorbance inférieure à 0,2 à la longueur d'onde d'excitation.

II.2. Emission de fluorescence et de luminescence de $^1\text{O}_2$

Les spectres d'émission de fluorescence et de $^1\text{O}_2$ ont été mesurés avec un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-222 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) équipé d'une lampe à arc xénon de 450 W, d'un compartiment porte-cuve thermostaté (25°C), d'un photomultiplicateur UV-visible R928 (Hamamatsu Japon) et d'un détecteur infrarouge InGaAs refroidi à l'azote liquide (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). Le faisceau d'excitation est diffracté par un monochromateur double réseaux SPEX (1200 traits/mm blasé à 330 nm). La fluorescence a été mesurée par le détecteur UV-Visible *via* le monochromateur d'émission double réseaux SPEX (1200 traits/mm blasé à 500 nm). La production de $^1\text{O}_2$ a été mesurée par le détecteur infrarouge *via* le monochromateur d'émission double réseaux SPEX (600 traits/mm blasé à $1 \mu\text{m}$) et un filtre passe haut à 780 nm.

Le rendement quantique en fluorescence a été déterminé par l'équation (17) :

$$\Phi_f = \Phi_{f_0} \cdot \frac{I_f}{I_{f_0}} \cdot \frac{DO_0}{DO} \cdot \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 \quad (17)$$

Avec Φ_f et Φ_{f_0} , les rendements quantiques, I_f et I_{f_0} , les intensités de fluorescence, DO et DO_0 , les densités optiques et n et n_0 , les indices de réfraction, de l'échantillon et de la référence respectivement.

La référence utilisée pour le calcul du rendement quantique de fluorescence est la tétraphénylporphyrine dans le toluène avec un Φ_{f_0} de 0,11.²¹³

Le rendement quantique de production de $^1\text{O}_2$ est déterminé par l'équation (y) :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO} \quad (18)$$

Avec Φ_{Δ} et $\Phi_{\Delta 0}$, les rendements quantiques de production d' $^1\text{O}_2$, I et I_0 , les intensités de production d' $^1\text{O}_2$ et DO et DO_0 les densités optiques, de l'échantillon et de la référence respectivement.

La référence utilisée pour le calcul du rendement quantique de production d' $^1\text{O}_2$ est le Rose de Bengale dans le DMSO avec $\Phi_{\Delta 0} = 0,16$, dans l'EtOH avec $\Phi_{\Delta 0} = 0,68$, dans le D_2O avec $\Phi_{\Delta 0} = 0,76$ et dans le MeOH avec $\Phi_{\Delta 0} = 0,76$.⁶⁹

Les durées de vie de fluorescence ont été mesurées en utilisant pour l'excitation une diode laser pulsée à 407 nm (LDH-P-C-400M, FWHM < 70 ps, 1 MHz) couplée à un générateur d'impulsions PDL 800-D (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) et pour la détection une photodiode à avalanche SPCM-AQR-15 (EG & G, Vaudreuil, Canada) couplée à un filtre passe haut à 650 nm.

L'acquisition a été réalisée par un module PicoHarp 300 associé à un routeur 4 voies PHR-800 (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany). Les déclins de fluorescence ont été enregistrés en utilisant la méthode de comptage monophotonique (Time Correlated Single Photon Counting TCSPC). Les données ont été collectées jusqu'à obtenir 1000 coups accumulés dans un canal puis analysés en utilisant le logiciel de TCSPC Fluofit (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) basé sur une reconvolution itérative utilisant un algorithme de Levensberg-Marquandt permettant l'obtention de déclins multi-exponentiels (principalement mono- ou bi-exponentiels dans notre cas).

Les mesures de durées de vie d' $^1\text{O}_2$ ont été réalisées avec un spectrophotomètre TEMPRO-01 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) composé d'une diode d'excitation pulsée SpectraLED-415 à 415 nm, d'un compartiment porte-cuve, d'un monochromateur d'émission de type Seya-Namioka (600 – 2000 nm) et d'un tube photomultiplicateur proche infra-rouge régulé thermo-électriquement H10330-45 (Hamamatsu, Japon). Le montage est piloté par le module de comptage FluoroHub-B et les logiciels DataStation et DAS6 (Horiba Jobin Yvon).

II.3. Photoblanchiment

Cette partie a été décrite la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

III. Photolabilité des alcoxyamines

III.1. Dispositifs d'illumination

III.1.1. Illumination de Alc1

III.1.1.1. Suivi par HPLC – Irradiateur

Lors des essais de photoclivage par irradiations aux rayons X, les échantillons ont été irradiés à l'aide d'un irradiateur biologique à rayons X, X-RAD 320 (Precision X-Ray INC., North BRANFORD, CT, USA), avec une anode en tungstène. Les photons ont été produits par des tubes à rayons X et ont produit des distributions d'énergie continues. Les paramètres du tube étaient réglés à des énergies moyennes des photons de 160 et 320 keV avec un courant réglé de 0,5 à 12,5 mA. Un filtre en Al de 2 mm a été utilisé pour éliminer les photons de faible énergie.

III.1.1.2. Suivi par HPLC – Lampe à vapeur de mercure

Lors des premières expériences avec suivi par HPLC du photoclivage, l'illumination des cuves a été effectuée à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure haute pression 500 W présentant des raies principales à 254 et 365 nm, avec une puissance de 125 mW.cm⁻².

III.1.1.3. Suivi par RPE – Lampe UV

Lors des expériences suivantes avec suivi par RPE du photoclivage, l'illumination des capillaires a été effectuée à l'extérieur de la cavité avec une chambre d'illumination fabriquée en laboratoire à l'Institut de Chimie de Strasbourg, composée de 4 ampoules UV identiques avec un maximum de 365 nm, soit $h = 3,4$ eV et $E = 1,5$ mW.cm⁻² par lampe (mesurée avec un wattmètre (1936-C Newport)).

III.1.2. Illumination de Alc2 – Lampe AURA light

Les illuminations des capillaires à 475 nm ont été effectuées avec une lampe AURA light engine® équipée de 5 sources lumineuses contrôlées indépendamment à 360 nm, 475 nm, 555 nm, 635 nm et 730 nm, couplée à une fibre optique. Les sources à 360 nm et 475 nm ont été utilisées avec des puissances de sortie respectives de 17,5 mW.cm⁻² et 22 mW.cm⁻².

III.2. Préparations des échantillons

III.2.1. Suivi par HPLC

Les solutions illuminées ont été préparées à une concentration de 10^{-3} M dans le DMSO avec 2 éq de TEMPO et illuminées dans une cuve quartz à 4 faces. Des prélèvements ont été effectués au cours de l'illumination et dilués par 20 dans l'ACN avant d'être analysés par HPLC.

