



Photothérapie dynamique vectorisée contre le rétinoblastome : conception, Synthèse et Etudes photobiologiques de photosensibilisateurs excitables à deux photons

Su Chen

► To cite this version:

Su Chen. Photothérapie dynamique vectorisée contre le rétinoblastome : conception, Synthèse et Etudes photobiologiques de photosensibilisateurs excitables à deux photons. Chimie organique. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS031 . tel-01315835

HAL Id: tel-01315835

<https://theses.hal.science/tel-01315835>

Submitted on 13 May 2016

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.

NNT : 2016SACLS031



université
PARIS-SACLAY



**THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉ À
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD**

**ÉCOLE DOCTORALE N°571
« Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB) »**

**Spécialité de doctorat chimie
par**

Mme. Su CHEN

Titre de la thèse :

**PHOTOTHÉRAPIE DYNAMIQUE VECTORISÉE CONTRE LE RÉTINOBLASTOME : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET
ÉTUDES PHOTOBIOLOGIQUES DE PHOTSENSIBILISATEURS EXCITABLES À DEUX PHOTONS**

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 15. Février. 2016 :

Composition du jury :

Mr. Richard A. DECRÉAU Mr. Vincent SOL	Maître de conférences, Université de Bourgogne Professeur, Université de Limoges	Rapporteur Rapporteur
Mr. Philippe MAILLARD Mr. Jean-Pierre Mahy	Directeur de recherche, Institut Curie Professeur, Université Paris-Saclay	Examineur Président
Mme. Céline FIORINI-DEBUISSCHERT Mme. Véronique ROSILIO	Directeur de recherche, CEA Saclay Professeur, Université Paris-Saclay	Invité Invité
Mme Florence MAHUTEAU-BETZER	Chargé de recherche, Institut Curie	Directrice de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire "Conception, Synthèse et Vectorisation de Biomolécules", UMR176-Institut Curie jusqu'au 31 décembre 2014 puis "Chimie, Modélisation et Imagerie pour la Biologique", UMR 9187-U1196 à partir du 1^{er} janvier 2015.

Je remercie la région Ile de France (appel à projet PICRI 2012 (RELATIVE AU SOUTIEN REGIONAL AUX PARTENARIATS INSTITUTIONS CITOYENS POUR LA RECHERCHE ET L'INNOVATION) pour le financement de ces trois années.

Je tiens à remercier Mme. Marie-Paule Teulade-Fichou, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

En tout premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements à Mr. Philippe Maillard, Directeur de Recherche au CNRS, et Mme. Florence Mahuteau-Betzer, Chargé de recherche 1^{ère} classe CNRS, pour avoir accepté de m'encadrer et de suivre ce travail de thèse, pour leur patience et leur confiance, pour leurs précieuses discussions et conseils qui m'ont été profitables tout au long de cette thèse.

Je remercie aussi Mme. Véronique Rosilio, Professeur à l'Université Paris-Saclay, et son équipe, notamment Mr. Ali Makky, Mr. David Chapron, Mr. Jean-Philippe Michel, pour leur aide et leurs conseils dans le cadre de l'étude du comportement interfacial de porphyrines dimères et leur interaction avec des modèles biomimétiques de la membrane cellulaire.

Je remercie également, Mme. Céline Fiorini-Debuisschert, Directrice de Recherche au CEA Saclay, pour son aide et ses conseils et les mesures de la section efficace de l'ADP des composés étudiés. Je remercie aussi, Mr. Florent Poyer, Ingénieur de recherche, à l'Institut Curie, pour son aide et les mesures de la photo- et cyto-toxicité *in vitro* des composés.

Je remercie aussi les membres du jury (Richard Décréau, Maître de conférence à l'université de Bourgogne ; Vincent Sol, Professeur à l'Université de Limoges ; Véronique Rosilio, Professeur à l'Université Paris-Saclay ; Céline Fiorini-Debuisschert, Directeur de Recherche au CEA ; Jean-Pierre Mahy, Professeur à l'Université Paris-Saclay) pour la lecture et le temps consacré à l'étude de mon travail de recherche.

Je remercie également les collègues, stagiaires, doctorants et post-doctorants, Anton Granzhan, Aude Sourdan, Chi-Hung Nguyen, Claire Beauvineau, Corinne Guetta, Delphine Martin, Elodie Morel, Joel Lefebvre, Naoko Kotera, Nicolas Saettel, Romain Najman, Sandrine Piguel, Tom Baladi et Xiao Xie...pour leur chaleureuse amitié et les moments agréables qu'on a passés dans une atmosphère de respect et d'entraide.

Enfin, je dirige mes remerciements vers toutes les personnes que j'aurai pu oublier de citer.

Table des matières

Chapitre I CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉTUDES PHOTOBIOLOGIQUES DE PHOTOSENSIBILISATEURS EXCITABLES À DEUX PHOTONS.....	1
I. INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIF	2
I.1. La thérapie photodynamique ou PDT¹	2
I.1.1. Histoire de la PDT depuis l'antiquité égyptienne jusqu'à nos jours	2
I.1.2. Principe de la PDT.....	3
I.1.3. Limites de la photothérapie dynamique à un photon ou PDT classique	4
I.1.4. Ps de première, seconde et troisième (Ps vectorisés, voir tableau en annexe qui liste différents types de vectorisation) générations.....	6
I.2. La Thérapie PhotoDynamique à absorption simultanée de deux photons (PDT-ADP).....	23
I.2.1. Principe de l'ADP.....	23
I.2.2. Méthodes de mesure des sections efficaces	25
I.2.3. Avantages de la PDT-ADP (pénétration de la lumière et précision spatiale).....	27
I.2.4. Ps ADP connus dans la littérature et leurs propriétés physiques et/ou biologiques)	29
I.3. Les tumeurs oculaires et PDT	35
I.3.1. Le rétinoblastome (Rb)	35
I.3.2. Spécificité du Rétinoblastome	39
I.3.3. Les lectines et glycoporphyrines.....	40
I.3.4. Les molécules issues du laboratoire avec leur activité biologique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> vis-à-vis de Rb.....	41
I.4. Objectif : Conception de six porphyrines dimères	44
I.4.1. Porphyrines dimères de première génération symétriques	45
I.4.2. Porphyrines dimères dissymétriques.....	46
II. SYNTHÈSE & CARACTÉRISATION ET PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DES PORPHYRINES DIMÈRES	47
II.1. Synthèse & Caractérisation	47
II.1.1. Synthèse	47
II.1.1.1. Rétrosynthèse des porphyrines dimères acéthyléniques P-Y-P.....	48
II.1.1.2. Synthèse des porphyrines dimères acéthyléniques	49
II.1.1.3. Rétrosynthèse des porphyrines dimères butadiynes P-Y ₂ -P.....	53
II.1.1.4. Synthèse des porphyrines dimères butadiynes	54
II.1.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	56
II.1.2.1. Spécificité des spectres ¹ H et ¹³ C des porphyrines.....	57
II.1.2.2. Spécificité du spectre ¹ H des porphyrines dimères dissymétriques.	59
II.2. Étude des Propriétés optiques et étude photobiologique.....	62
II.2.1. Absorption UV-visible et fluorescence.....	62
II.2.2. Rendement quantique de fluorescence	64
II.2.3. Rendement quantique de formation de l'oxygène singulet	66
II.2.3.1. Détection de l'oxygène singulet	66
II.2.3.2. Développement d'un test comparatif de détection d'oxygène singulet	70

II.2.4.	Section efficace ADP	73
II.2.5.	Phototoxicité in vitro	79
Chapitre II Comportement interfacial des porphyrines dimères et leur interaction avec des modèles biomimétiques de la membrane cellulaire.....		82
I.	GÉNÉRALITÉS ET OBJECTIFS	83
I.1.	Modèle de membrane pour étudier les interactions entre substance active et membrane	85
I.1.1.	La monocouche de Langmuir	85
I.1.2.	Les liposomes	87
I.2.	Techniques permettant d'étudier l'interaction PS-membrane en utilisant les liposomes	87
I.2.1.	La fluorescence.....	87
I.2.2.	La diffusion dynamique de la lumière (DLS)	88
II.	RÉSULTAT ET DISCUSSION	89
II.1.	Isotherme π -A des porphyrines dimères	90
II.1.1.	Aires supposées occupées par les molécules à A_0 (onset).....	94
II.1.2.	Aires moyennes	97
II.1.3.	Aires au collapse.....	98
II.2.	Isothermes π -A des mélanges SOPC-porphyrine.....	99
II.3.	Influence des interactions entre les liposomes de SOPC et les porphyrines dimères sur les spectres de fluorescence des porphyrines.....	102
II.4.	Interaction entre des liposomes incorporant le composé 2 et la Con A libre.....	106
II.5.	Formation de liposomes géants (GUV Giant Unilamellar Vesicle) incorporant les porphyrines dimères.....	109
Conclusion et Perspectives		111
Partie expérimentale		114
Reagents and Materials.....		115
Determination of absorption coefficients.....		115
Determination of fluorescence quantum yields		116
The quantum yield was calculated from relation:		116
DPBF Degradation Kinetics		116
Two-photon absorption cross-section measurements (CEA, Saclay).....		117
Biology		117
Synthesis		119
Some results of elemental analysis were calculated by adding one or several water molecules.....		119
Matériaux		155
Monocouches de Langmuir.....		155
Préparation des liposomes.....		157
DLS		157
Détermination du coefficient de partage des porphyrines entre la phase aqueuse et la bicouche phospholipidique		158

Préparation de vésicules unilamellaires géantes (GUV)	160
Bibliographie	161
Liste des abréviations	177
Nomenclature	180
Résumé	181
Abstract.....	182
摘要	183
Structures chimiques des porphyrines dimères avec leurs icônes abrégées et molécule référence.....	184

Chapitre I CONCEPTION, SYNTHÈSE ET ÉTUDES PHOTOBIOLOGIQUES DE PHOTSENSIBILISATEURS EXCITABLES À DEUX PHOTONS

I. INTRODUCTION ET ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIF

I.1. La thérapie photodynamique ou PDT¹

I.1.1. Histoire de la PDT depuis l'antiquité égyptienne jusqu'à nos jours

Les propriétés thérapeutiques de la lumière sont connues depuis plus de trois millénaires.^{1,2} Plusieurs maladies (vitiligo par exemple) étaient soignées par exposition au soleil, en Egypte ancienne, en Inde, en Chine...³ A la fin du 19^{ième} siècle, un traitement de la tuberculose utilisant la lumière rouge a été proposé par Niels Finsen⁴ ce qui marqua le début de la photothérapie moderne. Niels Finsen a constaté que l'exposition à la lumière rouge réduit les effets de la variole.⁴ En 1900, Oscar Raab, un étudiant en médecine allemande, a rapporté que les paramécies sont tuées par association entre l'acridine et la lumière en présence d'air ce qui marque la naissance de la photothérapie dynamique.⁵ La première démonstration de l'accumulation sélective de porphyrines dans les cellules tumorales est mentionnée en 1924 par Policard.⁶ Il a observé une émission de fluorescence rouge des sarcomes de rats par une excitation lumineuse à la lumière de Wood. Cette fluorescence rouge correspond à la fluorescence des porphyrines endogènes accumulées dans les tumeurs. Ce résultat a été confirmé, au début des années 60, à la clinique Mayo au Canada.^{7,8} Lipson & Baldes ont démontré, par émission de fluorescence, la localisation préférentielle de l'Hématoporphyrine Dérivée (HpD) dans les cellules de cancer.⁹ L'HpD peut aussi être utilisé comme outil diagnostique grâce à ses propriétés de fluorescence et sa relative sélectivité pour les cellules tumorales.¹⁰ Thomas Dougherty et ses collègues ont découvert que la croissance de tumeurs mammaires de souris est fortement ralentie en administrant de l'HpD par voie intraveineuse suivi d'une illumination par la lumière rouge.¹¹ En 1987, une fraction active de l'HpD a été isolée et purifiée par chromatographie à partir de l'HpD,¹² cette fraction est appelée Photofrin®. Dans les années suivantes, le Photofrin® a été autorisé aux États-Unis pour traiter le cancer du poumon aux stades précoce et tardif, le cancer de l'œsophage et les dysplasies.

Jusqu'à 2000, il a été utilisé sur environ 10 000 patients aux États-Unis, Pays-Bas, Canada, Japon et Italie.¹³

I.1.2. Principe de la PDT

La PDT est une technique prometteuse utilisée pour le traitement de cancer, particulièrement les cancers de la peau, du poumon ou des yeux...¹³⁻¹⁶ La PDT commence par l'administration d'une molécule photoactivable (le photosensibilisateur ou Ps) qui se localise préférentiellement dans les tissus malades. Quelques heures à quelques jours après l'injection par voie systémique du Ps, la tumeur est illuminée par une lumière rouge (650 nm) correspondant à une bande d'absorption du Ps. Lors de l'absorption de la lumière, le Ps passe de son état singulet fondamental S_0 à l'état excité singulet excité S_1 . Puis, cet état excité S_1 passe à l'état triplet T_1 par conversion inter-système (CIS). La durée de vie de cet état triplet (de 10^{-6} à 1s), relativement longue, permet à la molécule excitée d'interagir avec les substrats situés dans son environnement proche.¹³ Deux types de réactions sont alors possibles (**Figure 1**) :

- Photoréaction de type I : L'état triplet T_1 du Ps réagit directement avec des substrats biologiques par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation d'espèces radicalaires. Les radicaux libres peuvent réagir avec l'oxygène dans son état fondamental pour former l'ion superoxyde.
- Photoréaction de type II : L'état triplet T_1 réagit directement avec l'oxygène dont l'état fondamental est lui-même triplet, en lui transférant son excès d'énergie, ce qui fait passer l'oxygène fondamental 3O_2 à son état singulet 1O_2 qui est une espèce très réactive en milieu biologique.

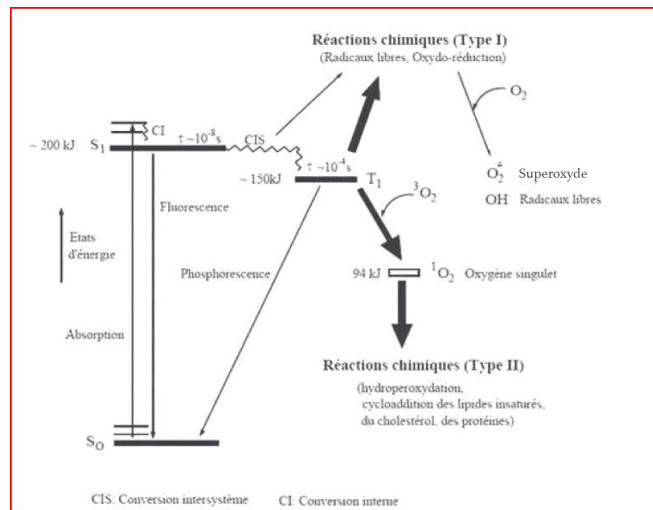


Figure 1. Le diagramme de Jablonski décrivant les différents états d'énergie de Ps, de l'oxygène et ses voies d'activation.¹⁷

L'ensemble de ces processus induisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraîne la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. La compétition entre ces deux mécanismes est contrôlée par plusieurs paramètres tels que la nature du Ps, la concentration en oxygène ou la dose lumineuse. De nombreuses études ont montré que le mécanisme de type II était prédominant dans la PDT sensibilisée par des porphyrines.¹³

I.1.3. Limites de la photothérapie dynamique à un photon ou PDT classique

Les majorités des Ps utilisés en clinique humaine ou en expérimentation, sont des dérivés macrocycles tétrapyrroliques (Voir nomenclature) issus de la nature comme l'hème, la chlorophylle et la bactériochlorophylle ou synthétiques. Les macrocycles tétrapyrroliques ont généralement une bande d'absorption dans la région 400 nm aussi connue sous le nom de bande de Soret, et un groupe de quatre bandes d'absorption d'intensité plus faible vers le rouge du spectre optique entre 500 nm et 750 nm, appelé les bandes Q.¹³ Les porphyrines ont une bande d'absorption vers 630 nm généralement utilisée pour une excitation en PDT à un photon.¹³ Les porphycènes (entre 610-650 nm) et les texaphyrines (entre 730-770 nm) sont les porphyrines expansées avec une absorptivité plus forte. Les chlorines sont les macrocycles tétrapyrroles obtenus en réduisant une double liaison dans un des quatre cycles pyrroles ce qui induit un déplacement vers rouge (entre 650-690 nm) de la bande

d'absorption rouge et une augmentation de l'absorption. Les bactériochlorines sont des macrocycles tétrapyrroliques dont deux doubles liaisons opposées sont réduites ce qui induit un déplacement encore plus vers le rouge (730-800 nm) et une nouvelle augmentation de l'intensité de l'absorption.¹⁸ (**Tableau 1**) Les bactériochlorines sont considérées comme des Ps plus efficaces que les porphyrines ou les chlorines. Mais ce type de Ps, beaucoup moins stable, n'a pas été beaucoup étudié. Deux autres macrocycles tétrapyrroliques très étudiés comme Ps sont les phtalocyanines et les naphtalocyanines dont les positions *méso* sont substituées par des atomes d'azote. La bande d'absorption maximale de ces deux familles est située entre 650 nm et 700 nm avec une absorptivité très forte. Comme on peut l'imaginer, la présence de quatre groupements phényles ou naphtyles peut provoquer des problèmes de solubilité et d'agrégation. Les phtalocyanines sont fréquemment préparées avec quatre groupements acide sulfonique pour améliorer la solubilité dans l'eau.¹⁹ Les structures des macrocycles tétrapyrroliques sont présentées dans la **Figure 2**.

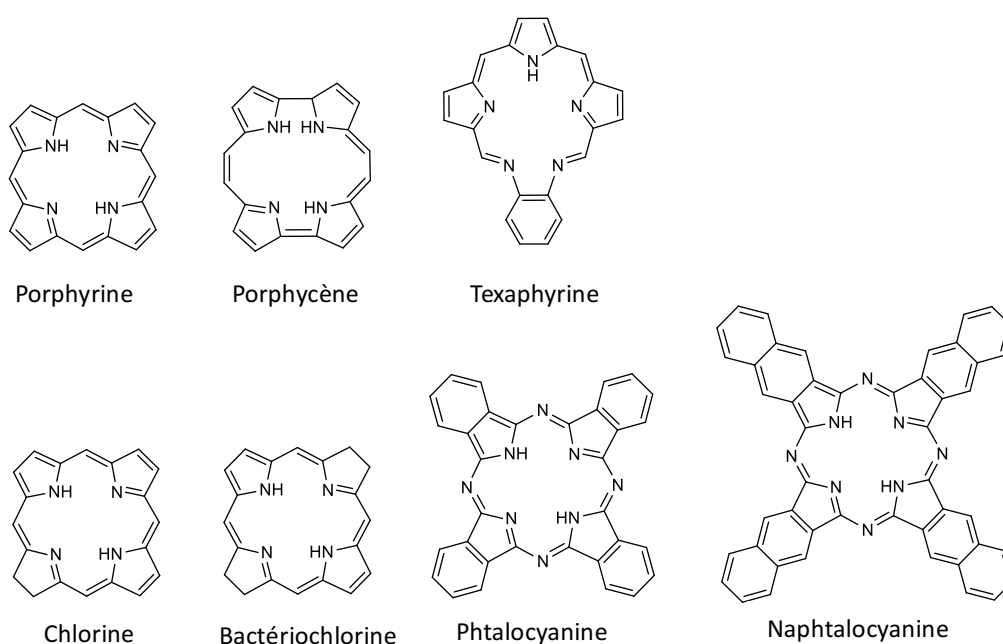


Figure 2. Les structures basiques des Ps tétrapyrroliques.

Actuellement, les Ps utilisés en clinique, de type macrocycle tétrapyrrolique, absorbent la lumière dans une zone située entre 630 et 800 nm, (ex Photofrin® 630 nm, Foscan® 652 nm, Photosense® 679 nm et TOOKAD®* 763 nm). Différents types de Ps et leurs données d'absorption sont présentés dans plusieurs revues.^{18,20,21}

La PDT présente un inconvénient de taille : les tissus pathologiques non accessibles à la lumière peuvent difficilement être traités. La profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus est entre 0,5 et 1,5 mm pour les longueurs d'onde situées entre 480 et 600 nm, elle augmente progressivement avec l'augmentation de longueur d'onde jusqu'à 1064 nm. La profondeur de pénétration dans le rétinoblastome humain peut atteindre jusqu'à 5,1 mm pour la longueur d'onde de 1064 nm.²² (**Tableau 1**)

Tableau 1. Profondeur de pénétration de la lumière (mm) en fonction de la longueur d'onde de la lumière.^{22,23}

Tissus	Longueur d'onde (nm)							
	600	650	700	750	800	850	900	1064
Rétinoblastome humain (<i>in vitro</i>)	2,9	3,8	4,0	4,0	4,1	4,2	4,3	5,1
Cerveau de porc (<i>in vitro</i>)	1,8	2,4	2,9	3,0	3,3	3,5	3,7	4,0
Main humaine (<i>in vitro</i>)	1,4	2,0	2,6	2,7	3,0	3,0	3,0	—
Mélanome mélanique (souris)	—	0,28	0,34	0,41	0,50	0,56	0,64	1,4

I.1.4. Ps de première, seconde et troisième (Ps vectorisés, voir tableau en annexe qui liste différents types de vectorisation) générations

Les Ps tétrapyrroliques sont usuellement classifiés en trois générations. La 1^{ère} génération inclue l'HpD et le Photofrin®.²⁰ Après accumulation des expériences utilisant l'HpD pour traiter des tumeurs cancéreuses, plusieurs inconvénients majeurs sont apparus,¹⁹ incluant :

- une photosensibilité prolongée de la peau nécessitant de protéger le malade de la lumière du soleil pendant plusieurs semaines, due à une élimination très lente du Ps des tissus sains dont la peau,²⁴
- une sélectivité pour la tumeur sous-optimale,²⁵
- la faible profondeur de pénétration de lumière dans les tissus en raison de la relativement courte longueur d'onde utilisée (630 nm),²⁶
- la structure mal connue de l'HpD (mélange complexe de structure incertaine).²⁷

Un certain nombre de Ps de 2^{ème} génération a été développé dans le but de palier le problème de 1^{ère} génération. Ils sont chimiquement purs, absorbent la lumière à une plus

longueur d'onde vers le rouge et sont éliminés plus rapidement des tissus sains provoquant moins de photosensibilisation de la peau. Cette génération regroupe des dérivés basés sur les porphyrines, chlorines, bactérochlorines, phtalocyanines etc. sous forme substituées ou non par des groupements chimiques afin de modifier leurs propriétés chimiques, biologiques et photophysiques. Les Ps de 2^{ème} génération greffés avec un ou plusieurs groupements chimiques visant à induire un ciblage actif ou incorporés dans des supports tels que des liposomes permettant l'accumulation sélective dans le tissu tumoral, sont désignés comme des Ps de 3^{ème} génération et actuellement des recherches très actives sont développées dans ce domaine.²⁰

Les Ps de 1^{ère} génération

L'Hp brut a été produite la première fois, en 1841 par Scherer pendant son étude sur la nature du sang, à partir de sang sec traité avec l'acide sulfurique concentré pour enlever le fer et ensuite avec l'alcool.²⁸ En 1955, Schwartz et al.²⁹ ont démontré que Hp brut est impur et constitué d'un mélange de porphyrines de propriétés différentes. Ils ont montré que la partie Hp pure se localise très mal dans les tumeurs après purification partielle, alors que le résidu de purification possède une meilleure affinité pour les tissus malins. Des études ultérieures ont démontré que le traitement chimique de l'Hp brut avec un mélange acétique et acide sulfurique, filtration et neutralisation avec l'acétate de sodium et dissolution dans une solution saline produit une substance possédant une meilleure affinité pour les tumeurs. Cette substance est appelée HpD. L'HpD est un mélange complexe qui contient trois porphyrines principales [hématoporphyrine (Hp), hydroxyéthyl-vinyldeutéroporphyrine (HVD) et protoporphyrine (PP)], des dimères et oligomères de porphyrines.¹² Un certain nombre d'études réalisées dans les années 1960 par Lipson *et al.* ont révélé que HpD a la capacité de s'accumuler sélectivement dans le tissu néoplasique en utilisant des doses plus faibles que l'Hp.^{7,9} La purification partielle de l'HpD a été complétée, la plupart des monomères moins actifs étant éliminés, ce qui conduit au Photofrin®, 1^{er} Ps à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) et représentant le « gold standard » dans la PDT. L'Hp, HpD et Photofrin® sont tous classés comme des Ps de 1^{ère} génération.

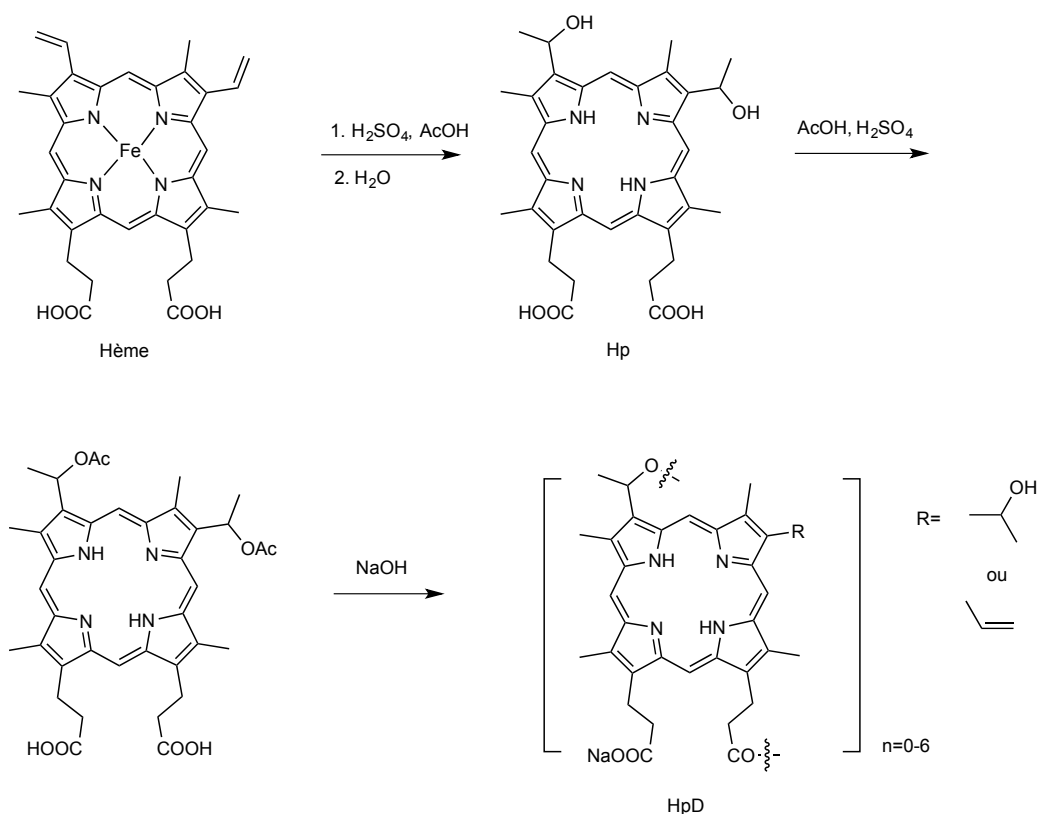


Figure 3. Synthèse de HpD à partir de l'hème.

Le Photofrin® a une absorption maximale à 630 nm avec un faible coefficient d'extinction molaire ($1170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).^{30,31} Cette propriété induit l'utilisation en clinique d'une quantité importante de Photofrin® et une forte intensité de lumière d'excitation afin d'obtenir une efficacité suffisante du traitement. La pénétration effective de la lumière dans les tissus est de 3-4 mm³²⁻³⁴ pour une excitation à 630 nm ce qui limite le traitement aux tumeurs superficielles. La photosensibilisation au niveau de la peau dure six à dix semaines, ce qui signifie qu'une exposition à la lumière de soleil et à une forte lumière artificielle doit être évitée au cours de cette période.³⁵ Bien que le Photofrin® ait des faiblesses, il possède un fort rendement quantique de formation de l'oxygène singulet, ($\Phi_{\Delta} = 0,89$).³⁶ Le Photofrin® a été approuvé en 1993 au Canada pour le traitement du cancer de la vessie et par la FDA (Food and Drug Administration) américaine pour le traitement du cancer de l'œsophage en 1995, le cancer du poumon en 1998 et de l'œsophage de Barrett en 2003.³⁷ Le traitement PDT par le Photofrin® a été étendu aux cancers de la tête, du cou, abdominale, thoracique, du cerveau, de l'intestin, de la peau, du sein et du col utérin.³⁸

Les Ps de 2^{ème} génération

Le développement de Ps de 2^{ème} génération est focalisé sur la suppression des désavantages de l'HpD. Les structures chimiques utilisées se sont enrichies, basées principalement sur les macrocycles basés sur les porphyrines, chlorines, bactériochlorines. Le coefficient d'extinction molaire de ces composés est plus important que celui de l'HpD ce qui permet de diminuer la quantité de lumière d'excitation, située aux alentours de 630 nm pour les porphyrines, 650 nm pour les chlorines et vers 710 nm pour les bactériochlorines.

- *Porphyrines*

Le Lévilan® (Acide 5-aminolévulinique) est un Ps de 2^{ème} génération (**Figure 4**), basé sur la voie de biosynthèse de l'hème. Ce traitement utilise de l'acide 5-aminolévulinique (ALA), qui est un précurseur métabolisé par la voie de biosynthèse de l'hème et transformé dans les mitochondries en protoporphyrine IX (PpIX), le Ps photoactif (**Figure 5**). La dernière étape (formation de l'hème par l'enzyme ferrochélatase) est limitante ainsi l'excès de L'ALA permet d'accumuler la PpIX dans les mitochondries avant d'être transformée en hème. Même si le coefficient d'extinction de la PpIX à 635 nm est faible, (vers $5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), le Lévilan® est éliminé en 48 heures réduisant la photosensibilisation de la peau. La FDA a approuvé l'ALA sous le nom de Levulan® pour le traitement topique de la kératose actinique du visage et du cuir chevelu en 1999.³⁹ Le lévilan® est un Ps potentiel pour traiter la maladie de Bowen, le carcinome basocellulaire (CBC) et d'autres maladies, ainsi que pour détecter des tumeurs de la vessie, de la peau, du poumon, et du tractus gastro-intestinal.⁴⁰

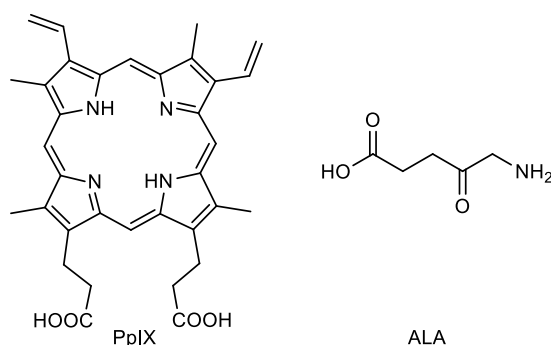


Figure 4. Structure de l'ALA et de la PpIX.

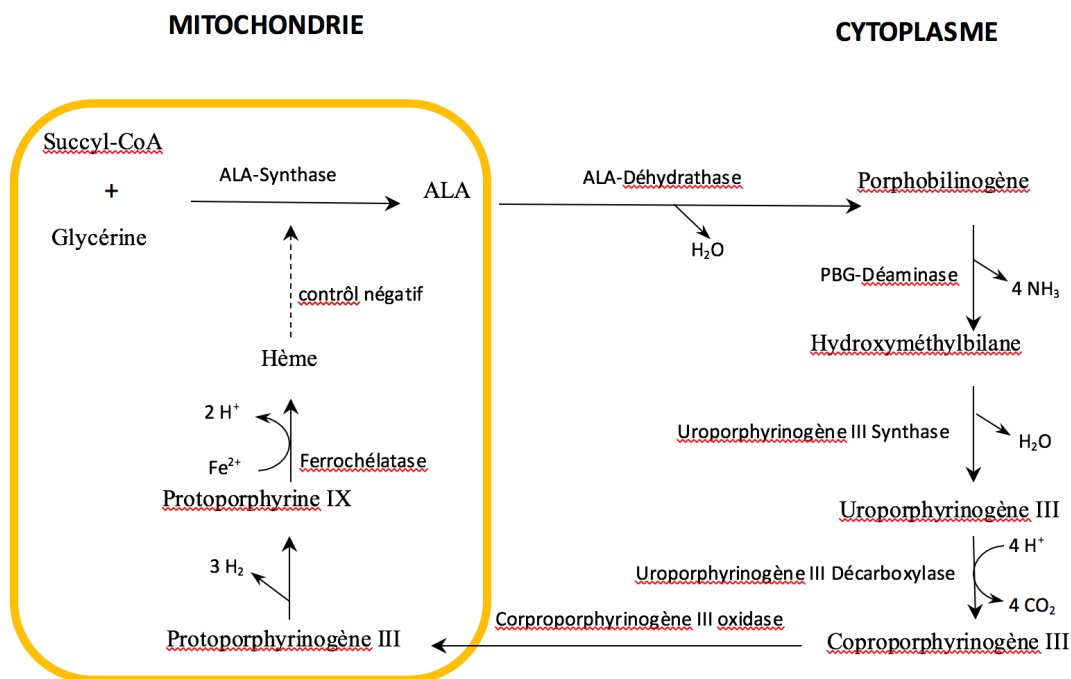


Figure 5. Métabolisation de l'ALA en PpIX.

- *Chlorines*

Plusieurs Ps évalués pour une meilleure efficacité de la PDT appartiennent à la famille des chlorines. On peut citer entre la Visudyne® (dérivé monoacide de la benzoporphyrine, BPD-MA) et le Foscan® (*méso-tétra-méta*-hydroxyphénylchlorine, *m*-THPC) (Figure 6). Le BPD-MA est excité par la lumière à 689 nm et a un intervalle de temps de phototoxicité de la peau inférieure à celui du Photofrin®, la pharmacocinétique plasmatique et tissulaire rapide permettant une élimination du BPD-MA efficace et très rapide.⁴¹ En 1999, la FDA a approuvé l'utilisation de BPM-MA sous le nom de Visudyne® pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge en ophtalmologie.²¹

Le *m*-THPC est préparée par la monoréduction de l'un des cycles pyrrole de la tétra(*méto*-hydroxyphénylporphyrine (*m*-THPP), comme représenté sur la Figure 7. Le *m*-THPC a été approuvé en Europe sous le nom de Foscan® pour traiter des cancers du cou et du cuir chevelu et ce médicament a été utilisé avec succès pour traiter les cancers du sein, de la prostate et du pancréas.^{30,42} L'activation de *m*-THPC est très efficace, une faible dose de *m*-THPC (due à un coefficient d'extinction fort à 652 nm) étant suffisante pour le traitement.²⁰

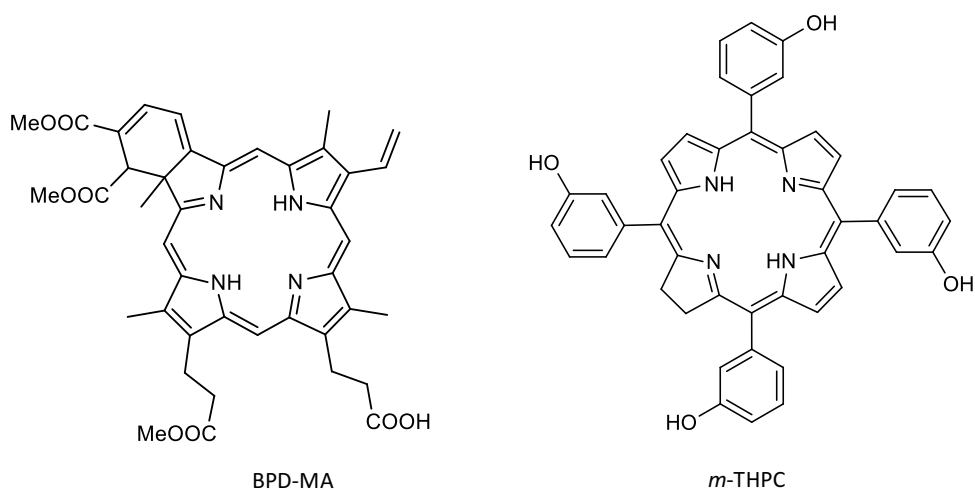


Figure 6. Structure de BPD-MA et *m*-THPC.

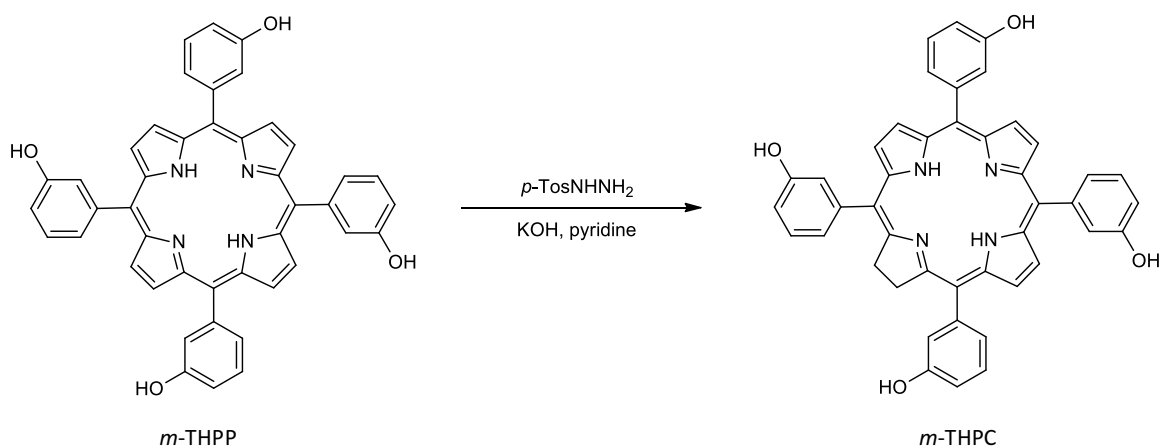


Figure 7. Formation de *m*-THPC par la monoréduction de l'un des cycles pyrrole de *m*-THPP.

- *Bactéριοchlorine*

Le Tookad® (Pd-bactériophéophorbide, WST09) est un dérivé de bactériochlorine isolé à partir de bactérie. (**Figure 8**) Le coefficient d'extinction molaire dans le chloroforme de WST09 ($108,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est plus important que celui du Photofrin®. Ainsi une pénétration plus profonde (vers 4 mm) de la lumière d'excitation (763 nm) et la photosensibilisation minimale de la peau rendent ce Ps le plus utilisé en clinique à ce jour.²⁰

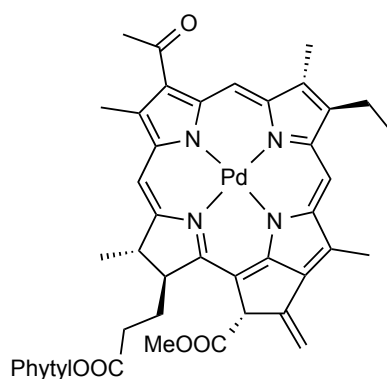


Figure 8. Structure du Tookad®.