III.2.2. Suivi par RPE

Cette partie a été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

III.3. Spectroscopie RPE

La méthodologie utilisée pour cette technique dans l'ensemble de cette thèse est décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

IV. Tests d'affinité LBA

Cette partie a été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre II § VIII.

V. Modélisation moléculaire

Cette partie a été décrite dans la publication incluse dans le Chapitre III § III.3.

VI. Détermination des Log P

La lipophilie des composés a été déterminée par la méthode traditionnelle « shake-flask » dans un mélange 1-octanol/eau Milli-Q à 37°C. Cent microlitres de solutions de chaque composé à 1 mM dans le DMSO, ont été mélangés avec un volume égal de n-octanol et d'eau Milli-Q dans un tube à hémolyse. Les tubes à essai ont été agités pendant 3 heures à 37°C, puis laissés au repos pendant 15 minutes. Après séparation, 100 μ L de chaque phase ont été prélevés et dilués dans 2 ml d'EtOH et les absorptions des solutions ont été mesurées par UV-vis (410 nm). Le coefficient de partage des composés, log P, a été déterminé par l'équation (19) :

$$\log P = \log \frac{A_{\varphi_{\text{orga}}}}{A_{\varphi_{\text{aq}}}} \quad (19)$$

PARTIE EXPERIMENTALE

Où $A_{\varphi_{\text{orga}}}$ est l'absorption de la phase organique (n-octanol) et $A_{\varphi_{\text{aq}}}$ est l'absorption de la phase aqueuse.

Références

- 1 Cancer, <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, (accessed 17 August 2020).
- 2 Cancer today, <http://gco.iarc.fr/today/home>, (accessed 14 June 2019).
- 3 Le ou les cancers ? – Qu'est-ce qu'un cancer ?, <https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Qu-est-ce-qu-un-cancer/Le-ou-les-cancers>, (accessed 31 August 2020).
- 4 N. Hanna, B. Parfait, D. Vidaud and M. Vidaud, Mécanismes et conséquences des mutations, *médecine/sciences*, 2005, **21**, 969–980.
- 5 J. Lamoril, N. Ameziane, J.-C. Deybach, P. Bouizegarène and M. Bogard, Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité, *Immuno-Anal. Biol. Spéc.*, 2008, **23**, 331–352.
- 6 Le cancer | Fondation contre le Cancer, <https://www.cancer.be/le-cancer>, (accessed 2 September 2020).
- 7 Qu'est-ce qu'un cancer ? | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, <https://www.fondation-arc.org/cancer/quest-ce-quun-cancer>, (accessed 15 April 2020).
- 8 Cancer, <https://www.fondation-arc.org/cancer-le-diagnostic>, (accessed 2 September 2020).
- 9 Édition professionnelle du Manuel MSD, <https://www.msmanuals.com/fr/professional>, (accessed 3 September 2020).
- 10 M. L. James and S. S. Gambhir, A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications, *Physiol. Rev.*, 2012, **92**, 897–965.
- 11 Traitements – Se faire soigner, <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements>, (accessed 24 November 2020).
- 12 Cancer, <https://www.fondation-arc.org/traitements-soins-cancer/cancer-traitements-soins-de-support>, (accessed 15 April 2020).
- 13 D. Schaeue and W. H. McBride, Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2015, **12**, 527–540.
- 14 Qu'est-ce qu'un cancer du cerveau ?, <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-cerveau/quest-ce-quun-cancer-du-cerveau->, (accessed 11 November 2020).
- 15 P. J. Poirier, *Le Système nerveux central et périphérique: Formation, Fonction et rôle*, ARSEP.
- 16 Global Cancer Observatory, <http://gco.iarc.fr/>, (accessed 14 June 2019).
- 17 Tumeurs du cerveau: points clés – Tumeurs du cerveau, <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Tumeurs-du-cerveau/Points-cles>, (accessed 11 November 2020).
- 18 Tumeurs intracrâniennes, <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle/tumeurs-intracraniennes>, (accessed 11 November 2020).
- 19 F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi and S. U. Simjee, Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, 2017, **18**, 3–9.
- 20 A. Omuro and L. M. DeAngelis, Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review, *JAMA*, 2013, **310**, 1842–1850.
- 21 S. K. Carlsson, S. P. Brothers and C. Wahlestedt, Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme, *EMBO Mol. Med.*, 2014, **6**, 1359–1370.
- 22 P. D. Delgado-López and E. M. Corrales-García, Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities, *Clin. Transl. Oncol.*, 2016, **18**, 1062–1071.
- 23 W. Stummer, A. Novotny, H. Stepp, C. Goetz, K. Bise and H. J. Reulen, Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients, *J. Neurosurg.*, 2000, **93**, 1003–1013.

- 24 A. Johansson, G. Palte, O. Schnell, J.-C. Tonn, J. Herms and H. Stepp, 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX Levels in Tissue of Human Malignant Brain Tumors, *Photochem. Photobiol.*, 2010, **86**, 1373–1378.
- 25 T. J. Beck, F. W. Kreth, W. Beyer, J. H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, W. Stummer and R. Baumgartner, Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, *Lasers Surg. Med.*, 2007, **39**, 386–393.
- 26 A. Johansson, F. Faber, G. Kniebühler, H. Stepp, R. Sroka, R. Egensperger, W. Beyer and F.-W. Kreth, Protoporphyrin IX Fluorescence and Photobleaching During Interstitial Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas for Early Treatment Prognosis, *Lasers Surg. Med.*, 2013, **45**, 225–234.
- 27 W. Stummer, T. Beck, W. Beyer, J. H. Mehrkens, A. Obermeier, N. Etminan, H. Stepp, J.-C. Tonn, R. Baumgartner, J. Herms and F. W. Kreth, Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report, *J. Neurooncol.*, 2008, **87**, 103–109.
- 28 C. Dupont, M. Vermandel, H.-A. Leroy, M. Quidet, F. Lecomte, N. Delhem, S. Mordon and N. Reyns, INtraoperative photoDYNAMIC Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial, *Neurosurgery*, 2019, **84**, E414–E419.
- 29 R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, CRC Press, 2000.
- 30 O. Raab, Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien, *Z Biol*, 1900, **39**, 524–546.
- 31 A. Jesionek and H. von Tappenier, Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen., *Muench Med Wochenshr*, 1903, **47**, 2042–2044.
- 32 H. Fischer and F. Meyer-Betz, Zur Kenntnis der Porphyrinbildung I Mitteilung, *Biol. Chem.*, 1912, **82**, 96–108.
- 33 F. Meyer-Betz, Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs, *Dtsch Arch Klin Med*, 1913, **112**, 475–503.
- 34 M. Hamblin, *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational, and Clinical*, Artech House, 2008.
- 35 R.-M. Szeimies, J. Dräger, C. Abels and M. Landthaler, in *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, Elsevier, 2001, vol. 2, pp. 3–15.
- 36 A. Policard, Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood, *Comptes Rendus Séances Société Biol.*, 1924, **91**, 1423–1428.
- 37 H. Auler and G. Banzer, Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren, *Z. Für Krebsforsch.*, 1942, **53**, 65–68.
- 38 F. H. Figge and G. S. Weiland, Studies on cancer detection and therapy; the affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissue for porphyrins, metalloporphyrins, and radioactive zinc hematoporphyrin, *Anat. Rec.*, 1948, **101**, 657.
- 39 F. H. Figge and G. S. Weiland, Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 640–641.
- 40 D. S. Rassmussen-Taxdal, G. E. Ward and F. H. J. Figge, Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin, *Cancer*, 1955, **8**, 78–81.
- 41 G. C. Peck, H. P. Mack, W. A. Holbrook and F. H. Figge, Use of hematoporphyrin fluorescence in biliary and cancer surgery, *Am. Surg.*, 1955, **21**, 181–188.
- 42 H. Scherer, Chemisch-physiologische untersuchungen, *Ann Chem Pharm*, 1841, **40**, 1.
- 43 S. K. Schwartz, K. Absolon and H. Vermund, Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors, *Univ Minn Med Bull*, 1955, **27**, 7–8.

- 44 R. L. Lipson and E. J. Baldes, The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative, *Arch. Dermatol.*, 1960, **82**, 508–516.
- 45 R. L. Lipson, E. J. Baldes and M. J. Gray, Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, *Cancer*, 1967, **20**, 2255–2257.
- 46 I. Diamond, Antony F. McDonagh, Charles B. Wilson, Steven G. Granelli, S. Nielsen and R. Jaenicke, Photodynamic therapy of malignant tumours, *The Lancet*, 1972, **300**, 1175–1177.
- 47 T. J. Dougherty, G. B. Grindey, R. Fiel, K. R. Weishaupt and D. G. Boyle, Photoradiation Therapy. II. Cure of Animal Tumors With Hematoporphyrin and Light, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, **55**, 115–121.
- 48 J. F. Kelly, M. E. Snell and M. C. Berenbaum, Photodynamic destruction of human bladder carcinoma, *Br. J. Cancer*, 1975, **31**, 237–244.
- 49 Kelly J.F. and Snell M.E., Hematoporphyrin Derivative: A Possible Aid in the Diagnosis and Therapy of Carcinoma of the Bladder, *J. Urol.*, 1976, **115**, 150–151.
- 50 T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle and A. Mittleman, Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors, *Cancer Res.*, 1978, **38**, 2628–2635.
- 51 C. Monnereau and C. Andraud, Thérapie photodynamique : évolution chimique des photosensibilisateurs, *Tech. Ing. Innov. En Anal. Mes.*
- 52 K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr and T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers Med. Sci.*, 2009, **24**, 259–268.
- 53 C. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi and C. Cervellati, Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage, *Curr. Pharm. Des.*, 2004, **10**, 1611–1626.
- 54 M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1997, **39**, 1–18.
- 55 W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier, Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 2000, **319**, 376–400.
- 56 P. Couleaud, Thèse de doctorat, Vandoeuvre–les–Nancy, INPL, 2011.
- 57 M. R. Hamblin, Y. Huang and Y. Huang, *Handbook of Photomedicine*, CRC Press, 2013.
- 58 La lumière contre le cancer, http://www.reflexions.uliege.be/cms/c_41432/fr/la-lumiere-contre-le-cancer?portal=j_55&printView=true, (accessed 10 September 2020).
- 59 J. Ogien, Thèse de doctorat, Université Paris–Saclay, 2017.
- 60 C. Vicentini, Thèse de doctorat, Université du Droit et de la Santé – Lille II, 2019.
- 61 L. Brancalion and H. Moseley, Laser and Non–laser Light Sources for Photodynamic Therapy, *Lasers Med. Sci.*, 2002, **17**, 173–86.
- 62 M. Toussaint, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, 2016.
- 63 M. O. Senge and J. C. Brandt, Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20–Tetra(m–hydroxyphenyl)chlorin)—A Second–generation Photosensitizer, *Photochem. Photobiol.*, 2011, **87**, 1240–1296.
- 64 Foscan, https://www.has-sante.fr/jcms/c_1012344/fr/foscan, (accessed 16 September 2020).
- 65 R. R. Allison, V. S. Bagnato and C. H. Sibata, Future of oncologic photodynamic therapy, *Future Oncol.*, 2010, **6**, 929–940.
- 66 M. R. Detty, S. L. Gibson and S. J. Wagner, Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3897–3915.
- 67 R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield and M. C. Berenbaum, Hydroporphyrins of the meso–tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers, *Biochem. J.*, 1989, **261**, 277–280.

- 68 R. R. Allison and C. H. Sibata, Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, **7**, 61–75.
- 69 M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **233–234**, 351–371.
- 70 A. E. O'Connor, W. M. Gallagher and A. T. Byrne, Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 1053–1074.
- 71 Visudyne, https://www.has-sante.fr/jcms/c_2613515/fr/visudyne, (accessed 16 September 2020).
- 72 H. Abrahamse and M. R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.*, 2016, **473**, 347–364.
- 73 S. J. Keam, L. J. Scott and M. P. Curran, Verteporfin: A Review of its Use in the Management of Subfoveal Choroidal Neovascularisation, *Drugs*, 2003, **63**, 2521–2554.
- 74 A. Noweski, A. Roosen, S. Lebdaï, E. Barret, M. Emberton, F. Benzaghrou, M. Apfelbeck, B. Gaillac, C. Gratzke, C. Stief and A. R. Azzouzi, Medium-term Follow-up of Vascular-targeted Photodynamic Therapy of Localized Prostate Cancer Using TOOKAD Soluble WST-11 (Phase II Trials), *Eur. Urol. Focus*, 2019, **5**, 1022–1028.
- 75 Tookad, https://www.has-sante.fr/jcms/p_3103877/fr/tookad, (accessed 1 November 2020).
- 76 P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson and J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: An update, *CA. Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 250–281.
- 77 N. Sekkat, H. van den Bergh, T. Nyokong and N. Lange, Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics, *Molecules*, 2011, **17**, 98–144.
- 78 B. Krammer and K. Plaetzer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside, *Photochem Photobiol Sci*, 2008, **7**, 283–289.
- 79 J. L. Sessler and R. A. Miller, Texaphyrins: New drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy, *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **59**, 733–739.
- 80 Photodynamic Therapy Using Silicon Phthalocyanine 4 in Treating Patients With Actinic Keratosis, Bowen's Disease, Skin Cancer, or Stage I or Stage II Mycosis Fungoides – Full Text View – ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00103246>, (accessed 17 September 2020).
- 81 G. Shafirstein, N. R. Rigual, H. Arshad, M. T. Cooper, D. A. Bellnier, G. Wilding, W. Tan, M. Merzianu and B. W. Henderson, Photodynamic therapy with 3-(1'-hexyloxyethyl) pyropheophorbide-a for early-stage cancer of the larynx: Phase Ib study, *Head Neck*, 2016, **38**, E377–E383.
- 82 Tookad, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tookad>, (accessed 17 September 2020).
- 83 Un médicament de l'Institut Weizmann, le Tookad® soluble, approuvé au Mexique pour soigner le cancer de la prostate, <https://www.weizmann.ca/un-medicament-de-linstitut-weizmann-le-tookad-soluble-approuve-au-mexique-pour-soigner-le-cancer-de-la-prostate/>, (accessed 26 November 2020).
- 84 W. M. Chan, T.-H. Lim, A. Pece, R. Silva and N. Yoshimura, Verteporfin PDT for non-standard indications—a review of current literature, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2010, **248**, 613–626.
- 85 P. Avci, S. S. Erdem and M. R. Hamblin, Photodynamic Therapy: One Step Ahead with Self-Assembled Nanoparticles, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, **10**, 1937–1952.
- 86 S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa and T. Hasan, Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy, *Theranostics*, 2016, **6**, 2458–2487.