Les Ps de 3^{ème} génération

Les études des Ps de 2^{ème} génération se sont efforcées d'améliorer des propriétés chimiques, biologiques et photophysiques par rapport aux Ps de 1^{ère} génération. Cependant des progrès restent à faire pour renforcer la spécificité et la sélectivité des Ps vis-à-vis des tissus malades. Certains Ps de deuxième génération ont été greffés ou encapsulés à des véhicules (transporteur) pour délivrer les Ps spécifiquement au niveau des tissus ciblés conduisant aux Ps de 3^{ème} génération.²⁰ Cette stratégie est généralement divisée en ciblage « passif » et « actif ». Le ciblage passif est le transport des Ps dans les cellules tumorales déterminé par des facteurs physicochimiques du véhicule. Le ciblage actif implique l'interaction entre le Ps et le site ciblé spécifique basé sur une reconnaissance moléculaire. La troisième stratégie de ciblage des Ps pour les cellules tumorales est l'utilisation de Ps seul ou attaché à des véhicules, qui sont chimiquement transformés dans la forme active et produit des effets cytotoxiques seulement au niveau du site de la lésion.⁴³

Ciblage passif

Basé sur les propriétés morphologiques et physiologiques différentes entre les tissus normaux et tumoraux, le ciblage passif permet de délivrer le Ps dans le site visé.⁴⁴ La vascularisation de la tumeur est très différente de celle des tissus sains. Par rapport au tissu endothélial dans le tissu sain, les vaisseaux sanguins tumoraux présentent des lacunes aussi grandes que 600-800 nm entre les cellules endothéliales adjacentes.⁴⁴ Les vaisseaux tumoraux sont souvent dilatés et complexes et ils ont des fenestrations et des membranes

discontinues. Cette architecture vasculaire défectueuse couplée à un mauvais drainage lymphatique provoque l'effet EPR « the enhanced permeability and retention effect », par lequel les Ps attachés aux véhicules peuvent s'accumuler sélectivement dans la zone interstitielle de la tumeur.⁴⁵ Un autre contributeur au ciblage passif est le microenvironnement spécial des cellules tumorales. Les cellules tumorales hyperproliférantes nécessitent un taux métabolique élevé. La fourniture d'oxygène et de nutriments ne suffit généralement pas à une croissance rapide des cellules tumorales. Par conséquent, les cellules tumorales utilisent la glycolyse aérobie pour obtenir de l'énergie supplémentaire, ce qui induit un environnement acide autour des cellules tumorales.⁴⁶

Une augmentation importante de l'accumulation de médicament dans la tumeur (généralement 10 fois ou plus), peut être réalisée quand le médicament est délivré par des nanoparticules.⁴⁴ La circulation sanguine prolongée et l'élimination faible par le système réticulo-endothélial (RES) des nanoparticules ayant un diamètre moyen de 100 nm sont présentées et discutées dans une revue.⁴⁷ Par conséquent, les médicaments encapsulés dans des nanoparticules peuvent facilement s'accumuler dans l'organisme et ses paramètres pharmacocinétiques tels que la demi-vie et le volume de distribution sont souvent significativement plus élevés que celui du médicament libre.⁴⁷ Plus important, les nanoparticules peuvent s'accumuler sélectivement dans la tumeur à l'aide de l'effet EPR.^{44,48} La paroi endothéliale fenestrée des vaisseaux sanguins tumoraux permet l'absorption sélective des nanoparticules, par contraste, la vascularisation des tissus sains étant une barrière primaire de distribution des nanoparticules en raison de la taille de pores limités. De nombreux médicaments libres peuvent diffuser librement à partir des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins en raison de leur petite taille, de sorte que la concentration de médicament dans les tissus tumoraux diminue rapidement. Par contre, les nanoparticules ne peuvent pas facilement diffuser dans le flux de sang en raison de leur grande taille, ce qui entraîne leur accumulation progressive dans le tissu tumoral.^{49,50} Pour ces raisons, les nanoparticules encapsulant les Ps sont aussi largement appliquées dans la PDT ciblée. Traditionnellement, ces constructions peuvent être classifiées par la composition de la matière biodégradable et non-biodégradable.^{51,52}

a. Nanoparticules biodégradables

Les nanoparticules biodégradables ont attiré l'attention pour leur possibilité de contrôler la libération du médicament, la diversité des matériaux de fabrication et la vectorisation efficace du médicament.^{52,53} Ils sont fabriqués avec des substances organiques naturelles ou synthétiques et dégradés dans l'environnement biologique par l'hydrolyse enzymatique libérant les Ps.⁵⁴ Les nanoparticules biodégradables avec des applications en détection et en traitement du cancer comprennent : les liposomes, les micelles, les nanoparticules lipidiques solides (SLN), les dendrimères etc... (**Figure 9**)

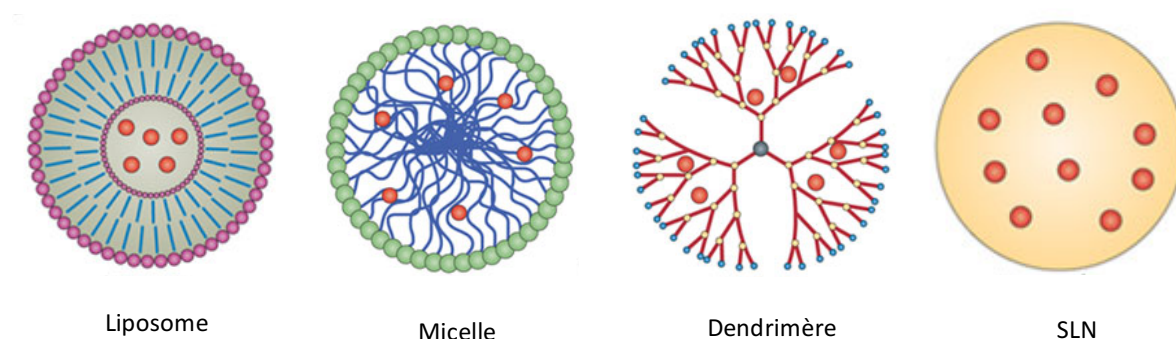


Figure 9. Différents types de particules ou nanoparticules pour la vectorisation des Ps.⁵⁵

- *Liposome*

Les liposomes, vésicules sphériques lipidiques de diamètre de quelques dizaines à quelques milliers de nm, sont composés d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques permettant l'incorporation de substances hydrophobes ou hydrophiles.⁴³ Plusieurs études ont démontré une accumulation des liposomes sélective et rapide dans les tumeurs.⁴⁴ Lasalle *et al.* ont étudié les effets pharmacologiques du Foslip®, qui est une formulation de *m*-THPC incorporé dans les liposomes formés de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG), sur la souris portant la tumeur de EMT6.⁵⁶ Après administration intraveineuse de Foslip® à une dose de 0,3 mg.kg⁻¹, le volume de distribution est environ 4 fois plus élevé par rapport au Foscan® libre (709 et 172 ml.kg⁻¹, respectivement) montré par Jones *et al.*⁵⁷ La concentration de *m*-THPC pour cette formulation dans la tumeur atteint son maximum après 72 h après l'administration, tandis que dans le cas de Foscan®, la

concentration maximale dans la tumeur est obtenue après 24 à 48 h après l'administration.⁵⁷ Les liposomes classiques composés principalement de phospholipides et cholestérols, présentent souvent une demi-vie plasmatique trop courte pour une absorption efficace par les cellules tumorales, à cause de l'élimination rapide par le RES et la désintégration provoquée par l'échange de lipides avec des lipoprotéines du plasma sanguin et de l'interaction moléculaire entre les composants du liposome.⁵⁸

- *Micelle*

Une micelle est un assemblage sphéroïde de molécules possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers l'eau et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur, qui mesure de 10-100 nm.⁵⁹ Le noyau des micelles photosensibles est un espace chargé de Ps hydrophobes et la coque externe hydrophile facilite la dispersion des micelles dans l'eau.⁵⁹ Les micelles de copolymères sont plus intéressantes que les liposomes comme système de délivrance de Ps étant uniformes et plus stables. Les micelles peuvent s'accumuler sélectivement dans les tissus tumoraux par l'effet EPR et l'élimination de micelle par le RES est faible ce qui permet de prolonger le temps de circulation dans les vaisseaux sanguins.^{60,61} Hu *et al.* ont montré que la chlorine e6 encapsulée dans des micelles stéariques de chitosane greffés par acide est absorbée plus significativement par les cellules A-549 de cancer du poumon *in vitro* que le Ps libre.⁶²

- *Nanoparticules lipidiques solides ou SLN*

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont une classe de nanoparticules non-polymères biodégradables. Ils sont formés par les lipidiques solides avec un diamètre moyen de 150-170 nm.⁶³ L'excellente stabilité physique, la protection des médicaments labiles en évitant la dégradation, la libération contrôlée de médicaments rapide ou durable, une bonne tolérance et le ciblage sélective rendent le SLN bon candidat pour la PDT ciblée.⁶⁴ Mais les résultats des études réalisées à ce jour sont moins prometteurs.⁴³

- *Dendrimères*

Les dendrimères ont des structures régulières tridimensionnelles ramifiées, constituées d'une molécule centrale avec des groupements fonctionnels pour attacher les branches de

polymère répétées et terminées par des groupements fonctionnels à la surface qui déterminent les propriétés physico-chimiques du dendrimère.⁶⁵ Le dendrimère peut transporter une variété de molécules à la fois hydrophobes et hydrophiles. Le coût raisonnable de leur fabrication, les bonnes propriétés toxicologiques et une biocompatibilité acceptable permettent de les utiliser pour transporter des Ps pour la PDT ciblée. Cette formulation peut améliorer de manière significative le temps de circulation des Ps et l'accumulation de Ps dans les tissus tumoraux par l'effet EPR.⁶⁶ Battah *et al.* ont préparé des molécules dendritiques bien définies pour délivrer l'ALA. Chaque dendrimère porte 18 molécules d'ALA ce qui entraîne une augmentation de la production en PpIX dans les cellules, induisant une phototoxicité plus importante pour les kératinocytes tumorigène PAM 212 et l'épidermoïde humain A431 que l'ALA seul.⁶⁷

b. Nanoparticule non-biodégradable

Par rapport aux systèmes biodégradables, les nanoparticules non biodégradables présentent plusieurs avantages : la synthèse facile, la facilité de fonctionnalisation, et la bonne biocompatibilité.^{51,52} Ces nanoparticules agissent comme des véhicules, qui ne sont pas détruits pendant le traitement. La taille, la forme et la porosité peuvent être facilement contrôlées lors de la préparation.^{51,52} Les particules non-biodégradables sont à la plupart à la base de céramique et métallique. Les nanoparticules à base de silice ont encapsulé avec succès le *m*-THPC⁶⁸, le Fotolon⁶⁹, la PpIX⁷⁰ et des tétraphenyl porphyrines modifiées⁷¹⁻⁷⁹.

Ciblage actif

Le ciblage actif consiste à cibler des cellules tumorales en utilisant des ligands spécifiques qui se lient à des récepteurs appropriés exprimés au site cible. Des ligands sont choisis pour se lier aux récepteurs surexprimés par les cellules tumorales ou par le système vasculaire tumoral, qui ne sont pas exprimés par les cellules normales.⁴⁹

Le tableau suivant résume quelques stratégies utilisées en PDT ciblée.

Tableau 2. Stratégie de vectorisation en Photothérapie Dynamique (excepté les Ps glycoconjugués).

Cible	Partie ciblante	Chromophore	Réf.
Acides biliaires	Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT)	Porphyrine Chlorine	80
Angiogénine	Aptamère 45-mer angiogénine	Chlorine e6	81
Antigène EpCAM associé au cancer du colon	Anticorps 17.1	Chlorine e6	82
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps	Porphyrine cationique	83
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps monoclonal	Porphyrine	84
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps monoclonal	Porphyrine isothiocyanates	85
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps monoclonal	Chlorine e6	86
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps monoclonal	Chlorine	87
Antigène associé aux tumeurs	Anticorps monoclonal	Al-phtalocyanine	87-89
Antigène T/Tn associé à la tumeur	Morniga G galactose-specific lectine végétale	Porphyrine	90
Cancer surexprimant EGFR	Cetuximab	Pyrophéophorbide-a	91
Cancer surexprimant EGFR	Anticorps monoclonal (mAb), HER50 et HER66	Pyrophéophorbide-a visudyne	92
Cancer surexprimant EGFR	GE11 peptides YHWYGYTPQNV	Phtalocyanine	93
Cancer surexprimant EGFR	Peptides EGFR-L1 et EGFR-L2	Zn-phtalocyanine	94
Cancer surexprimant EGFR	Anticorps monoclonal chimérique EGFR reconnaissant C225	Verteoporphine	95
Cancer surexprimant EGFR	Erlotinib	Zn-phtalocyanine	96,97
Cancer surexprimant EGFR	Facteur de croissance épidermique (EGF)	Al-Phtalocyanine Co-Phtalocyanine	98
Cancer surexprimant EGFR	Facteur de croissance épidermique (EGF)	Sn(IV)-chlorine e6	99
Cancer-associated Thomsen–Friedenreich (T) carbohydrate antigen	Jacaline	Zn-phtalocyanine	100
Cellules T leucémiques Jurkat	Capside virale modifiée par un aptamère Jurkat-spécifique	Porphyrine	101
Domaine EDB de fibronectine	Anticorps monoclonal	Porphyrine	102
Domaine EDB de fibronectine	Anticorps humain L19	Sn(IV)-chlorine e6	103
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Anti-VEGF	Verteoporphine	104
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Anti-VEGF	Hématoporphyrine chronochimiothérapie	105
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)	Peptide mimant le VEGF ₁₆	Tétraphénylchlorine	105
Galectine-1, GLUT1 (Glucose transporter 1)	Galactodendrimère	Zn-phtalocyanine	106
Gastrin releasing peptide (GRP) or integrin receptors	Acetylenic bombesin ou RGD (Arginylglycylaspartic acid)	Zn-phtalocyanine	107
Glycosphingolipid Gb3	Toxine de Shiga sous-unité B	Chlorine e6	108
Glycosphingolipid Gb3	Toxine de Shiga sous-unité B	Porphyrine	109
Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors	GnRH agonist ou GnRH antagonist	Protoporphyrine IX	110
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Ferritine modifiée dans les séquences (RGD4C)	Zn-phtalocyanine	111,112
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	c(RGDfK)	Zn-phtalocyanine	113
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	c(RGDyK) dans chitosan	Pyrophéophorbide-a	114
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	c(RGDfK) dans nanoparticules	Méthylène bleue	115
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Protéine contenant un RGD	Tétraphénylporphyrine	116
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Protéine contenant un RGD Cyclique	Tétraphénylporphyrine	117,118
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Protéine contenant un RGD Cyclique	Chlorine	119
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Protéine contenant un RGD Cyclique	Protoporphyrine IX	120
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	RGD polyamide nanoparticule	Hématoporphyrine	121
Le récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGFR2)	Peptide ciblante, ATWLPPR	Verteoporphine	122
Le récepteur des LDL	LDL (Lipoprotéine à faible densité)	Chlorine e6	123
Le récepteur des LDL	LDL	Zn-phtalocyanine	124

Le récepteur des LDL	LDL	Hématoporphyrine	125-128
Le récepteur des LDL	LDL	Benzoporphyrine	129-133
Le récepteur des LDL	LDL	Al-phtalocyanine	134
Le récepteur des LDL	LDL	Porphyrine	135
Monoclonal antibody	Antigène carcinoembryonique	Zn-phtalocyanine	136
Nucléoline	Aptamer AS1411 formé par G-quadruplex	Porphyrine	137,138
Nucléoline	Peptide vasculaire F3 dans nanoparticule	Photofrin	139
Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)	Siloxypropyldiméthylamine Ligand axial	Si-phtalocyanine	140
Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER-2)	Anticorps monoclonal	Zn-phtalocyanine	141
Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER-2)	Anticorps monoclonal (mAb), HER50 et HER66	Pyrophéophorbide-a photoimmunothérapie	92
Récepteur de facteur tissulaire	Protéine Facteur VII (fVII)	Verteoporphine	142
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Chlorine e4	143
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Zn-phtalocyanine	144
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Zn-phtalocyanine polyvinylpyrrolidone dans micelles	145
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Zn-phtalocyanine dans Nanodots	146
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Al-phtalocyanine dans nanoparticule	147
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Al-phtalocyanine dans liposome	148
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Protoporphyrine IX-nanosphère furtive	149
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Tétraphénylporphyrine	150
Récepteur de l'acide folique	Nuclear targeting b pullulan/folate nanogel	Pheophorbide-a	151
Récepteur de l'acide folique	Acide folique	Chlorine	112,152, 153
Récepteur de l'Interleukin-2 (IL-2R)	Anticorps IL-2 ou un anti-IL-2R	Hématoporphyrine	154
Récepteur de l'Interleukin-2 (IL-2R)	Anticorps IL-2 ou un anti-IL-2R	Chlorine e6	154
Récepteur de la transferrine	Transferrine	Hématoporphyrine	128
Récepteur de la transferrine	Transferrine	Chlorine e6	155
Récepteur de la transferrine	Transferrine dans liposome	Al-phtalocyanine	156
Récepteur de la transferrine	Albumine de sérum bovin (BSA) Maléylée	Chlorine e6	157
Récepteur des œstrogènes	C11-estradiol	Tétraphénylporphyrine	158
Récepteur des œstrogènes	Estradiol	Zn-phtalocyanine	159
Récepteur des œstrogènes	C17-alkynylestradiol	Chlorine e6	160
Récepteur des œstrogènes	Tamoxifen	Pyrophéophorbide	161
Récepteur des œstrogènes	Estradiol	Phéophorbide a	162
Récepteur hyaluronique CD44	Acide hyaluronique	Chlorine e6	163
Recepteur ICAM-1 de la surface de cellule	Antixorps ICAM-1	Porphyrene	164
Récepteur Neuropilin-1	ATWLPPR heptapeptide	Chlorine	165-169
Récepteur SST2	octreotate	Porphyrine	170,171
Récepteur SST2	Peptide GE11	Porphyrine	170,171
Signal de localisation nucléaire	peptide unit Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val	Zn-phtalocyanine	172
Up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS)	Polyamine	Tétrabenzoporphyrine	173
Up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS)	Polyamine	Si(IV)-phtalocyanine	174-176
Up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS)	Polyamine, spermine, spermidine	Porphyrine	177-181

Up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS)	Polyimine	Purpurine-18 bactériopurpurine-18	182,183
--	-----------	--------------------------------------	---------

- *Peptides*

Les marqueurs de prolifération cellulaire surexprimés par certaines cellules tumorales sont des cibles importantes pour la thérapie du cancer.¹⁸⁴ De nombreux Ps peuvent être facilement incorporés dans les lipoprotéines telles que les lipoprotéines à faible densité (LDL) dont les récepteurs sont plus abondants pour les cellules tumorales que pour les cellules normales.⁵³ Les LDL chargés avec un Ps peuvent cibler les cellules endothéliales et les cellules néovasculaires tumorales présentant une forte expression de récepteurs des LDL due à l'augmentation de la prolifération des cellules.⁵³ L'utilisation de LDL comme véhicule de Ps pour améliorer la phototoxicité a été étudiée pour beaucoup de Ps, y compris l'HpD^{185,186}, les phthalocyanines de zinc¹²⁴, et la chlorine e6¹²³.

- *Anticorps*

La PDT ciblée par un anticorps est une technique permettant de modifier la concentration intracellulaire du Ps en conjuguant le Ps à un anticorps spécifique. Les anticorps, par des interactions avec des antigènes surexprimés par les cellules tumorales ciblées, induisent une forte internalisation des Ps.^{53,187} Malgré des résultats prometteurs et des progrès ces dernières années, la PDT ciblée par anticorps n'a pas encore été mise en œuvre en clinique.⁴³ pourquoi

- *Acide folique*

Parmi les vitamines, l'acide folique semble présenter la meilleure promesse en PDT ciblée.¹⁸⁸ Il est stable au stockage et à la circulation, peu coûteux, non toxique et non immunogène. L'acide folique a une forte affinité pour les récepteurs folates qui sont surexprimés dans de nombreux cancers, tels que des carcinomes de l'ovaire, du rein, du poumon, du sein et du cerveau. Par contre, les récepteurs folates sont absents dans la plupart des tissus normaux.¹⁸⁹ En outre, l'acide folique peut être facilement conjugué avec des Ps (exemple, voir **Figure 10 et 11**).

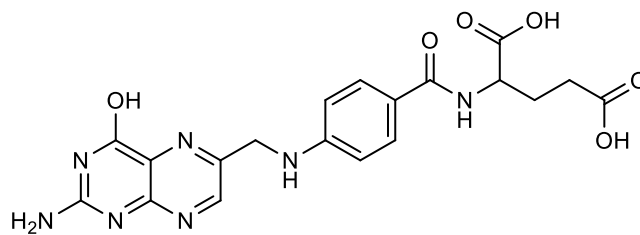


Figure 10. Structure de l'acide folique (FA).

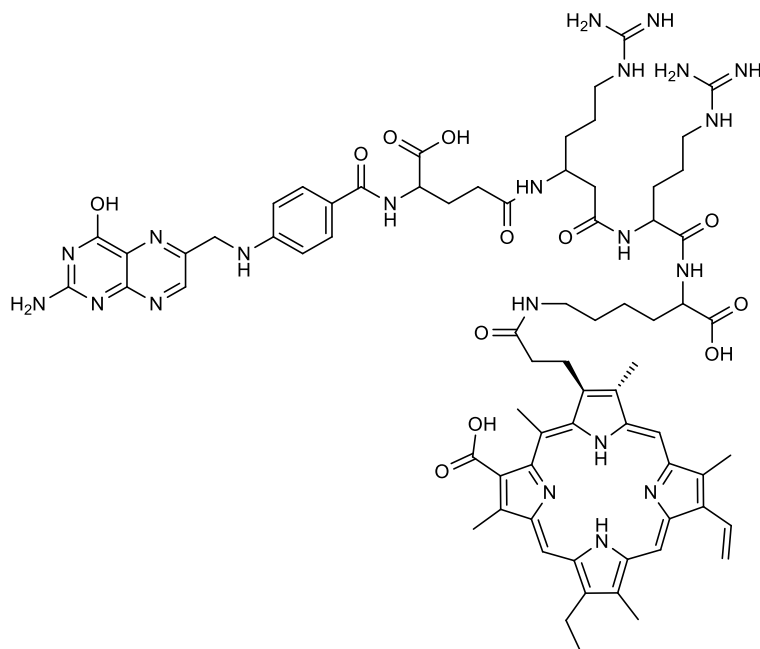


Figure 11. Exemple de conjugué entre l'acide folique et la chlorine e6.¹⁴³

- *Aptamères*

Similaire au ciblage par les peptides, le ciblage par des aptamères basés sur des acides nucléiques semble être une technique de ciblage prometteuse et puissante. Les aptamères sont des nucléotides courts qui se replient dans une architecture tridimensionnelle bien définie, leur permettant de se lier spécifiquement aux cibles.¹⁹⁰ Ils ont plusieurs avantages, la petite taille, la facilité d'isolement et la faible immunogénicité. En outre, les aptamères sont structurellement stables dans une large gamme de conditions de stockage. Ils ont la capacité

de former des structures tertiaires uniques.^{137,191} Shieh et al. ont préparé un conjugué de l'aptamère G-quadruplex AS1411 avec la porphyrine (tétra-méthyl-pyridinium porphyrine, TMPyP4) soluble dans l'eau. Ce conjugué montre une meilleure affinité pour les cellules du cancer du sein MCF7 par rapport aux cellules épithéliales normales. Après irradiation avec la lumière bleue, les photodommages dans les cellules MCF7 sont plus importants que dans les cellules épithéliales M10.¹³⁷ Yin et al. ont préparé une nanoparticule magnétique encapsulant le Ps (TMPyP4) et fonctionnalisée par l'aptamère G-quadruplex AS1411 pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses.¹³⁸ D'autres exemples sont présentés par Yang X. et al.⁸¹ et Schmidt-Erfurth U. et al.¹²³.

- *Sucre*

L'adjonction de sucre sur des Ps de type cycles tétrapyrroliques permet d'augmenter l'hydrophilie et la biocompatibilité du Ps.^{192,193} En outre, Griegel et al. ont montré que les cellules de rétinoblastome surexpriment des récepteurs lectiniques présentant une affinité élevée pour le galactose et le mannose dès 1989.¹⁹⁴ Très récemment Gallup et coll. ont confirmé la présence de récepteurs membranaires à mannose sur deux lignées tumorales de rétinoblastome (Y79 et WERI Rb) et sur des tumeurs primaires de rétinoblastome issues d'enfants malades énuclés.¹⁹⁵ (voir molécules de notre équipe dans **Chapitre I.I.3.4.**)

Ciblage activable

Les Ps activables peuvent être activés par diverses conditions stimulantes, entraînant la production d'oxygène singulet dans les tissus cibles. Ils peuvent cibler et tuer plus spécifiquement des cellules tumorales qui diffèrent des cellules normales par l'environnement, l'expression d'enzyme, ou l'expression d'acide nucléique par exemple.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

a. Ps activable par un *stimulus* environnemental

La conception de Ps activables est basée sur le fait que le pH extérieur des tumeurs est inférieur à celui des tissus sains.⁴⁶ Ce système comportant des composés sensibles au pH ou à la température peut répondre aux *stimuli* physiologiques locaux tels que les changements de pH et/ou de la température locale associés à la pathologie.⁴³ Shieh et al. ont encapsulé le

m-THPC dans des micelles sensibles au pH. Les Ps sont libérés quand le PH est 5,0 aux alentours des tissus tumoraux.¹⁹⁹ L'efficacité photocytotoxique de cette formulation *In vivo* est similaire à celle de *m*-THPC libre, mais le Ps encapsulé présente moins de photocytotoxicité pour les tissus normaux.¹⁹⁹

b. Photodynamic molecular beacons (PMB)

Le PMB consiste à associer le Ps, le «quencher» et un lien spécifique « linker », en maintenant le Ps et le «quencher» à proximité l'un de l'autre, de sorte que le Ps est désactivé vers son état fondamental par un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (phénomène de FRET).^{43,197}

Lorsque le linker interagit avec des cellules cibles, le Ps et le «quencher» sont séparés les uns des autres, par conséquent, le Ps est activé.¹⁹⁶ Le premier exemple de PMB utilise un peptide court avec une séquence spécifique d'acide aminé ciblé vers la protéase (caspase 3) surexprimée par les cellules tumorales.²⁰⁰ Comme illustré à la **Figure 12** à gauche, le conjugué composé un Ps (pyropheophorbide- α) en rouge, un linker (séquence d'acides aminés activée par la caspase 3) en vert, et un quencher (caroténoïde) en violet. La **Figure 12** à droite montre que la partie peptidique est clivée après interaction avec la caspase 3, et le Ps est libéré.

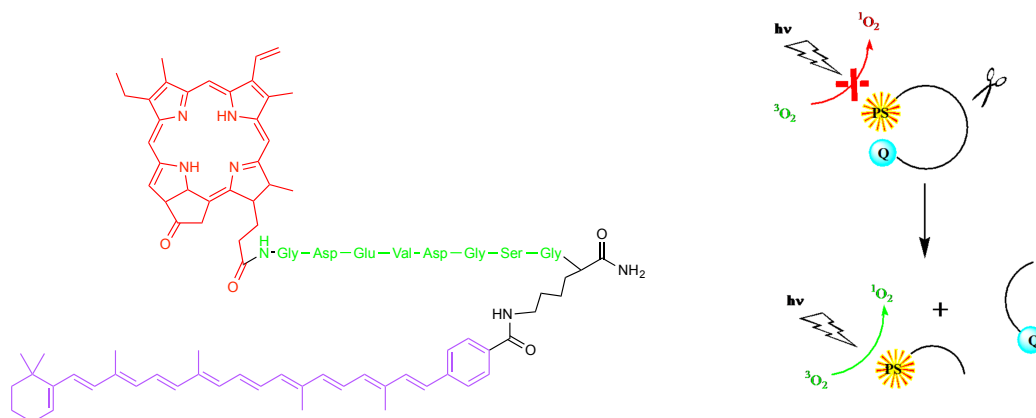


Figure 12. Structure d'un exemple de PMB à gauche²⁰⁰ ; Processus d'activation de Ps à droite¹⁹⁷.

I.2. La Thérapie PhotoDynamique à absorption simultanée de deux photons (PDT-ADP)

I.2.1. Principe de l'ADP

Les processus d'absorption simultanée de deux photons par une même molécule ont été analysés et démontrés théoriquement pour la première fois dans les années 1930 par Maria Göppert-Mayer.²⁰¹ La première observation expérimentale a ensuite été réalisée en 1961,²⁰² juste après l'invention du laser. L'étude des processus d'absorption à deux photons s'est développée avec la disponibilité de sources pulsées sub-picosecondes dans les années 1990 (en particulier le laser Ti : saphir). L'invention de la microscopie de fluorescence à deux photons par Webb *et al.*²⁰³ et l'adoption rapide de cette technique par des fournisseurs de microscopie confocale, a conduit à une explosion d'intérêt dans tous les types de processus multiphotoniques.²⁰⁴

La différence principale entre l'absorption d'un photon et l'absorption de deux photons est que l'ADP implique l'interaction avec deux photons simultanément. L'absorption simultanée de deux photons implique surtout le passage par un état virtuel de durée de vie extrêmement courte, d'où la nécessité de disposer de sources pulsées sub-picoseconde.

Du point de vue de la physique classique et en considérant le phénomène d'absorption comme la collision entre une molécule et un ou plusieurs photons, la difficulté de la mise en œuvre de l'ADP peut se comprendre de la manière suivante : les collisions à deux particules sont un phénomène courant de la physique dont l'occurrence statistique est grande, tandis que l'ADP demande la rencontre de trois particules, le chromophore et deux photons, de façon simultanée ou dans un laps de temps extrêmement court. Ce phénomène est peu probable ce qui induit plusieurs contraintes.²⁰⁵

La propagation de la lumière de l'intensité I , à travers un matériau d'épaisseur z , est présentée sur la **Figure 13** et peut être exprimée par l'équation 1, où un α_1 et un α_2 sont les coefficients d'absorption à un et deux photons. Contrairement à l'absorption classique à un photon, l'ADP est un phénomène non linéaire. Le premier terme correspond à l'absorption classique d'un photon, ce terme dépend linéairement de l'intensité lumineuse I . Le second

correspond à l'ADP qui en dépend quadratiquement. Les ordres supérieurs d'absorptions non linéaires ne sont pas abordés ici, mais des formulations pour l'absorption multiphotoniques peuvent être trouvées dans la revue de Guang S. He.²⁰⁶

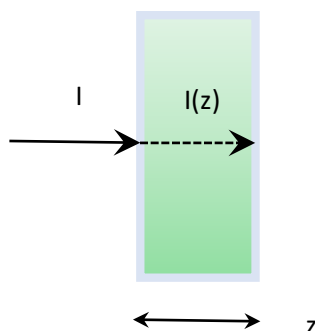


Figure 13. Absorption d'un rayonnement lumineux par un échantillon.

$$\frac{dI}{dz} = -(\alpha_1 I + \alpha_2 I^2 \dots) \text{ (Équation 1)}$$

L'absorption d'un photon est basée sur la loi Beer-Lambert.

Pour caractériser l'absorption de deux photons d'un composé, on définit la section efficace d'absorption à deux photons (δ) par l'équation 2:

$$dn_p/dt = N F^2 \text{ (Équation 2)}$$

Où dn_p/dt est le nombre de photons absorbés par unité de temps, N est le nombre de molécules par unité de volume et $F = I/h\nu$, le flux de photons.

La section efficace d'absorption à deux photons est en général relativement faible, de l'ordre de $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1}$. Par égard au travail effectué par Maria Göppert-Mayer, une unité spécifique a été définie : le GM (Göppert-Mayer) qui vaut : $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$.

L'excitation du Ps de l'état fondamental (S_0) vers l'état excité (S_1) par l'absorption d'un photon ou par l'absorption quasi-simultanée (vers 10^{-16} s) de deux photons est montrée à la **Figure 14**. Un photon excite le Ps à un état intermédiaire virtuel, tandis que le second

photon excite en l'état excité virtuel conduisant le Ps à l'état excité. Les deux photons ont environ la moitié de l'énergie nécessaire à une excitation à un photon et double ainsi la longueur d'onde du photon requis pour exciter le Ps. Théoriquement, deux photons dans la région infrarouge du spectre (vers 900 nm) peuvent combiner leurs énergies et exciter un Ps, qui absorbe un photon unique dans la région bleu (vers 450 nm).

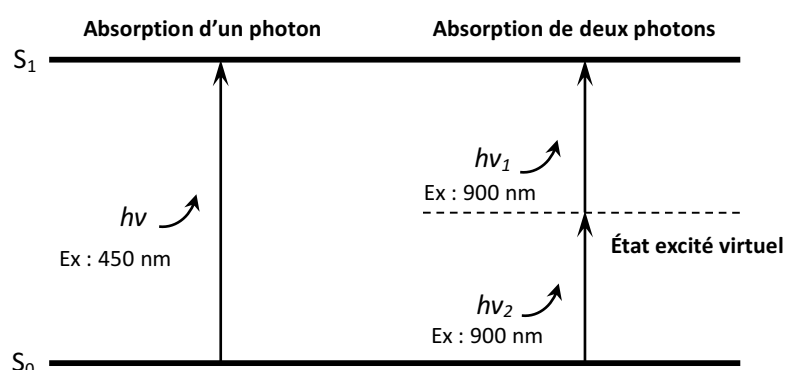


Figure 14. Diagramme de Janbloski pour l'absorption à un et deux photons ($h\nu_1 = h\nu_2 = h\nu/2$).

I.2.2. Méthodes de mesure des sections efficaces

Les molécules ADP sont caractérisées par leur section efficace (δ) exprimée en Goeppert-Mayer (GM). Ces dernières sont délicates à mesurer et dépendent fortement des conditions expérimentales et en particulier du solvant. Par exemple, des composés, présentant une très forte ADP dans le toluène, sont susceptibles d'absorber très peu dans l'eau. D'autres paramètres comme la durée des impulsions ainsi que leur forme sont à l'origine de variations importantes de δ .

Diverses techniques ont été mises au point afin d'accéder à δ . Cette section présente les trois principales méthodes de mesure de cette grandeur.

- **Transmission Non Linéaire (TNL)** : Il s'agit d'une méthode directe de mesure d'absorption d'un échantillon n'absorbant pas à un photon à la longueur d'onde utilisée.²⁰⁷ Elle consiste à comparer les différences d'intensité d'un rayon avant et après traversée de la solution absorbante. Contrairement à l'absorption UV-visible classique (AMP), le rayon incident n'est pas linéaire mais focalisé ce qui conduit à une modélisation mathématique un peu plus complexe en ADP qu'en AMP. Il est toutefois possible de mesurer le coefficient d'ADP $\beta(\lambda)$ et d'en déduire $\delta = 10^3 \cdot \frac{h\nu}{N_A} \cdot \frac{\beta}{d_0}$ (Équation 3) avec h la constante de Planck, ν la fréquence d'excitation, N_A le nombre d'Avogadro et d_0 la concentration en espèce absorbante en mol.l⁻¹.

Cette méthode est peu précise du fait de l'influence d'effets de solvant pouvant conduire à des variations de la taille du point focal provoquant une modification de l'intensité transmise et des erreurs pouvant aller jusqu'à 50-100% de la valeur mesurée. Il faut multiplier les mesures à plusieurs intensités et les moyenner pour obtenir δ . Le montage expérimental peut, lui aussi, influencer de manière non négligeable la valeur obtenue.

- **Z-scan** : Il s'agit d'une méthode directe dont l'objet est la mesure de la composante imaginaire de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre. Cette grandeur est directement liée à l'absorption bi photon et donc à la section efficace.²⁰⁸

D'un point de vue pratique, on déplace l'échantillon au long du faisceau (axe z) en mesurant pour chaque position la puissance transmise en présence et absence d'un diaphragme. Cette puissance transmise dépend d'effets non linéaires sur la réfraction et l'absorption du milieu, il est ensuite possible de déterminer δ pour la molécule étudiée.

Bien que plus précis que la méthode TNL, le Z-scan reste limité par des effets thermiques et le faible rapport signal/bruit inhérent à la mesure. Les grandeurs mesurées sont peu précises.

- **Fluorescence Excitée à Deux Photons** : Cette méthode, appelée TPEF de l'anglais *Two-Photon Excited Fluorescence* est une méthode indirecte consistant à mesurer l'intensité d'émission de fluorescence suite à l'absorption biphotonique.^{209,210} La plupart des molécules organiques ADP sont susceptibles d'émettre de la fluorescence.

L'absorption biphoton conduit généralement au peuplement d'états électroniques S_n ($n > 1$). Ceux-ci se relaxent par conversion interne (CI) jusqu'au niveau S_1 d'où est émise la

fluorescence. En comparant l'émission de fluorescence de la molécule testée à une molécule de référence dont le spectre ADP (en général la fluorescéine ou la rhodamine) et le rendement quantique de fluorescence sont connus, il est possible de déterminer la section efficace de la première.²¹¹ Cette méthode est beaucoup plus sensible que les précédentes et permet de s'affranchir de certaines des considérations expérimentales comme une concentration très forte en espèce ADP et des lasers extrêmement puissants.²⁰⁶ La condition principale pour l'application de cette méthode est que les rendements quantiques de fluorescence suite à excitation à un et deux photons soient identiques.

I.2.3. Avantages de la PDT-ADP (pénétration de la lumière et précision spatiale)

La profondeur de pénétration de la lumière est limitée par l'absorption des tissus. Dans les tissus biologiques, l'absorption de la lumière provient principalement de l'eau, de l'hémoglobine (Hb), de l'oxyhémoglobine (HbO₂) de certaines protéines comme la mélanine. L'eau absorbe dans l'ultraviolet et surtout dans l'infrarouge. Le spectre d'absorption de l'hémoglobine dépend de son état d'oxygénation (HbO₂). Son absorption est importante aux faibles longueurs d'ondes du visible. Enfin, la mélanine absorbe préférentiellement dans le visible. Leurs spectres d'absorption permettent alors de définir une fenêtre, appelée « fenêtre thérapeutique optique » pour laquelle l'absorption globale des tissus est relativement faible.^{212,213} Comme le montre la **Figure 15**, celle-ci se situe entre 700 nm et 1300 nm.

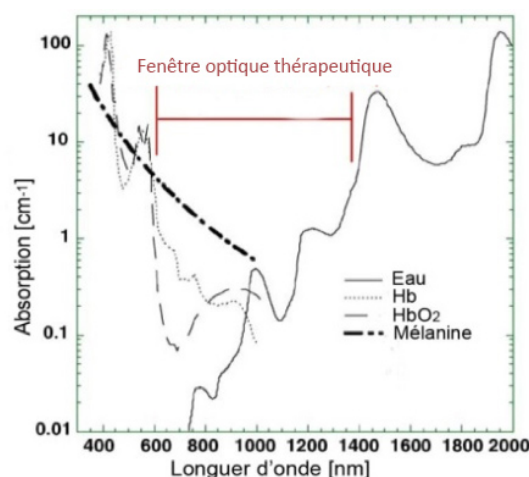


Figure 15. La fenêtre optique physiologique : spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques (eau, mélanine et hémoglobine Hb, oxyhémoglobine HbO₂).¹⁹

Spangler a estimé la profondeur efficace d'un rayonnement situé dans la fenêtre thérapeutique optique *in vivo* à 2 cm.¹⁷⁰ Cependant, la lumière au-delà de 800 nm n'a pas une énergie d'activation suffisante pour permettre la production de ROS. (**Figure 16**)

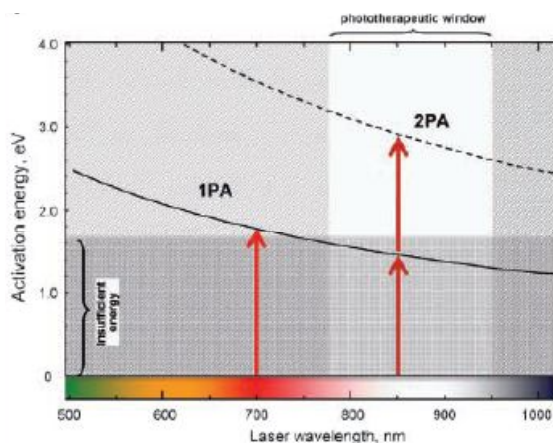


Figure 16. La relation entre la longueur d'onde et l'énergie minimale nécessaire pour l'excitation de l'oxygène triplet en oxygène singulet.

La zone grisée correspond aux énergies d'excitation inférieures à la valeur minimale requise pour former l'oxygène singulet, ce qui montre que la sensibilisation par l'absorption d'un photon de longueur d'onde supérieure à 780 nm ne permet pas la formation d'oxygène singulet. La sensibilisation par absorption simultanée de deux photons combine l'énergie de deux photons et peut fournir suffisamment d'énergie pour exploiter l'ensemble de la fenêtre phototherapeutique.²¹⁴ De ce fait, la photothérapie dynamique à absorption simultanée de deux photons (PDT-ADP) pourrait permettre d'atteindre et de traiter les tissus qui sont situés plus profondément.

Un autre avantage important, par rapport à la PDT conventionnelle à absorption d'un photon, est que la PDT-ADP permet d'avoir une meilleure précision. En utilisant les lasers femtosecondes pulsés et focalisés, l'effet ADP est obtenu seulement en un point de haute énergie, correspondant au point focal du faisceau laser de par la dépendance quadratique de l'ADP à l'intensité lumineuse locale, ce qui permet un contrôle très précis de la zone de photosensibilisation. Cela est montré dans la **Figure 17**, la fluorescence suite à une absorption à un photon est émise sur tout le trajet de la lumière. La fluorescence suite à une

absorption à deux photons n'est effective qu'au point focal du faisceau laser. Ainsi la PDT-ADP permet d'éviter d'endommager les tissus autour des tissus malades et de traiter les tissus malades délicats comme les tumeurs intraoculaires.

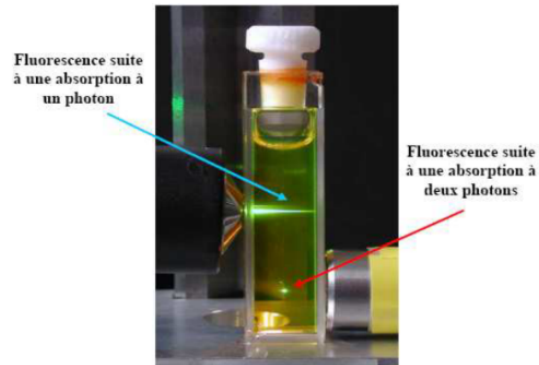


Figure 17. Comparaison de la fluorescence suite à une absorption à un photon et celle suite à une absorption à deux photons.²⁶

De plus, l'effet cytotoxique est limité au lieu de l'irradiation en raison de la réactivité très importante et de la durée de vie courte de l'oxygène singulet dans les cellules. La distance de diffusion de l'oxygène singulet est aux alentours de 2 μm . En comparaison la cellule eucaryote mesure environ 10-30 μm , la diffusion se produit au niveau intracellulaire.²¹⁵

I.2.4. Ps ADP connus dans la littérature et leurs propriétés physiques et/ou biologiques)

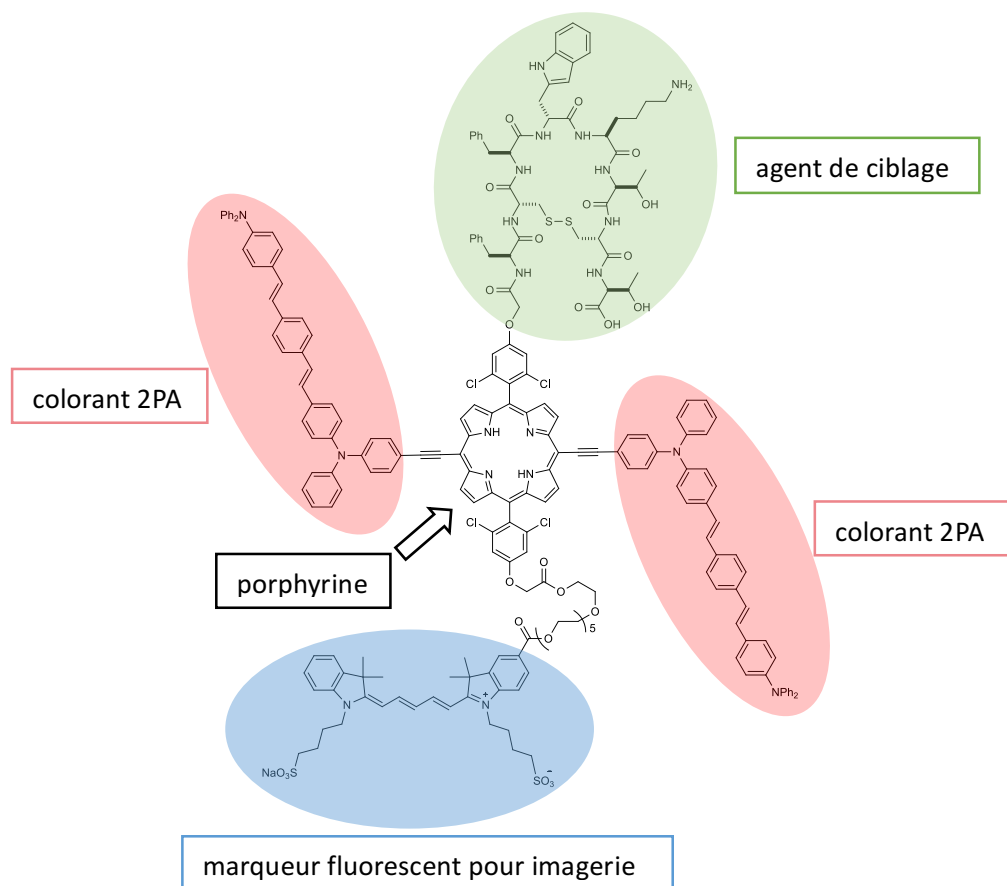


Figure 18. Porphyrine hybride tri-fonctionnalisée optimisée pour l'imagerie, l'ADP et le ciblage tumoral.¹⁷⁰

Une méthode connue pour améliorer l'efficacité d'absorption » de deux photons d'un Ps est d'attacher un ou plusieurs colorants excitables à deux photons pour « récolter » et transférer l'énergie au Ps par un transfert d'énergie de résonance Förster (FRET).²¹⁶ La **Figure 18** montre un exemple d'ingénierie effectuée sur une porphyrine dite hybride, optimisée via l'incorporation de deux colorants distyrylbenzène pour améliorer la section efficace de 2PA ($\delta = 1500-2000 \text{ GM}$), un peptide (octreate) qui cible un récepteur (somatostatine) généralement surexprimé dans des cellules cancéreuses humaines, et un marqueur fluorescent cyanine pour faciliter l'étude de l'imagerie de fluorescence.