- 87 K. Ogawa and Y. Kobuke, Recent Advances in Two-Photon Photodynamic Therapy, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.–Anti-Cancer Agents*, 2008, **8**, 269–279.
- 88 G. S. He, L.–S. Tan, Q. Zheng and P. N. Prasad, Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 1245–1330.
- 89 C. Wang, L. Cheng and Z. Liu, Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics, *Theranostics*, 2013, **3**, 317–330.
- 90 S. S. Lucky, K. C. Soo and Y. Zhang, Nanoparticles in Photodynamic Therapy, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 1990–2042.
- 91 L. Larue, A. Ben Mihoub, Z. Youssef, L. Colombeau, S. Acherar, J. C. André, P. Arnoux, F. Baros, M. Vermandel and C. Frochot, Using X-rays in photodynamic therapy: an overview, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2018, **17**, 1612–1650.
- 92 T. André, E. Chastre, L. Kotelevets, J. Vaillant, C. Louvet, J. Balosso, E. Le Gall, S. Prévot and C. Gespach, Angiogenèse tumorale: physiopathologie, valeur pronostique et perspectives thérapeutiques, *Rev. Médecine Interne*, 1998, **19**, 904–913.
- 93 A. M. Bugaj, Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 1097.
- 94 A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz and H. Car, Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacol. Rep.*, 2012, **64**, 1020–1037.
- 95 G. Jori, E. Reddi, I. Cozzani and L. Tomio, Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumour-bearing mice, *Br. J. Cancer*, 1986, **53**, 615–621.
- 96 A. M. Richter, E. Waterfield, A. K. Jain, A. J. Canaan, B. A. Allison and J. G. Levy, Liposomal Delivery of a Photosensitizer, Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring a (bpd), to Tumor Tissue in a Mouse Tumor Model, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **57**, 1000–1006.
- 97 A. Safdar, J. Ma, F. Saliba, B. Dupont, J. R. Wingard, R. Y. Hachem, G. N. Mattiuzzi, P. H. Chandrasekar, D. P. Kontoyiannis, K. V. Rolston, T. J. Walsh, R. E. Champlin and I. I. Raad, Drug-Induced Nephrotoxicity Caused by Amphotericin B Lipid Complex and Liposomal Amphotericin B: A Review and Meta-Analysis, *Medicine (Baltimore)*, 2010, **89**, 236–244.
- 98 M. Gries, N. Thomas, J. Daouk, P. Rocchi, L. Choulier, J. Jubréaux, J. Pierson, A. Reinhard, V. Jouan–Hureaux, A. Chateau, S. Acherar, C. Frochot, F. Lux, O. Tillement and M. Barberi–Heyob, Multiscale Selectivity and in vivo Biodistribution of NRP-1-Targeted Theranostic AGuIX Nanoparticles for PDT of Glioblastoma, *Int. J. Nanomedicine*, 2020, **15**, 8739–8758.
- 99 W. Sharman, Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 53–76.
- 100 D. Fanuel–Barret, T. Patrice, M.–T. Foulter, V. Vonarx–Coinsmann, N. Robillard and Y. Lajat, Influence of epidermal growth factor on photodynamic therapy of glioblastoma cells in vitro, *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 1997, **197**, 219–233.
- 101 S. V. Lutsenko, N. B. Feldman, G. V. Finakova, G. A. Posypanova, S. E. Severin, K. G. Skryabin, M. P. Kirpichnikov, E. A. Lukyanets and G. N. Vorozhtsov, Targeting Phthalocyanines to Tumor Cells Using Epidermal Growth Factor Conjugates, *Tumor Biol.*, 1999, **20**, 218–224.
- 102 L. C. Murphy, H. Dotzlaw, E. Leygue, A. Coutts and P. Watson, The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer 11 Proceedings of the 13th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology “Recent Advances in Steroid Biochemistry & Molecular Biology” Monaco 25–28 May 1997., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **65**, 175–180.
- 103 D. A. James, N. Swamy, N. Paz, R. N. Hanson and R. Ray, Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin–estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2379–2384.

- 104N. Swamy, D. A. James, S. C. Mohr, R. N. Hanson and R. Ray, An estradiol–Porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor–Positive breast cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 3237–3243.
- 105E. H. Khan, H. Ali, H. Tian, J. Rousseau, G. Tessier, Shafiullah and J. E. van Lier, Synthesis and biological activities of phthalocyanine–estradiol conjugates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1287–1290.
- 106A. Stallivieri, F. Baros, G. Jetpisbayeva, B. Myrzakhmetov and C. Frochot, The Interest of Folic Acid in Targeted Photodynamic Therapy, *Curr. Med. Chem.*, 2015, **22**, 3185–3207.
- 107R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.–F. Müller and M. Barberi–Heyob, Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2799–2808.
- 108H. Azais, C. Frochot, A. Grabarz, S. Khodja Bach, L. Colombeau, N. Delhem, S. Mordon and P. Collinet, Photosensibilisateur spécifique pour la thérapie photodynamique ciblée des métastases péritonéales des cancers ovariens, *Gynécologie Obstétrique Fertil. Sénologie*, 2017, **45**, 190–196.
- 109World Intellectual Property Organization, WO2019016397A1, 2019.
- 110P. C. Brooks, R. A. Clark and D. A. Cheresh, Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science*, 1994, **264**, 569–571.
- 111C. Frochot, B. D. Stasio, R. Vanderesse, M.–J. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemin, M.–L. Viriot and M. Barberi–Heyob, Interest of RGD–containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity, *Bioorganic Chem.*, 2007, **35**, 205–220.
- 112K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas and M. J. Cross, Vascular endothelial growth factor receptor–2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition, *Cell. Signal.*, 2007, **19**, 2003–2012.
- 113S. Djordjevic and P. C. Driscoll, Targeting VEGF signalling via the neuropilin co–receptor, *Drug Discov. Today*, 2013, **18**, 447–455.
- 114L. M. Ellis, The role of neuropilins in cancer, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 1099–1107.
- 115L. Chen, Y. Shi and R. Qiu, Neuropilin–1 (NRP–1), a Novel Molecular Target of Glioma, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2016, **16**, 6657–6666.
- 116A. Dumond, L. Demange and G. Pagès, Les neuropilines: Des cibles pertinentes pour améliorer le traitement des cancers, *médecine/sciences*, 2020, **36**, 487–496.
- 117A. Curnow, J. C. Haller and S. G. Bown, Oxygen monitoring during 5–aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon: Comparison of continuous and fractionated light regimes, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2000, **58**, 149–155.
- 118L. Larue, B. Myrzakhmetov, A. Ben–Mihoub, A. Moussaron, N. Thomas, P. Arnoux, F. Baros, R. Vanderesse, S. Acherar and C. Frochot, Fighting Hypoxia to Improve PDT, *Pharmaceuticals*, 2019, **12**, 163.
- 119L. W. Jones and R. T. Major, Substituted O–Alkyl hydroxylamines chemically related to medicinally valuable amines, *J. Am. Chem. Soc.*, 1927, **49**, 1527–1540.
- 120United States, US4581429A, 1986.
- 121P. Nesvadba, N–Alkoxyamines: Synthesis, Properties, and Applications in Polymer Chemistry, Organic Synthesis, and Materials Science, *Chim. Int. J. Chem.*, 2006, **60**, 832–840.
- 122G. Audran, P. Brémond and S. R. A. Marque, Labile alkoxyamines: past, present, and future, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7921–7928.
- 123Y. Guillaneuf, D. Bertin, D. Gimes, D.–L. Versace, J. Lalevée and J.–P. Fouassier, Toward Nitroxide–Mediated Photopolymerization, *Macromolecules*, 2010, **43**, 2204–2212.

- 124G. Audran, P. Brémond, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, Alkoxyamines: a new family of pro-drugs against cancer. Concept for theranostics, *Org Biomol Chem*, 2014, **12**, 719–723.
- 125D. Moncelet, P. Voisin, N. Koonjoo, V. Bouchaud, P. Massot, E. Parzy, G. Audran, J.-M. Franconi, E. Thiaudière, S. R. A. Marque, P. Brémond and P. Mellet, Alkoxyamines: Toward a New Family of Theranostic Agents against Cancer, *Mol. Pharm.*, 2014, **11**, 2412–2419.
- 126J. C. Scaiano, C. Aliaga, M. N. Chrétien, M. Frenette, K. S. Focsaneanu and L. Mikelsons, Fluorescence sensor applications as detectors for DNA damage, free radical formation, and in microlithography, *Pure Appl. Chem.*, 2005, **77**, 1009–1018.
- 127L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, 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**, 153–164.
- 128N. Thomas, D. Bechet, P. Becuwe, L. Tirand, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2009, **96**, 101–108.
- 129N. Thomas, M. Pernot, R. Vanderesse, P. Becuwe, E. Kamarulzaman, D. Da Silva, A. François, C. Frochot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **80**, 226–235.
- 130E. Kamarulzaman, R. Vanderesse, A. M. Gazzali, M. Barberi-Heyob, C. Boura, C. Frochot, O. Shawkataly, A. Aubry and H. A. Wahab, Molecular modelling, synthesis and biological evaluation of peptide inhibitors as anti-angiogenic agent targeting neuropilin-1 for anticancer application, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2017, **35**, 26–45.
- 131E. Thomas, L. Colombeau, M. Gries, T. Peterlini, C. Mathieu, N. Thomas, C. Boura, C. Frochot, R. Vanderesse, F. Lux, M. Barberi-Heyob and O. Tillement, Ultrasmall AGuIX theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of glioblastoma, *Int. J. Nanomedicine*, 2017, **12**, 7075–7088.
- 132J. C. Scaiano, T. J. Connolly, N. Mohtat and C. N. Pliva, Exploratory study of the quenching of photosensitizers by initiators of free radical ‘living’ polymerization, *Can. J. Chem.*, 1997, **75**, 92–97.
- 133D.-L. Versace, Y. Guillaneuf, D. Bertin, J. P. Fouassier, J. Lalevée and D. Gigmes, Structural effects on the photodissociation of alkoxyamines, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2892–2898.
- 134Y. Guillaneuf, D.-L. Versace, D. Bertin, J. Lalevée, D. Gigmes and J.-P. Fouassier, Importance of the Position of the Chromophore Group on the Dissociation Process of Light Sensitive Alkoxyamines, *Macromol. Rapid Commun.*, 2010, **31**, 1909–1913.
- 135D.-L. Versace, J. Lalevée, J.-P. Fouassier, Y. Guillaneuf, D. Bertin and D. Gigmes, Photodissociation Rate Constants of New Light Sensitive Alkoxyamines, *Macromol. Rapid Commun.*, 2010, **31**, 1383–1388.
- 136B. Myrzakhmetov, P. Arnoux, S. Mordon, S. Acherar and C. Frochot, Photophysical properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a and Photofrin in different conditions, *Pharmaceuticals*, Under review.
- 137R. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. 1. Synthesis of a tetrapeptide, *J Am Chem Soc*, 1963, **85**, 2149–2154.
- 138 *Solid Phase Peptide Synthesis*, Bachem.
- 139J. M. Palomo, Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 32658–32672.

- 140C.–H. Wong and S. C. Zimmerman, Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1679–1695.
- 141F. Albericio, Orthogonal protecting groups for N α -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis, *Pept. Sci.*, 2000, **55**, 123–139.
- 142R. Behrendt, P. White and J. Offer, Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis, *J. Pept. Sci.*, 2016, **22**, 4–27.
- 143M. Amblard, J.–A. Fehrentz, J. Martinez and G. Subra, Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, *Mol. Biotechnol.*, 2006, **33**, 239–254.
- 144S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft and W. C. Chan, An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1603–1606.
- 145I. Coin, M. Beyermann and M. Bienert, Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 3247–3256.
- 146M. Amblard, J.–A. Fehrentz, J. Martinez and G. Subra, in *Peptide Synthesis and Applications*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005, vol. 298, pp. 3–24.
- 147E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. I. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.
- 148W. S. Hancock and J. E. Battersby, A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid, *Anal. Biochem.*, 1976, **71**, 260–264.
- 149T. Christensen and C. T, A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil, *Acta Chem. Scand. B*, 1979, **33**, 763–766.
- 150D. A. T. Pires, M. P. Bemquerer and C. J. do Nascimento, Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2014, **20**, 53–69.
- 151J. C. Sheehan and G. P. Hess, A New Method of Forming Peptide Bonds, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1067–1068.
- 152J. Sheehan, P. Cruickshank and G. Boshart, A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides., *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 2525–2528.
- 153C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 10827–10852.
- 154B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin and C. Selve, Peptide coupling reagents. IV. N-[Oxytris (dimethylamino) phosphonium] benzotriazole hexafluorophosphate, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **14**, 1219–1222.
- 155D. M. M. Jaradat, Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation, *Amino Acids*, 2018, **50**, 39–68.
- 156J. Coste, D. Le-Nguyen and B. Castro, PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 205–208.
- 157F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S. A. Triolo, L. A. Carpino and S. A. Kates, On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 4853–4856.
- 158J. Coste, E. Frérot, P. Jouin and B. Castro, Oxybenzotriazole free peptide coupling reagents for N-methylated amino acids, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 1967–1970.
- 159L. A. Carpino, 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4397–4398.
- 160V. Dourtoglou, J.–C. Ziegler and B. Gross, L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un réactif de couplage peptidique nouveau et efficace, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **19**, 1269–1272.