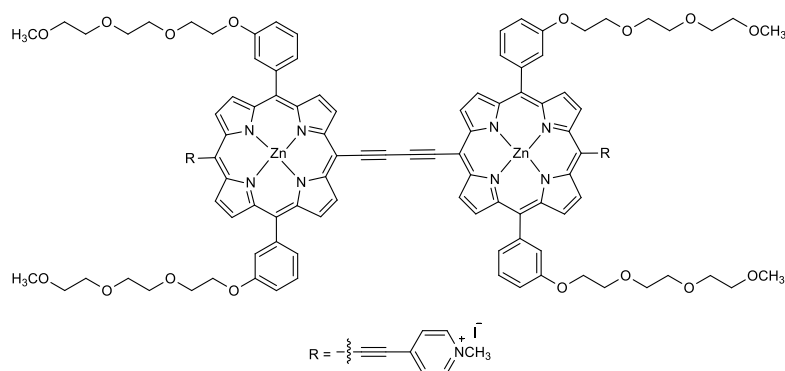


Figure 19. Structure de porphyrine dimère synthétisée par Anderson et al.

La première démonstration *in vivo* de la PDT-ADP a été réalisée par Harry L. Anderson *et al.*²¹⁷ en utilisant un Ps porphyrine dimère fonctionnalisé avec un substituant polaire. (**Figure 19**) Le coefficient d'extinction de cette porphyrine dimère est environ de $300,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 460 nm. La section efficace maximale est $170,000 \text{ GM}$ à 916 nm. Le rendement quantique de génération d'oxygène singulet est 0,60. L'effet photocytotoxique de ce composé excité par une absorption d'un photon est similaire à celle observée avec la Verteporfin sur les cellules adénocarcinome ovarien humain (SK-OV-3) (incubation de $10 \mu\text{M}$ de chaque Ps pendant 6 h et irradiation à 657 nm). L'expérience de la PDT-ADP est réalisée dans les cellules SK-OV-3 en utilisant un laser Ti : saphir (920 nm, 300 fs, 90 MHz). Cette porphyrine dimère est considérablement plus phototoxique que la Verteporfin, avec seulement 260 scans (moins de temps d'irradiation) pour tuer 50% de cellules, tandis que 430 scans sont nécessaires pour la Verteporfin.

Ensuite, un test sur les vaisseaux sanguins *in vivo* avec ce Ps a été réalisé dans les souris nudes (NCRUN-M, Taconic) en utilisant le laser (900 nm, 300 fs, 90 MHz, 39 mW). Les souris traitées avec $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ du Ps ont montré un amincissement des vaisseaux pendant l'irradiation et la cessation du flux sanguin après 7-12 min. Un segment du vaisseau d'environ $100 \mu\text{m}$ de chaque côté de la région irradiée était non-visible dans l'image de transmission, probablement en raison de l'exclusion de l'hémoglobine. (**Figure 20**) Bien que la longueur de l'artère close soit supérieure à la région irradiée, des vaisseaux sanguins environnants semblent ne pas avoir été affectés ce qui démontre la sélectivité de la PDT-ADP pour traiter les maladies dans les organes complexes comme les yeux et la tête.

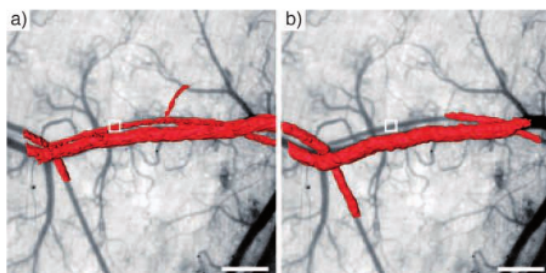


Figure 20. Test *in vivo* sur les vaisseaux sanguins avec la molécule décrite à la **Figure 19**.

K. Ogawa *et al.*²¹⁸ ont synthétisé une série de porphyrines conjuguées auto-assemblées solubles dans l'eau (**Figure 21**). La section efficace de cette porphyrine, mesurée en utilisant un laser de 150 fs, est 7,900 GM à 850 nm ce qui fait de cette molécule un candidat possible pour une application en PDT-ADP.

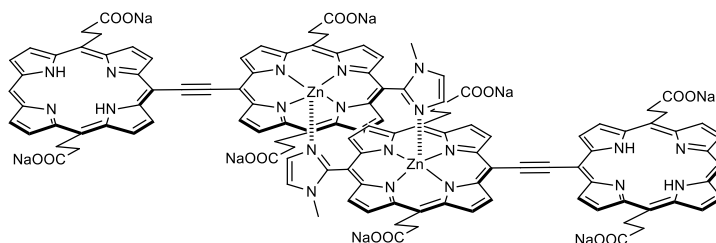


Figure 21. Porphyrine dimère auto-aseemblée.

La photocytotoxicité de ce composé vis-à-vis des cellules Hela a été examinée en observant la mort cellulaire sous microscopie avec une irradiation du laser à diode CW (671 nm). Aucune mort de cellule n'a été observée sans Ps, même après 2 h d'irradiation. La mort cellulaire est observée en présence de cette porphyrine dimère (5×10^{-6} M) pendant environ 74 min. La fuite du cytoplasme en fonction du temps est illustrée dans la **Figure 22**.

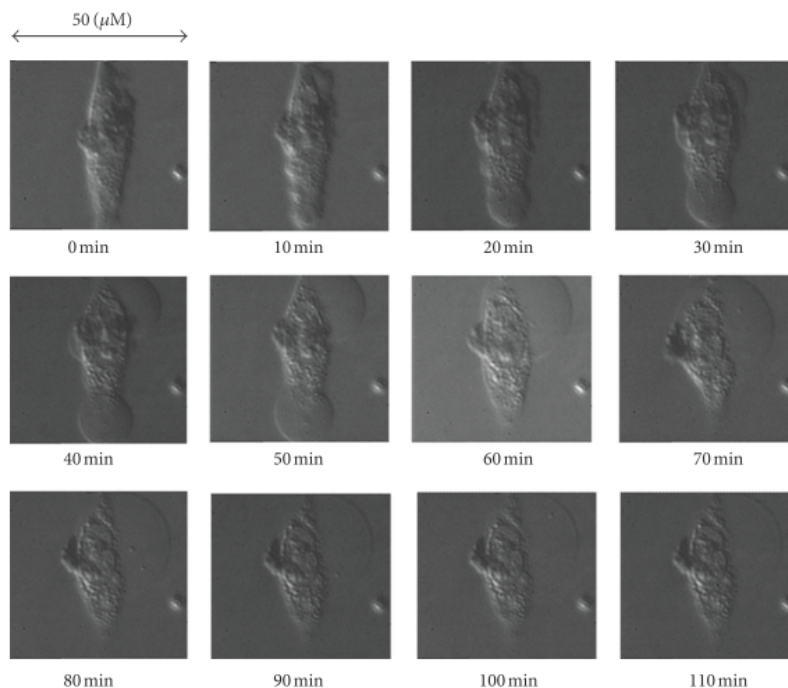


Figure 22. Test de porphyrine dimère sur les cellules Hela.²¹⁸

K. Ogawa *et al.*²¹⁹ ont ensuite publié un autre système de porphyrines auto-assemblées en utilisant un substituant dendritique (**Figure 23**). La section efficace de ce système est 33,000 GM à 890 nm.

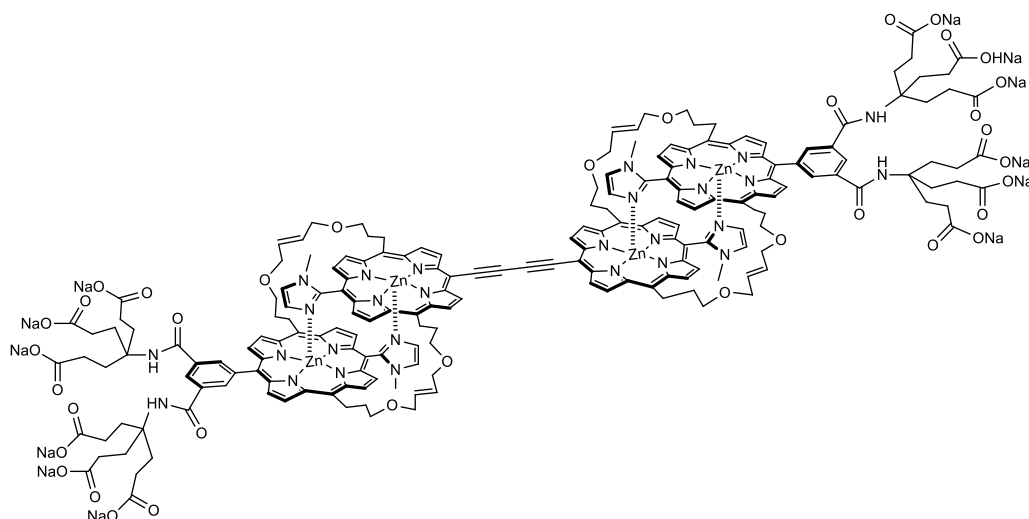


Figure 23. Système de porphyrines auto-semblées développé par Ogawa.

Les mesures de photocytotoxicité PDT-ADP ont été réalisées en utilisant des cellules Hela. Une cellule Hela incubée avec la porphyrine dimère sur une lame de verre a été irradiée pendant 5 minutes. Comme représenté sur la **Figure 24**, une cellule Hela sur le côté supérieur est excitée sélectivement (marquée par une flèche). Après irradiation, la dégradation de la membrane cellulaire a été observée à un niveau superficiel de la cellule. La cellule inférieure qui n'a pas été irradiée est en bon état.

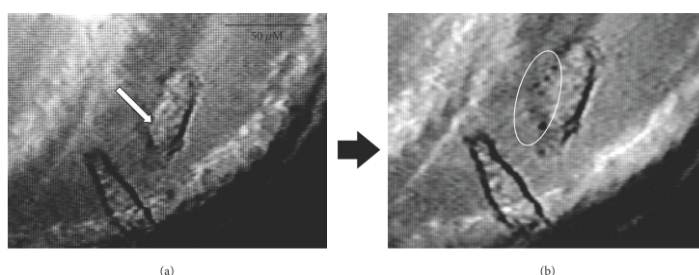


Figure 24. Test sur cellules Hela (dégradation de la membrane cellulaire après irradiation).

Notre groupe a synthétisé un hybride de porphyrine glycoconjuguée et de triphénylamine (**Figure 25**).²²⁰ Les mannoses permettent de cibler spécifiquement les récepteurs lectines surexprimés sur la membrane des cellules de rétinoblastome.¹⁹⁴ La substitution de triphénylamine sur la porphyrine permet d'obtenir une forte absorption de deux photons à l'aide d'un mécanisme de FRET, avec une section efficace de 225 GM et un rendement quantique de formation d'oxygène singulet de 0,84. Les études de photocytotoxicité ont été réalisées dans deux types de cellules tumorales : Y79 (une souche de cellules de rétinoblastome humaines surexprimant des récepteurs lectine à mannose) et HT-29 (cellules tumorales de côlon humain ne présentant pas de lectine à mannose). Ce composé n'est cytotoxique sur aucune souche de cellules à une concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) supérieure à 7,5 μM avec ou sans irradiation. De plus, ce composé n'a montré aucun ciblage actif sur les récepteurs lectine. Les deux observations peuvent être expliquées par une internalisation cellulaire très faible de ce composé en raison de l'hydrophobicité de la partie de triphénylamine.

être observés.²²³ 60% des rétinoblastomes sont unilatéraux et la plupart de ces formes ne sont pas héréditaires. Ils impliquent une déficience génétique liée au gène Rb1 dans environ 40% des cas bilatéraux. Toutes les formes bilatérales et multifocales sont héréditaires. Cette déficience peut induire des tumeurs secondaires graves liées ou non au traitement clinique.²²³

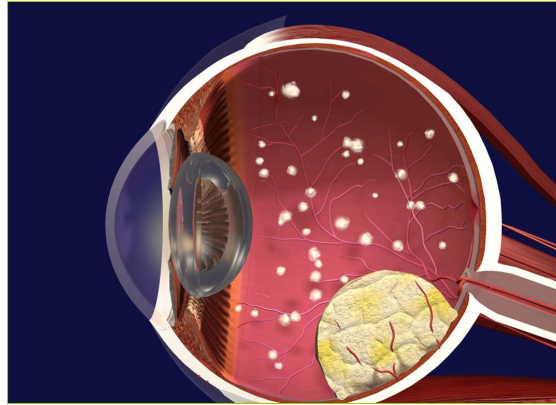


Figure 26. Rétinoblastomes.²²⁴



Figure 27. Symptômes de rétinoblastome (leucocorie et strabisme).

Pour bien comprendre les indications thérapeutiques, il faut savoir qu'il existe dans l'œil, deux parties distinctes, antérieure et postérieure, séparées par une ligne virtuelle appelée équateur. La partie de la rétine postérieure à l'équateur comporte des structures très fragiles (la macula, ou centre de la rétine, et la papille, ou tête du nerf optique). De ce fait, au niveau postérieur, certaines thérapeutiques ne peuvent pas être utilisées car elles risqueraient de compromettre la vision. (**Figure 28**).

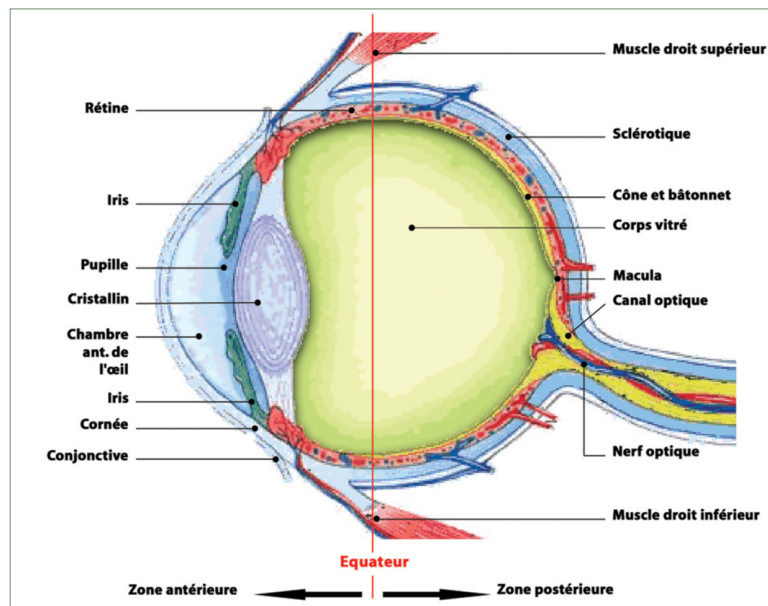


Figure 28. Anatomie de l'œil.²²⁵

1.3.1.2. Traitements actuels de rétinoblastome et leurs limites

Les traitements conservateurs actuels du rétinoblastome sont : la cryothérapie, la curiethérapie par disque radioactif, la thermochimiothérapie, la photocoagulation, ou la radiothérapie externe.²²⁶ Lorsque la tumeur est très volumineuse et la destruction visuelle déjà importante, la meilleure solution thérapeutique est l'ablation chirurgicale de l'œil dite "énucléation".²²⁷

L'utilisation des différents traitements est fonction de la forme de la tumeur (héréditaire/sporadique/unilatérale/bilatérale), de sa localisation dans l'œil, de son volume et de l'âge de l'enfant.

a. Tumeurs antérieures à l'équateur de l'œil

- Cryothérapie

La cryothérapie consiste à geler et tuer la tumeur en plusieurs séances, en appliquant de très basses températures entre -60°C et -80°C. Cette technique est employée pour traiter des petites lésions tumorales ne dépassant pas 3 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur, situées dans la partie antérieure de l'équateur de l'œil. Le désavantage de cette méthode est de risquer de perturber la vision.

- *Curiethérapie par disque radioactif*

La curiethérapie utilise des disques en or contenant des grains d'iode radioactif qui permettent une irradiation très localisée de la tumeur sans risque d'endommager les tissus à proximité. L'or permet d'arrêter le rayonnement de l'iode vers les zones à protéger (paupière, tissus orbitaire et paroi osseuse). Ce traitement permet de traiter des tumeurs antérieures à l'équateur de l'œil, ne dépassant pas 15 mm de diamètre. Il est aussi utilisé en cas d'envahissement du vitré. Mais les patients possédant une mutation du gène Rb1 ont des risques de développer une ou plusieurs tumeurs secondaires à long terme.

b. Tumeurs postérieures à l'équateur de l'œil

- *Thermochimiothérapie*

La thermochimiothérapie combine la chimiothérapie et le réchauffement de la tumeur par un rayon laser diode. La molécule anticancéreuse (carboplatine) est administrée par voie intraveineuse. Dans les deux heures suivantes, le chirurgien oriente un faisceau laser sur la lésion tumorale pendant quelques minutes à l'aide d'un microscope opératoire. La chaleur permet de sensibiliser la tumeur au médicament dont l'efficacité anticancéreuse est ainsi renforcée. Si plusieurs tumeurs touchant le même œil, elles peuvent être traitées en même temps.²²⁶ Cette technique est utilisée pour les tumeurs postérieures à l'équateur de l'œil mesurant jusqu'à 10-12 mm de diamètre. Les résultats se sont encore améliorés. Actuellement, jusqu'à 90 % de guérison en première intention avec le minimum de séquelles sont obtenues. Mais, l'efficacité de la chimiothérapie est limitée par les phénomènes de résistance et les risques mutagènes liés au carboplatine pouvant induire des tumeurs à long terme.

- *Photocoagulation*

La photocoagulation consiste à projeter un faisceau lumineux intense et étroit sur les vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur, pour entraîner leur destruction par brûlure. Cette technique permet d'éliminer les petites tumeurs postérieures à l'équateur ne dépassant pas 2 mm de diamètre.

- *Radiothérapie externe*

En cas d'échec des précédents traitements ou dans le cas de tumeurs évoluées, volumineuses ou présentant un envahissement diffus du vitré, les médecins peuvent avoir recours à une radiothérapie externe. Chaque jour durant environ cinq semaines, l'œil de l'enfant reçoit une irradiation indolore de quelques minutes visant à détruire les cellules tumorales. Du fait des effets secondaires observés (défaut de croissance de la zone irradiée qui reste souvent discrète, séquelles endocrines exceptionnelles, surtout augmentation du risque de sarcome secondaire en territoire irradié) en restreignent actuellement l'utilisation.

I.3.2. Spécificité du Rétinoblastome

Due à la déficience génétique de Rb1, il y a un risque de développement de tumeurs tardives dû aux traitements. Donc il faut rechercher un nouveau traitement n'induisant pas de mutation pouvant entraîner l'apparition de tumeurs secondaires. Comme les noyaux des cellules ne sont généralement pas ciblés par la plupart des Ps de type macrocyclique tétrapyrrolique, la PDT n'est pas susceptible d'induire des mutations génétiques. Par conséquent, la PDT pourrait être un espoir permettant de diminuer notablement les effets secondaires à long terme.

Griegel *et al.* ont montré que les cellules de rétinoblastome surexpriment des récepteurs lectiniques présentant une affinité élevée pour le galactose et le mannose dès 1989.¹⁹⁴ Dans l'objectif de favoriser l'internalisation des composés photoactivables, notre équipe a développé une série de Ps glycoconjugués,^{220,228,229} en particulier substitués par des groupes mannosyles.²³⁰ La substitution de porphyrine par des groupes mannosyles permet le ciblage actif vers des lectines membranaires^{71,73,74,231,232} et l'augmentation de l'hydrophilie et de la biocompatibilité du Ps.^{220,229}

Pour améliorer encore la spécificité dans le traitement de rétinoblastome, Gallut *et al.*¹⁹⁵ ont démontré, pour la première fois, que les récepteurs de mannose CD209 et MRC2 sont principalement surexprimés dans les lignées cellulaires de rétinoblastome en combinant plusieurs analyses biologiques. Ils ont ensuite synthétisé des nanoparticules mésoporeuses

de silice (MSN) greffées avec des anticorps spécifiques de CD209 et MRC2 pour valider la stratégie de vectorisation. L'internalisation cellulaire de ces MSN a lieu par la voie d'endocytose et une co-localisation dans les lysosomes a été contrôlée par l'imagerie confocale sur des lignées de cellules de rétinoblastome vivantes en utilisant le MSN chargées avec de la rhodamine. Les MSN chargées avec un Ps ont été irradiées sous absorption deux photons par une lumière rouge. L'effet cytotoxique des MSN chargées avec le Ps est plus important que celui mesuré avec le MSN de contrôle ce qui rend le MSN greffé avec des anticorps très prometteurs pour une utilisation en PDT-ADP.

I.3.3. Les lectines et glycoporphyrines

Les lectines sont des protéines non-enzymatiques qui exercent des fonctions cellulaires telles que le trafic, l'adhérence et la signalisation par déchiffrer le « glycode ». ^{233,234} Elles se lient spécifiquement de façon réversible à certains glucides. Beaucoup de changements au niveau des lectines de la surface cellulaire sont provoqués par la transformation oncogénique. Ce phénomène donne une forte impulsion pour une recherche future, dans le domaine de la détection et des traitements du cancer. Par exemple, la galectine et les transporteurs du glucose sont surexprimées sur les cellules tumorales. ^{235 236}

Les oligosaccharides jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'adhésion cellulaire, les métastases, la signalisation, la communication et les signaux de croissance. ^{234,237} Senge *et al.* ont revu en profondeur la synthèse des glycoporphyrines et leurs applications dans la médecine d'aujourd'hui. ¹⁹³ De part la présence des groupes hydroxyles polaires, les unités carbohydate ont le potentiel d'entraîner les conjugués à cibler les récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. **(Figure 29)** L'interaction entre les glucides et les lectines surexprimées à la surface des cellules cancéreuses peut être mise à profit dans le développement de nouveaux médicaments plus spécifiques.

Ces deux dernières décennies, les porphyrines modifiées par des glucides ont été développées pour surmonter les obstacles observés avec les premières et deuxièmes générations de Ps. Le couplage de molécules de sucre aux porphyrines hydrophobes peut rendre la molécule amphiphile, améliorer leur solubilité dans les fluides physiologiques,

promouvoir la reconnaissance cellulaire via des interactions spécifiques entre les lectines membranaires et les sucres, augmenter l'accumulation des Ps et orienter la localisation de Ps dans des domaines critiques tels que les mitochondries et le réticulum endoplasmique.^{230,238-243} Singh *et al.* ont rappelé les méthodes de synthèse et les activités biologiques des conjugués de saccharides et des porphyrinoides (porphyrines, phtalocyanines, corroles, tétrabenzoporphyrines) pour la PDT.¹⁹²

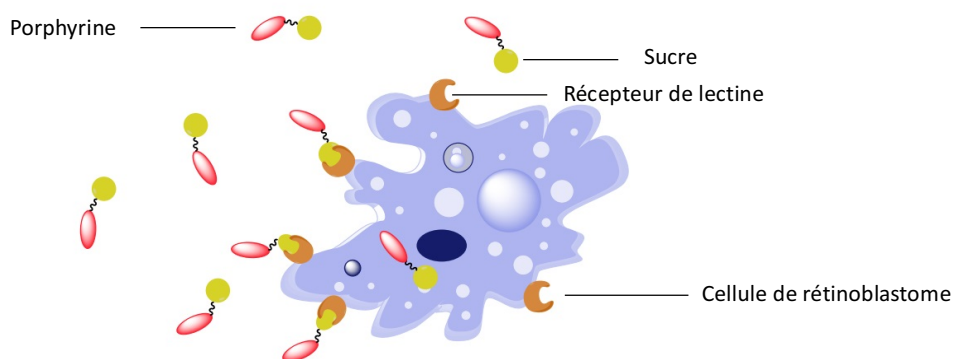


Figure 29. Ciblage de cellule de rétinoblastome par une porphyrine glycoconjuguée.

I.3.4. Les molécules issues du laboratoire avec leur activité biologique *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de Rb

Dans le but de favoriser l'internalisation de composés photoactivables, notre équipe a, ces dernières années, développé plusieurs séries de Ps glycoconjugués et évalué leur photocytotoxicité : les dérivés de glycoporphyrines avec liaison DEG ou MEG²³⁰ (**Figure 30**), les dérivés de glycoporphyrines synthétisés par «chimie click»²⁴⁴ (**Figure 31**), les porphyrines glycodendrimériques²⁴⁵ (**Figure 32**), les porphyrines dimères glycoconjuguées symétriques²²⁹ (**Figure 33**), les hybrides de porphyrines glycoconjuguées et triphénylamine²²⁰ (**Figure 34**).

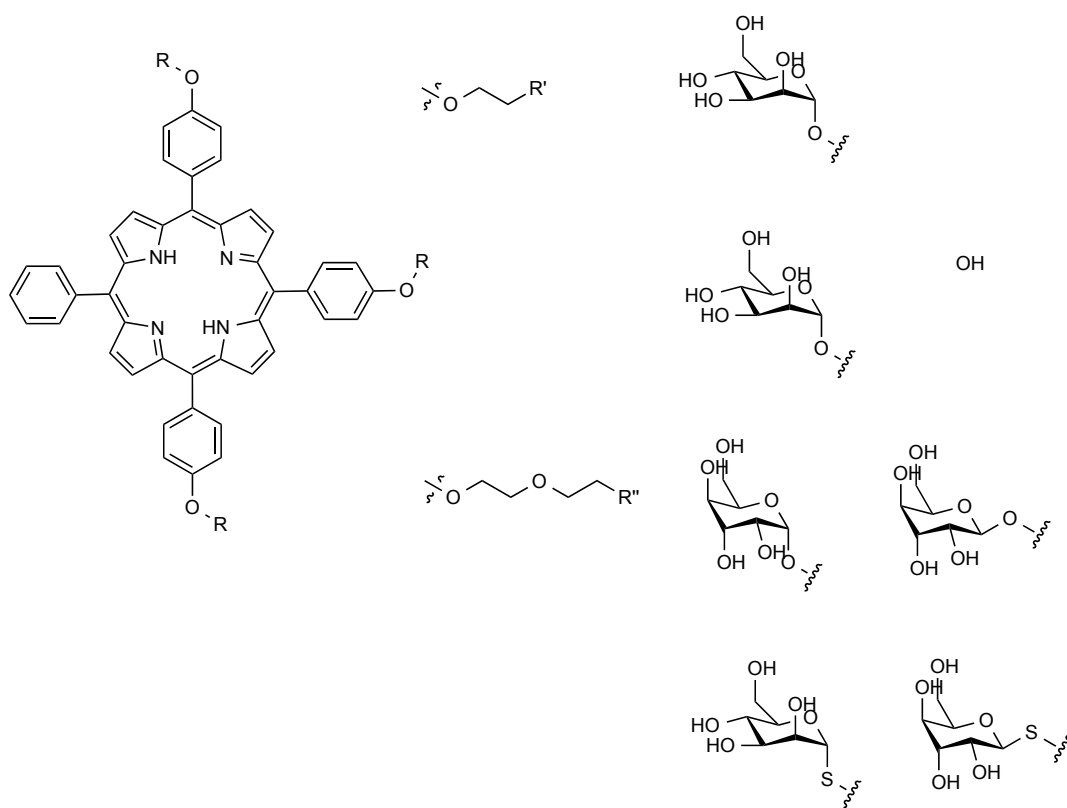


Figure 30. Dérivé de glycoporphyrines avec liaison DEG ou MEG.²³⁰

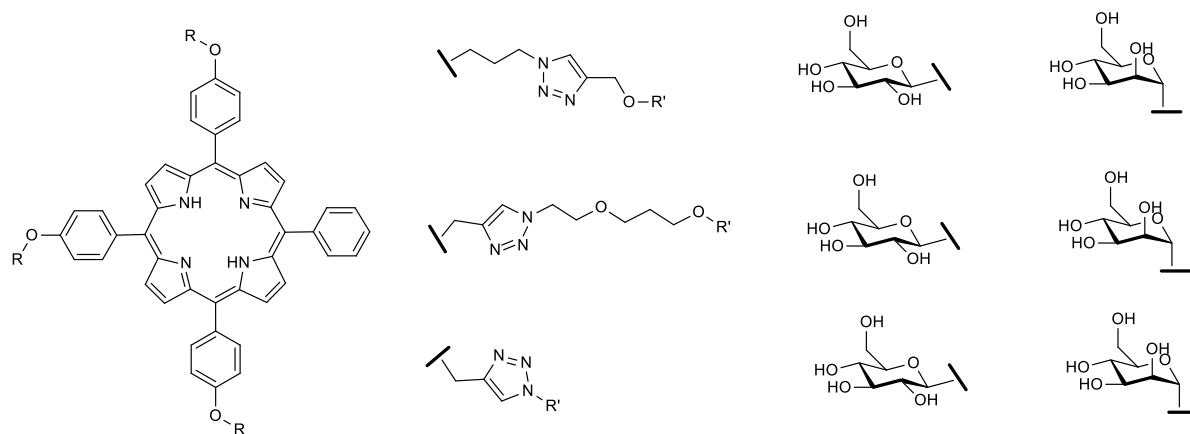


Figure 31. Dérivés de glycoporphyrines synthétisés par « chimie click ».²⁴⁴

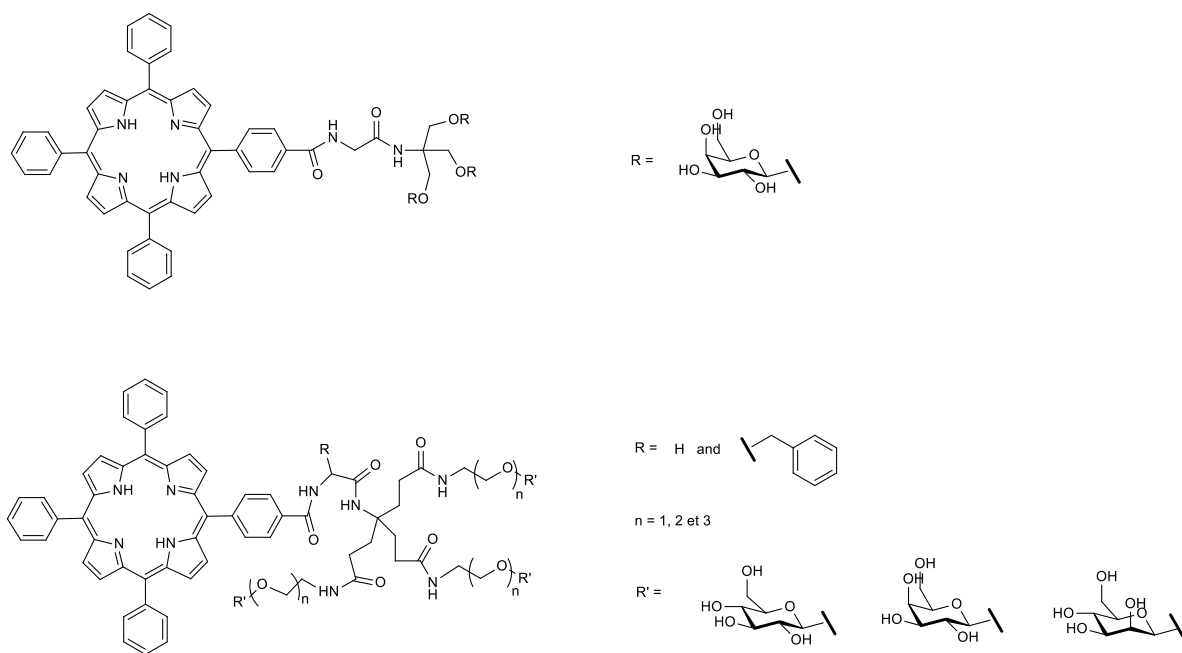


Figure 32. Porphyrines glycodendrimériques.²⁴⁵

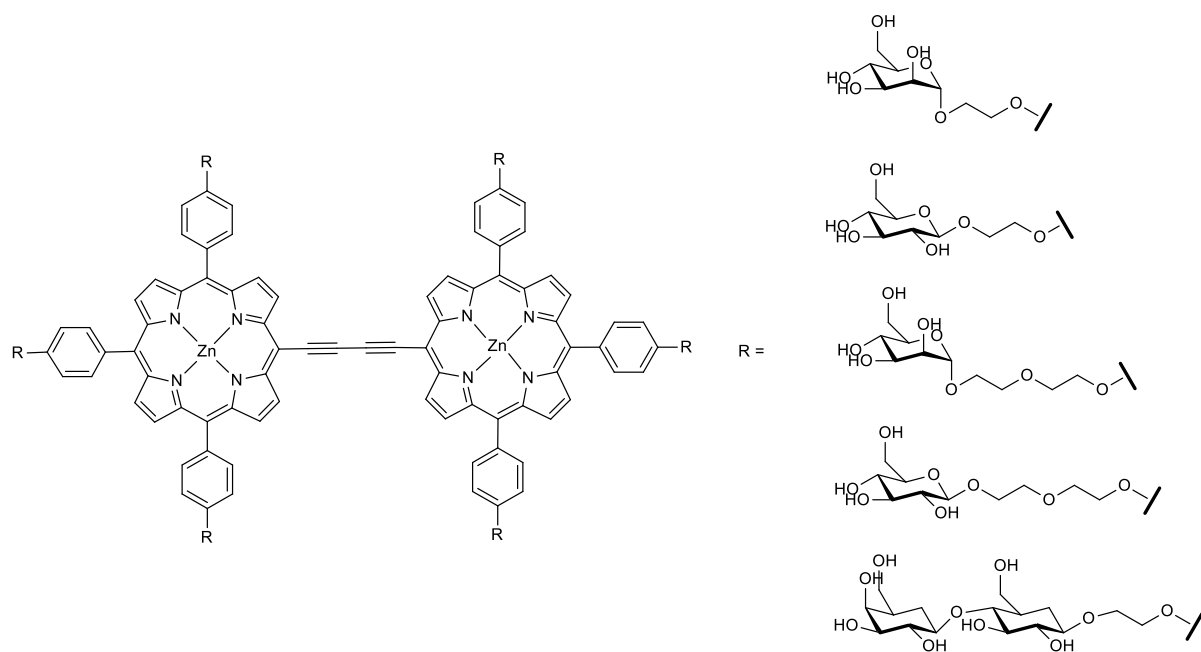


Figure 33. Porphyrines dimères glycoconjuguées symétriques.²²⁹

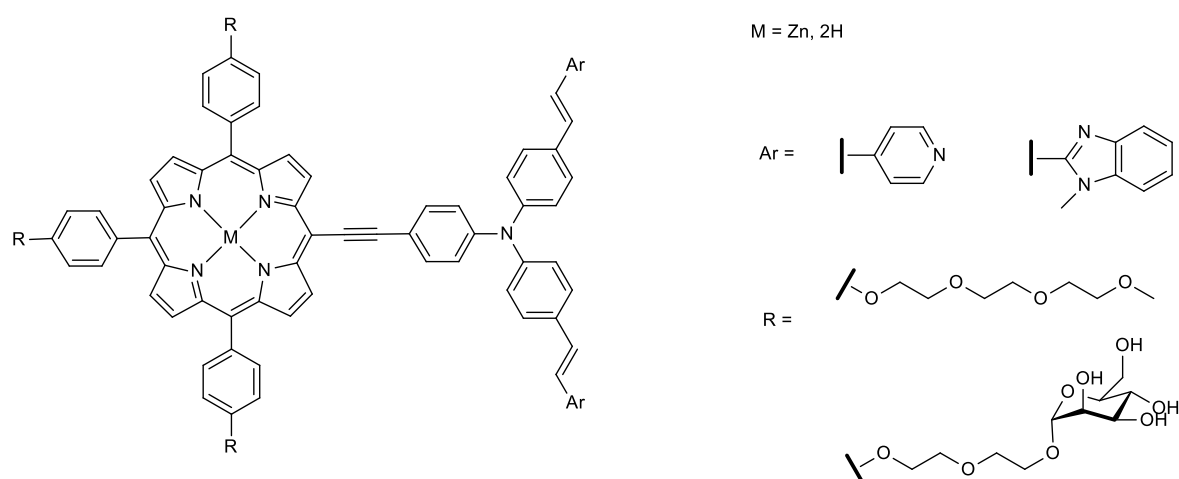


Figure 34. Hybrides de porphyrines glycoconjuguées et triphénylaminés.²²⁰

I.4. Objectif : Conception de six porphyrines dimères

La substitution périphérique avec un groupement de conjugaison ou l'assemblage intermoléculaire a récemment permis d'augmenter la valeur de δ .²⁴⁶ Un renforcement important de δ des Ps utilisés pour l'ADP peut, par exemple, être obtenu par la conjugaison ou π -expansion de groupements acétylénique et butadiyne, situés entre deux groupes porphyrines.²⁴⁷ La grande valeur de δ atteinte est attribuée à une délocalisation efficace d'électron π grâce au système conjugué. La délocalisation des électrons sur la porphyrine- Zn^{II} substituée par deux groupes, en position méso 5, 15, d'azulényéthynyle (**Figure 35**, à gauche) conduit à une augmentation significative de l'efficacité ADP avec δ atteignant 8030 GM à 1400 nm.²⁴⁸ La structure coplanaire linéaire de la porphyrine dimère (**Figure 35**, à droite) facilite la délocalisation des électrons en donnant un $\delta = 9100$ GM à 873 nm.^{249,250}

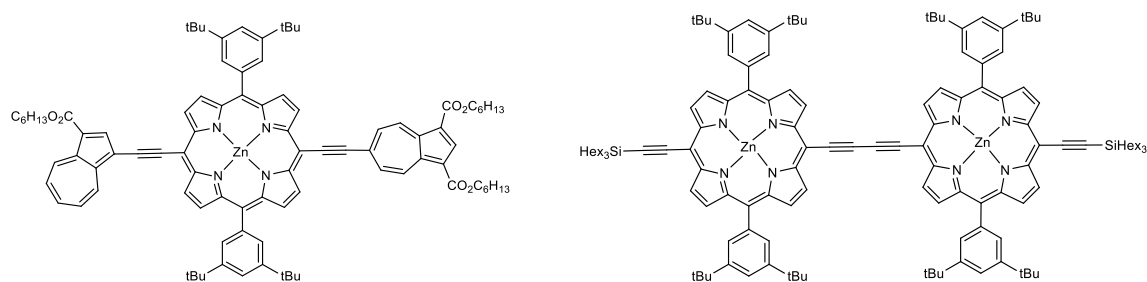


Figure 35. Porphyrines éthynylène-conjuguées.^{249,250}

I.4.1. Porphyrines dimères de premoère génération symétriques

Lors de sa thèse, Fabien Hammerer a synthétisé un dimère de porphyrine glycoconjuguée symétrique en utilisant le couplage de Glaser à partir de deux monomères acétyléniques identiques qui sont préparés par un couplage de Sonogashira.²⁵¹ (**Figure 36**)

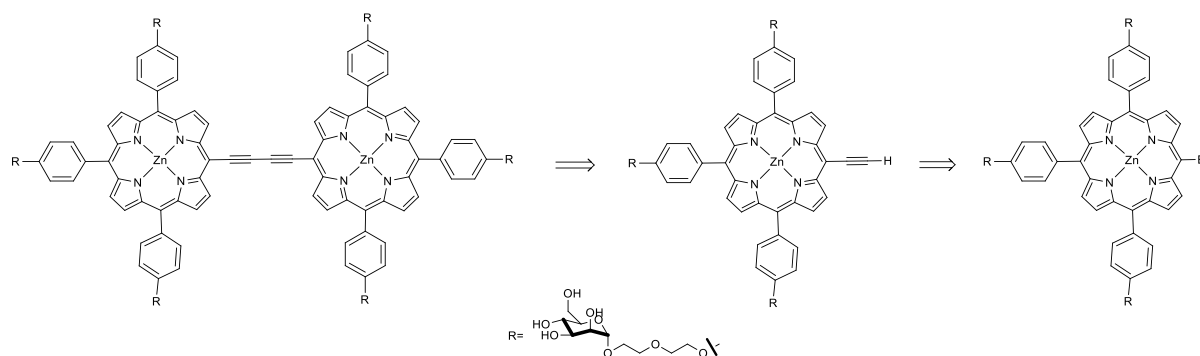


Figure 36. Porphyrine dimère symétrique synthétisée par Fabien Hammerer.²⁵¹

Cependant ce Ps a donné lieu à de mauvais résultats biologiques (très faible activité phototoxique *in vitro* sur lignée de rétinoblastome). Cette molécule symétrique ne pénètre que faiblement dans les cellules tumorales cars n'étant pas assez amphiphile. Par ailleurs des essais d'incorporation de ces molécules dans des modèles de membranes cellulaires de type liposome se sont avérés très difficiles. Pour avoir un bon passage à travers la membrane cellulaire ou une bonne incorporation dans les bicouches de liposomes, nous avons fait l'hypothèse qu'il falloir rendre le Ps dissymétrique, donc amphiphile.