- 161R. Huisgen, Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1963, **2**, 633–645.
- 162R. Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1963, **2**, 565–598.
- 163H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021.
- 164V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes, *Angew. Chem.*, 2002, **114**, 2708–2711.
- 165C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057–3064.
- 166S. Acherar, L. Colombeau, C. Frochot and R. Vanderesse, Synthesis of Porphyrin, Chlorin and Phthalocyanine Derivatives by Azide-Alkyne Click Chemistry, *Curr. Med. Chem.*, 2015, **22**, 3217–3254.
- 167S. Sakai, T. Noji, M. Kondo, T. Mizuno, T. Dewa, T. Ochiai, H. Yamakawa, S. Itoh, H. Hashimoto and M. Nango, Molecular Assembly of Zinc Chlorophyll Derivatives by Using Recombinant Light-Harvesting Polypeptides with His-tag and Immobilization on a Gold Electrode, *Langmuir*, 2013, **29**, 5104–5109.
- 168D. J. Simpson and K. M. Smith, Ascorbic acid photoreductions of zinc(II) chlorophyll derivatives: access to metal-free isobacteriochlorins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2854–2861.
- 169T. Trimaille, L. Autissier, M. D. Rakotonirina, Y. Guillaneuf, C. Villard, D. Bertin, D. Gigmes and K. Mabrouk, Peptide ligation from alkoxyamine based radical addition, *Chem Commun*, 2014, **50**, 2744–2747.
- 170J. Varchola, K. Želonková, D. Chorvat Jr, D. Jancura, P. Miskovsky and G. Bánó, Singlet oxygen produced by quasi-continuous photo-excitation of hypericin in dimethyl-sulfoxide, *J. Lumin.*, 2016, **177**, 17–21.
- 171P. B. Merkel and D. R. Kearns, Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 7244–7253.
- 172P. Bertrand, *La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique – Applications: Applications*, EDP Sciences, 2014.
- 173F. Sahli, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2019.
- 174N. Le Breton, Thèse de doctorat, Aix-Marseille Université, 2014.
- 175S. Marque, C. Le Mercier, P. Tordo and H. Fischer, Factors Influencing the C–O–Bond Homolysis of Trialkylhydroxylamines, *Macromolecules*, 2000, **33**, 4403–4410.
- 176W. A. Pryor, *Bio-Assays for Oxidative Stress Status*, Elsevier, 2012.
- 177S. Barbati, J. L. Clément, G. Olive, V. Roubaud, B. Tuccio and P. Tordo, in *Free Radicals in Biology and Environment.*, Springer Netherlands, 1997, pp. 39–47.
- 178R. Lauricella and B. Tuccio, in *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy: Applications*, ed. P. Bertrand, Springer International Publishing, Cham, 2020, pp. 51–82.
- 179K. Stolze, N. Udilova and H. Nohl, Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**, 1005–1014.
- 180C. Ciobanasu, I. Dragomir and A. Apetrei, The penetrating properties of the tumor homing peptide LyP-1 in model lipid membranes, *J. Pept. Sci.*, 2019, **25**, e3145.
- 181A. Gautam, P. Kapoor, K. Chaudhary, R. Kumar, O. Drug Discovery Consortium and G. P. S. Raghava, Tumor Homing Peptides as Molecular Probes for Cancer Therapeutics, Diagnostics and Theranostics, *Curr. Med. Chem.*, 2014, **21**, 2367–2391.

- 182T. Teesalu, K. N. Sugahara, V. R. Kotamraju and E. Ruoslahti, C–end rule peptides mediate neuropilin–1–dependent cell, vascular, and tissue penetration, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, **106**, 16157–16162.
- 183E. Ruoslahti, Tumor penetrating peptides for improved drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, **110–111**, 3–12.
- 184N. Song, L. Zhao, M. Zhu and J. Zhao, Recent progress in LyP–1–based strategies for targeted imaging and therapy, *Drug Deliv.*, 2019, **26**, 363–375.
- 185P. Laakkonen, K. Porkka, J. A. Hoffman and E. Ruoslahti, A tumor–homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels, *Nat. Med.*, 2002, **8**, 751–755.
- 186P. Laakkonen, M. E. Åkerman, H. Biliran, M. Yang, F. Ferrer, T. Karpanen, R. M. Hoffman and E. Ruoslahti, Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, **101**, 9381–9386.
- 187A. Abulrob, S. Corluka, B. Blasiak, B. Gino Fallone, D. Ponjevic, J. Matyas and B. Tomanek, LyP–1 Conjugated Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging of Triple Negative Breast Cancer, *Mol. Imaging Biol.*, 2018, **20**, 428–435.
- 188W. Wu, S. Zhong, Y. Gong, Y. Shan, L. Yuan, L. Wang, J. Chen and Z. Zhang, A new molecular probe: An NRP–1 targeting probe for the grading diagnosis of glioma in nude mice, *Neurosci. Lett.*, 2020, **714**, 134617.
- 189B. Xu, Y. Ju, Y. Cui, G. Song, Y. Iwase, A. Hosoi and Y. Morita, tLyP–1–Conjugated Au–Nanorod@SiO₂ Core–Shell Nanoparticles for Tumor–Targeted Drug Delivery and Photothermal Therapy, *Langmuir*, 2014, **30**, 7789–7797.
- 190M. Yang, D. Jiang, Z. Chen and J. Chen, Photodynamic therapy of drug–resistant human colon adenocarcinoma using verteporfin–loaded TPGS nanoparticles with tumor homing and penetrating peptide functionalization, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 100984–100992.
- 191D. Jiang, X. Gao, T. Kang, X. Feng, J. Yao, M. Yang, Y. Jing, Q. Zhu, J. Feng and J. Chen, Actively targeting D– α –tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate–poly(lactic acid) nanoparticles as vesicles for chemo–photodynamic combination therapy of doxorubicin–resistant breast cancer, *Nanoscale*, 2016, **8**, 3100–3118.
- 192W. Li, J. Peng, L. Tan, J. Wu, K. Shi, Y. Qu, X. Wei and Z. Qian, Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp–1 modified Docetaxel/IR820 Co–loaded micelles, *Biomaterials*, 2016, **106**, 119–133.
- 193Y. Shi, S. Shan, C. Li, X. Song, C. Zhang, J. Chen, J. You and J. Xiong, Application of the Tumor Site Recognizable and Dual–Responsive Nanoparticles for Combinational Treatment of the Drug–Resistant Colorectal Cancer, *Pharm. Res.*, 2020, **37**, 72.
- 194A. J. Alpert, Hydrophilic–interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr. A*, 1990, **499**, 177–196.
- 195B. Buszewski and S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 231–247.
- 196Stratégies alternatives à la RPLC, <https://www-techniques-ingenieur-fr.bases-doc.univ-lorraine.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/evolutions-majeures-en-chromatographie-liquide-p1494/strategies-alternatives-a-la-rplc-p1494niv10002.html>, (accessed 8 November 2020).
- 197T. Yoshida, Peptide separation by Hydrophilic–Interaction Chromatography: a review, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, **60**, 265–280.
- 198A. B. Ryerson, C. R. Ehemann, S. F. Altekruse, J. W. Ward, A. Jemal, R. L. Sherman, S. J. Henley, D. Holtzman, A. Lake, A.–M. Noone, R. N. Anderson, J. Ma, K. N. Ly, K. A. Cronin, L. Penberthy and B. A. Kohler, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2012, featuring the increasing incidence of liver cancer, *Cancer*, 2016, **122**, 1312–1337.

- 199L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.–L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi–Heyob, 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**, 153–164.
- 200P. Couleaud, V. Morosini, C. Frochot, S. Richeter, L. Raehm and J.–O. Durand, Silica–based nanoparticles for photodynamic therapy applications, *Nanoscale*, 2010, **2**, 1083–1095.
- 201J. Enbäck and P. Laakkonen, Tumour–homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 780–783.
- 202H. Wu, Z. Wang, Q. Wang, Y. Han, M. Wang, W. Zhou and H. Li, Use of Labelled tLyP–1 as a Novel Ligand Targeting the NRP Receptor to Image Glioma, *PLOS ONE*, 2015, **10**, e0137676.
- 203S. S. Timur, G. Yalçın, Ö. Çevik, C. Andaç and R. N. Gürsoy, Molecular dynamics, thermodynamic, and mutational binding studies for tumor–specific LyP–1 in complex with p32, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018, **36**, 1134–1144.
- 204G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**, 2785–2791.
- 205M. A. von Wronski, N. Raju, R. Pillai, N. J. Bogdan, E. R. Marinelli, P. Nanjappan, K. Ramalingam, T. Arunachalam, S. Eaton, K. E. Linder, F. Yan, S. Pochon, M. F. Tweedle and A. D. Nunn, Tuftsin Binds Neuropilin–1 through a Sequence Similar to That Encoded by Exon 8 of Vascular Endothelial Growth Factor, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 5702–5710.
- 206E. M. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1033–1046.
- 207A. Ben Mihoub, L. Larue, A. Moussaron, Z. Youssef, L. Colombeau, F. Baros, C. Frochot, R. Vanderesse and S. Acherar, Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment, *Molecules*, 2018, **23**, 1936.
- 208A. Ben Mihoub, Z. Youssef, L. Colombeau, V. Jouan–Hureaux, P. Arnoux, C. Frochot, R. Vanderesse and S. Acherar, Inclusion complex vs. conjugation of hydrophobic photosensitizers with β –cyclodextrin: Improved disaggregation and photodynamic therapy efficacy against glioblastoma cells, *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **109**, 110604.
- 209A. Ben Mihoub, Université Amar Telidji – Laghouat (Faculté des Sciences), 2019.
- 210A. Gaudel–Siri, D. Siri and P. Tordo, Homolysis of N–alkoxyamines: a computational study, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, 2006, **7**, 430–438.
- 211J. Kalia and R. T. Raines, Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2008, **47**, 7523–7526.
- 212H. Dernaika, S. V. Chong, C. G. Artur and J. L. Tallon, Spectroscopic Identification of Neurotoxin Tetramethylenedisulfotetramine (TETS) Captured by Supramolecular Receptor β –Cyclodextrin Immobilized on Nanostructured Gold Surfaces, *J. Nanomater.*, 2014, **2014**, 207258.
- 213T. L. C. Figueiredo, R. A. W. Johnstone, A. M. P. S. Sørensen, D. Burget and P. Jacques, 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**, 517–528.

ANNEXE : LISTE DES PUBLICATIONS

- P1) Larue L., Ben Mihoub A., Youssef Z., Colombeau L., Acherar S., André J.C., Arnoux P., Baros F., Vermandel M., Frochot C. Using X-ray in photodynamic therapy: an overview. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018, **17**, 1612–1650. IF = 2.80.
- P2) Ben Mihoub A., Larue L., Moussaron A., Youssef Z., Colombeau L., Baros F., Frochot C., Vanderesse R., Acherar S. Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment. *Molecules.* 2018, **23 (8)**, 1936. IF = 3.06.
- P3) Youssef Z., Yesmurzayeva N., Larue L., Juan–Hureaux V., Colombeau L., Acherar S., Frochot C. New targeted gold nanorods for the treatment of glioblastoma by photodynamic therapy. *J. Clin. Med.* 2019, **8 (12)**, 2205. IF = 3.30.
- P4) Toubia I., Nguyen C., Diring S., Ali L., Larue L., Aoun R., Frochot C., Gary–Bobo M., Kobeissi M., Odobel F. Synthesis and Anticancer Activity of Gold Porphyrin Linked to Malonate Diamine Platinum Complexes. *Inorg. Chem.* 2019, **58 (18)**, 12395–12406. IF = 4.82.
- P5) Larue L., Myrzakhmetov B., Ben–Mihoub A., Moussaron A. Thomas N., Arnoux P., Baros F. Vanderesse R., Acherar S., Frochot C. Fighting Hypoxia to Improve PDT. *Pharmaceuticals.* 2019, **12 (4)**. IF = 4.42.
- P6) Larue L., Moussounda Moussounda Koumba T., Le Breton N Vilen B., Arnoux P., Jouan–Hureaux V., Boura C., Audran G., Bikanga R., Marque S., Acherar S., Frochot C. The design of a targeting and O₂–independent platform to improve Photodynamic Therapy: A proof of concept, *acceptée dans ACS Applied Biomaterials.* 2021, **4 (2)**, 1330–1339.

ANNEXE : LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications internationales

▪ Communications orales :

CIo1) Larue L., Colombeau L., Arnoux P., Baros F., Audran G., Marque S. R. A., Boura C., Acherar S., Frochot C. New platforms for improving the treatment of glioblastoma by PhotoDynamic Therapy, 2019 ESP–IUPB World Congress, Barcelone (Espagne), 25 – 30 Août 2019.