I.4.2. Porphyrines dimères dissymétriques

En conséquence, nous avons conservé la géométrie définie par Fabien Hammerer avec les triples liaisons entre les chromophores pour avoir une section efficace d'absorption à deux photons suffisante, avec trois groupes hydrophiles mannoses d'un côté de la molécule (**premières positions *méso***) pour cibler les récepteurs lectiniques surexprimés dans les cellules tumorales et trois groupes plutôt lipophiles sur les **secondes positions *méso***. Nous avons conçu les porphyrines dimères dissymétriques suivantes. (**Figure 37**)

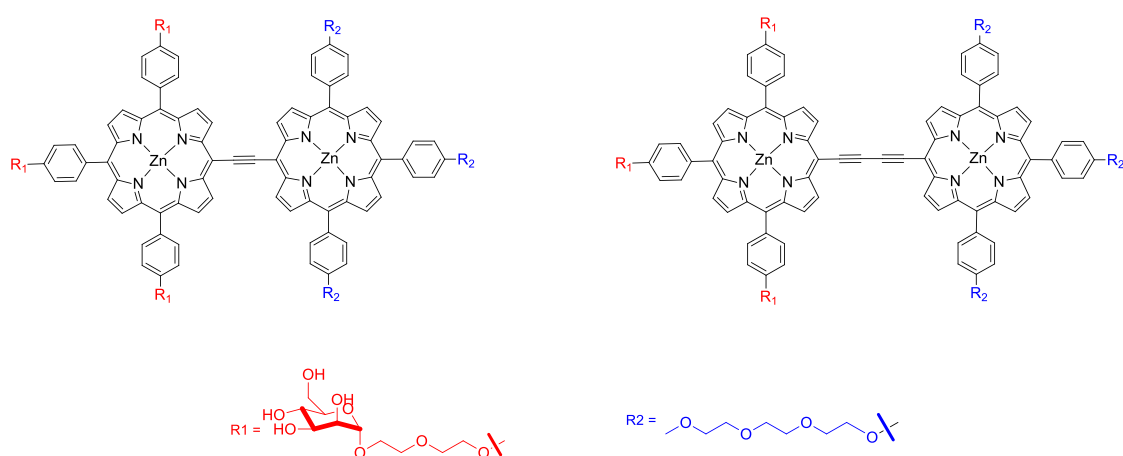


Figure 37. Structure des porphyrines dimères dissymétriques.

II. SYNTHÈSE & CARACTÉRISATION ET PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DES PORPHYRINES DIMÈRES

II.1. Synthèse & Caractérisation

II.1.1. Synthèse

Six porphyrines dimères dont les structures sont présentées ci-dessous ont été préparées dans des quantités d'environ une vingtaine de milligrammes chacune (**Figure 38**). Les six porphyrines sont séparées en deux familles. La famille de porphyrine dimère acétylénique **P-Y-P** à gauche comprend le composé **1** *Zn-TPP(ODegOManOH)-Y-Zn-TPP(OTeg)*, le composé **2** *Zn-TPP(ODegOManOH)-Y-Zn-TPP* et le composé **3** *Zn-TPP(OTeg)-Y-Zn-TPP*, et la famille de porphyrine dimère butadiyne **P-Y₂-P** à droite est constituée du composé **4** *Zn-TPP(ODegOManOH)-Y₂-Zn-TPP(OTeg)*, le composé **5** *Zn-TPP(ODegOManOH)-Y₂-Zn-TPP* et le composé **6** *Zn-TPP(OTeg)-Y₂-Zn-TPP*.

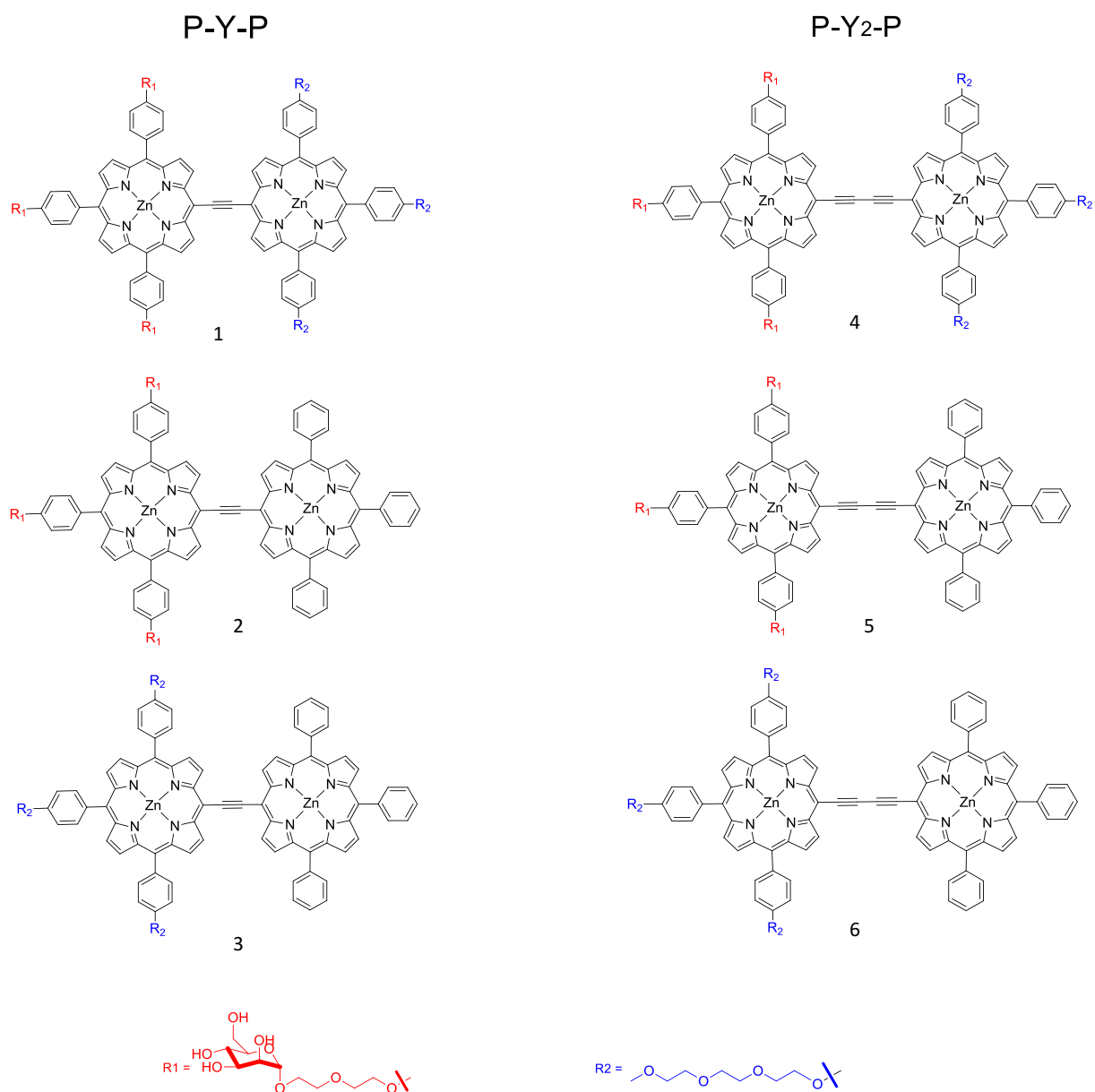


Figure 38. Structure des six porphyrines dimères synthétisées.

II.1.1.1 Rétrosynthèse des porphyrines dimères acétyléniques P-Y-P

La porphyrine dimère acétylénique **P_A-Y-P_B** peut être obtenue à partir de la porphyrine monomère acétylénique **P_A-Y** et un monomère bromé **P_B**. Le monomère acétylénique **P_A-Y** est préparé à partir un monomère bromé **P_A-Br**. Le monomère bromé **P_X-Br** est obtenue à partir de la 5,10,15-triarylporphyrine **P_X** qui est synthétisée par arylation de Senge^{252,253} et condensation de Lindsey²⁵⁴⁻²⁵⁶ (**Schéma 1**).

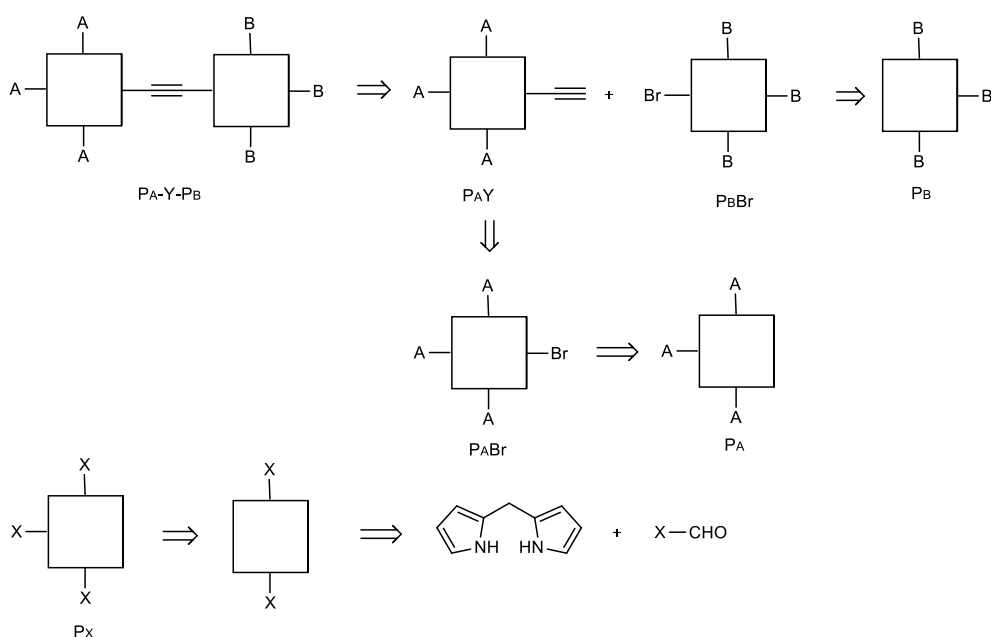


Schéma 1. Rétrosynthèse de P-Y-P.

II.1.1.2. Synthèse des porphyrines dimères acéthyléniques

Le dipyrrométhane **7** est synthétisé avec un rendement de 100% par la méthode de condensation, catalysée par le chlorure d'indium.^{254,256} Le pyrrol est utilisé comme un solvant. La porphyrine de type A2 trans **9** est formée par la méthode de condensation 2+2 décrite par Lindsey²⁵⁴ en utilisant le dipyrrométhane **7** et l'aldéhyde approprié **8** avec un rendement de 35%. Pour introduire le groupement aryl, nous avons utilisé la méthode de Senge basée sur une attaque nucléophile suivie d'une oxydation par l'oxygène de l'air.^{252,253} Nous avons obtenu la *méso*-triarylporphyrine **10** avec un rendement de 87%. Après bromation 95%, déprotection avec un rendement de 90%, métallation par l'acétate de zinc, nous avons obtenu la porphyrine **13** avec un rendement de 95%. (**Schéma 2**)

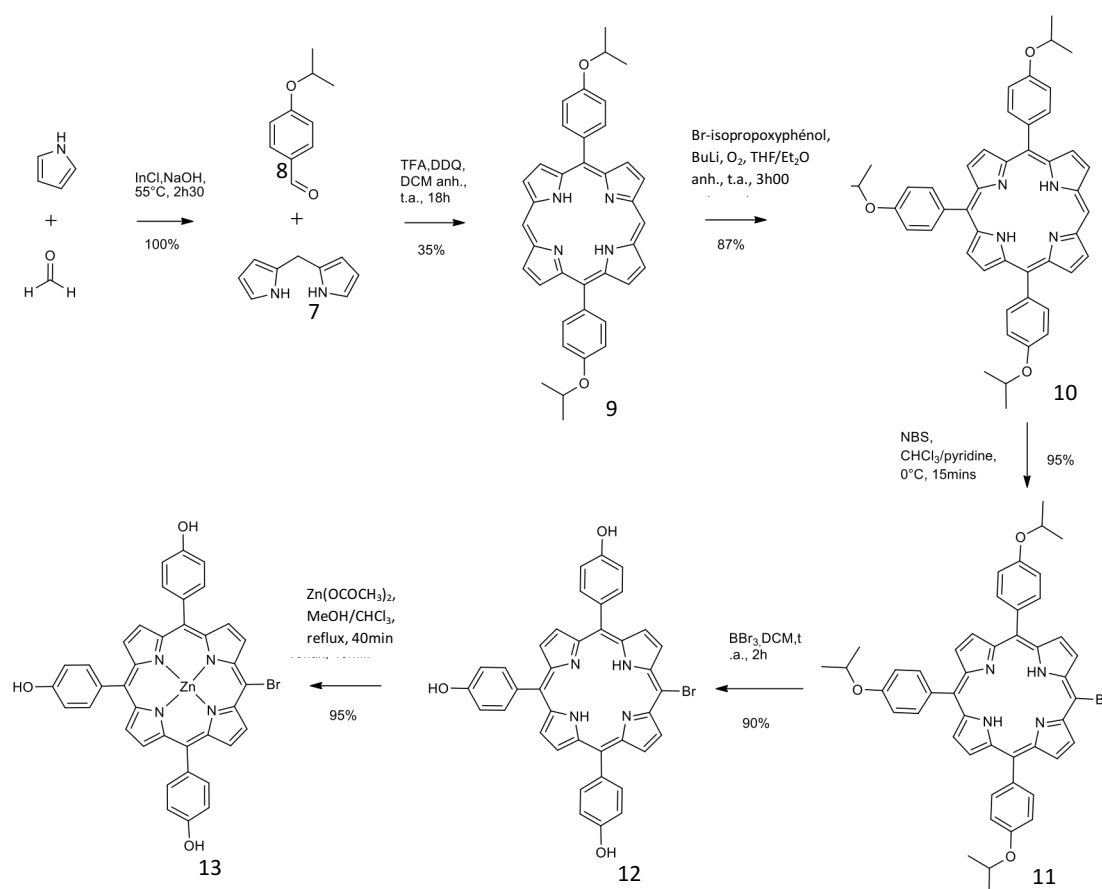


Schéma 2. Synthèse de l'intermédiaire porphyrine monomère Zn-TPPBr.

La porphyrine **13** peut ensuite être modifiée par introduction de différentes chaînes latérales par la réaction de Williamson.²⁵⁷ Nous avons synthétisé la porphyrine bromée **14** et la porphyrine glycosylée **16** avec les rendements respectifs de 94% et de 77%. Grâce à un couplage de Sonogashira²⁵⁸, les deux monomères acétyléniques **15** et **17** sont été synthétisés avec les rendements de 70% et 87%. (**Schéma 3**)

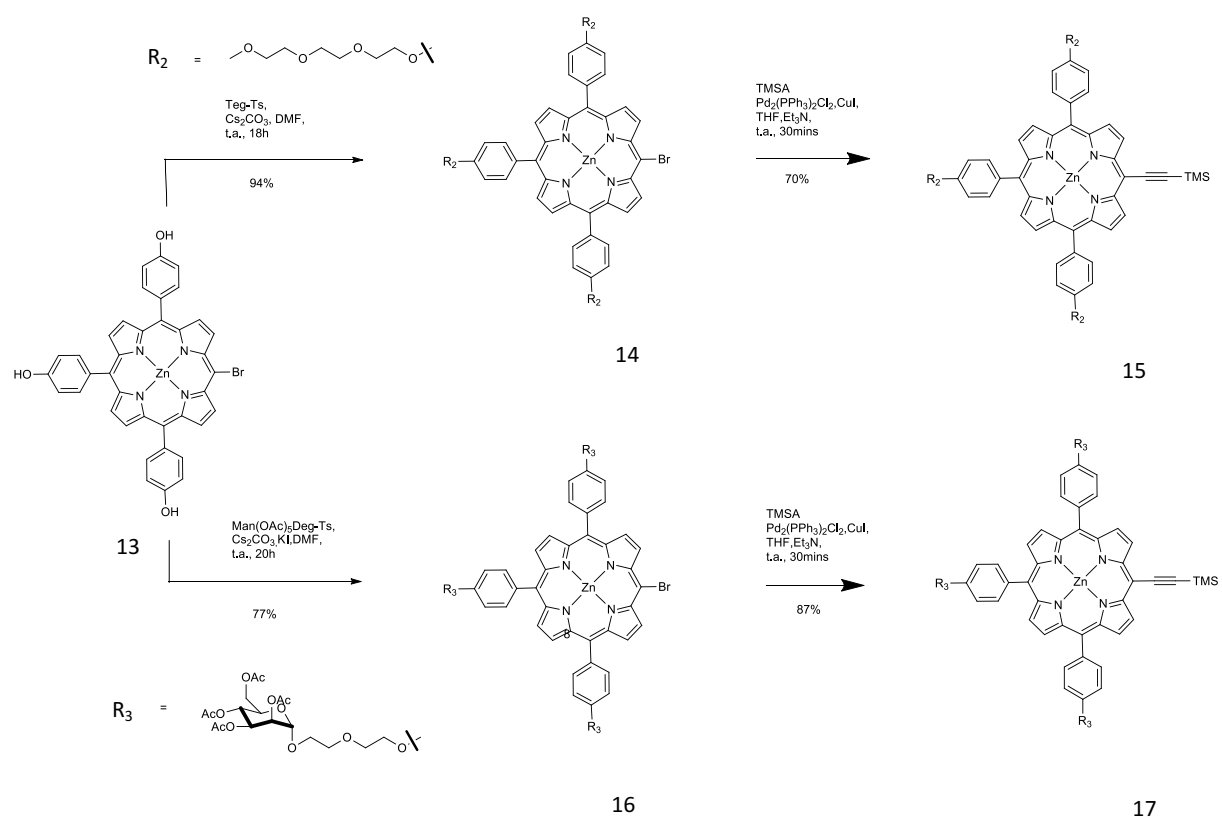


Schéma 3. Synthèse de l'intermédiaire porphyrine monomère acétylénique fonctionnalisée par chaîne latérale **15** et **17**.

Par la même stratégie de synthèse, nous avons obtenu le monomère bromé **22** avec le rendement total de 12%. (**Schéma 4**)

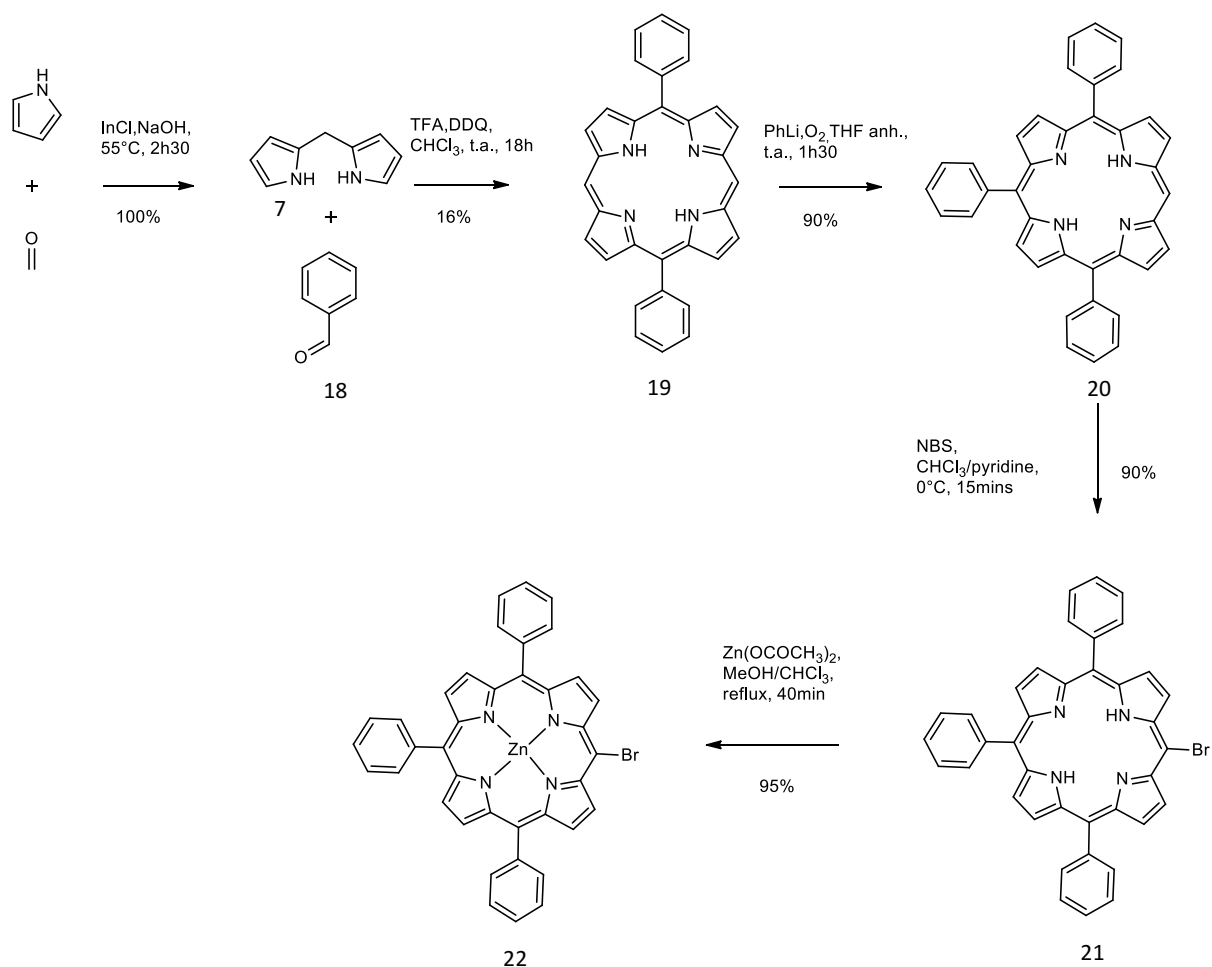


Schéma 4. Synthèse de l'intermédiaire porphyrine monomère **22**.

Nous avons synthétisé trois porphyrines dimères acéthyléniques protégés **1-OAc**, **2-OAc** et **3** en couplant les monomères acéthyléniques et bromés par le couplage de Heck²⁵⁹ : **17** et **14** (composé **1-OAc**, rendement 33%), **17** et **22** (composé **2-OAc**, rendement 45%), **15** et **22** (composé **3**, rendement 65%). Exemple ci-dessous, de couplage entre les monomères **17** et **14** pour former le composé **1-OAc**. (Schéma 5)

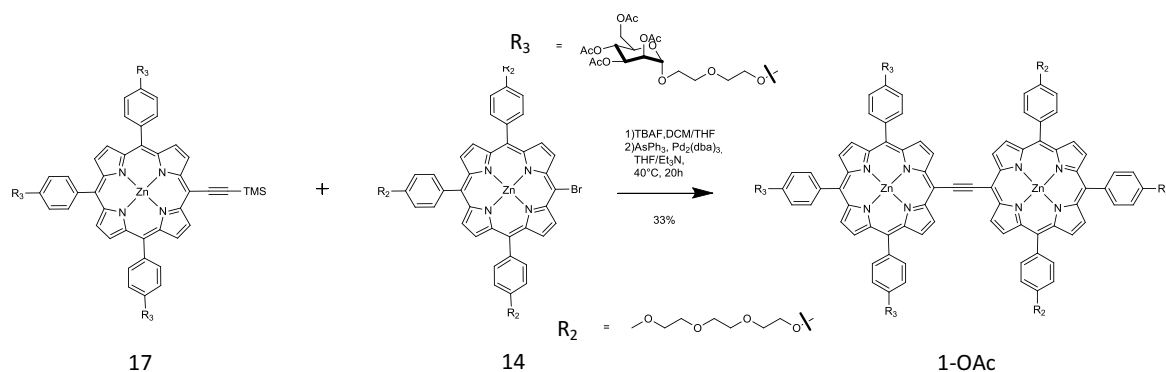


Schéma 5. Synthèse de porphyrine dimère acéthylénique **1-OAc**.

II.1.1.3. Rétrosynthèse des porphyrines dimères butadiynes $P\text{-Y}_2\text{-P}$

La porphyrine dimère butadiyne $P_A\text{-Y}_2\text{-P}_B$ peut être synthétisée en utilisant la stratégie 1 (**Schéma 6**) à partir de deux monomères acéthyléniques $P_A\text{-Y}$ et $P_B\text{-Y}$ selon le travail déjà décrit dans notre groupe par F. Hammerer.²²⁰

Cette stratégie a fonctionné avec un rendement acceptable dans le cas de la formation du dimère symétrique. Pour synthétiser la porphyrine dimère dissymétrique, la première stratégie a conduit à la formation de trois dimères en proportion statistique : $P_A\text{-Y}_2\text{-P}_A$, $P_A\text{-Y}_2\text{-P}_B$, $P_B\text{-Y}_2\text{-P}_B$ qui seront difficiles à séparer et à purifier. Pour pallier cette difficulté, nous avons utilisé la stratégie 2 à partir d'une porphyrine monomère butadiyne $P_A\text{-Y}_2$ et d'un monomère bromé P_B . Le monomère butadiyne $P_A\text{-Y}_2$ est préparé à partir d'un monomère bromé $P_A\text{-Y}$. (**Schéma 7**)

Stratégie 1

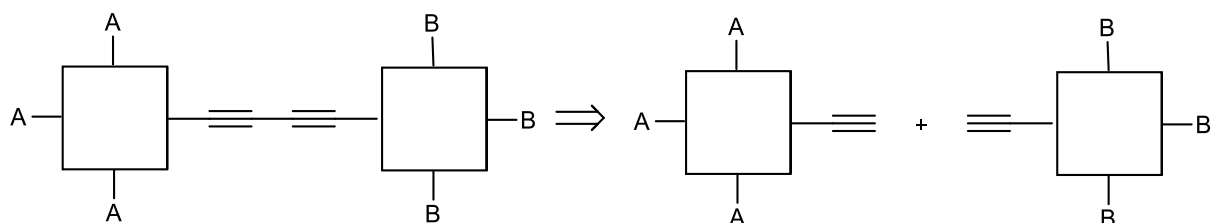


Schéma 6. Rétrosynthèse de $P\text{-Y}_2\text{-P}$ avec le risque de former trois dimères en proportion statistique.

Stratégie 2

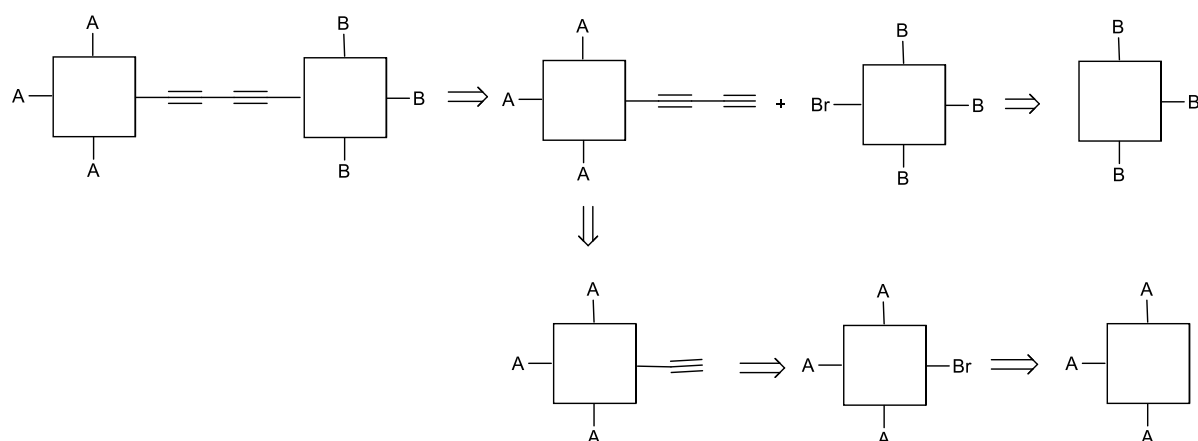


Schéma 7. Rétrosynthèse de **P-Y₂-P**.

II.1.1.4. Synthèse des porphyrines dimères butadiynes

Nous avons synthétisé la porphyrine monomère butadiyne en utilisant le couplage de Glaser.^{260,261} Nous avons synthétisé la porphyrine monomère **23** avec un rendement de 53% (**Schéma 8**) et la porphyrine monomère **24** avec un rendement de 57% (**Schéma 9**).

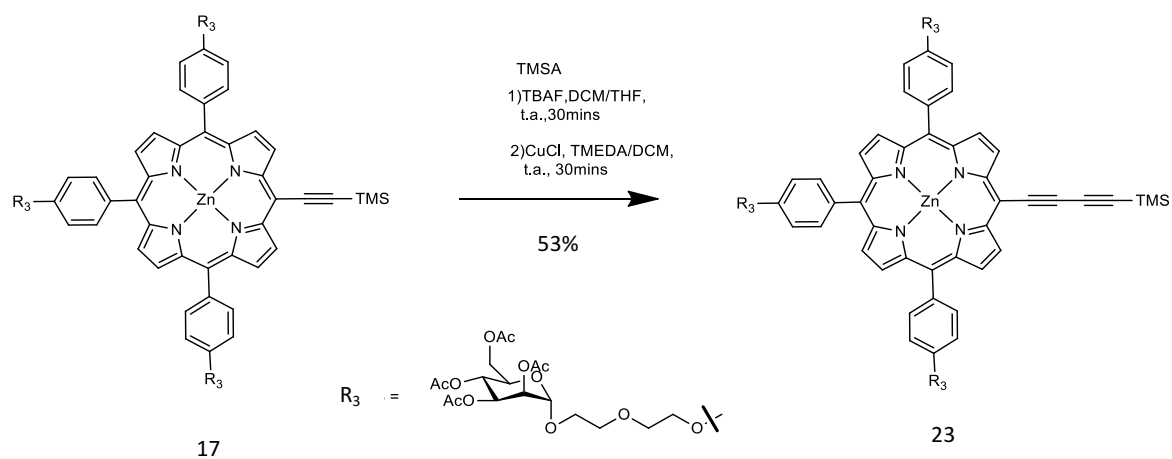


Schéma 8. Synthèse de la porphyrine monomère butadiyne **23**.

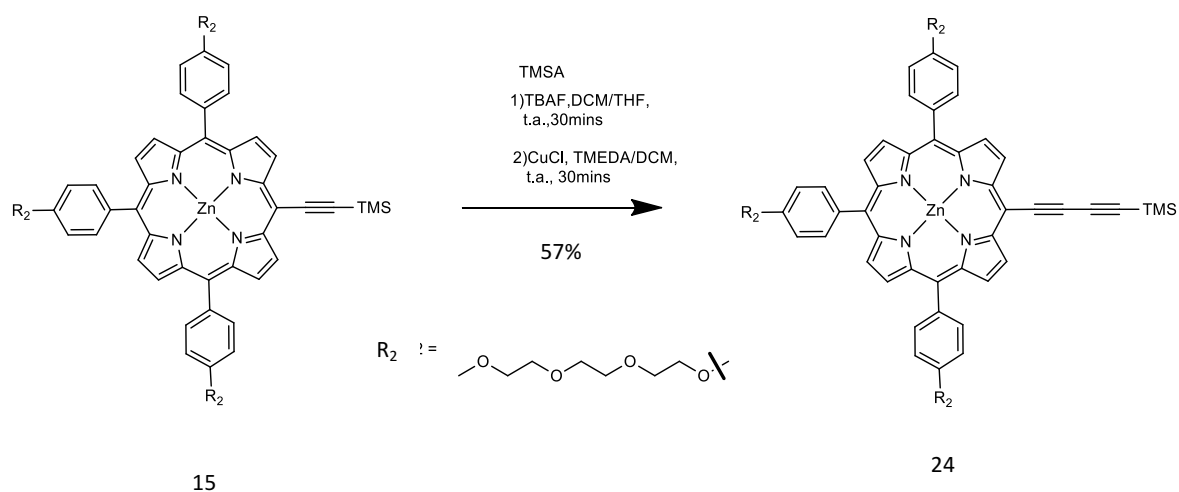


Schéma 9. Synthèse de la porphyrine monomère butadiyne **24**.

En utilisant le couplage de Heck²⁵⁹, nous avons synthétisé trois porphyrines dimères en couplant les porphyrines monomères butadiynes et bromées avec des rendements autour de 23%. Par exemple, la préparation de la porphyrine dimère **4-OAc** est présentée dans le **Schéma 10**.

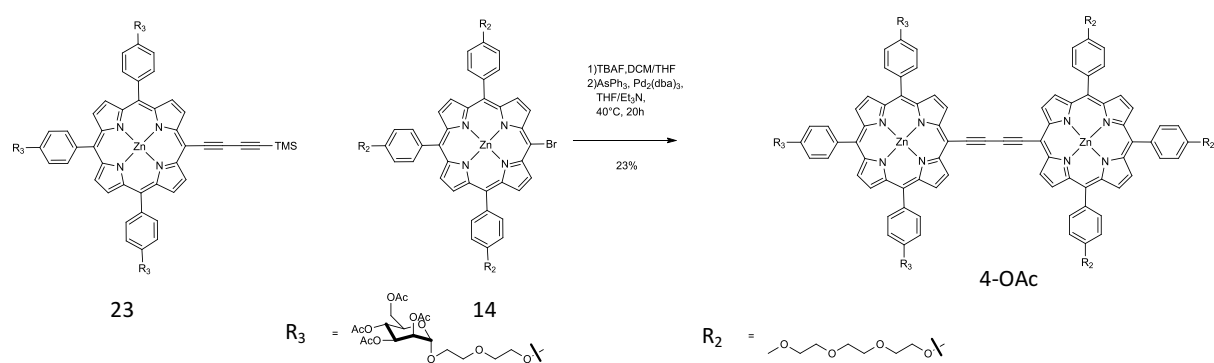


Schéma 10. Synthèse de la porphyrine dimère **4-OAc**.

Les composés portant des groupements mannosylés protégés par des fonctions acétylées sont déprotégés quantitativement par NaOMe dans le méthanol anhydre selon la méthode classique de Zemplén.²⁶² Par exemple, la déprotection de la porphyrine dimère **4-OAc** est présentée dans le **Schéma 11**.

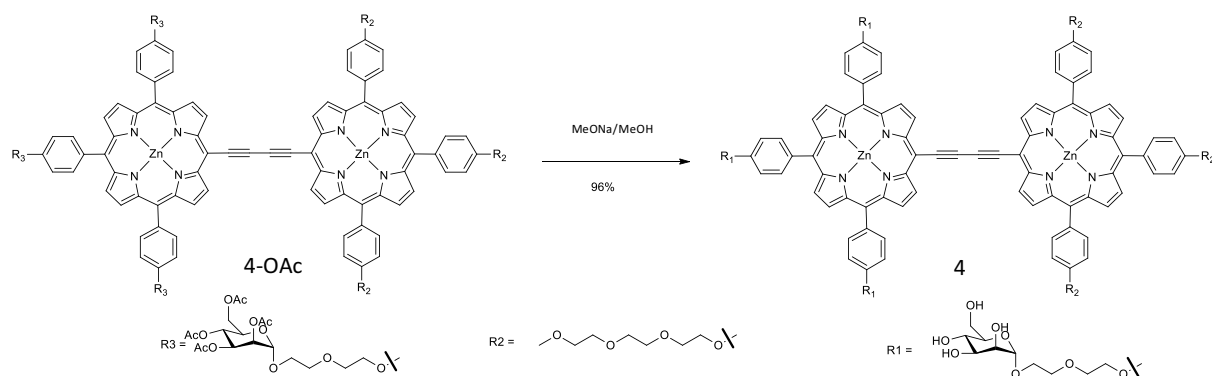


Schéma 11. Déprotection des groupements acétate sur les mannoses

Tous les composés préparés sont caractérisés par RMN du proton et du ^{13}C , spectroscopie UV-visible quantitative, spectrométrie de masse haute résolution MALDI-TOF et microanalyse lorsque cela a été possible.

II.1.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique d'analyse chimique et structurale non destructive très utilisée en physique (études de matériaux), chimie ou biochimie (structure de molécules) et pour l'imagerie médicale (IRM). En chimie organique, la RMN est l'outil d'analyse le plus utilisé permettant d'obtenir des informations structurales généralement qualitatives, suivant la technique employée.

Depuis les premiers travaux réalisés par Becker *et coll.*²⁶³ en 1959, l'étude par RMN des porphyrines a fait l'objet d'un grand nombre de publications. Le système conjugué de liaisons π des porphyrines induit un courant de cycle important affectant les propriétés magnétiques des protons du macrocycle.

II.1.2.1. Spécificité des spectres ^1H et ^{13}C des porphyrines

Les spectres RMN du proton des porphyrines présentent des déplacements chimiques caractéristiques vers les champs faibles (protons *meso* à environ 10-11 ppm) et vers les champs forts (NH à -2,5 ppm environ) (**Figure 39**).

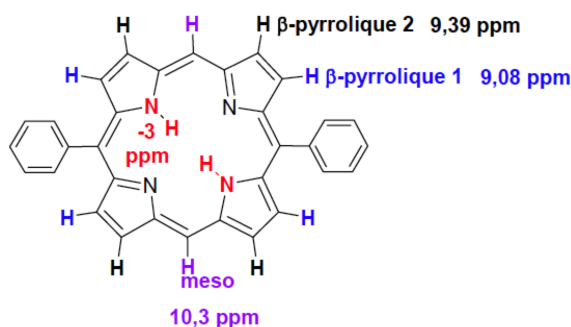


Figure 39. Exemple de déplacements chimiques caractéristiques d'une porphyrine (exemple avec la 5,15-diphénylporphyrine).

Ces déplacements sont dus aux effets de courant de cycle induits par la délocalisation des électrons π hyperconjugués du cycle tétrapyrrolique (**Figure 40**). Les protons portés par les phényles sont peu affectés par ce courant de cycle car ils sont extérieurs au champ magnétique du macrocycle et ne sont pas conjugués avec celui-ci.

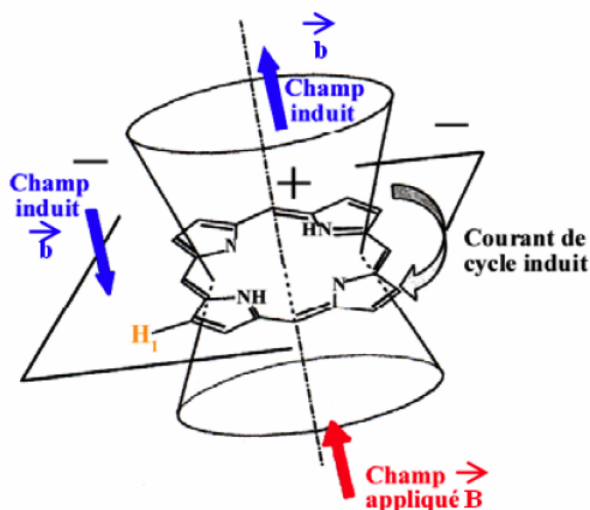


Figure 40. Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine engendré par le courant de cycle dû aux électrons π .

La circulation des électrons délocalisés crée une boucle de courant de part et d'autre du macrocycle induisant un champ magnétique secondaire ($\vec{B}$) lorsque la molécule est soumise à un champ magnétique statique ($\vec{B}$). L'effet de ce courant de cycle sur un atome proche du macrocycle dépendra de sa position par rapport au système π . Un proton situé à l'intérieur du cône de blindage du macrocycle est blindé (déplacé vers les champs forts, exemple NH) et ceux situés à l'extérieur, subissent moins l'effet de courant de cycle, et sont plus déblindés (déplacés vers les champs faibles selon leur position sur le macrocycle, exemple les protons pyrroliques et *meso*). Le spectre RMN ^1H est étendu sur une large zone de plus de 15 ppm (**Figure 41**).

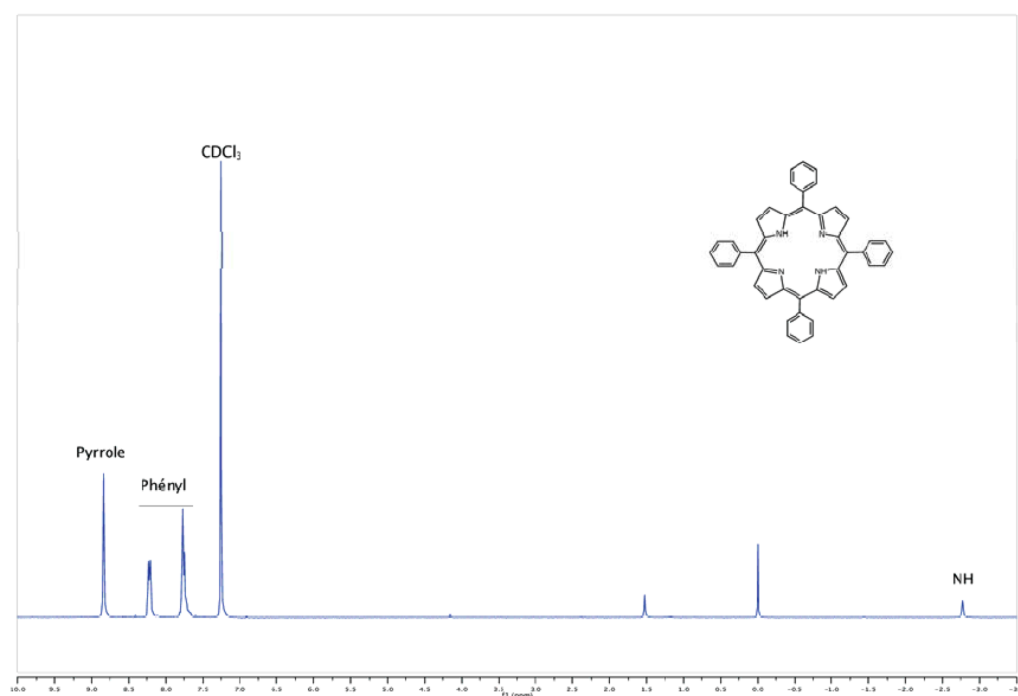


Figure 41. Exemple de spectre RMN ^1H de la tétraphényl porphyrine dans CDCl_3 .

Le spectre RMN ^{13}C d'une porphyrine s'étendant sur environ 150 ppm, est divisé en trois régions : les carbones α -pyrroliques vers 145 ppm, les carbones β -pyrroliques vers 130 ppm et les carbones *meso* entre 120 et 95 ppm (**Figure 42**). Le signal des carbones α -pyrroliques est élargi et souvent mal défini. Ceci est la conséquence de la tautomérie des protons NH internes. Ce phénomène peut également affecter la forme des signaux des carbones β -pyrroliques. En RMN ^{13}C , la résonance des noyaux est peu sensible aux courants de cycle.

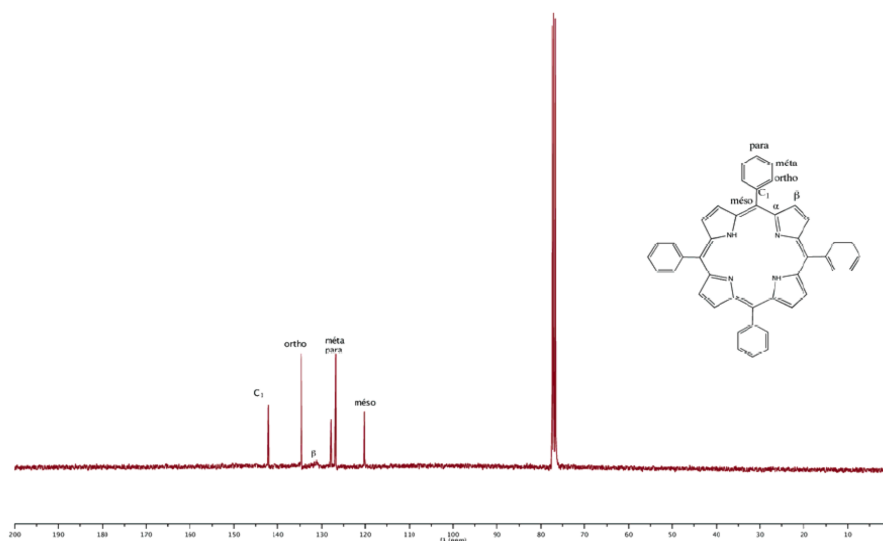


Figure 42. Exemple de spectre RMN ^{13}C avec la TPP dans le chloroforme deutéré.

II.1.2.2. Spécificité du spectre ^1H des porphyrines dimères dissymétriques.

Les spectres RMN ^1H de porphyrine monomère acétylénique et de porphyrine monomère butadiyne sont réalisés dans la pyridine à température ambiante et présentés à la **Figure 43**. Les protons de pyrroliques s'étendent entre 9 et 10 ppm. Les protons phényles sont vers 7 et 8 ppm. Les protons du mannose et de la chaîne DEG sont vers 3,5 et 5,5 ppm et les protons des groupements de protection acétate sont vers 2 ppm. Les protons de la porphyrine monomère butadiyne sont plus déblindés que ceux de la porphyrine acétylénique. Nous avons trouvé que les protons de triméthysilyl (TMS) (vers 0,61 ppm) sur les composés butadiynes sont plus déblindés que pour le composé acétylénique (vers 0,33 ppm).

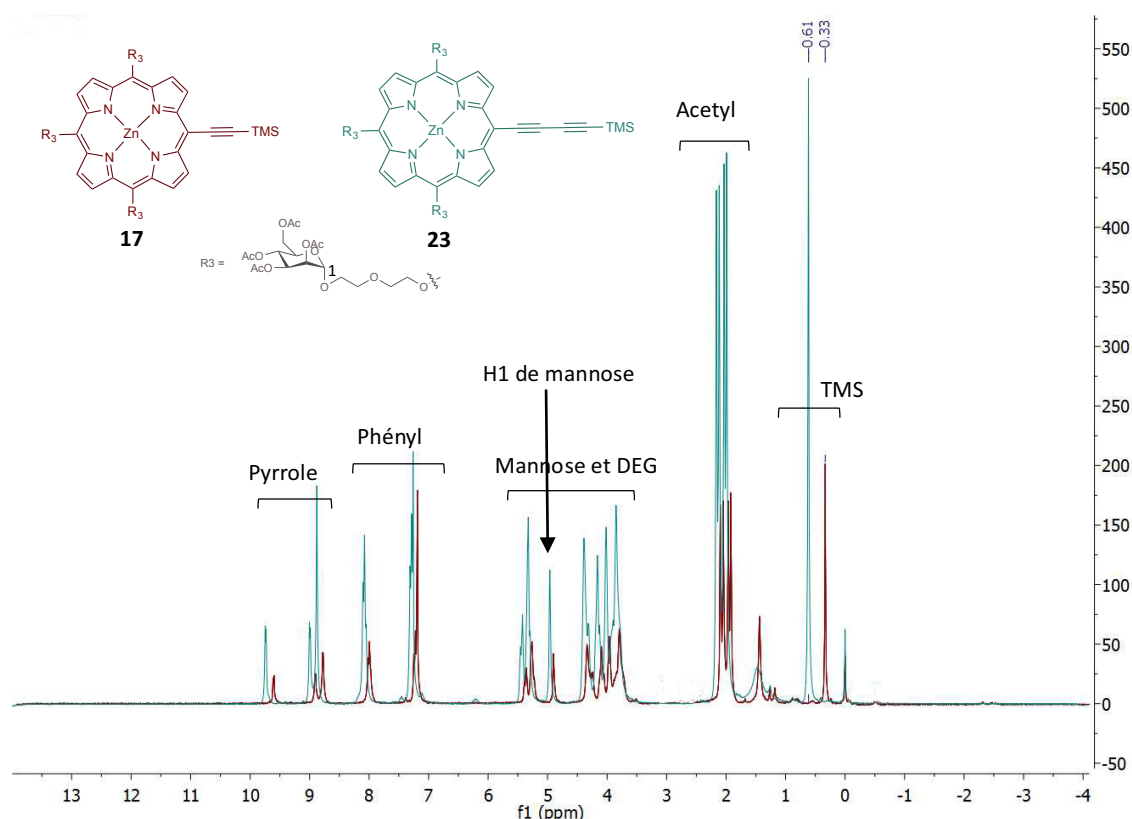


Figure 43. Spectre de RMN ^1H des porphyrines monomères acétylénique **17** et butadiyne **23**.

Les spectres RMN ^1H de la porphyrine dimère acétylénique **2-OAc** et de la porphyrine dimère butadiyne **5-OAc** sont réalisés dans la pyridine à la température ambiante comparés dans la **Figure 44**. Ils sont proches de ceux des porphyrines monomères, les protons pyrroliques s'étendent entre 9 et 10 ppm et ces des protons des phényles sont vers 7 et 8 ppm. Les protons de mannose et le chaîne DEG sont vers 3,5 et 5,5 ppm et les protons des groupements de protection acétate sont vers 2 ppm.

Comme les porphyrines dimères sont dissymétriques, nous pouvons observer l'influence des chaînes latérales sur les protons pyrroles et l'influence de liaison (acétylénique et butadiyne) entre les deux noyaux. Sur les porphyrines dimères acétyléniques, l'influence des chaînes latérales est très faible, les deux protons dans la même position ont le même déplacement, même si les chaînes latérales sont différentes. En revanche, l'influence des chaînes latérales est observée dans les porphyrines butadiynes. Par exemple, les deux protons du composé acétylénique **2-OAc** ont le même déplacement (vers 10,3 ppm), mais les deux protons du composé butadiyne **5-OAc** se séparent (9,7 ppm et 9,9 ppm). (**Figure 44**)

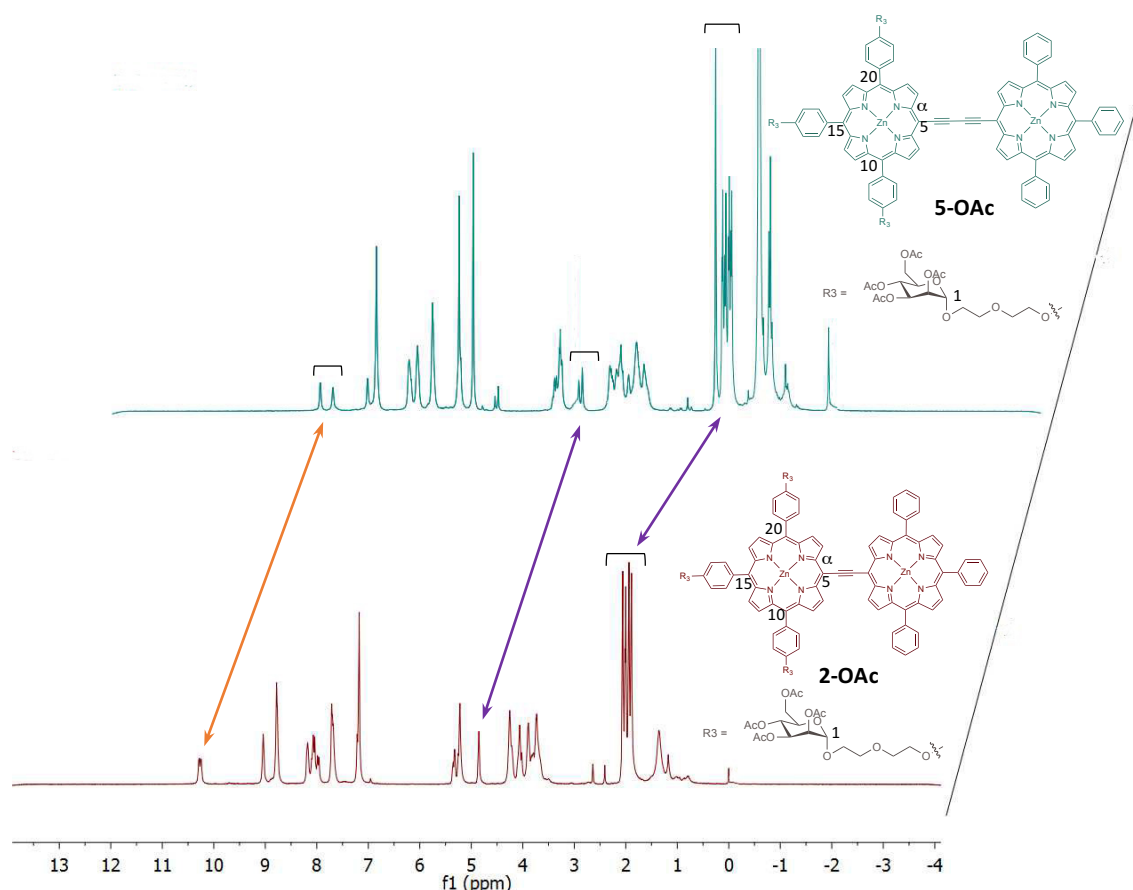


Figure 44. Comparaison des spectres de RMN ^1H des porphyrines dimères acétylénique **2-OAc** et butadiyne **5-OAc**.

De plus, pour le composé **5-OAc**, les trois protons en position anomérique (β) **1** de mannose se séparent aussi, le proton (substitution en *méso* 15) vers 4,9 ppm est plus déblindé que les deux protons (substitution en *méso* 10 et 20) (vers 4,8 ppm). Nous pouvons observer le même phénomène sur les protons acétates dans ces deux porphyrines dimères.

Sur le spectre COSY (**Figure 45**), les signaux à 10,0 et 9,7 ppm sont caractéristiques des H pyrroliques en position 2 et 18. Les signaux à 9 et 8,8 ppm sont caractéristiques des H pyrroliques en position 3 et 17. Les protons H2, H3, H17 et H18 subissant l'influence de la triple liaison $\text{C}\equiv\text{C}$, sont plus déblindés que les H7, H8, H12 et H13. L'effet le plus fort est observé pour H2 et 18 plus proches de la triple liaison.

Les H des groupements phényles *meso* apparaissent comme deux singulets aux alentours de 8,3 et 7,0 ppm. En subissant l'influence des chaîne latérales, les H phényles en même position ne sort pas dans au même déplacement.

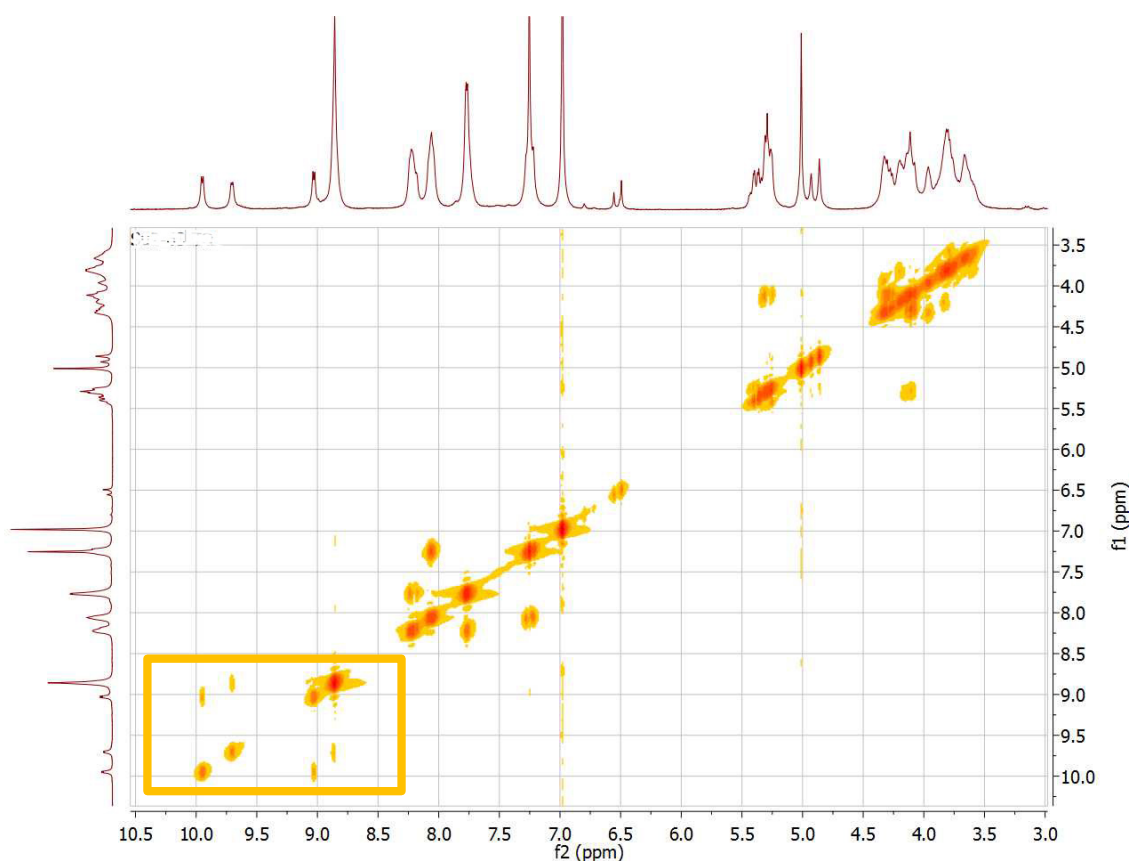


Figure 45. Le spectre COSY de la porphyrine dimère butadiyne **5-OAc**.

II.2. Étude des Propriétés optiques et étude photobiologique

II.2.1. Absorption UV-visible et fluorescence

Dans cette partie, plusieurs propriétés spectroscopiques des dimères dissymétriques sont comparées avec celles des monomères acétyléniques. Les spectres d'absorption normalisés des composés protégés ont été enregistrés dans CHCl_3 et ceux des composés déprotégés ont été enregistrés dans une solution pyridine/méthanol : 1/24, v/v.

Nous avons trouvé un effet de la déprotection des sucres sur l'absorption des dimères (**Figure 46**). Un déplacement faible du spectre dans les Bandes Q vers le rouge après la déprotection est observé, il pourrait s'agit d'un effet de solvant.

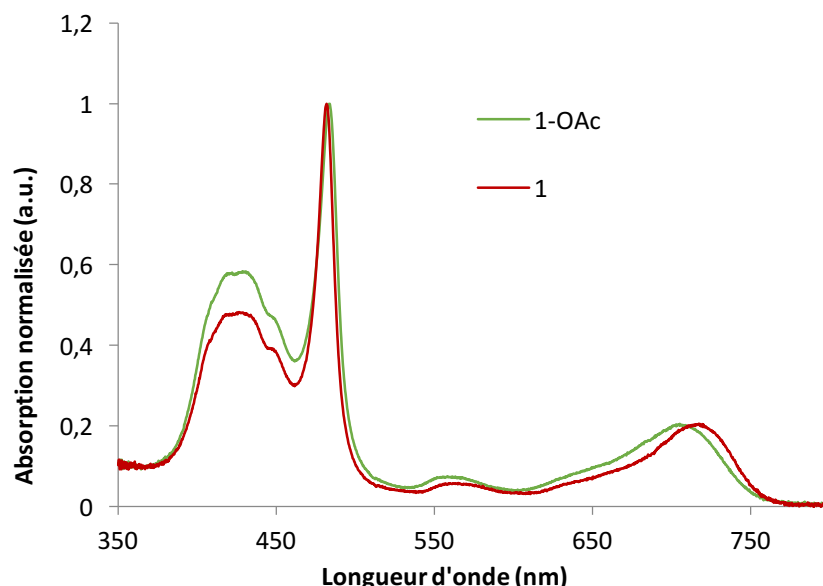


Figure 46. Spectres d'absorption normalisés du composé **1-OAc** dans CHCl_3 (vert) et du composé **1** dans Pyridine/Méthanol : 1/24, v/v (rouge).

Les composés dimères possèdent une bande de Soret remarquablement élargie (400-500 nm) comparée à celle du monomère. En particulier dans le cas du dimère butadiyne, le spectre obtenu présente 3 transitions bien marquées dans cette région. On peut observer un important déplacement bathochromique des spectres des composés dimères. Les modifications observées au niveau des bandes Q sont aussi importantes. Tandis que le monomère acétylénique présente deux transitions de faibles intensités à 581 nm 627 nm, les bandes Q des dimères sont plus intenses et fortement déplacées vers le rouge (710 nm pour la transition la plus extrême pour la porphyrine dimère acétylénique **2**, 705 nm pour la porphyrine dimère butadiyne **5**).

Les spectres d'émission des porphyrines monomères butadiynes **23** et **24**, suite à l'excitation à 450 nm, sont très proches avec une première bande intense autour 640 nm, et une seconde plus faible à 690 nm. Comparativement, les émissions des dimères sont sujettes à un fort effet bathochromique du fait de l'extension de la conjugaison et sont décalées vers le rouge. En revanche, l'émission de dimère acétylénique **2** est plus bathochromique que celle de dimère butadiyne **5**. (Figure 47)

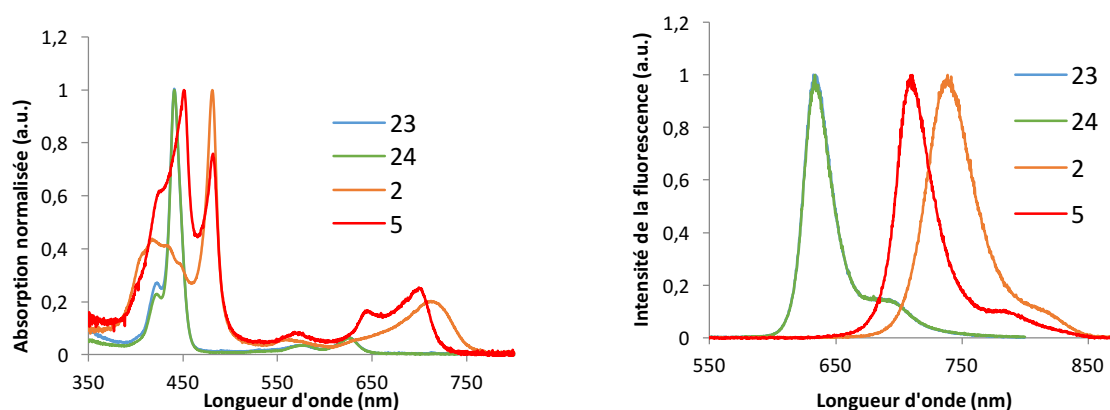


Figure 47. Absorption normalisée (à gauche) et émission normalisée (à droite) de la porphyrine dimère acétylénique **2**, de la porphyrine dimère butadiyne **5**, dans Pyridine/Méthanol : 1/24, v/v, des porphyrines monomères butadiynes **23** et **24** dans CHCl_3 .

II.2.2. Rendement quantique de fluorescence

Nous avons mesuré le rendement quantique de fluorescence des porphyrines dimères déprotégés dans la solution pyridine/méthanol : 1/24 et des composés protégés par les acétates dans le CHCl_3 . Nous avons utilisé la rhodamine 6G (λ_{ex} 528 nm; $\lambda_{\text{ém}}$ 551 nm dans le méthanol, $\Phi_f = 0.95$) la Coumarine 153 ($\lambda_{\text{ém}}$ 422 nm; $\lambda_{\text{ém}}$ 532 nm dans l'éthanol, $\Phi_f = 0.54$) comme référence.²⁶⁴

Tableau 3. Rendements quantiques de fluorescence des composés protégés dans le CHCl₃ et des composés déprotégés dans le mélange pyridine/méthanol : 1/24, v/v. Réréférences Rhodamine 6G et Coumarine 153 dans l'éthanol.

Composé	λ_{exc} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	Φ_f^a
1	480	724	0,028
2	480	743	0,029
3	480	735	0,038
4	480	715	0,050
5	480	711	0,050
6	480	706	0,057
1-OAc	480	739	0,035
2-OAc	480	702	0,038
4-OAc	480	712	0,052
5-OAc	480	709	0,054
23	450	635	0,029
24	450	635	0,029
31 (synthétisé par Dr. Achelles.)	424	707	0,08 ²²⁸
32 (synthétisé par Dr. Achelles.)	419	619	0,07 ²²⁸
TPP	514	650	0,11 ²⁶⁵

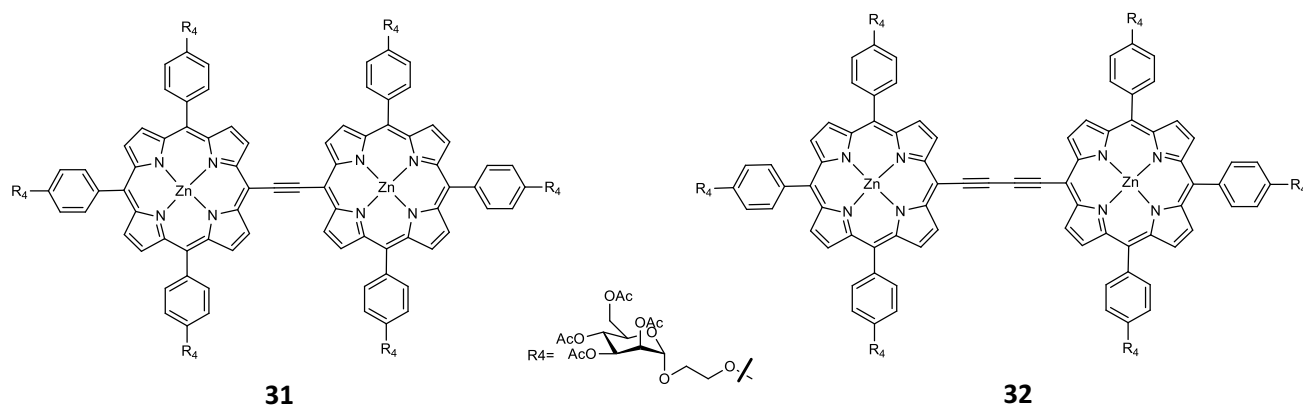


Figure 48. Structure de porphyrines dimères symétriques synthétisées par le Dr Achelle.²²⁸

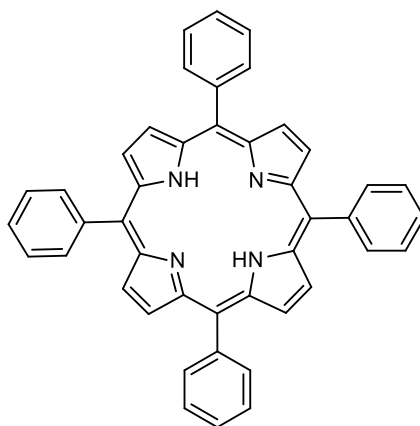


Figure 49. Structure de TPP.

Les rendements quantiques de fluorescence des composés dimères sont plus faibles que celui de la TPP. En comparaison avec les rendements quantiques de fluorescence des porphyrines dimères symétriques (0,08 pour dimères acéthylénique et 0,07 pour dimère butadiyne), synthétisés par Sylvain Achelles²²⁸, les valeurs obtenues restent acceptable. Il s'agit d'un résultat encourageant dans la mesure où une faible fluorescence peut correspondre à un CIS important permettant ainsi la formation de l'oxygène singulet à partir de l'état triplet excité. Les rendements quantiques de fluorescence des dimères acéthyléniques sont vers 0,03 et ces des dimères butadiynes sont 0,05. On peut dire que les dimères acéthyléniques peuvent former plus d'oxygène singulet. Le rendement quantique de fluorescence du dimère déprotégé est plus petit que celui du dimère protégé correspondant.

II.2.3. Rendement quantique de formation de l'oxygène singulet

II.2.3.1. Détection de l'oxygène singulet

La détection de l'oxygène singulet est délicate du fait de sa courte durée de vie et de sa haute réactivité. Deux méthodes sont couramment utilisées afin d'y parvenir : une méthode physique reposant sur la luminescence de l'oxygène singulet (transition $T_1 \rightarrow S_1$) et une méthode chimique faisant intervenir une molécule dont les propriétés seront altérées en présence de cette espèce.

a. Mesure directe de Φ_{Δ} par luminescence de $^1\text{O}_2$

L'état singulet de l'oxygène est un état excité donc instable. Il se désexcite rapidement jusqu'à l'état triplet fondamental. Plusieurs chemins de désexcitation sont envisageables :

- transition non radiative : CIS suivi de relaxation vibrationnelle (RV).
- échange d'énergie par collision avec le solvant ou une autre molécule.
- transition radiative : émission d'un photon (aussi appelée luminescence).

Le photon émis lors du phénomène de luminescence possède une énergie de $94,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ environ et est détectable à 1268 nm avec le matériel adapté. Le rendement quantique de luminescence d' $^1\text{O}_2$ étant connu, il est utilisable pour déterminer celui de production d' $^1\text{O}_2$ du Ps. Le signal observé est présenté dans la **Figure 50**. Les déterminations de rendements quantiques en $^1\text{O}_2$ s'appuient sur un autre photosensibilisateur dont les différents rendements quantiques sont connus (fluorescence, non radiatif, phosphorescence...). À l'aide de l'équation suivante, il est possible de déterminer l'efficacité du composé étudié.

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I}{I_0} \frac{A_0}{A} \Phi_{\Delta_0} \text{ (Équation 4)}$$

avec Φ_{Δ} et Φ_{Δ_0} les rendements quantiques d'oxygène singulet de l'échantillon et de la référence, I et I_0 , leurs luminescences intégrées et A et A_0 leurs absorbances respectives. En revanche, contrairement à la fluorescence, il est nécessaire que l'échantillon et la référence soient en solution dans le même solvant afin de se placer dans des conditions identiques d'oxygénation et de diffusion.

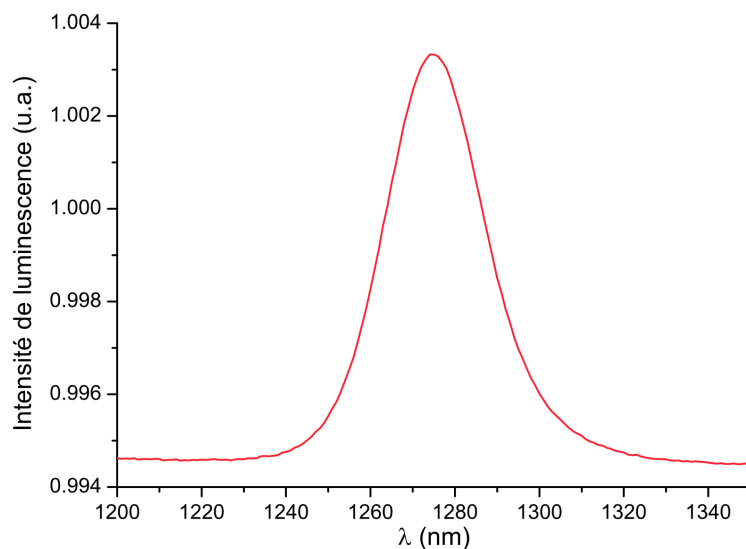


Figure 50. Le spectre d'émission d' $^1\text{O}_2$.

b. Principe de la détection par voie chimique

L'oxygène singulet est une espèce très réactive, il est possible de le détecter en le faisant réagir avec une molécule adaptée, appelée accepteur ou quencheur, dont la réaction avec l'oxygène modifiera les propriétés spectroscopiques. L'évolution des bandes d'absorption ou d'émission de fluorescence de ces composés révèle la vitesse de production d'oxygène singulet par le photosensibilisateur. Ce principe suppose l'absence d'interactions entre ce dernier et l'accepteur d'oxygène singulet.

Parmi elles, on peut retenir l'ADPA (Acide 9,10-anthracènedipropionique disodique) et le DPBF (diphénylisobenzofurane) (**Figure 51**) réagissant tous deux avec l'oxygène singulet selon une réaction d'hétéro Diels-Alder. L'ADPA présente l'avantage d'être hydrosoluble et de permettre de se placer aussi proche des conditions physiologiques que possible, cependant la durée de vie de l'oxygène singulet dans l'eau est largement raccourcie par rapport aux autres solvants usuels du fait de la proximité d'énergie entre d'un mode de vibration de la liaison OH avec l'énergie de l'oxygène singulet.

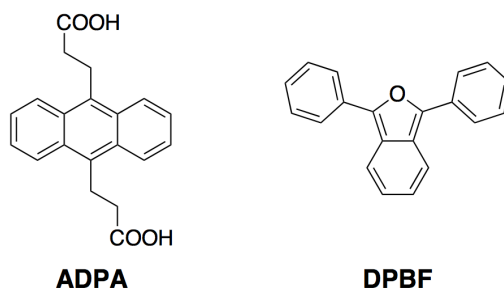


Figure 51. Structures des « quenchers » d' $^1\text{O}_2$ ADPA et DPBF.

Le test à l'ADPA nécessite de se placer dans D_2O et est peu sensible avec des variations d'intensité de bandes assez faibles. Le DPBF, insoluble dans l'eau, présente beaucoup plus de sensibilité à l'oxygène singulet. Il réagit avec ce dernier selon une réaction de type hétéro Diels-Alder provoquant la rupture d'aromaticité de la molécule, conduisant à la disparition de la fluorescence ainsi que celle de la bande d'absorption à 412 nm caractéristique de ce composé.

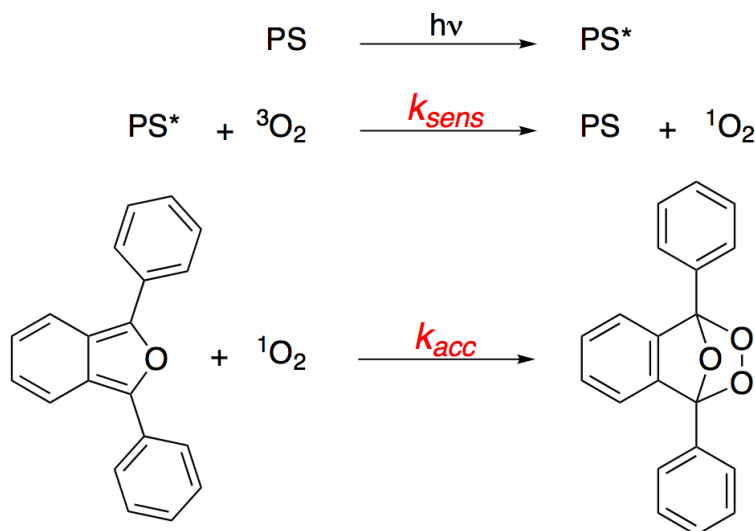


Figure 52. Photosensibilisation du DPBF par le Ps et l'oxygène.

En milieu aéré, la décroissance de la bande à 412 nm peut être modélisée comme un phénomène d'ordre 1. La réaction électro-cyclique possède un mécanisme concerté, il est ainsi possible de lui appliquer la loi de Vant'Hoff :

$$v = k_{acc}[DPBF][^1O_2] \text{ (Équation 5)}$$

avec v la vitesse de disparition du DPBF, k_{acc} la constante de vitesse de la réaction de « quenching » et $[X]$ les concentrations des espèces X. Si l'on considère que la réaction de l'oxygène singulet avec le DPBF est très rapide, il est possible de considérer l'oxygène singulet comme un intermédiaire réactionnel dont la concentration sera constante au cours de l'expérience. La consommation du DPBF s'apparente donc à une réaction d'ordre 1 et la décroissance de la bande d'absorption suit une loi exponentielle négative.

Il s'agit d'un modèle faisant appel à plusieurs hypothèses qui sont résumées ci-dessous :

- pas d'interactions entre DPBF et Ps,
- absence de « photobleaching » des espèces durant la durée de l'expérience : $[Ps] = \text{cte}$,
- saturation de la solution en 3O_2 afin de garantir d'une part que $[^3O_2] = \text{cte}$ et aussi de permettre un point de comparaison entre des Ps différents,
- la production d'oxygène singulet est l'étape limitante du processus ($k_{acc} \gg k_{sens}$), il faut aussi assurer une densité de photons assez importante.

Un test utilisant le DPBF a été développé au laboratoire afin de tester rapidement divers Ps.

II.2.3.2. Développement d'un test comparatif de détection d'oxygène singulet

La quantification de la production d'oxygène singulet impose de nombreuses conditions. Les conditions d'illumination doivent être identiques d'une expérience à l'autre, il est important de s'affranchir de tout phénomène externe et de travailler en réacteur fermé. Le choix de la source lumineuse est déterminant pour assurer une densité de photons équivalente d'un Ps à l'autre.

L'apport en oxygène doit à tout moment permettre la saturation de la solution. Cet apport doit être important et aussi régulier que possible. Les propriétés spectroscopiques et

chimiques des espèces en présence dépendant de la température, les mesures doivent être effectuées à température constante.

Pour la réalisation du montage et des mesures ont été effectués précédemment dans notre équipe (renvoyer à une référence).

Nous avons utilisé le DPBF pour tester la cinétique de formation d'oxygène singulet. Le DPBF peut réagir avec l'oxygène singulet en provoquant la rupture d'aromaticité de la molécule, nous observons la disparition de la bande d'absorption. Par enregistremnt du spectre du DPBF dans le DMF en présence de chaque composé (un exemple est présenté à la **Figure 53**) et par comparaison des spectres obtenus avec le monomère *TPP(ODegOManOH)-Ph* (**Figure 54**), nous pouvons obtenir la cinétique de formation d'oxygène singulet. Les résultats sont présentés à la **Figure 55**.

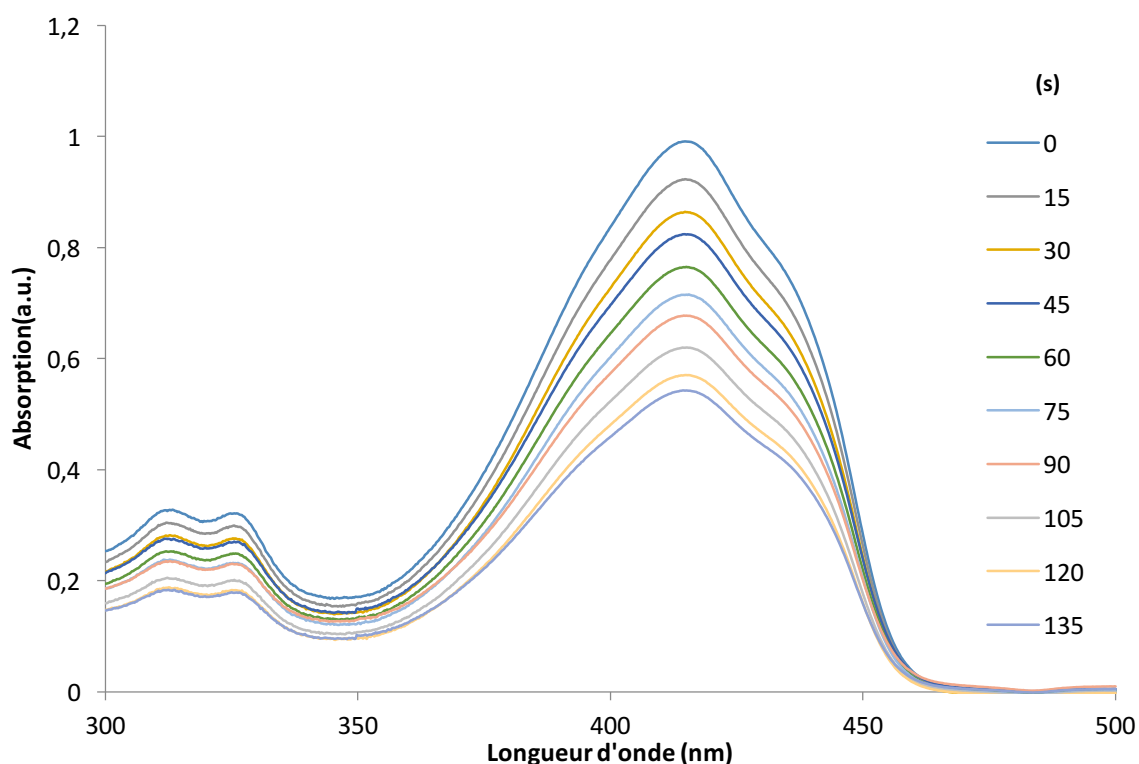


Figure 53. Diminution progressive du spectre d'absorption de DPBF en fonction du temps.

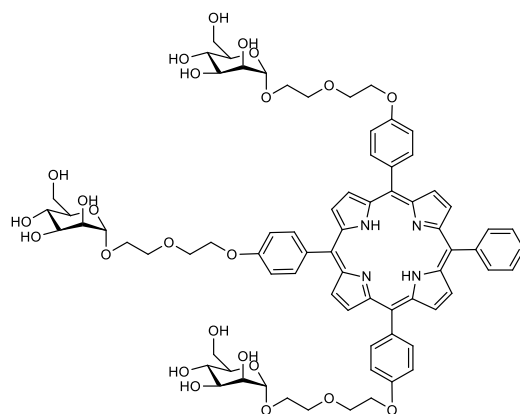


Figure 54. Structure de la porphyrine monomère *TPP(ODegOManOH)-Ph*.²³⁰

Tous les dimères montrent une production significative d'oxygène singulet. Pour chacun des composés, nous avons tracé la droite moyenne et extrait la pente correspondante, k_{acc} , qui est rapportée à celle du monomère *TPP(ODegOManOH)-Ph*, conduisant à une constante relative k_{rel} . Les différentes valeurs de k_{rel} sont présentées dans le **Tableau 4**.

Les valeurs (k_{rel}) des dimères acétyléniques (**1** et **2**) sont environ deux fois plus grandes que celles observées avec le monomère *TPP(ODegOManOH)-Ph*, et les valeurs (k_{rel}) des dimères butadiynes (**4** et **5**) sont une fois et demi plus grandes. Ceci confirme les résultats de rendement quantique de fluorescence (**Chapitre I, II.4.**), les dimères acétyléniques forment plus d'oxygène singulet que les dimères butadiynes. L'influence des chaînes latérales (TEG) est faible sur la production d'oxygène singulet.

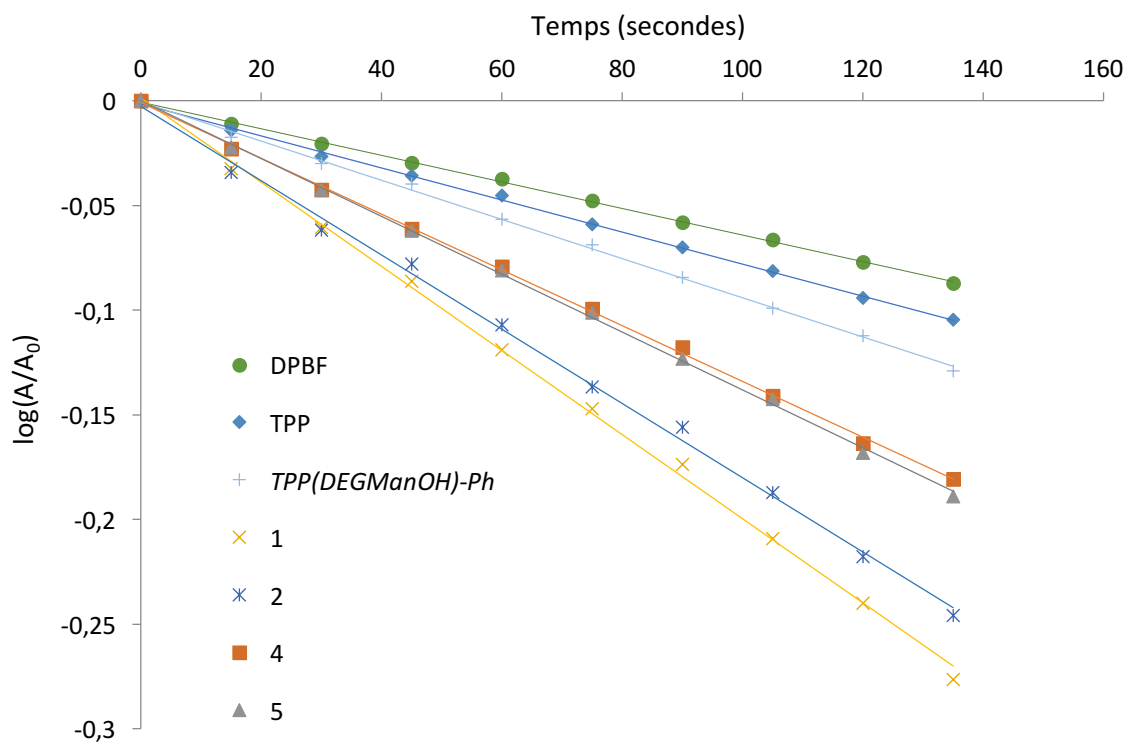


Figure 55. Cinétique de dégradation du DPBF en présence des dimères déprotégés, du monomère $TPP(ODEGOManOH)-Ph$ et de la TPP dans le DMF aéré.