CIo2) Larue L., Koumba TMM., Le Breton N., Vileno B., Arnoux P., Jouan–Hureaux V., Boura C., Audran G., Bikanga R., Marque S., Acherar S., Frochot C. A Targeted and Oxygen–independent PDT: A proof of concept, Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update E–CONGRESS 2020, 5–6 Novembre 2020.

▪ Communications écrites :

CIe1) Larue L., Colombeau L., Arnoux P., Baros F., Audran G., Marque S. R. A., Boura C., Acherar S., Frochot C. New Platforms for improving the treatment of glioblastoma by photodynamic therapy Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update, Kochel Am See (Allemagne), 19 – 22 Septembre 2018.

CIe2) Larue L., Colombeau L., Arnoux P., Baros F., Audran G., Marque S. R. A., Boura C., Acherar S., Frochot C. New Platforms for improving the treatment of glioblastoma by photodynamic therapy, Ecole thématique (5th ESP Photobiology School), New Platforms for improving the treatment of glioblastoma by photodynamic therapy, Brixen (Italie), 10 – 16 Juin 2018.

Communications nationales

▪ Communication orale

CNo1) Larue L., Colombeau L., Arnoux P., Baros F., Audran G., Marque S. R. A., Boura C., Acherar S., Frochot C. Développement de nouvelles plateformes pour une thérapie photodynamique indépendante de l’oxygène, 2^{ème} Journée Française sur la thérapie photodynamique, Lille (France), 28 novembre 2019.

▪ Communication écrite

CNe1) Achard M., Acherar S., André J.C., Arnoux P., Barberi–Heyob M., Baros F., Bastogne T., Bechet D., Boura C., Colombeau L., Frochot C., Jouan–Hureaux V.,

Goria S., Larue L., Moussaron A., Pinel S., Rétif P., Roques–Carmes T., Thomas N., Vanderesse R., Youssef Z., PDTeam's projects, 1^{ère} journée française sur la thérapie photodynamique, Lille (France), 30 novembre 2017.

Participation à un congrès sans communication

CHIMI Meeting: Fluorescence: from benchtop to clinical use, Dijon (France), 25 – 26 Janvier 2018.

Développement de nouvelles plateformes pour l'amélioration du traitement du glioblastome par thérapie photodynamique

Mots-clés : thérapie photodynamique, espèces réactives de l'oxygène, cancer.

Le traitement des tumeurs malignes du cerveau, dont le glioblastome multiforme est la forme la plus agressive, est un défi majeur de la cancérologie. La thérapie photodynamique (PDT) apparaît comme une technique prometteuse dans ce contexte. La PDT permet une destruction des cellules cancéreuses par l'action de trois éléments à savoir un photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène. Après photoexcitation sous lumière visible, le PS engendre, en présence d'oxygène, la formation d'espèces réactives de l'oxygène dont d'oxygène singulet (1O_2), toxiques, qui vont détruire les tissus avoisinants. Malheureusement, la PDT souffre de deux inconvénients majeurs qui sont le manque de sélectivité de nombreux PSs actuellement utilisés cliniquement ainsi que le besoin d'oxygène pour être efficace. Pour pallier le manque de sélectivité, le ciblage des néovaisseaux tumoraux est une approche prometteuse. L'affinité du peptide KDKPPR pour le récepteur NRP-1 surexprimé sur les cellules endothéliales a déjà été prouvée par notre équipe. Concernant le manque d'oxygène, nous nous sommes intéressés aux alcoxyamines capables de générer des radicaux alkyles toxiques par activation lumineuse, même en milieu hypoxique. Ces alcoxyamines photoactivables sont décrites dans la littérature mais jamais utilisées dans le traitement de tumeurs. Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé une plateforme trimodale combinant un PS et un alcoxyamine photoactivable pour une PDT en milieu normoxique et hypoxique, respectivement, et un peptide pour cibler NRP-1. La synthèse de cette plateforme a été réalisée avec succès. L'étude de cette plateforme a montré un maintien de la capacité à former de 1O_2 et de l'affinité pour NRP-1. Grâce à la technique de spectroscopie RPE, les radicaux engendrés par l'illumination de l'alcoxyamine ont pu être détectés. Bien que prometteuse, cette plateforme n'est pas applicable en PDT en raison d'une photoactivation de l'alcoxyamine à une longueur d'onde UV inadaptée. La seconde partie de cette thèse a donc été consacrée à l'optimisation de cette plateforme. Nous nous sommes focalisés sur trois pistes : 1) le *design* d'une nouvelle alcoxyamine absorbant à de plus hautes longueurs d'onde 2) l'amélioration de la solubilité de la plateforme en greffant une cyclodextrine et 3) le développement d'un nouveau peptide ciblant NRP-1 et pouvant être internalisé dans les cellules.

Development of new platforms to improve the treatment of glioblastoma by photodynamic therapy

Key-words: photodynamic therapy, reactive oxygen species, cancer.

The treatment of malignant brain tumors, of which glioblastoma multiform is the most aggressive form, is a major challenge in oncology. Photodynamic therapy (PDT) appears to be a promising technique in this context. PDT destroys cancer cells by the action of three elements: a photosensitizer (PS), light and oxygen. After photoexcitation under visible light, PS generates, in the presence of oxygen, the formation of reactive oxygen species including singlet oxygen (1O_2), toxic, which will destroy surrounding tissues. Unfortunately, PDT suffers from two major drawbacks which are the lack of selectivity of many PSs currently used clinically as well as the need for oxygen to be effective. To overcome the lack of selectivity, targeting tumor neovessels is a promising approach. The affinity of KDKPPR peptide for the overexpressed NRP-1 receptor on endothelial cells has already been demonstrated by our team. Regarding the lack of oxygen, we were interested in alkoxyamines able of generating toxic alkyl radicals by light activation, even in hypoxic environment. These photoactivatable alkoxyamines are described in the literature but never used in tumor treatment. In this thesis, we developed a trimodal platform combining a PS and a photoactivatable alkoxyamine for PDT in normoxic and hypoxic medium, respectively, and a peptide to target NRP-1. The synthesis of this platform was successfully performed. The platform study confirmed the conservation of the ability to form 1O_2 and the NRP-1 affinity. The detection of the photogenerated radicals from alkoxyamine is detected by EPR spectroscopy. Although promising, this platform is not applicable in PDT due to the use of an unsuitable UV wavelength for photoactivation of alkoxyamine. The second part of this thesis was devoted to the platform optimization. We focused on three avenues: 1) Design of a new alkoxyamine absorbing at higher wavelengths, 2) Improvement of the platform solubility by grafting a cyclodextrin and 3) Development of a new NRP-1-targeted peptide which can be internalized in cells.