Tableau 4. Constantes relatives (k_{rel}) de dégradation du DPBF par les dimères déprotégés en comparaison avec celle obtenue avec le monomère $TPP(ODEGOManOH)-Ph$.

Composé	$TPP(ODEGOManOH)-Ph$	1	2	4	5
$K_{rel}(s^{-1})$	1	2,22	2,00	1,44	1,56

II.2.4. Section efficace ADP

Expérimentalement, la détermination de la section efficace d'absorption à deux photons s'effectue généralement en référence à une molécule donnée, suivant la méthode développée par Xu et Webb.²⁶⁶ Lors d'une mesure de fluorescence excitée à deux photons, le nombre moyen de photons de fluorescence collectés par unité de temps $\langle F(t) \rangle_t^{211}$ est donné par l'équation suivante :

$$\langle F(t) \rangle_t = \frac{1}{2} \phi_f \eta_{sys} C \sigma_{2p} \frac{g_p}{f_T} \frac{8n \langle P(t) \rangle_t^2}{\pi \lambda} \quad (\text{Équation 6})$$

où ϕ_f est le rendement quantique de fluorescence du fluorophore ; η_{sys} , l'efficacité de collection du système ; C , la concentration ; σ_{2p} , la section efficace d'absorption à deux photons de fluorescence ; $\frac{g_p}{f_T}$ est un terme dépendant du laser, où g_p dépend de la forme de l'impulsion, f correspond à la fréquence du laser et T à la durée d'impulsion du laser (dans le cas d'un laser Ti :saphir, $\frac{g_p}{f_T} \sim 10^5$) et $\langle P(t) \rangle_t$, la puissance moyenne incidente.

Lors de ces expériences, on considère qu'il n'y a pas de relaxation de fluorescence dite « anormale » ($S_2 \rightarrow S_0$) et que l'émission de fluorescence a lieu à partir du même état excité que celui obtenu par l'absorption mono-photonique. Les processus d'émission sont indépendants du processus d'absorption (1 ou 2 photons), on utilise le rendement quantique de fluorescence déterminé à un photon.

Le principe de l'expérience consiste à comparer l'intensité de fluorescence émise par une molécule référence (usuellement la fluorescéine dans de l'eau à pH = 11) à l'intensité de fluorescence de la molécule (A) à caractériser. La section efficace d'absorption à deux photons est donnée par la formule suivante :

$$\sigma_{2p_A}(\lambda) = \frac{\eta_{Ref} \sigma_{2p_{Ref}}(\lambda) C_{Ref}}{\eta_A C_A} \frac{\langle P_{Ref}(t) \rangle^2}{\langle P_A(t) \rangle^2} \frac{\langle F(t) \rangle_A}{\langle F(t) \rangle_{Ref}} \frac{\phi_{f_{Ref}}}{\phi_{f_A}} \quad (\text{Équation 7})$$

où $\langle F(t) \rangle_A$ est l'émission de fluorescence moyenne du fluorophore et $\langle F(t) \rangle_{Ref}$ est l'émission de fluorescence moyenne de la référence. $\langle P_{Ref}(t) \rangle$ est la puissance d'excitation incidente moyenne de la référence et $\langle P_A(t) \rangle$ est la puissance d'excitation incidente moyenne du fluorophore, η_{f_A} est l'efficacité de collection du système pour le fluorophore A et η_{Ref} est l'efficacité de collection du système pour la référence.

Si l'on considère que l'efficacité de collection de la lumière émise est similaire d'une molécule à l'autre et si l'on utilise la fluorescéine (dans l'eau à pH basique, $\phi_f = 0.9$) comme référence alors l'équation 7 devient :

$$\sigma_{2p_A}(\lambda)\phi_{f_A} = \frac{0.9 \sigma_{2p_{FL}}(\lambda)C_{FL}\langle F(t) \rangle_A}{C_A\langle F(t) \rangle_{FL}} \quad (\text{Équation 8})$$

Les mesures des sections efficaces des dimères ont été réalisées par le Dr. Céline Fiorini-Debuisschert au CEA Saclay (SPEC/LEPO). Comme illustré sur **La figure 56**, le banc expérimental est un microscope optique inversé couplé à une excitation laser femtoseconde (Ti-Saphir, 80 MHz, 100 fs, accordable entre 770 et 920 nm).

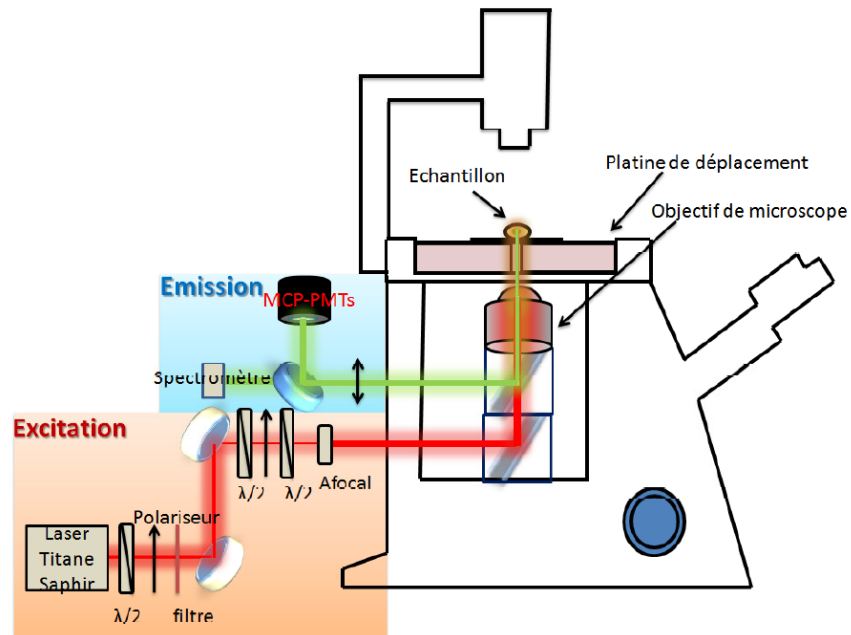


Figure 56. Représentation simplifiée du montage de microscopie de fluorescence à deux photons. Le banc peut être séparé en trois grandes parties : (1) Une partie excitation qui comprend la mise en forme du faisceau ainsi que le contrôle de sa puissance ; (2) Une partie couplage via le statif de microscope : l'excitation de l'échantillon est effectuée par le dessous, au moyen d'un objectif de microscope, ce même objectif étant également utilisé pour la collection du signal ; (3) Une partie

mesure de l'émission de fluorescence : mesure de l'intensité par un photomultiplicateur de type MCP-PMT et analyse spectrale du signal.

Comme expliqué ci-dessus, les intensités TPEF des échantillons ont été mesurées et comparées en utilisant une solution de fluorescéine comme référence, le rapport des signaux de fluorescence permettant de déterminer la section efficace d'ADP. Pour éviter tout risque de réabsorption ou de « quenching », nous utilisons des solutions diluées (concentrations de l'ordre de 50 μM). Le détecteur est un photomultiplicateur (CPM-PMT Perkin Elmer). Pour ne pas fausser la mesure du signal de fluorescence, il faut éliminer au maximum le bruit provenant de la rétrodiffusion du faisceau laser d'excitation : pour cela, on utilise différents filtres qui coupent notamment toutes les longueurs d'ondes supérieures à 720 nm. Ainsi, selon les composés testés, ces filtres peuvent couper aussi une partie du signal de fluorescence émis (**Figure 57**).

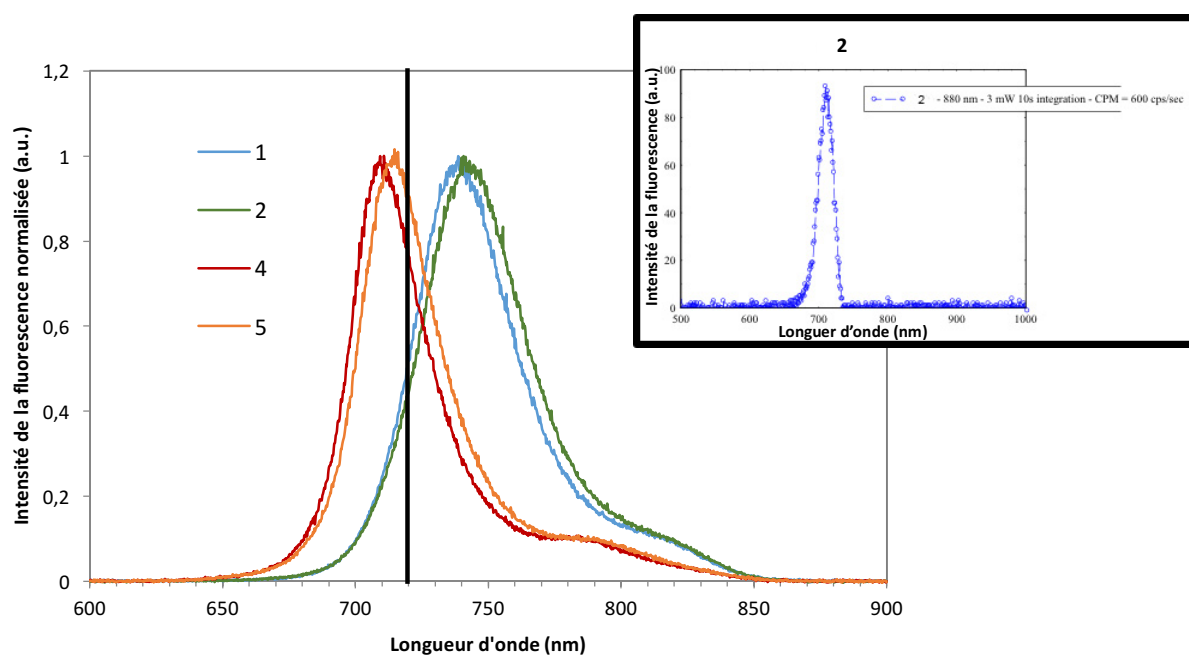


Figure 57. A gauche : spectre de fluorescence obtenu après excitation à 2 photons et filtrage de la partie infrarouge du spectre. A droite : spectre de fluorescence obtenu après excitation à 1 photon à $\lambda = 480$ nm.

Étant donné les spectres d'absorption des porphyrines dimères (**Figure 58**) (bande absorbant dans le rouge notamment), leur fluorescence peut se trouver partiellement réabsorbée.

Afin de s'affranchir de ce problème de collection partielle du signal de fluorescence, on estime pour chacun des composés testés, la proportion de signal absorbée par les filtres. Pour ce faire, nous considérons les différents spectres de fluorescence des composés testés (mesurés suite à une excitation monophotonique) et le spectre d'absorption total de tous les filtres utilisés. Un taux de correction à appliquer à la mesure directe du signal est déterminé.

Afin de s'assurer que le signal de fluorescence mesuré provient bien d'une excitation à deux photons, la dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence est systématiquement vérifiée (pour chaque échantillon et chaque longueur d'onde d'excitation considérée).

On notera enfin que les très faibles rendements quantiques de fluorescence des différents composés testés limitent les signaux de fluorescence mesurés et imposent l'utilisation de puissance incidente d'excitation relativement importantes (densités de puissance crête de l'ordre de quelques GW/cm^2)

Selon les spectres d'absorption des porphyrines dimères, leur absorption maximale à un photon se situe entre 400 et 500 nm (**Figure 58**).

Afin de caractériser l'absorption à deux photons de ces composés, il faut considérer des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 800-1000 nm.

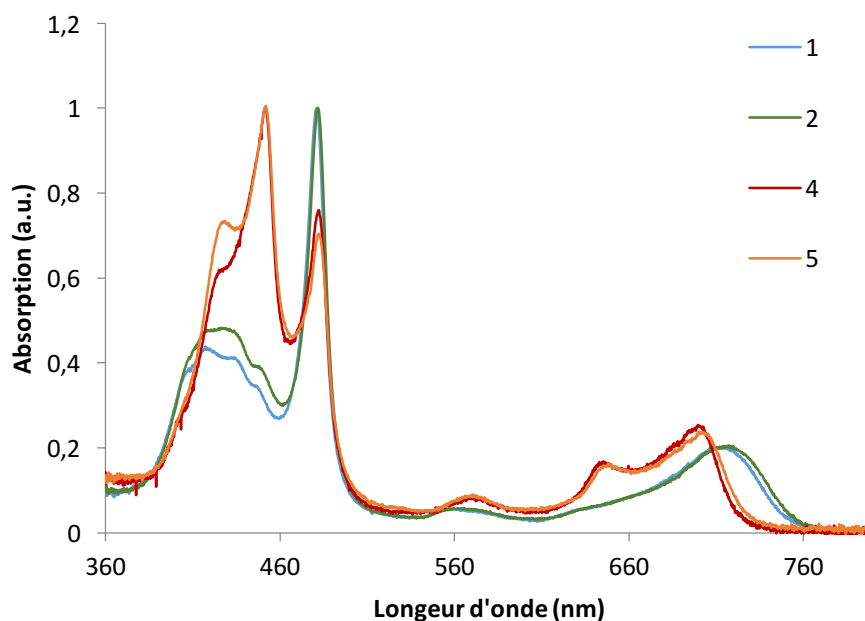


Figure 58. Spectre d'absorption des porphyrines dimères dans mélange de méthanol /pyridine (24 :1).

Au cours des expériences, nous avons été confrontées à différentes difficultés :

- De façon assez surprenante, le signal de fluorescence à deux photons a tendance à augmenter au cours du temps puis semble atteindre un seuil de saturation. Les puissances d'excitation utilisées étant relativement importantes, des effets d'échauffement de la solution peuvent éventuellement être invoqués et entraîné une augmentation de la solubilité des molécules entraînant une augmentation du signal, la solubilité des molécules considérées n'étant pas très élevée. Ces mêmes phénomènes ont été observés à la fois lors de l'utilisation d'un mélange pyridine/méthanol (1 :24) et dans le DMSO.
- Quels que soient les composés testés, la présence d'une bande d'absorption dans le rouge ($\lambda = 620\text{-}720\text{ nm}$ ou $620\text{-}760\text{ nm}$) empêche toute mesure utilisant des longueurs d'ondes d'excitation inférieures à 840 nm (présence d'une fluorescence parasite liée à l'excitation à un photon de cette bande « rouge »).
- Même en considérant des longueurs d'ondes d'excitation supérieures à 840 nm, certains composés donnent lieu à un signal qui ne varie pas de façon attendue avec la

puissance laser incidente (dépendance non quadratique). C'est notamment le cas des composés acéthyléniques (**1** et **2**), pour lesquels la section efficace d'absorption à deux photons n'a pu raisonnablement être estimée que pour une longueur d'onde incidente $\lambda=880$ nm : $\delta_1 \approx \delta_2 \approx 300$ GM.

- Le problème est moins marqué pour les composés butadiynes (**4** et **5**) dont la bande d'absorption « rouge » est davantage décalée vers les petites longueurs d'onde (620-720 nm). Ainsi, 3 longueurs d'ondes ont été testées pour ces composés, $\lambda=840$ nm, $\lambda = 860$ et $\lambda = 880$ nm, le maximum de section efficace à deux photons étant enregistré pour $\lambda=840$ nm : $\delta_4 \approx 600$ - $\delta_5 \approx 1000$ GM.

Le δ de **4** est proche de 1000 GM : il s'agit donc de structures qui présentent une très bonne absorption à deux photons.

Le facteur de mérite (FM) 1,5 entre **4** et **5** est un peu surprenant car il s'agit de structures moléculaires quasi-identiques, ces deux molécules qui ne diffèrent que par la présence de chaîne TEG (meilleure solubilité).

La comparaison entre structures butadiynes ou acéthyléniques est délicate car les mesures n'ont été possibles qu'à certaines longueurs d'onde, rendant impossible la détermination du maximum d'absorption à deux photons de ces deux structures.

II.2.5. Phototoxicité *in vitro*

Nous avons testé l'activité phototoxique *in vitro* des composés **1** et **4** sur deux lignées cellulaires (HT-29, une lignée du cancer du côlon et Y79, cellules de rétinoblastome). Les deux lignées sur-expriment des récepteurs membranaires lectiniques, spécifiques du β -glucose dans le cas du HT-29 et du α -mannose pour Y79. Une illumination monophotonique a été utilisée pour des raisons pratiques.

La survie des cellules après traitement PDT est mesurée à l'aide du test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui est un marqueur spécifique, réduit

par les mitochondries en formazan de couleur violette. Il s'agit d'un indicateur d'activité cellulaire et la coloration violette ne sera observée que pour des cellules vivantes.

Les cellules sont incubées avec différentes doses de Ps pendant des durées variables selon la lignée cellulaire. Elles sont ensuite exposées à une lumière de longueur d'onde supérieure à 570 nm pour une dose de 5 J.cm² puis conservées à 37 °C pendant 3 jours dans le noir. Le MTT est ajouté et les cellules conservées à 37 °C pendant 30 min. Le milieu est ensuite retiré et les cristaux de formazan dissouts dans une quantité connue DMSO. La mesure de l'absorption à 540 nm de la solution obtenue permet la mesure de la proportion de cellules vivantes et mortes dans le milieu.

Selon la **Figure 59**, les composés **1** et **4** ne sont pas phototoxiques sur les cellules HT-29 et Y79. Il n'a pas été possible de déterminer des IC₅₀. Nous avons testé la phototoxicité de monomère **17** qui semble très efficace, la toxicité apparente est à relativiser en réalisant plusieurs fois de manipulation.

Nous avons également testé la phototoxicité du monomère **17** sur des cellules de la rétine pigmentaire (ARPE-19). Le composé **17** n'est pas toxique sans irradiation et la phototoxicité est de 0,24 µM avec une dose de 2,5 J/M² avec le filtre orange ($\lambda_{exc} > 570$ nm) (**Figure 60**).

3 fois ?

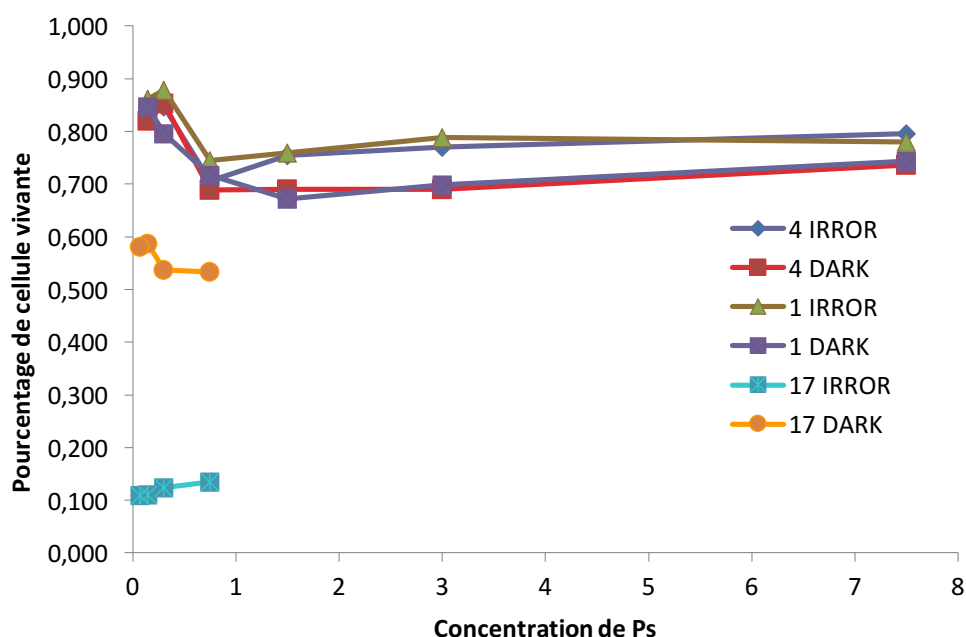


Figure 59. Toxicité en présence de dimères **1** et **4**.

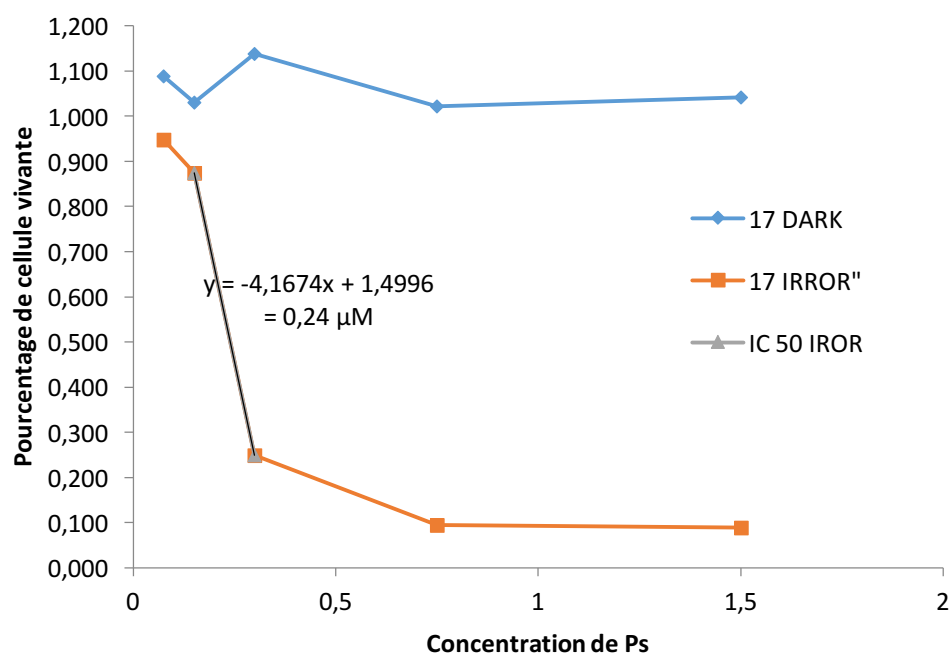


Figure 60. Toxicité et phototoxicité du monomère composé **17**.

Chapitre II Comportement interfacial des porphyrines dimères et leur interaction avec des modèles biomimétiques de la membrane cellulaire

I. GÉNÉRALITÉS ET OBJECTIFS

Les six porphyrines dimères (**1-6**) caractérisées dans la partie précédente possèdent les propriétés physicochimiques et photophysiques encourageantes pour être des candidats de Ps pour la PDT-ADP. Les rendements quantiques de fluorescence de ces porphyrines, précédemment mesurés (**Chapitre, II.4.**) sont faibles (de l'ordre de 0,03) et leurs cinétiques de formation de l'oxygène singulet sont beaucoup plus rapides que celles du monomère *TPP(ODegOManOH)-Ph* pris comme référence (voir les résultats dans **Chapitre I, II.5.2.**). En revanche, les résultats de la photocytotoxicité *in vitro* des porphyrines dimères (**1-2-4-5**) sur cellules tumorales HT-29 (cancer du côlon) et Y79 (rétinoblastome) (**Chapitre I, II.7.**) ont révélé que ces composés sont inactifs vis-à-vis de ces cellules. Même si les six porphyrines dimères dissymétriques sont plus amphiphiles que les porphyrines dimères symétriques synthétisées au laboratoire,²⁵¹ leur pénétration intracellulaire sous forme libre reste faible. Ce résultat peut être expliqué par leur faible solubilité qui conduit à leur agrégation dans l'environnement aqueux des cellules.

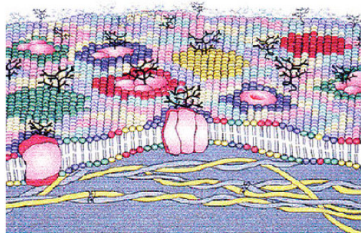
Afin de contourner le problème de solubilité des porphyrines dimères en milieu aqueux et leur faible pénétration dans les cellules, la vectorisation à l'aide de liposomes pourrait être utilisée. Un certain nombre de travaux comparant les efficacités de la PDT des Ps libres par rapport à leur formulation liposomale, dans des conditions identiques, fournissent une preuve solide des avantages de la formulation liposomale.²⁶⁷ Les liposomes porteurs d'un ligand actif permettant d'améliorer la spécificité vis-à-vis des cellules ciblées sont également fortement développés pour une utilisation en PDT.⁵⁸ Dans ce contexte, une connaissance approfondie des interactions entre les porphyrines dimères et la bicouche phospholipidique de ces vésicules pourrait fournir les premières informations permettant de les vectoriser. De

plus, en considérant ces vésicules comme des modèles membranes, il serait possible d'obtenir un aperçu significatif de la performance thérapeutique des formulations liposomales de ces porphyrines dimères.

La membrane cellulaire est composée d'un double feuillet de phospholipides, dans lequel sont insérées des protéines, qui s'organisent en une structure bicouche et sépare l'intérieur de la cellule du milieu extérieur. Dans les cellules eucaryotes, le contenu d'organites tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries, est isolé du cytosol par une seconde membrane.²⁶⁸ Les Ps induisent un dommage cellulaire irréversible et la mort cellulaire, s'ils pénètrent dans le cytoplasme après avoir traversé la membrane cellulaire,²⁶⁹ car leurs cibles majoritaires se situent à l'intérieur de la cellule tumorale. Les localisations intracellulaires des Ps ont été présentées par Ana P. Castono *et al.*¹⁹ ; les Ps doivent traverser la membrane cellulaire, voire l'enveloppe nucléaire pour exercer leur activité pharmacologique. La membrane cellulaire est donc la première barrière qu'ils doivent franchir avant d'exercer leur action PDT.^{231,270} Par conséquent, l'étude de leur interaction avec cette membrane est une étape cruciale dans la compréhension de leur mécanisme d'action en PDT.²⁷¹

Cependant, il est difficile d'étudier cette interaction en raison de la complexité des membranes biologiques. Des modèles plus simples ont donc été construits pour étudier les interactions entre les membranes et les médicaments anticancéreux. Les principaux systèmes modèles des membranes sont la monocouche de Langmuir à l'interface air-liquide, les liposomes et les bicouches supportées.²⁷² **(Figure 61)**

a. Membrane cellulaire



b. Modèles lipidiques membranaires



1) Monocouche de Langmuir



2) Liposomes



3) Bicouches supportées

Figure 61. Illustration schématisique de la membrane cellulaire et des différents modèles membranaires. a. La membrane cellulaire comporte des couches de lipides asymétriques et des microdomaines enrichis en lipides particuliers et protéines membranaires. b. Les modèles lipidiques membranaires imitent la disposition des lipides dans une membrane cellulaire : 1) La monocouche de Langmuir ; 2) Les liposomes ; 3) Les bicouches supportées.²⁷²

Notre objectif est d'évaluer les interactions entre nos porphyrines dimères et les membranes cellulaires en utilisant une monocouche phospholipidique et des liposomes bicouches.

I.1. Modèle de membrane pour étudier les interactions entre substance active et membrane

I.1.1. La monocouche de Langmuir

La technique de la monocouche de Langmuir est utilisée pour étudier les propriétés interfaciales des porphyrines dimères et modéliser leur interaction avec la membrane

cellulaire.²⁷³ Cette technique est également utilisée pour sélectionner les phospholipides permettant de former des liposomes avec ces molécules, dans un but de vectorisation.

La structure des porphyrines dimères peut être analysée à l'échelle de l'Å²⁷³ et le comportement des molécules à l'interface air-liquide peut être analysé par tensiométrie. Desroches *et al.* ont ainsi montré les changements des propriétés superficielles de dérivés de porphyrines selon leur degré de substitution par des groupements *méso*-phényl-glucose par des mesures de pression superficielle (isotherme π -A) et leur interaction avec une monocouche de phospholipides par diffraction des rayons X à incidence rasante.²⁷⁴

La monocouche de Langmuir à l'interface air-liquide possède une organisation interfaciale définie qui est supposée être très proche de celle de la membrane biologique. Même si la monocouche de Langmuir peut ne pas refléter la complexité des membranes biologiques, ce système simple, complémentaire d'expériences cellulaires *in vitro*, permet de contrôler indépendamment plusieurs paramètres (la densité de surface, le degré d'ordre des molécules lipidiques, la composition de la sous-phase, le pH et la température).²⁷³ Comparé aux liposomes, ce système ne souffre pas des problèmes comme la variation de composition lipidique en raison du changement de courbure de surface, ou encore l'incapacité de contrôler indépendamment la composition lipidique et le degré d'empilement des molécules lipidiques.²⁷⁵ L'interaction entre un Ps hydrophobe et des molécules de phospholipide peut être mise en évidence en comparant l'isotherme de compression du lipide pur et celle du mélange du lipide avec le Ps. En plus du changement de la pression de surface, la modification de morphologie de la monocouche à l'interface air-liquide peut être étudiée par la microscopie à l'angle de Brewster.²⁷² Depuis les dernières décennies, la monocouche de Langmuir est beaucoup utilisée pour caractériser les interactions entre des molécules médicamenteuses et la membrane par des mesures de pression de surface.²⁷⁶⁻²⁸¹ Makky *et al.* ont étudié, par exemple, l'influence de différents rapports phospholipide/cholestérol sur l'interaction entre des porphyrines glycodendrimériques et des modèles de membrane, en comparant les caractéristiques des isothermes π -A des monocouches mixtes.²⁸²

I.1.2. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques sphériques contenant un compartiment aqueux interne.²⁸³ Selon leur taille, ces vésicules peuvent être classées en trois types : les petits liposomes unilamellaires (SUV, 20-50 nm), les gros liposomes unilamellaires (LUV, 50-100 nm) et les liposomes unilamellaires géants (GUV, 10-100 µm).²⁷² Depuis le milieu des années soixante-dix, de nombreuses études ont été consacrées à l'utilisation des liposomes comme véhicules de substance active. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses formulations liposomales ont été mises sur le marché pour véhiculer des antibiotiques²⁸⁴, des antifongiques²⁸⁵, des oligonucléotides^{286,287} et des médicaments anticancéreux²⁸⁸ dans le but de les cibler vers un site d'action cellulaire, et d'améliorer ainsi leurs effets cliniques, réduire leur toxicité et, en même temps, éviter le métabolisme ou les réponses immunitaires.²⁸⁹ L'exemple des *m*-THPC en formulation liposomale (Foslip®) est présenté dans la **Chapitre I, I.1.4.**

Bien que les liposomes soient proposés comme véhicule de médicaments, ils ont aussi été considérés, dès leur découverte, comme un outil potentiel pour modéliser la membrane d'une cellule biologique.²⁶⁸ Ils ont permis d'étudier les propriétés mécaniques des bicouches lipidiques,²⁹⁰⁻²⁹² l'adhérence et la fusion de membrane,^{293,294} la perméabilité des membranes aux ions,²⁹⁵ ainsi que les effets de la viscosité, des changements de densité de surface, de proportion de cholestérol et de pH pendant la distribution des substances actives dans les tissus normaux et cancéreux.²⁹⁶ De nombreuses études ont été effectuées pour comprendre les interactions entre les lipides membranaires et des biomolécules telles que l'ADN,²⁹⁷ les protéines,²⁹⁸ les molécules actives,²⁹⁹ et plus spécifiquement, évaluer le partage des Ps entre liposomes et milieu aqueux.³⁰⁰

I.2. Techniques permettant d'étudier l'interaction PS-membrane en utilisant les liposomes

I.2.1. La fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est idéale pour étudier l'interaction entre des Ps et la membrane liposomale, parce que les Ps sont des molécules qui fluorescent fortement et parfois différemment en fonction du solvant. Hammerer et *al.* ont montré que les propriétés de fluorescence des porphyrines dimères sont influencées par le solvant et la température.²⁵¹ L'agrégation des molécules de Ps est souvent accompagnée d'un déplacement de bandes ou de l'apparition de nouvelles bandes spectrales dues aux interactions excitoniques entre chromophores.³⁰¹

Les porphyrines s'agrègent fortement dans un milieu très polaire comme l'eau. Une augmentation significative de l'intensité de fluorescence peut être observée en présence de molécules non-polaires, tels que des lipides, parce qu'une désagrégation des porphyrines peut se produire avec formation d'un complexe non-covalent entre porphyrine et lipide. En conséquence, la détermination du coefficient de partage de Ps (K_p) entre liposome et tampon peut être réalisée par la mesure du changement d'intensité de fluorescence du Ps lors de l'augmentation de la concentration de lipides présentés sous forme de liposomes.^{296,302} Le changement progressif de cette intensité de fluorescence du Ps est, en effet, proportionnel à l'addition des liposomes, et lié à la solubilisation progressive de ce Ps dans les liposomes.

1.2.2. La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La mesure de diffusion dynamique de la lumière est une technique physique qui permet de déterminer la distribution de taille de particules sphériques de dimensions submicroniques en suspension dans un milieu aqueux, ou de polymères ou protéines en solution.³⁰³ La distribution de taille des liposomes est généralement déterminée par le DLS. Cette mesure demande une période de temps relativement longue, et n'est pas appropriée pour les systèmes dans lesquels les changements de taille des particules sont rapides. Une application convenable de la DLS est la mesure de l'agrégation, la fusion et la micellisation des liposomes provoquées par des peptides ou d'autres agents.³⁰⁴ Les études précédentes réalisées par le groupe du Professeur Rosilio ont montré une interaction spécifique entre des porphyrines glycodendrimériques et la Concanavaline A (Con A) par des mesure de la taille des liposomes incorporant des porphyrines avant et après interaction avec la Con A.^{305,306} Ces travaux ont

mis en évidence, dans certaines conditions, l'agrégation des liposomes contrôlée par l'interaction lectine-sucre.

II. RÉSULTAT ET DISCUSSION

Cette partie de l'étude a été dirigée par Mme le professeur Véronique Rosilio à l'institut Galien Paris-Sud, Châtenay-Malabry. Son objectif est d'analyser et de comprendre le comportement interfacial des six porphyrines dimères (**1-6**) à l'interface air-tampon et leur interaction spécifique avec la ConA. Cette dernière a été utilisée, dans des travaux précédents, comme modèle des récepteurs membranaires à mannose surexprimés à la surface des cellules de rétinoblastome.¹⁹⁴ Pour faciliter la distinction de chaque composé dans les graphes, six icônes sont utilisées pour représenter chacune des six porphyrines dimères (**Figure 62**).

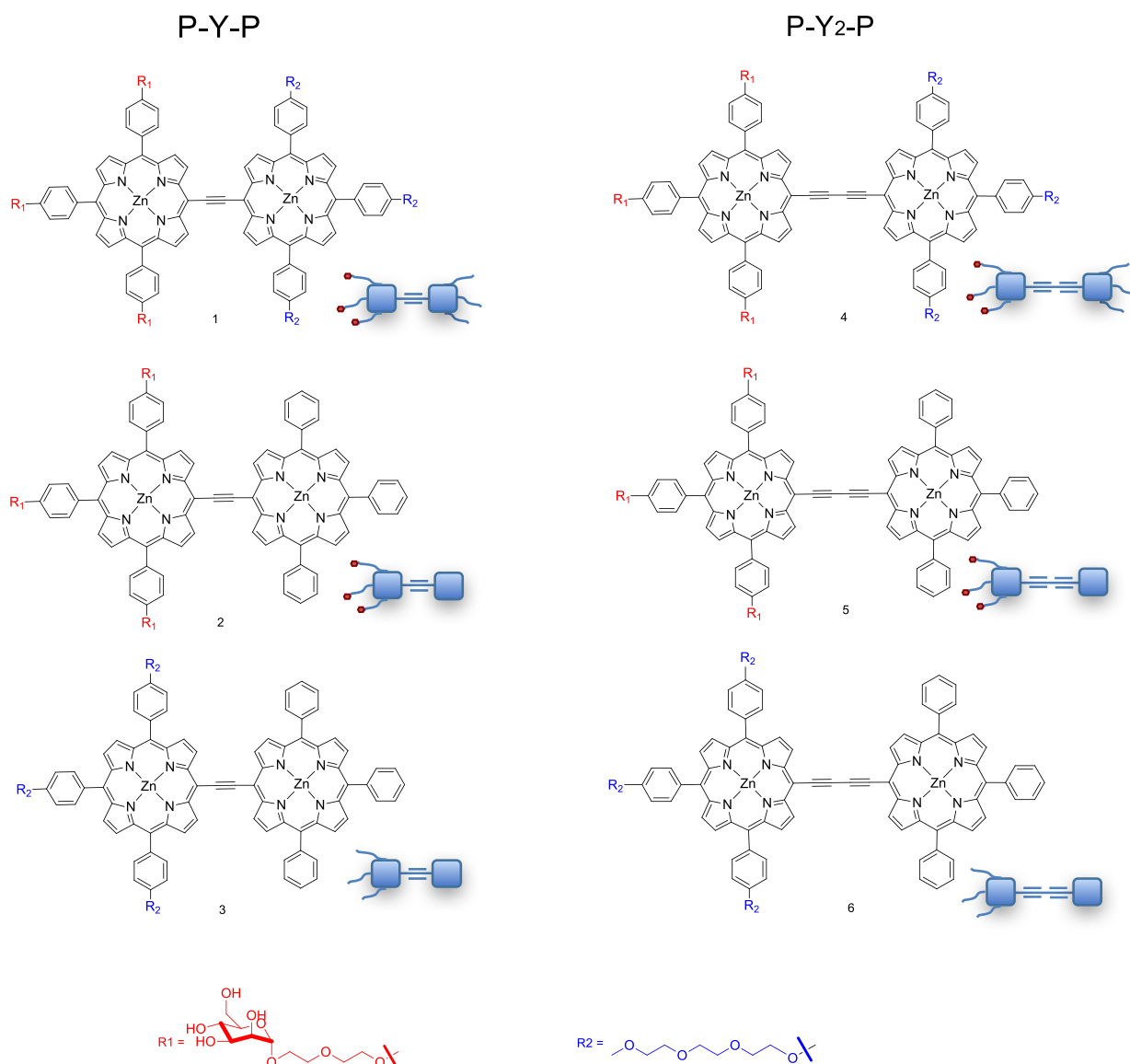


Figure 62. Structures chimiques des porphyrines dimères avec leurs icônes abrégées.

II.1. Isotherme π -A des porphyrines dimères

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les porphyrines dimères forment des monocouches stables à l'interface air/liquide. Pour cela, nous avons étalé des aliquots de solution de porphyrines à la surface du tampon et mesuré, en fonction du temps, l'évolution de la tension superficielle. Nous avons observé que toutes les porphyrines forment des monocouches stables dans le temps. A titre d'exemple, les isothermes γ -t obtenus pour les composés **1** et **2** sont présentés dans la **Figure 63**.

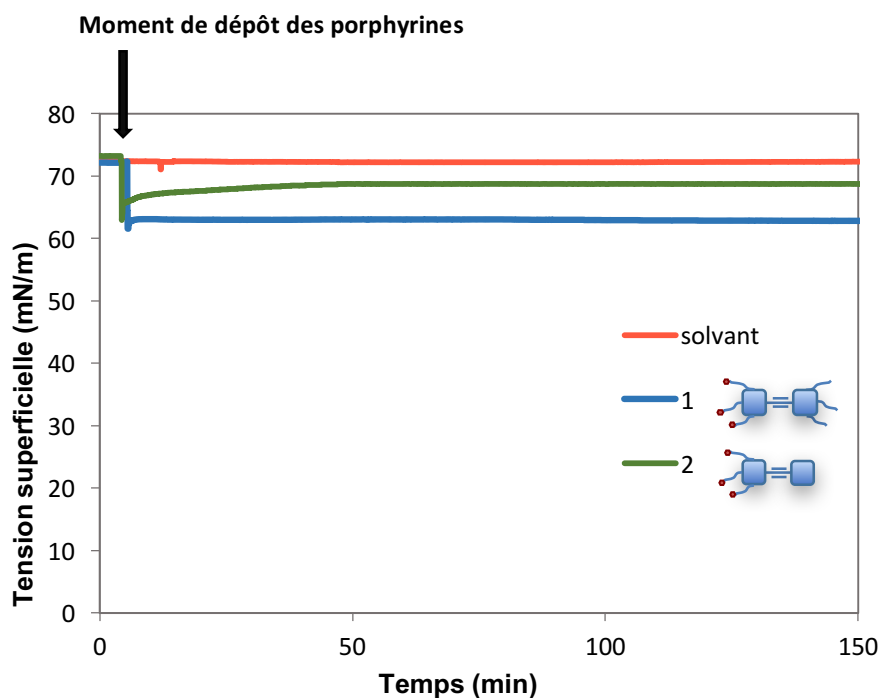


Figure 63. Comportement interfacial des composés **1** (1,1 mg/l) et **2** (1,05 mg/ml), et de leur solvant, déposés à raison de 2 μ L à la surface de la solution du tampon ($T = 23 \pm 1^\circ\text{C}$)

Nous avons analysé le comportement interfacial des porphyrines par des mesures de pression de surface dans des conditions dynamiques de compression.²⁷¹ Les isothermes obtenues sont regroupées dans la **Figure 64** et les modules de compressibilité correspondants dans la **Figure 65**. Ces expériences ont montré que les composés portant des sucres (**1**, **2**, **4** et **5**) ont des pressions de surface plus faibles que ceux qui ne portent que des TEG ($\pi_c < 50$ mN/m). Elles montrent également que les composés portant à la fois des sucres et des TEG (**1** et **4**) ont des pressions de surface (π_c environ 43 mN/m) encore plus faibles que les autres et occupent des aires plus grandes ($A_c = 112 \text{ \AA}^2$ pour le composé **1** et $A_c = 97 \text{ \AA}^2$ pour le composé **4**). Ces résultats étaient attendus. Ces composés doivent avoir des difficultés à s'orienter perpendiculairement à l'interface, car ils portent des chaînes latérales des deux côtés. L'analyse des modules de compressibilité confirme qu'ils forment des monocouches beaucoup moins organisées que les autres.

Les porphyrines dimères butadiynes (**4-5-6**) occupent des aires moléculaires plus faibles que les porphyrines dimères acétyléniques correspondantes (**1-2-3**). Ce résultat dont nous avons vérifié la reproductibilité, est plus étonnant. Par exemple, l'aire au collapse du composé **5** est $78 \text{ \AA}^2$. Elle est plus faible que celle mesurée pour le composé **2** ($87 \text{ \AA}^2$). Si les

molécules des deux familles de porphyrines s'organisent de la même façon à l'interface air-liquide, nous devrions obtenir des aires au collapse similaires pour les deux porphyrines ayant des chaînes latérales identiques. Le fait d'avoir une ou deux triples-liaisons ne devrait pas modifier l'aire occupée par ces molécules. Il est à noter que les valeurs maximales du module de compressibilité (K_{max}), évoluent de la même façon, que les molécules aient une ou deux triples-liaisons et sont très similaires (**Tableau 6**). Il n'y a pas de différence apparente entre les deux familles sur ce point.

Si l'on considère l'ensemble des courbes des modules de compressibilité (et non seulement la valeur maximale), on constate que les composés **2**, **3** et **6** forment les monocouches les plus organisées (**Figure 64**). Le composé **5** se comporte comme ces composés à pression élevée et plutôt comme les composés **1** et **4** à faible pression. Il n'est pas surprenant que les composés **3** et **6** qui ne portent que les chaînes TEG forment les monocouches les plus rigides. Mais lorsque la porphyrine est mannosylée, la *double* triple-liaison contribue à une désorganisation de la monocouche. Le composé **5** qui a deux triples liaisons s'organise moins bien que le composé **2** qui n'en a qu'une.

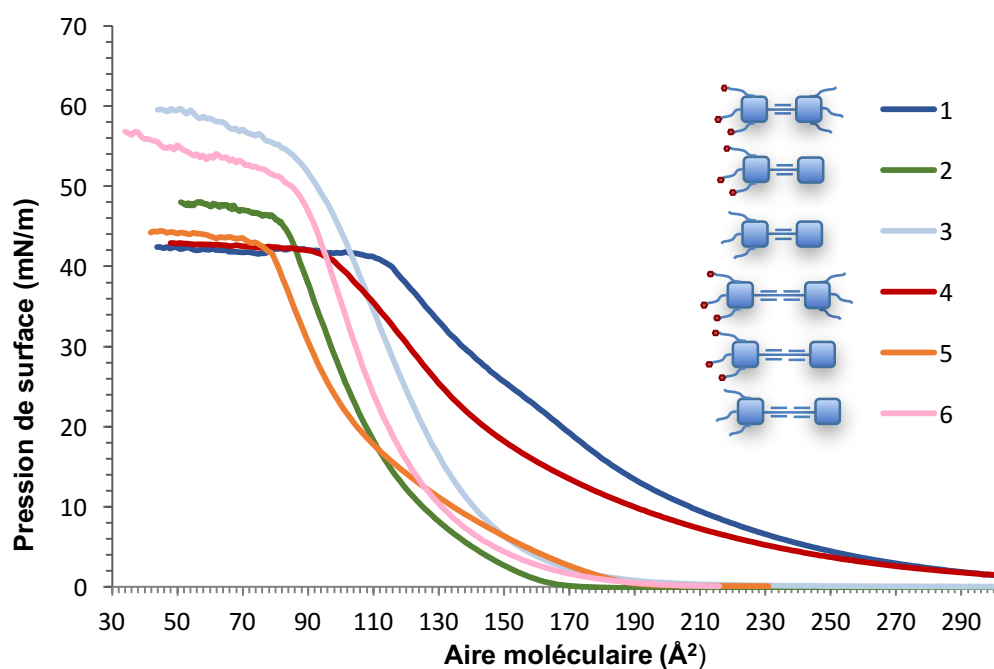


Figure 64. Isothermes π -A des porphyrines dimères étalées seules à l'interface air-liquide.

Tableau 5. Données tirées des isothermes des porphyrines dimères.

Aire moléculaire à pression non nulle (A_{onset}), Aire moyenne (A_m), Aire au collapse (A_c), pression de surface au collapse (π_c) et module de compressibilité maximal (K_{max})

Composition de la monocouche	A_{onset} ($\text{\AA}^2$)	A_m ($\text{\AA}^2$)	A_c ($\text{\AA}^2$)	π_c (mN/m)	K_{max} (mN/m)
1	> 300	202	112	43,0	62,7
2	170	125	87	47,5	106,5
3	210	143	90	54,5	117,3
4	> 300	178	97	43,0	65,8
5	210	124	78	43,5	91,1
6	210	129	81	50,5	125,9

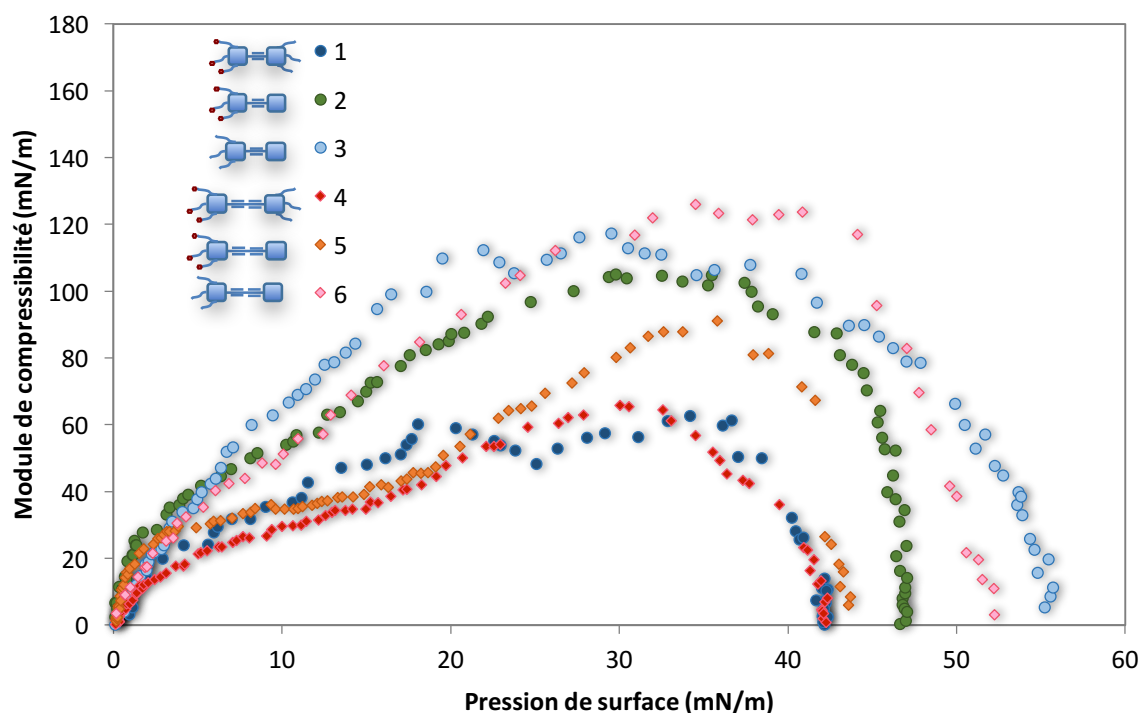


Figure 65. Les modules de compressibilité déduits des isothermes π -A des porphyrines dimères.

II.1.1. Aires supposées occupées par les molécules à A_0 (onset)

Pour comprendre le phénomène décrit au-dessus, nous avons évalué les dimensions des porphyrines acéthyléniques et des porphyrines dimères. Les tailles des différentes molécules ont été estimées par un calcul effectué par le logiciel « Chem3D » en trois étapes :

- I. Un calcul tenant compte uniquement des contraintes stériques afin de définir la forme générale de la molécule ;
- II. Un calcul sous contrainte de la mécanique quantique (en utilisant MM2) afin d'affiner la structure en tenant compte des effets électroniques ;
- III. Enfin, un calcul de dynamique moléculaire pour déterminer la conformation la plus stable.

Le macrocycle porphyrine seul mesure $77 \text{ \AA}^2$.³⁰⁷ En fait, une porphyrine peut être assimilée à un carré de $8,8 \text{ \AA}$ de côté, ce qui donne une surface estimée de $77 \text{ \AA}^2$ (**Figure 65**).

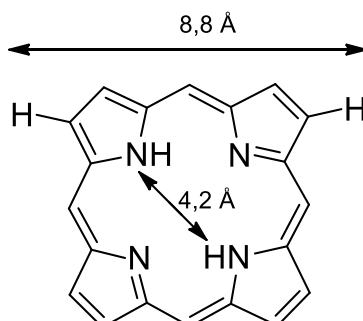


Figure 66. Dimension du macrocycle de porphyrine.

Les dimensions principales des porphyrines dimères (**1-6**) sont présentées dans la **Figure 66**. La taille théorique des porphyrines dimères butadiynes (**4, 5** et **6**) est, comme attendue, plus grande que celle des porphyrines acétyléniques (**1, 2** et **3**).

Si l'on considère que lorsque les molécules sont à plat sur la surface du tampon, leurs chaînes TEG et DEG-mannose sont immergées dans l'eau, on peut calculer une aire moléculaire maximale théorique identique pour les composés **1-3** d'une part, et **4-6**, d'autre part (**Figure 67**):

Composés **1, 2** et **3** : $A_{\text{théorique}} = L \times l = 651,4 \text{ \AA}^2$

Composés **4, 5** et **6** : $A_{\text{théorique}} = L \times l = 773,1 \text{ \AA}^2$

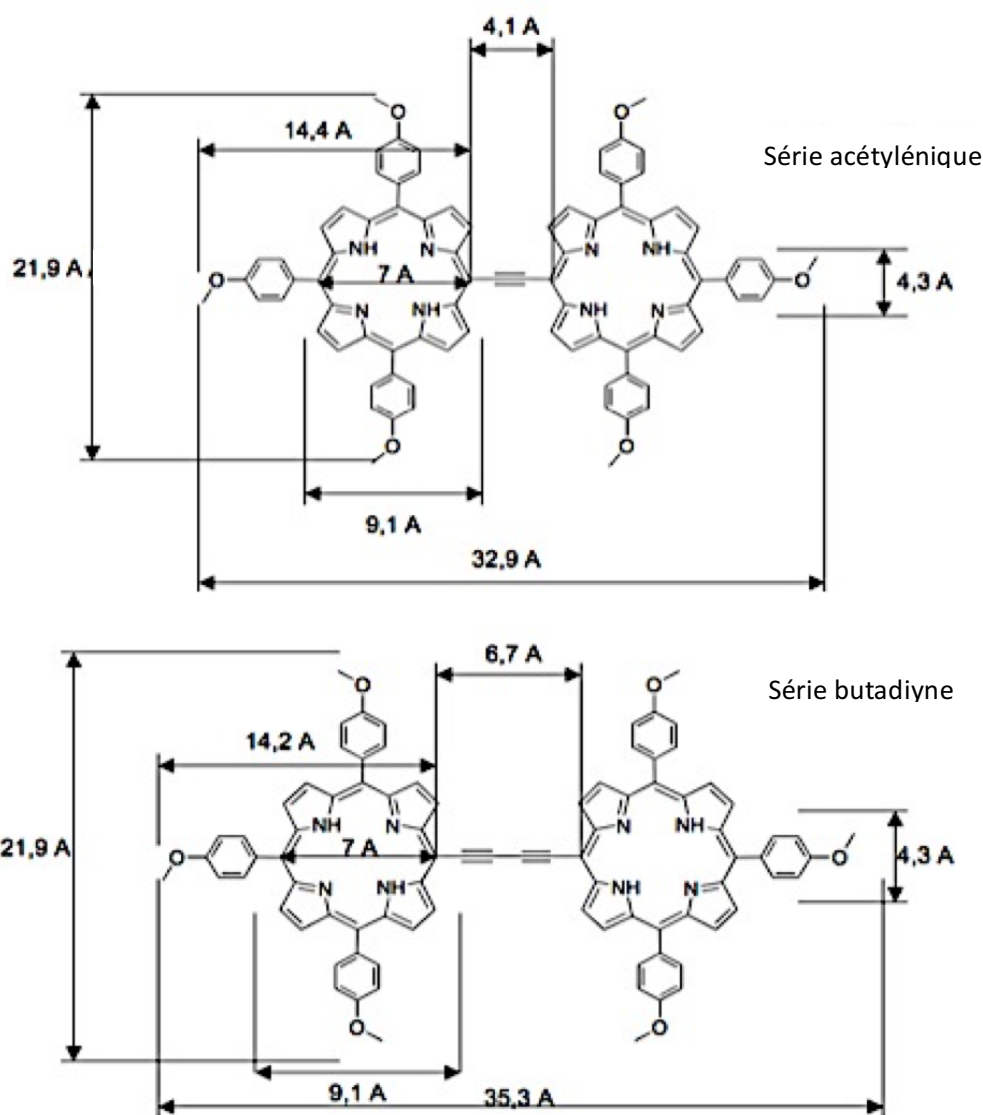


Figure 67. Dimensions principales des molécules étudiées

Toutes les aires déduites à l'onset des isothermes π -A sont inférieures à ces valeurs. On peut en déduire que les molécules ne sont pas « à plat » à la surface de l'eau, mais positionnées avec un certain angle α par rapport au plan de l'interface (**Figure 68**). D'autre part, les groupements sucre et TEG sont vraisemblablement immergés dans la sous-phase, ou éventuellement en l'air pour les chaînes TEG.

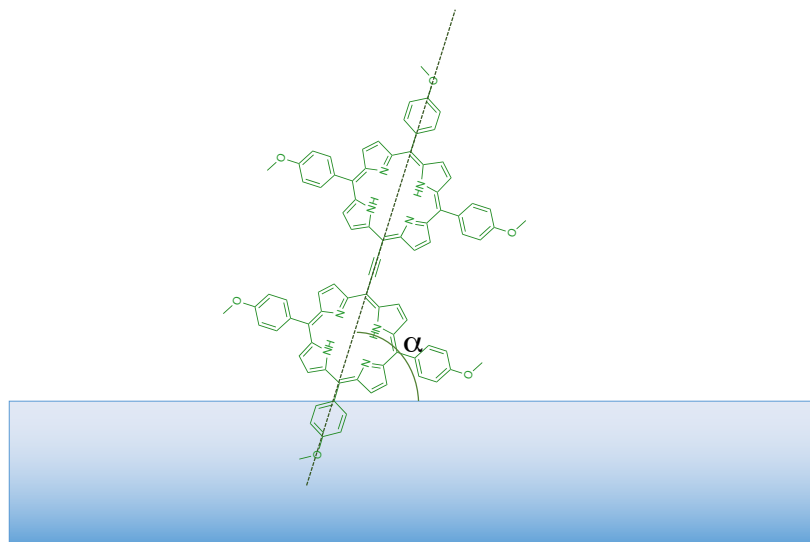


Figure 68. Porphyrine dimérique positionnée avec un certain angle α par rapport au plan de l'interface.

II.1.2. Aires moyennes

L'aire moyenne correspond à celle des molécules moins contraintes qu'au collapse.

Si on considère les molécules comme *monoblocs* et que les chaînes DEG-mannose et TEG n'interfèrent pas, on peut écrire :

$$A_{m(\text{exp})} = A_{0(\text{Th})} \cos \alpha \quad (\text{Équation 9})$$

En utilisant les valeurs d'aires expérimentales obtenues pour les 6 porphyrines dimériques, on peut calculer les angles α (**Figure 68**) correspondants (**Tableau 7**).

Tableau 6. Angles d'inclinaison des TPP dimériques par rapport à la surface du tampon, à pression intermédiaire

Série acétylénique	Aire expérimentale (Å ²)	Angle par rapport à l'interface (°)	Série butadiyne	Aire expérimentale (Å ²)	Angle par rapport à l'interface (°)
1	202	71,9	4	178	76,7
2	125	79,0	5	124	80,8
3	143	77,3	6	129	80,2

D'après ces résultats, les molécules de la série butadiyne sont orientées plus perpendiculairement par rapport à l'horizontale (plan de l'interface) que les molécules de la série acétylénique.

II.1.3. Aires au collapse

La même approche peut être appliquée pour les molécules au collapse (**Équation 10**, **Tableau 8**) :

$$A_{c(\text{exp})} = A_{0(\text{Th})} \cos \alpha \quad (\text{Équation 10})$$

Tableau 7. Angles d'inclinaison des porphyrines dimériques par rapport à la surface du tampon, au collapse

Série acétylénique	Aire expérimentale (Å ²)	Angle par rapport à l'interface (°)	Série butadiyne	Aire expérimentale (Å ²)	Angle par rapport à l'interface (°)
1	112	80,2	4	97	82,5
2	87	82,5	5	78	84,3
3	90	82,0	6	81	84,3

Les molécules sont, dans tous les cas, davantage orientées vers la verticale au collapse par rapport à l'état de compression intermédiaire.

D'après les calculs, une liaison triple mesure à peu près 4,1 Å et deux liaisons triples, 6,7 Å.

Les calculs montrent également que le côté d'un macrocycle, en prenant en compte les liaisons, mesure 9,1 Å. Si on envisage un empilement par intercalation des molécules au collapse au niveau des triples liaisons, cette intercalation est plus facile pour les molécules qui ont deux triples liaisons que pour celles qui n'en ont qu'une.

L'organisation des molécules de la série butadiyne peut être légèrement plus compacte que celle des molécules de la série acétylénique, comme semblent le montrer les valeurs d'aires moléculaires obtenues. (**Figure 69**)

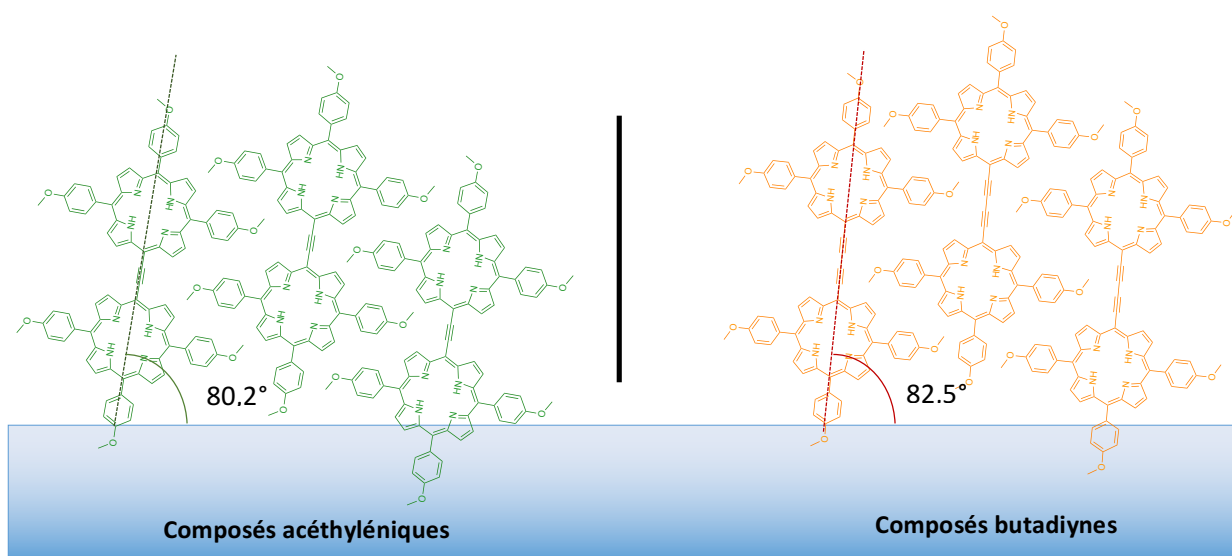


Figure 69. Organisation possible des porphyrines dimériques à l'interface air/tampon.

II.2. Isothermes π -A des mélanges SOPC-porphyrine

Les isothermes des mélanges SOPC-porphyrines ont été réalisées dans les mêmes conditions que les précédentes (22°C) pour évaluer la capacité d'incorporation des porphyrines dimères dans la membrane de liposomes. Les mélanges de SOPC-porphyrine dans le rapport (9 :1) ont été étalés à l'interface air-tampon.

Les résultats sont présentés dans la **Figure 70** et résumés dans le **Tableau 9**. La pression de surface des mélanges SOPC-porphyrine est la même que celle de la SOPC pure. Mais les mélanges occupent des aires au collapse plus importantes que celle de SOPC. On observe, en

particulier, que les aires au collapse des mélanges SOPC-porphyrine dimère portant des sucres (**1**, **2**, **4** et **5**) sont plus grandes que les autres (**Tableau 9**).

Tableau 8. Données tirées des isothermes des mélanges SOPC-porphyrine dimères

Composition de la monocouche	$A_{\text{onset}} (\text{\AA}^2)$	$A_m (\text{\AA}^2)$	$A_c (\text{\AA}^2)$	$\pi_c (\text{mN/m})$
SOPC	140	62	66	41,5
SOPC-1	190	139	73	42
SOPC-2	162	121	73	44,5
SOPC-3	158	107	70	44,5
SOPC-4	172	124	69	42
SOPC-5	158	121	74	41
SOPC-6	153	112	71	42,5

Les modules de compressibilité des mélanges sont tous plus faibles que celui de la SOPC pure. Les porphyrines tendent toutes à désorganiser la monocouche de SOPC. L'effet le plus limité est observé avec les composés **2** et **5** (**Figure 70**), c'est-à-dire les molécules uniquement glycoconjuguées.

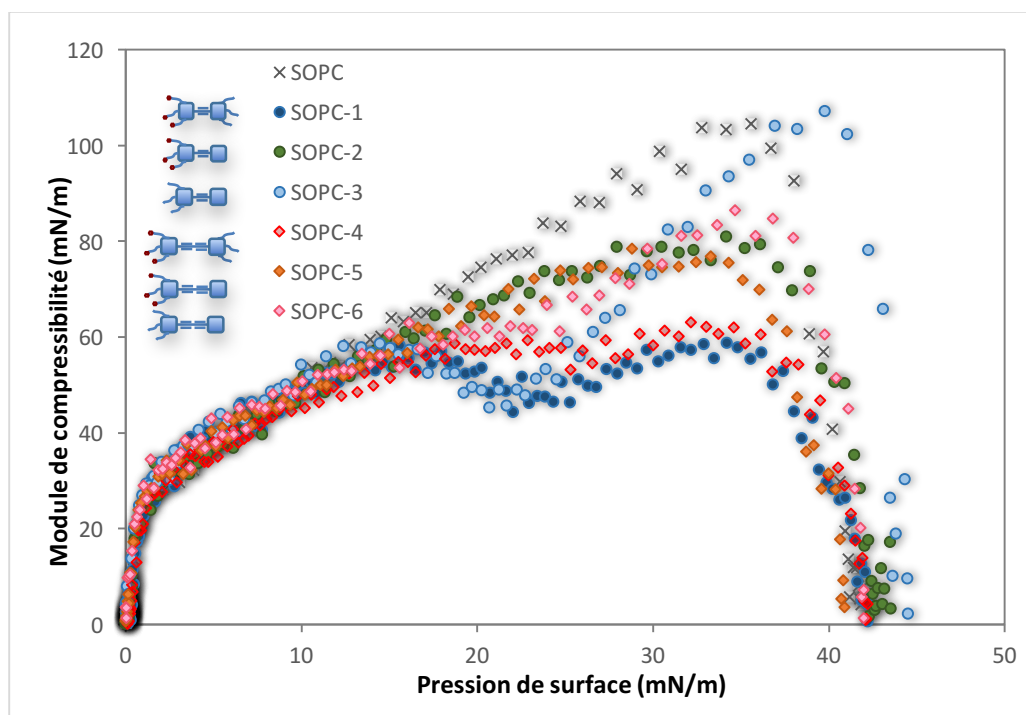


Figure 70. Modules de compressibilité pour les mélanges SOPC-porphyrines (9 :1).

Lorsque les porphyrines dimères sont mélangées à la SOPC, leurs isothermes de compression, les modules de compressibilité de leurs monocouches et leurs énergies libres de mélange montrent que seuls les composés asymétriques portant des sucres (sans TEG) (**2** et **5**) sont miscibles au phospholipide aux pressions de surface ≤ 30 mN/m. Cette dernière pression est considérée par de nombreux auteurs comme la pression latérale dans la membrane d'un liposome ou d'une cellule.^{308,309}

D'après les résultats des calculs de l'énergie libre (Gibbs) d'excès (**Méthode de calcul voir page 154-155**), les interactions entre SOPC et les porphyrines dimères substituées par les sucres et les chaînes TEG (**1** et **4**) sont défavorables quand la pression de surface est de 25 mN/m. Les porphyrines qui portent seulement des sucres (**2** et **5**) sont miscibles à la SOPC. Nous avons choisi le composé **2** pour analyser son interaction avec le modèle liposome. (Figure 71)

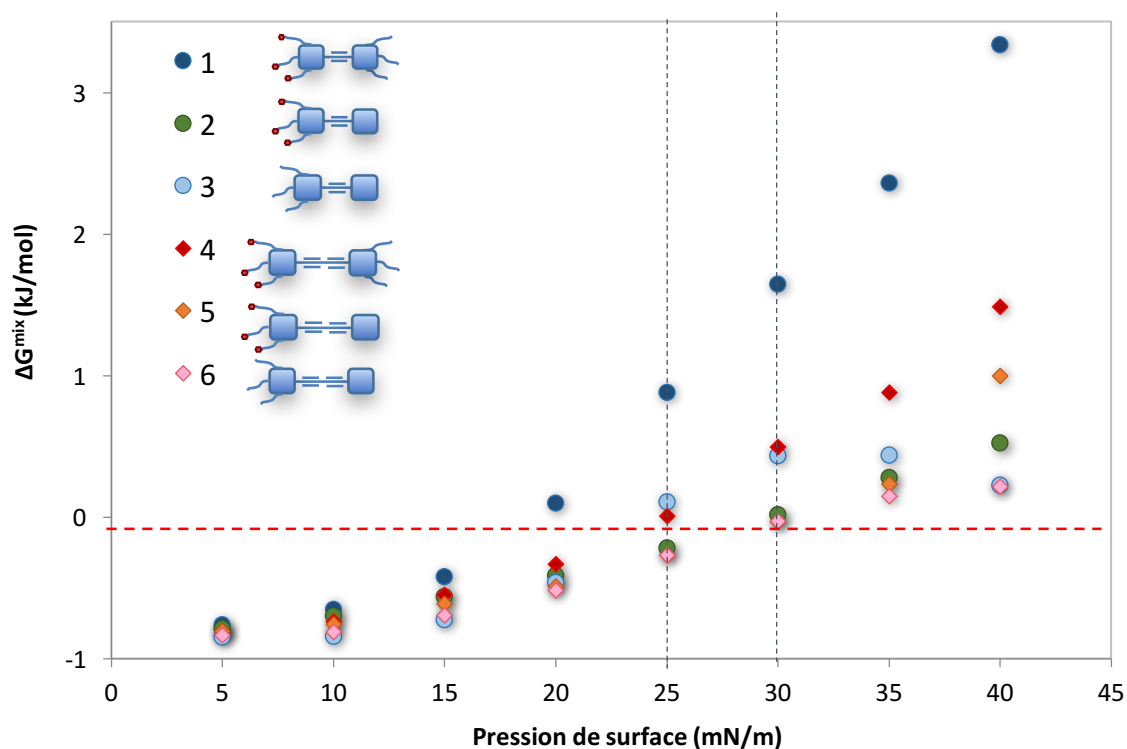


Figure 71. L'énergie libre (Gibbs) d'excès des mélanges SOPC-porphyrine.

II.3. Influence des interactions entre les liposomes de SOPC et les porphyrines dimères sur les spectres de fluorescence des porphyrines

Pour trouver les meilleures conditions d'incorporation du composé **2** dans les liposomes de SOPC, nous avons analysé l'affinité de ce composé pour des liposomes de SOPC pure en concentrations croissantes, par des mesures de fluorescence de la porphyrine.²⁸² Comme indiqué précédemment, les porphyrines fluorescent mieux dans une solution organique que dans une solution aqueuse. Il est donc attendu que l'intensité de fluorescence du composé **2** augmente avec la proportion de lipide dans le milieu. L'interaction du composé **2** avec les phospholipides a été quantifiée par mesure de l'intensité de fluorescence après incubation avec des liposomes suspendus dans le tampon. Cette méthode permet d'analyser les propriétés de la porphyrine à des concentrations faibles (10^{-7} M) en présence d'un excès de phospholipide jusqu'à 2000 fois plus concentré.

Dans un premier temps, nous avons analysé la cinétique d'interaction du composé **2** avec les vésicules de SOPC. Les résultats montrent que ce composé ne fluoresce pas dans le tampon seul même au bout de 12 h d'incubation. En revanche, pour la même concentration du composé **2**, l'intensité de fluorescence de la porphyrine augmente au fil des heures en présence de SOPC (**Figure 72**). Pour atteindre la stabilité, la porphyrine a besoin du temps : au moins 18 h, ce qui est très supérieur à ce qui avait été observé par Ali Makky pour les TPP monomériques.²⁸²

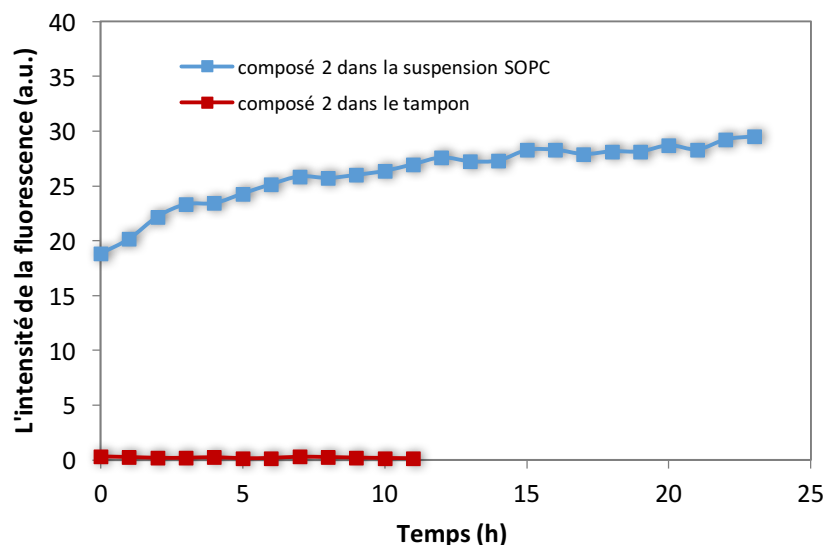


Figure 72. Cinétique d'interaction de composé **2** avec liposome SOPC.

Nous avons comparé les spectres d'émission du composé **2** (10^{-7} M) enregistrés en présence de concentrations croissantes de liposomes de SOPC ($0 - 2 \times 10^{-4}$ M) après incubation pendant 36 h à 37°C à l'obscurité. La **Figure 73** montre que le composé **2** ne fluoresce pas seul dans le tampon aqueux car la porphyrine s'agrège. L'intensité des spectres d'émission de la porphyrine augmente de façon remarquable en présence de liposomes de SOPC, parce que l'addition de liposomes permet de dissocier les agrégats de porphyrine et de lui fournir un environnement apolaire. Nous n'avons pas observé de déplacement de la bande d'émission en présence de liposome par rapport au spectre de la porphyrine seule dans un solvant organique. Ce résultat montre que l'addition des liposomes de SOPC améliore, d'une certaine façon, la solubilité de la porphyrine dans le tampon. L'intensité de fluorescence augmente lorsqu'on accroît la quantité des liposomes et elle sature quand la concentration de liposomes atteint 10^{-4} M. En conséquence, le rapport molaire (composé **2** : SOPC 1 /1000) est utilisé par la suite, pour former des vésicules de SOPC contenant le composé **2**.

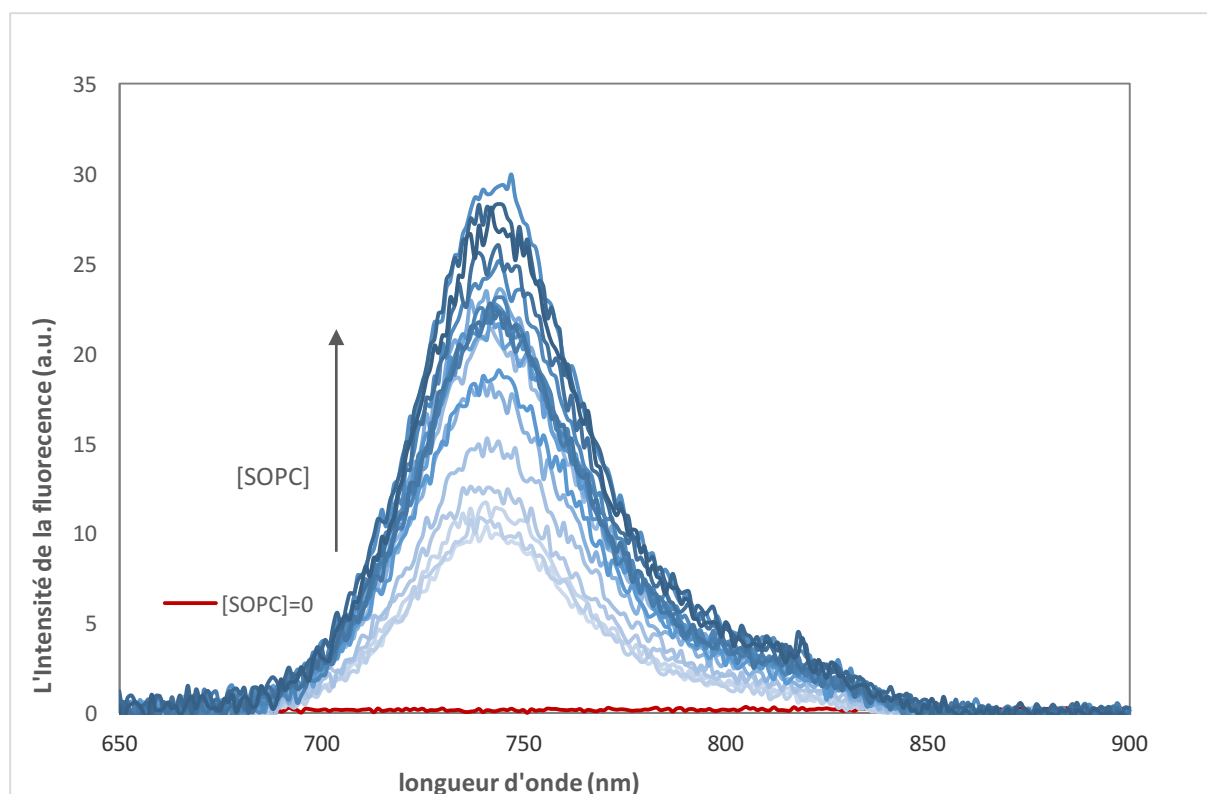


Figure 73. Spectre d'absorption de composé **2** en présence de concentrations croissantes de liposomes SOPC.

Le coefficient de partage (K_p) du composé **2** entre la phase aqueuse et la bicouche de phospholipide SOPC est calculé d'après l'équation 20 (voir page 156-157) et la **Figure 74**. La **Figure 69** (a) montre l'augmentation de l'intensité de la fluorescence due au composé **2** (10^{-7} M) avec titration des liposomes de SOPC jusqu'à la saturation. La **Figure 74** (b) présente la courbe de doubles réciproques correspondante avec une linéarité relativement bonne. Le K_p du composé **2** avec les liposomes de SOPC est de $7,4 \times 10^5$.

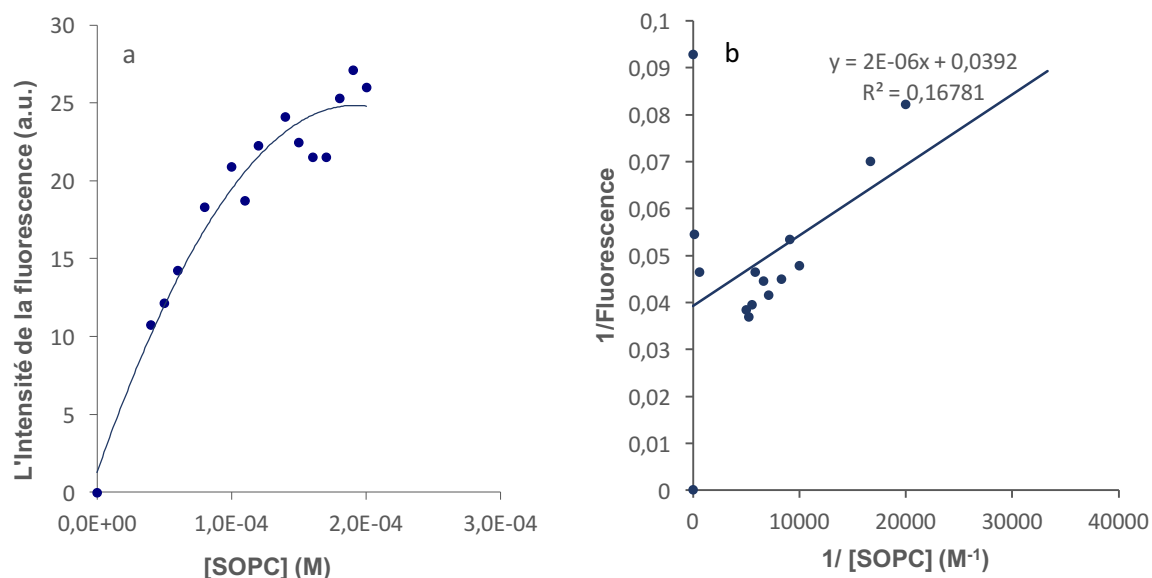


Figure 74. (a) Titration des liposomes de SOPC dans la solution de composé **2** (10^{-7} M). (b) La courbe de doubles réciproques correspondant à l'évaluation du spectre de fluorescence du composé **2** avec des concentrations croissantes de liposomes de SOPC.

Des liposomes de SOPC-composé **2** ont été préparés dans le rapport molaire (phospholipide : composé **2**, 1000 :1). La **Figure 75** compare le spectre d'émission du composé **2** (10^{-7} M) incubé 36 h avec les liposomes de SOPC (10^{-4} M) et celui des liposomes (10^{-4} M) incorporant le composé **2** (10^{-7} M). On note une nette augmentation de l'intensité de fluorescence : lorsque la porphyrine dimère est mélangée aux lipides au moment de la préparation des liposomes, elle s'insère dans la membrane liposomale et fluoresce davantage. Le composé **2** se solubilise beaucoup mieux dans le tampon aqueux, lorsqu'il est incorporé dans les liposomes. La question reste de savoir si les sucres sont bien exposés à la surface de ces liposomes.

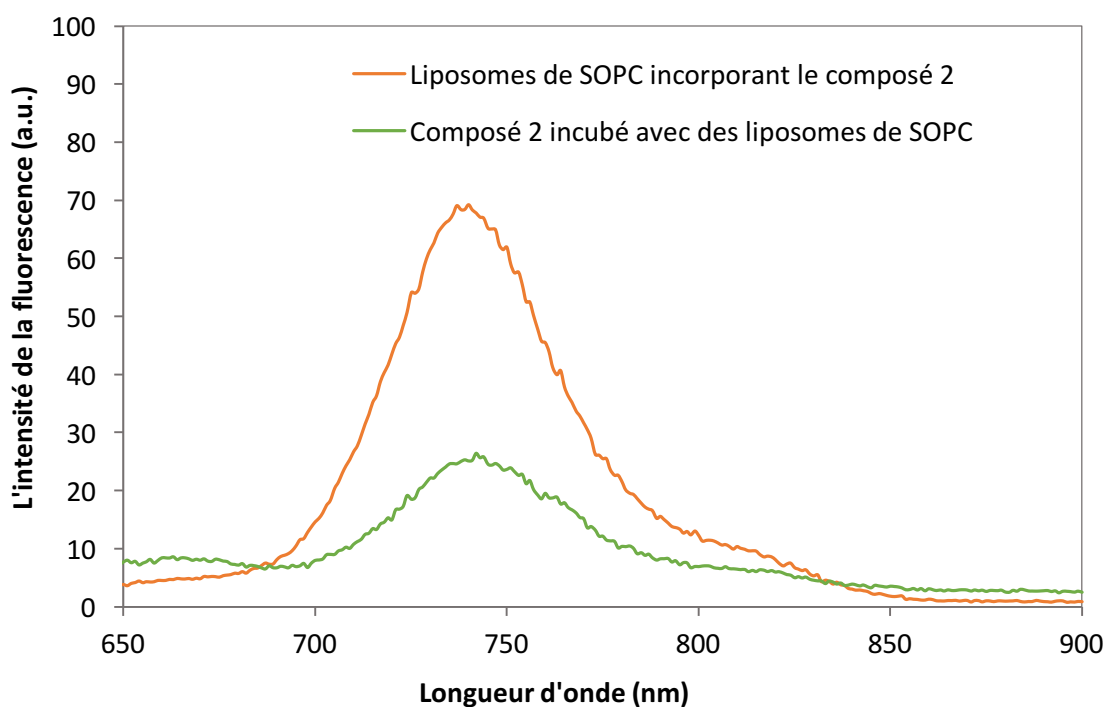


Figure 75. Comparaison des spectres d'émission du composé **2** (10^{-7} M) incubé 36 h avec les liposomes de SOPC (10^{-4} M) avec celui de liposomes (10^{-4} M) incorporant, dès leur préparation, le composé **2** (10^{-7} M) dans leur membrane.

II.4. Interaction entre des liposomes incorporant le composé **2** et la Con A libre

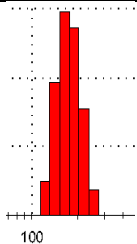
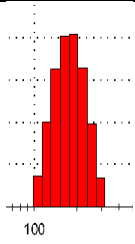
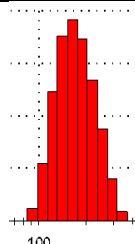
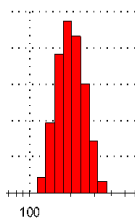
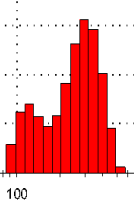
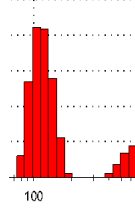
A partir des résultats obtenus précédemment, le composé **2** a pu être incorporé dans les liposomes de SOPC. Ces liposomes pourraient être utilisés comme véhicule pour transporter ce composé jusqu'aux cellules et les faire pénétrer dans les cellules tumorales. Pour cela, il faudrait que les liposomes soient reconnus par le récepteur à mannose exposé à la surface des cellules de rétinoblastome.

Nous avons fabriqué des liposomes de SOPC blancs et des liposomes de SOPC-composé **2** au rapport molaire phospholipide : composé **2** (1000 :1). Nous avons mesuré leurs tailles par DLS avant et après incubation 1 h avec la Con A. La taille et la distribution de taille des liposomes de SOPC pure n'ont pas été modifiée sous l'effet de l'addition de Con A. En

revanche, celles des liposomes de SOPC-composé **2** ont augmenté de façon remarquable, avec un dédoublement de pic. Il apparaît un deuxième groupe de particules vers 300 nm (**Tableau 10**). Ce résultat démontre que des groupements mannose des porphyrines sont exposés vers l'extérieur des liposomes et peuvent interagir avec la Con A. Sans ce phénomène, il n'y aurait pas le dédoublement du pic, ni une augmentation de taille si significative. Cette interaction lectine-sucre permet de former des agrégats de liposomes, ce qui explique l'augmentation de taille et l'apparition d'une nouvelle famille de particules. Mais l'effet reste limité, par rapport à ce qui avait été observé avec les TPP monométriques.^{305,306}

Nous avons mesuré la taille des liposomes de SOPC-composé **2** en présence de Con A après 3 jours d'incubation et nous avons observé que la taille des petites particules diminue, mais que leur volume augmente. En revanche, nous avons trouvé une famille de particules plus grandes vers 650 nm, de volume plus faible. Ceci tendrait à indiquer qu'une partie des liposomes se dissocient de la Con A. La raison pour laquelle cette dissociation se produit n'est pas claire.

Tableau 9. Diamètre des liposomes de SOPC pure et des liposomes de SOPC-composé **2** avant et après l'addition de Con A. PDI=Indices de polydispersité.

Liposomes	Avant l'addition de Con A			Après l'addition de Con A (1h)			Après l'addition de Con A (3 j)		
Composition	Diamètre $\pm \sigma$ (nm)	Volume (%)	PDI $\pm \sigma$ (nm)	Diamètre $\pm \sigma$ (nm)	Volume (%)	PDI $\pm \sigma$ (nm)	Diamètre $\pm \sigma$ (nm)	Volume (%)	PDI $\pm \sigma$ (nm)
SOPC	 177,6 $\pm 6,8$	100	0.095 ± 0.024	 183,0 $\pm 7,5$	100	0.111 ± 0.007	 183,2 $\pm 59,86$	100	0.134 ± 0.021
SOPC-2	 201,2 $\pm 6,2$	100	0.201 ± 0.012	 136,0 $\pm 12,9$ 307,2 $\pm 14,7$	29,9 70,1	0.174 ± 0.011	 124,2 $\pm 5,7$ 658,9 $\pm 319,9$	77,3 22,7	0.212 ± 0.014

II.5. Formation de liposomes géants (GUV Giant Unilamellar Vesicle) incorporant les porphyrines dimères

Nous avons réalisé un essai d'incorporation du composé **2** dans des vésicules géantes (10-20 μm). L'objectif est de comparer la fluorescence des porphyrines dans des bicouches fluides (SOPC) et des bicouches rigides (DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine), les vésicules géantes, modélisant la membrane cellulaire. En effet, il est supposé que les dimères butadiynes changent de conformation selon la viscosité du milieu et que cela modifie leur spectre de fluorescence. La DPPC ayant une température de transition de phase à 41°C est plutôt en phase gel à température ambiante, tandis que la SOPC dont la température de transition de phase est voisine de 6°C, est plutôt en phase cristal liquide. Notre objectif est de donc comparé avec les deux types de liposomes, les composés **2** et **5**. Mais cette analyse n'a pas pu être menée à son terme faute de temps.

Nous avons fabriqué des liposomes géants de SOPC-composé **2** (200 : 1). La formation de ces GUV est confirmée par microscopie optique (**Figure 76**). Toutefois, lorsque nous avons voulu vérifier l'incorporation du composé **2** dans les liposomes par mesure de fluorescence, nous n'avons pas pu observer la fluorescence de la porphyrine. La raison peut être que le rapport de porphyrine était trop important, et que les molécules « s'auto-quenchaient » dans la membrane. Il est aussi possible que la porphyrine se soit agrégée dans la solution pendant la préparation de GUV, et n'a pas été incorporée dans le liposome géant. Des expériences complémentaires sont nécessaire pour comprendre ce phénomène.

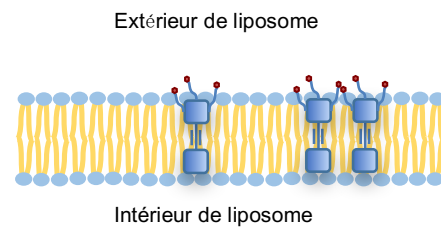
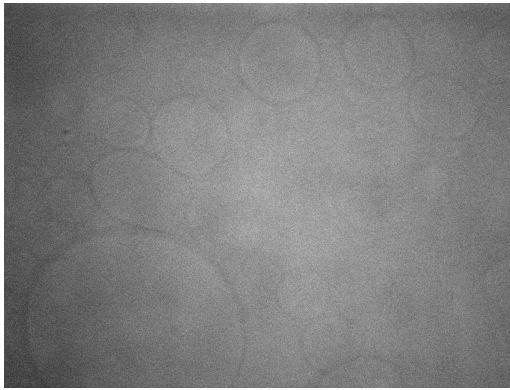


Figure 76. Aspect des GUV au microscope optique.

Conclusion et Perspectives

Les travaux effectués au cours de cette thèse concernent la conception, la synthèse et l'étude photobiologique de Ps excitables à deux photons. La stratégie développée au laboratoire, ces dernières années, consiste en la vectorisation de Ps grâce à des groupement glycolysés. Le Dr. Fabien Harmmerer a montré que des porphyrines dimères glycosylées symétriques possèdent une section efficace d'absorption à deux photons intéressante, mais l'internalisation dans les cellules cancéreuse est très faible.

Nous avons conçu de nouvelles porphyrines dimères dissymétriques en conservant le cœur photoexcitable décrit précédemment par le Dr. Fabien Harmmerer. Des groupements de vectorisation DEG- α -mannose sont fixés d'un seul côté de la molécule afin d'augmenter l'amphiphile moléculaire et l'internalisation dans les cellules. Les six porphyrines dimères dissymétrique possèdent une section efficace d'absorption à deux photons intéressante (composés acéthyléniques vers 300 GM à 880 nm et composés butadiyne vers 600-1000 GM à 840 nm).

En comparaison avec les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire, les propriétés physicochimiques du cœur de porphyrine dimère acéthylénique et butadiyne sont intéressantes. Le changement des chaînes latérales n'influence pas les valeurs de section efficace. En revanche, le test MTT de mesure de la viabilité cellulaire montre que les composés **1** et **4** sont dénués de cytotoxicité et de phototoxicité vis à vis des cellules de rétinoblastome Y79 et des cellules du cancer du côlon HT-29, dues à leur faible internalisation.

Afin de palier les mauvais résultats biologiques, des liposomes sont choisis pour transporter les porphyrines dimères dans les cellules. Les propriétés interfaciales des porphyrines dimères (**1-6**) et leurs interactions avec les liposomes sont étudiées pour sélectionner le meilleur candidat porphyrine incorporable dans les liposomes. Le composé **2** est ensuite choisi pour former les liposomes et étudier son interaction avec les Con A. Le composé **2** peut être incorporé dans les liposomes, et les groupements sucres sont orientés vers extérieur des liposomes et peuvent interagir avec les Con A.

Il semble difficile d'améliorer les structures moléculaires. Le cœur de porphyrine dimère acéthylénique et butadiyne possèdent une valeur de section efficace intéressante, mais leur propriété hydrophile induit une faible internalisation cellulaire, même si des chaînes latérales

dissymétriques permet d'augmenter leur amphiphilité. En outre, les processures de synthèses des porphyrines dimères dissymétriques sont compliquées et le rendement de synthèse est très faible vers 0,5% en globale.

Dans ce cadre, il est intéressant d'améliorer la formulation liposomale des porphyrines dimères et étudier ses propriétés physicochimiques et cyto-, phototoxiques.

En perspective, il serait intéressant d'étudier l'interaction spécifique de porphyrines dimères avec le Con A, et avec les cellules de rétinoblastome vivantes (dont les récepteurs à mannose ont été récemment identifiés) en utilisant le QCM-D pour éviter les interactions non-spécifiques entre les lipides et porphyrines. Il est difficile d'étudier le dosage de la porphyrine incorporée dans les liposomes. En suite, Il serait intéressant de mesurer la section efficace et étudier la cyto-, phototoxicité des porphyrines en formulation de liposome approprié.

Partie expérimentale

Reagents and Materials

All solvents used were reagent grade. The following reagents have been abbreviated: dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), were purchased from Aldrich and used without purification. Dry DMF, dry methylene chloride were purchased from Aldrich. Column chromatography was performed with the indicated solvents using E. Merck silica gel 60 (particle size 0.035-0.070 mm). Macherey-Nagel precoated plates (SIL G-200, 2 mm) were used for preparative thin-layer chromatography. Yields refer to chromatographically and spectroscopically pure compounds. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC300 spectrometer (300 MHz) at ambient temperature using an internal deuterium lock. Chemical shift values are given in ppm relative to tetramethyl silane (TMS). Acidic impurities in CDCl_3 were removed by treatment with anhydrous K_2CO_3 . Assignments of the resonance to individual protons are based on integration and selective homonuclear correlation (COSY). Heteronuclear multiple coherence (HMQC, HMBC) spectra were also obtained for all compounds and allow assignments of the resonance to carbon atoms. Microanalyses and MALDI-TOF analysis were performed respectively by the ICSN-CNRS Elemental Analysis Center and Mass Spectrometry Center (Imagif) at Gif-sur-Yvette, France.

Determination of absorption coefficients

Quantitative UV-visible spectra were recorded with a UVIKON xm SECOMAM or Agilent Cary spectrometer.

The compounds were dissolved in DMSO in order to obtain millimolar solutions. The bulk solutions were then diluted in the solvent of interest so as to obtain adequate absorption of the final solutions (about 2-3 at maximum wavelength), the ratio of DMSO in the final solution was always less than 1%. When the compounds were not soluble in DMSO, the final solution was obtained by successive dilution of a millimolar solution in CH_2Cl_2 in order to obtain adequate absorption.

The absorption spectrum of the solution of known concentration was measured between 350 and 800 nm. The solution was then diluted to the 9/10 or 8/10 and the new spectrum recorded. The operation was repeated 4 times.

The epsilon values of the main absorption band were calculated from the slope of the straight line obtained after the plotting of absorption against concentration. The epsilon values for other bands were obtained by proportionality from the main band.

Determination of fluorescence quantum yields

Fluorescence spectra were recorded using a Spex FluoroMax-3 Jobin-Yvon Horiba apparatus or Agilent Cary fluorimeter.

The quantum yields were calculated according to Crosby comparative method using Rhodamine 6G in EtOH ($\Phi_f = 0,95$) and Coumarine 153 in EtOH ($\Phi_f = 0.54$) as reference.

The millimolar DMSO solutions were diluted in order to obtain absorption less than 0.1 in order to prevent re-absorption of the emitted light. Data were corrected at room temperature with a blank and from the variations of the detector with the emitted wavelength.

The absorption and emission spectra of the dyes were recorded and the solution was then diluted to 9/10 or 8/10. The new spectra were measured and the operation repeated 4 times. The integrated emission signal was plotted against the absorption of the solutions.

The quantum yield was calculated from relation:

$$\Phi_f = \Phi_{ref.} \left(\frac{n}{n_{Ref.}} \right)^2 \frac{k}{k_{Ref.}} \quad (\text{Équation 11})$$

With Φ_f and $\Phi_{ref.}$ the fluorescence quantum yields of the sample and of reference, n and $n_{ref.}$ the refraction indexes of the solvent of the sample and reference solution respectively and k and $k_{ref.}$ the slopes of the straight lines obtained when plotting the data (integrated fluorescence against absorption) for the sample and the Coumarine solution respectively.

DPBF Degradation Kinetics

A solution of Ps at 1 μm and DPBF at 50 μm in freshly distilled DMF was prepared and

introduced in a 100 mL three-necked flask in a homemade photoreactor. The solution was aerated for 5 min in the dark. A first aliquot was taken and the mixture was illuminated with a homemade white light source under air bubbling. Aliquots were taken regularly and put in inactinic vials to prevent further photo- chemical reaction.

The absorption at 412 nm of the samples was measured after the reaction of DPBF was complete. The logarithm of the ratio of the absorption over initial absorption $\log(A/A_0)$ was plotted against the time.

Two-photon absorption cross-section measurements (CEA, Saclay)

Two photon induced fluorescence measurements were performed at the CEA (Saclay) using an inverted microscope set-up coupled to a mode locked Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) delivering 100 fs pulses with a 76 MHz repetition rate over the spectral range covering 740 to 950 nm. The Ti-Saphir excitation beam was focused in a cell filled with low concentration solutions using a 40x microscopic objective, the same objective being also used for the two-photon fluorescence signal collection. The signal is then sent either to a channel plate multiplier (Perkin Elmer MP-993-CL) or to a spectrometer coupled to a CCD camera (Andor DU401-BR-DD) for detailed study of the emission spectra. The laser beam was linearly polarized and a set of half-wave plate and polarizer was used to vary the fundamental beam intensity (700 μ W at the level of the sample). Excitation spectra were determined from measurements of the whole emitted light using a photomultiplier proceeded with filters cutting the fundamental beam (SemRock razor edge 785, stopline 785 and 808, FF735 and FF-01-750). The TPIF intensities of the samples were measured relative to a solution of fluorescein in water (pH= 13), the ratio of the fluorescent signals enabling further determination of the 2PA cross section (δ) assuming equal one- and two-photon fluorescence quantum yields.

Biology

- Cell Culture Conditions

The Y79 (Human retinoblastoma cells) and HT-29 (Human colorectal adenocarcinoma cells) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, HTB-18 and HTB-38, respectively). Y79 cells were cultured in suspension in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Eurobio, les Ulis, France) GlutamaxTM supplemented with 20% fetal calf serum (FCS, Eurobio) and antibiotics in humidified atmosphere under 5% CO₂ in air at 37 °C. Adherent HT-29 cells were grown to confluence in DMEM GlutamaxTM supplemented with 10% FCS and antibiotics in humidified atmosphere under 5% CO₂ in air at 37 °C. Cells were subcultured by dispersal with 0.25% trypsin (Eurobio) for 10 min at 37 °C.

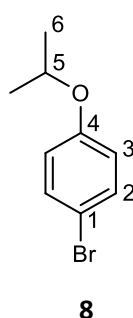
- Phototoxicity

For Y79 cells and HT-29 cells, 1.5×10^5 and 0.5×10^5 cells/well in 1 mL respectively, were seeded into 24-microwell plates with the appropriate culture medium. After 2-3 h of incubation at 37 °C for Y79 and 24 h for HT-29, tested compounds, in DMSO solution, were added in the dark at a final concentration ranging from 0.15 to 7.5 mM. Control cells received 5 mL of DMSO free of dye. After 24 h of incubation at 37 °C in the dark, Y79 cells were centrifuged, washed with phosphate buffered saline (PBS, Eurobio) and resuspended in fresh medium free of drug.

After medium was removed, adherent HT-29 cells were washed with PBS before addition of fresh medium free of drug. Illumination was performed for 11 min ($2 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) through the bottom of the 24-microwell plates using a "light box" made of six Phillips TL 13 W tubes covered by a diffusing glass fitted with an orange filter (emission wavelength $>540 \text{ nm}$), leading to a final fluence of $3 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$. Plates were left to incubate in the dark for 3 days before evaluation of the cell viability by determination of mitochondrial activity using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) assay. At the time of counting, 50 μL of a MTT (5 mg/mL) solution was added to each well. After 30 min of incubation and removal of the medium, formazan crystals were taken up with 500 μL of DMSO and absorbance at 540 nm was measured with a microplate reader (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Survival was expressed as percentage of untreated controls. IC₅₀ values corresponding to the concentration of drug leading to 50% survival were interpolated from the dose response curves and are expressed in mM. Each experiment was carried out in triplicate.

Synthesis

Some results of elemental analysis were calculated by adding one or several water molecules.

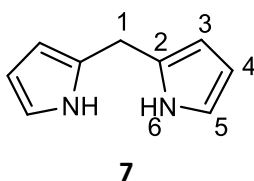


A solution of *p*-bromophenol (20 g, 116 mmol, 1 equiv) in acetone (1 L) combined with K₂CO₃ (40.1 g, 290 mmol, 5 equiv) was stirred for 10 min at room temperature. Then the reaction mixture was refluxed for 16 h after adding Isopropyl iodide (15 ml, 150 mmol, 1.3 equiv), then cooled and evaporated. The crude product was filtered over a pad of silica and eluted with petroleum ether. Removal of the solvents under vacuum afforded 21.07 g of colorless oil (compound **8**) (85%).

C₉H₁₁BrO, MW = 215.09 g.mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-2), 6.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3), 4.41-4.53 (sept, *J* = 11.9, 5.8 Hz, 1H, H-5), 1.31 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 157.09 (C-4), 132.55 (C-2), 117.97 (C-3), 112.81 (C-1), 70.51 (C-5), 22.22 (C-6).



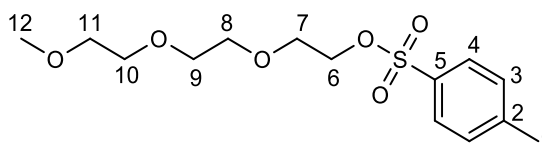
Fresh distilled pyrrole (400 ml, 5.78 mol, 100 equiv) was introduced in a three-necked round-bottom flask which equipped with a condenser and a CaCl_2 guard. Pyrrole was degassed with argon for 10 min. The 37 % by weight of formaldehyde solution in water (4.30 ml, 28.6 mmol, 1 equiv) was added dropwise by a syringe and the reaction mixture degassed for an additional 15 min and then warmed to 55 °C. InCl_3 (1.26 g, 5.72 mmol, 0.1 equiv) was added quickly and the reaction mixture was then stirred at 55°C for 2 h 30. After cooling to room temperature, NaOH (6.87 g, 171.7 mmol, 3 equiv) was added and the reaction mixture stirred for an additional 1 h. Remaining unreacted pyrrole was evaporated under vacuum and recycled while the residue was taken up in toluene and filtered on a short pad of silica and eluted with a toluene/ethyl acetate (3:1, v/v) mixture. The filtrate was collected in a balloon* dried with anhydrous magnesium sulfate, and the solvents were removed under reduced pressure to afford a gray/white solid (compound **7**) (8.45 g, 100%).

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2$, MW = 146.19 g.mol⁻¹

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.89 (s, 2H, H-6), 6.67 (d, J = 1.2 Hz, 2H, H-5), 6.15 (dd, J = 2.7 Hz, 2H, H-4), 6.04 (s, 2H, H-3), 3.99 (s, 2H, H-1).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 129.37 (C-2), 117.58 (C-5), 108.75 (C-4), 106.69 (C-3), 26.73 (C-1).

*washed with a water NaOH solution, then with pure water, and dried.



25

Triethylene glycol monomethyl ether (10.00 g, 60.9 mmol, 1 equiv), tosyl chloride (23.22 g, 121.8 mmol, 2 equiv), Et₃N (18.48 g, 182.7 mmol, 3 equiv), and dimethylaminopyridine (DMAP) (0.2 g, 1.64 mmol, 0.027 equiv) were dissolved in CH₂Cl₂ (800 ml). The reaction mixture was stirred for 3 days under argon atmosphere at room temperature. The solution was diluted with water (280 ml) and neutralized with aqueous HCl (wt. 35 %). The organic layer was washed with brine (2x280 ml), dried with MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated and the products were separated by column chromatography on silica gel using EtOAc/cyclohexane (from 5:5 to 3:1, v/v). Evaporation of the solvent afforded the title compound *TEG-Ts* (compound **25**) as a colorless liquid (17.77 g, 92 %).

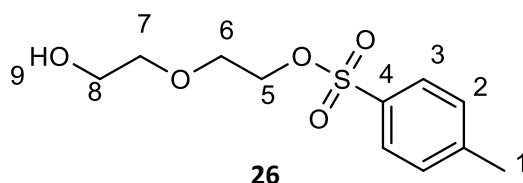
C₁₄H₂₂O₆S, MW = 318.39 g.mol⁻¹

Elemental analysis: calc. C 52.81, H 6.96, found C 52.62, H 6.96.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): δ 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-4), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3), 4.19-4.13 (m, 2H, H-6), 3.72-3.65 (m, 2H, H-7), 3.63-3.58 (m, 6H, H-8-9-10), 3.55-3.50 (m, 2H, H-11), 3.36 (s, 3H, H-12), 2.45 (s, 3H, H-1).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 144.79 (C-2), 132.89 (C-5), 129.80 (C-3), 127.87 (C-4), 71.80-58.90 (C-6-7-8-9-10-11), 21.54 (C-1).

MS MALDI-TOF: m/z = 341.11 [M+Na]⁺ (expected:341.10).

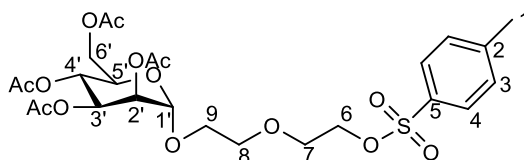


Diethylene glycol (50.00 g, 471.70 mmol, 1 equiv) and Et₃N (18.35 ml, 132.08 mmol, 0.28 equiv) were dissolved in CH₂Cl₂ (260 ml) and the reaction mixture was cooled to 0 °C. A solution of tosyl chloride (18.00 g, 94.34 mmol, 0.2 equiv) in CH₂Cl₂ (100 ml) was added dropwise into the flask via dropping funnel. After stirring for 24 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with water and neutralized with HCl solution (1 N in water). The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ solution, brine, dried with MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated and the products were separated by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/cyclohexane (9:1, v/v). Evaporation of the solvent afforded the title compound **26** (*DEG-Ts*) as colorless oil (9.50 g, yield 39 %).

C₁₁H₁₆O₅S, MW = 260.31 g.mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-4), 7.35 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3), 4.18 (t, 2H, H-6), 3.72 – 3.62 (m, 4H, H-7-8), 3.51 (t, 2H, H-9), 3.04 (s, 1H, H-OH), 2.43 (s, 3H, H-1).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 145.04 (C-2), 132.75 (C-5), 129.91 (C-3), 127.84 (C-4), 72.50 (C-9), 69.42 (C-6), 68.43 (C-7), 61.39 (C-8), 21.54 (C-1).



27

D-(+)-Mannose(OAc)₅ (4.97 g, 12.8 mmol, 1 equiv) and *DEG-Ts* **26** (5 g, 19.2 mmol, 1.5 equiv) were introduced into in a round-bottom flask and degassed with argon for 10 min. The oils were dissolved in dry CH₂Cl₂ (20 ml) and the solution was cooled to 0 °C. Boron trifluoride diethyl etherate (7.42 g, 51.2 mmol, 4 equiv) was added and the reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was neutralized with saturated NaHCO₃ solution, washed with water, dried with MgSO₄, and filtered. The solvent was evaporated and the products were separated by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/Et₂O (10:1, v/v). Evaporation of the solvent afforded the title compound **27** (*Man-DEG-Ts*) as colorless oil (5.73 g, 76%).

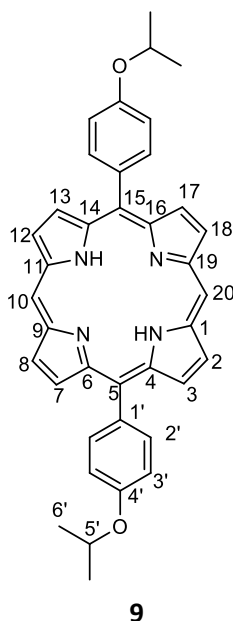
C₂₆H₃₄O₁₄S, MW = 590.59 g.mol⁻¹

Elemental analysis: calc. C 50.84, H 5.80, found C 50.36, H 6.17 (C₂₆H₃₄O₁₄S · 1/2H₂O: calc. C 50.08, H 5.88).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-4), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3), 5.38 – 5.29 (m, 2H, H-3'-4'), 5.27 – 5.24 (m, 1H, H-2'), 4.86 (s, 1H, H-1'), 4.36 – 4.26 (m, 1H, H-6_a'), 4.14 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, H-6_b'-6), 4.09 (s, 1H, H-5'), 3.84 – 3.46 (m, 6H, H7-8-9), 2.46 (s, 3H, H-acetyl), 2.16 (s, 3H, H-acetyl), 2.11 (s, 3H, H-acetyl), 2.05 (s, 3H, H-acetyl), 2.00 (s, 3H, H-acetyl).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.76, 170.15, 170.03, 169.94 (C-C=O acetyl), 145.00 (C-2), 133.03 (C-5), 130.02 (C-3), 128.05 (C-4), 97.74 (C-1'), 70.22, 69.57, 69.38, 69.20, 68.80, 68.52, 67.29, 66.14, 62.55 (C-6-7-8-9-2'-3'-4'-5'), 21.72 (C-1), 20.99, 20.87, 20.80 (C-CH₃ acetyl).

MS MALDI-TOF: *m/z* = 613.16 [M+Na]⁺ (expected: 613.16).



2,2'-Dipyrromethane **7** (2 g, 13.7 mmol, 1.0 equiv) was introduced in a two-necked round-bottom flask and dissolved in a large volume of CHCl_3 (2.8 L). 4-isopropoxybenzaldehyde (2.25 g, 13.7 mmol, 1.0 equiv) were introduced and the solution was degassed with argon for 15 min. TFA (0.23 ml, 3.01 mmol, 0.22 equiv) was diluted in CHCl_3 (200 ml) and added dropwise through a dropping funnel. The reaction mixture was stirred for 18 h and protected from light at room temperature. 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone(DDQ) (4.52 g, 19.9 mmol, 1.45 equiv) was added and the mixture was stirred for an additional 1 h. The solution was filtered in a short pad of silica and eluted with CHCl_3 or the adequate mixture of CHCl_3 and MeOH. The solvents were removed under reduced pressure and the desired porphyrin **9** was isolated after crystallization in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ as a purple solid (1.5 g, 40 %).

$\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4$, MW = 574.70 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

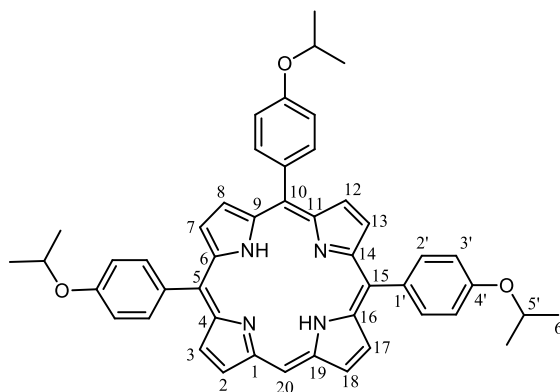
Elemental analysis: calc. C 78.87, H 5.92, N 9.68, found C 77.36, H 5.76, N 9.43. ($\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: calc. C 77.66, H 6.00, N 9.53).

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 410.5 (326.3), 505.5 (15.3), 541.5 (7.2), 578.5 (5.1), 534 (2.2).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 10.30 (s, 2H, H-10-20), 9.39 (d, J = 4.5 Hz, 4H, H-2-8-12-18), 9.13 (d, J = 4.4 Hz, 4H, H-3-7-13-17), 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H-2'), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H-3'), 4.90 (sept, 2H, H-5'), 1.60 (d, J = 6.0 Hz, 12H, H-6'), -3.07 (s, 2H, H-NH).

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157.9 (C-4'), 148 (C-4-6-14-16), 145 (C-1-9-11-19), 136.10 (C2'), 133.6 (C-1'), 131.5 (C-2-3-7-8-12-13-17-18), 119.2 (C-5-10-15), 114.50 (C-3'), 105.31 (C-20), 70.50 (C-5'), 22.40 (C-6').

MS MALDI-TOF: m/z = 578.28 $[\text{M}]^+$ (expected: 578.27).



10

1-isopropoxy-4-bromobenzene **8** (9.7 g, 45 mmol, 30 equiv) was introduced in a two-necked round-bottom flask and degassed with argon for 10 min. Dry Et₂O was added and the solution cooled to -78°C. n-BuLi (28.2 ml at 1.6 M in hexane, 45 mmol, 30 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred and allowed to warm slowly to 0°C. A solution of compound **9** (870 mg, 1.5 mmol, 1 equiv) in 450 ml anhydrous THF at room temperature was transferred into the first flask *via cannula*. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. It was then quenched with THF/H₂O (50 ml/50 ml) mixture. After 20-30 min stirring, the reaction was submitted to air bubbling for 1 h until the reaction has completely turned to deep red/purple. The solvents were evaporated and compound **10** was isolated after crystallization as a purple solid (758 mg, 71%).

C₄₇H₄₄N₄O₃, MW = 712.88 g.mol⁻¹

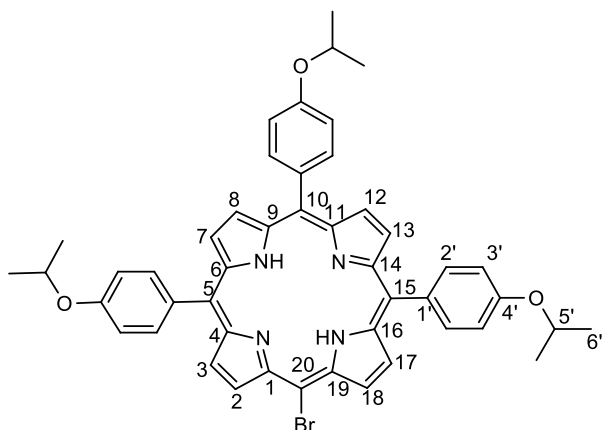
Elemental analysis: calc. C 79.19, H 6.22, N 7.86, found C 78.42, H 6.23, N 7.56. (C₄₇H₄₄N₄O₃ · ½ H₂O calc. C 78.19, H 6.38, N 7.76).

UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 416 (129.5), 512 (5.5), 548 (3.0), 586 (2.0), 642 (1.4).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 10.14 (s, 1H, H-20), 9.28 (d, J = 4.6 Hz, 2H, H-2-18), 9.04 (d, J = 4.6 Hz, 2H, H-3-17), 8.92 (q, J = 4.8 Hz, 4H, H-7-8-12-13), 8.09 (t, J = 8.5 Hz, 6H, H-1'), 7.36-7.16 (m, 6H, H-3'), 4.91-4.74 (sept, 3H, H-5'), 1.55 (m, 21H, H-6'), -2.97 (s, 2H, H-NH).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 157.75 (C-4'), 147.32-145.80 (C-1-4-6-9-11-14-16-19), 135.85 (C-5-15), 134.79 (C-1'), 134.80 (C2'), 133.93 (C-7-8-12-13), 131.46 (C-3-17), 131.08 (C-2-18), 120.51 (C-10), 119.44 (C-5-15), 70.15 (C-5'), 22.33 (C-6').

MS MALDI-TOF: m/z = 712.34 [M]⁺ (expected: 712.34).



11

Compound **10** (758 mg, 1.06 mmol, 1 equiv) was dissolved in CHCl_3 (80 ml) and pyridine (0.6 ml). The solution was cooled to 0 °C. A solution of NBS (199 mg, 1.12 mmol, 1.05 equiv) in CHCl_3 (35 ml) and pyridine (0.3 ml) was added and the reaction mixture was stirred for 15 min while slowly warming to room temperature. Acetone (3ml) was then introduced to quench the remaining N-BromoSuccinimide(NBS). The solvents were removed under reduced pressure. The remaining purple solid (compound **11**) (800 mg, 95 %) was washed with water and dried and used without purification.

$\text{C}_{47}\text{H}_{43}\text{BrN}_4\text{O}_3$, MW = 791.77 g.mol⁻¹

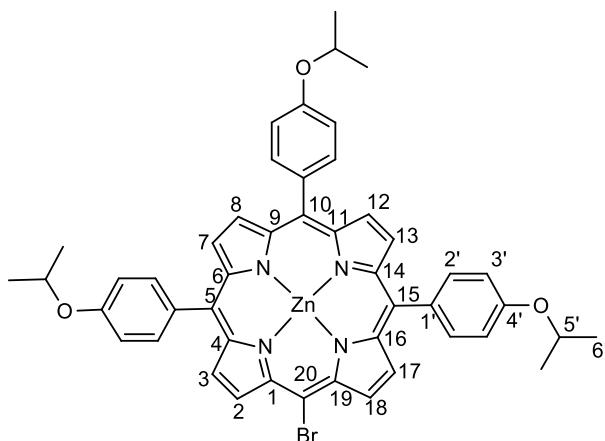
Elemental analysis: cal. C 71.30, H 5.47, N 7.08, found C 70.22, H 5.54, N 7.00. ($\text{C}_{47}\text{H}_{43}\text{BrN}_4\text{O}_3 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ C 70.49, H 5.54, N 7.00).

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 423 (108.5), 522 (4.7), 558 (3.5), 599 (1.5), 657 (1.8).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.65 (d, J = 4.8 Hz, 2H, H-2,18), 8.94 (d, J = 4.6 Hz, 2H, H3-17), 8.84 (s, 4H, H-7,8,12,13), 8.07 (d, J = 8.2 Hz, 6H, H-2'), 7.27 (d, J = 6.4 Hz, 6H, H-3'), 4.91-4.82 (sept, J = 11.1, 5.7 Hz, 3H, H-5'), 1.58 (d, J = 5.5 Hz, 18H, H-6'), -2.72 (s, 2H, N-H).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157.86 (C-4'), 135.73 (C-2'), 135.64 (C-1'), 132.04-131.90 (C-1-4-6-9-11-14-16-19), 120.99 (C-5-10-15), 120.63 (C-3'), 113.99 (C-20), 70.17 (C-5'), 22.30 (C-6').

MS MALDI-TOF: m/z = 790.24 [M]⁺ (expected: 790.25).



28

Compound **11** (560 mg, 0.71 mmol, 1 equiv) was introduced in a round-bottom flask and dissolved in CHCl_3 (70 ml). A solution of zinc (II) acetate hydrate (776 mg, 3.54 mmol, 5 equiv) in 9 ml methanol was added and the mixture was heated to reflux for 2 h. After cooling to room temperature and removing of solvents under reduced pressure, the solid residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed abundantly with water. The organic phase was dried with MgSO_4 . The solvent was evaporated and the compound **28** was isolated as purple crystals (580 mg, 96 %) and was used without purification.

$\text{C}_{47}\text{H}_{41}\text{BrN}_4\text{O}_3\text{Zn}$, MW = 855.14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

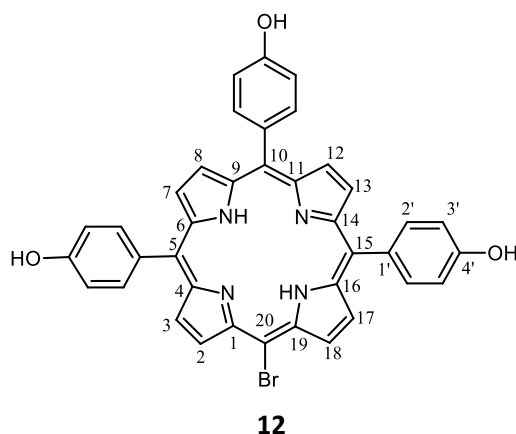
Elemental analysis: calc. C 66.01, H 4.83, N 6.55, found C 65.33, H 4.98, N 6.67. ($\text{C}_{47}\text{H}_{41}\text{BrN}_4\text{O}_3\text{Zn} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ calc. C 65.33, H 4.90, N 6.48).

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 429 (344.5), 575 (12.6), 605(9.0).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.71 (d, J = 4.3 Hz, 2H, H-2-18), 9.01 (d, J = 4.3 Hz, 2H, H-3-17), 8.93 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.12 – 7.93 (m, 6H, H-2'), 7.32 – 7.22 (m, 6H, H-3'), 4.86 (sept, J = 5.7 Hz, 3H, H-5'), 1.58 (d, J = 5.3 Hz, 18H, H-6').

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157.63 (C-4'), 150.90 (C-6-9-11-14), 149.56 (C-4-16), 135.56 (C-1'-2'), 134.81 (C-3-17), 133.09 (C-2-18), 132.28 (C-7-8-12-13), 121.69 (C-5-10-15), 113.84 (C-3'), 100.03 (C-20), 70.16 (C-5'), 22.33 (C-6').

MS MALDI-TOF: m/z = 852.16 $[\text{M}]^+$ (expected: 852.17).



Compound **11** (500 mg, 0.63 mmol, 1 equiv) was introduced in a round-bottom flask, dissolved in dry CH_2Cl_2 (120 ml) under argon and cooled down to $-30\text{ }^\circ\text{C}$. BBr_3 (1.8 ml, 18.9 mmol, 30 equiv) was added cautiously. Temperature was maintained between -30 and $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. The reaction mixture was slowly poured into a water-ice bath and then a solution of ammonia (25 % in water) was added dropwise until the color changes from green to purple. The mixture was extracted with AcOEt , washed three times with water and dried on MgSO_4 and filtrated. Solvents removed under reduced pressure and the solid residues dried under vacuum. The solvents were evaporated and compound **12** was isolated as a purple powder (400 mg, 90 %) and used without other purification.

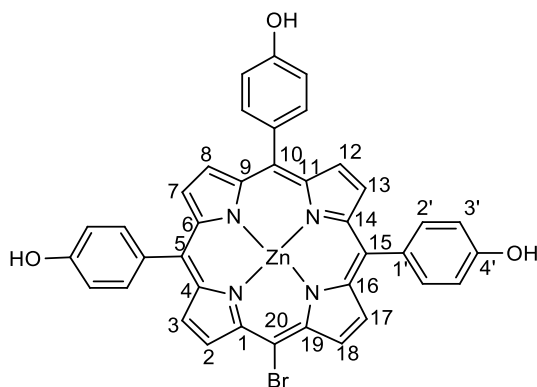
$\text{C}_{38}\text{H}_{25}\text{BrN}_4\text{O}_3$, MW = 665.53 g.mol^{-1}

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm ($\epsilon\text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$): 424 (218.7), 523 (9.6), 560 (7.1), 600 (3.2), 658 (3.8).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 9.50 (d, $J = 4.7\text{ Hz}$, 2H, H-2-18), 8.82 (d, $J = 4.5\text{ Hz}$, 2H, H-3-17), 8.79-8.65 (m, 7H, H-7-8-12-13-OH), 7.95-7.78 (m, 6H, H-2'), 7.17-6.91 (m, 6H, H-3'), -2.78 (s, 2H, H-NH).

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 158.26 (C-4'), 146.3-146.8 (C-1-4-6-9-11-14-16-19), 135.40 (C-2'), 132.60 (C-1'), 131.44-130.25 (C-2-3-7-8-12-13-17-18), 120.84 (C-5-15-20), 113.72 (C-3').

MALDI-TOF: $m/z = 664.09\text{ [M]}^+$ (expected: 664.11).



13

Compound **12** (400 mg, 0.60 mmol, 1 equiv) was introduced in a round-bottom flask and dissolved in CHCl_3 (60 ml) with several drops of THF. A solution of zinc (II) acetate (660 mg, 3.0 mmol, 5 equiv) in methanol (8 ml) was added and the mixture was heated to reflux for 40 min. After cooling to room temperature and evaporating, the solid residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed abundantly with water. The organic phase was dried with MgSO_4 and the solvents removed under reduced pressure. The compound **13** was isolated as purple crystals (453 mg, 99 %) and used without other purification.

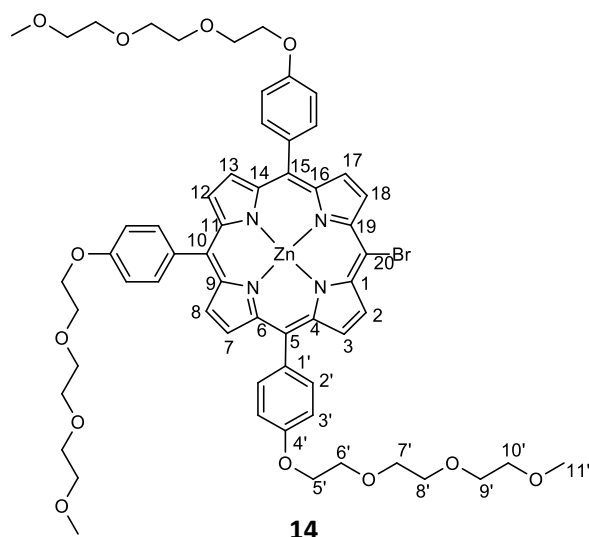
$\text{C}_{38}\text{H}_{23}\text{BrN}_4\text{O}_3\text{Zn}$, MW = 728.90 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 430 (111.8), 566 (4.4), 640 (7.2).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.94 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-2-18), 7.24 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-3-17), 7.13 (s, 4H, H-7-8-12-13), 7.03 (s, 3H, H-OH), 6.30 – 6.13 (m, 6H, H-2'), 5.52 – 5.29 (m, 6H, H-3').

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157.11 (C-4'), 150.52 (C-4-6-9-11-14-16), 148.86 (C-1-19), 145.95 (C-2'), 135.13 (C-2'), 133.99 (C-5-10-15), 132.28 (C-2-18), 131.47 (C-3-7-8-12-13-17), 121.16 (C-1'), 112.88 (C-3'), 102.30 (C-20).

MALDI-TOF: m/z = 726.02 $[\text{M}]^+$ (expected: 726.02).



A mixture of compound **13** (400 mg, 0.53 mmol, 1 equiv), TEG-Ts **25** (2.52 g, 7.91 mmol, 15 equiv) and Cs_2CO_3 (7.73 g, 23.72 mmol, 45 equiv) in anhydrous DMF (100 ml) was stirred under argon at room temperature during 24 h. The mixture was concentrated under vacuum, and then dissolved in CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water, dried with MgSO_4 , filtered and evaporated under vacuum. Compound **14** was purified by column chromatography as a purple solid after recrystallization from CH_2Cl_2 /n-heptane two times (581 mg, 94%).

$\text{C}_{59}\text{H}_{65}\text{BrN}_4\text{O}_{12}\text{Zn}$, MW = 1167.45 g.mol⁻¹

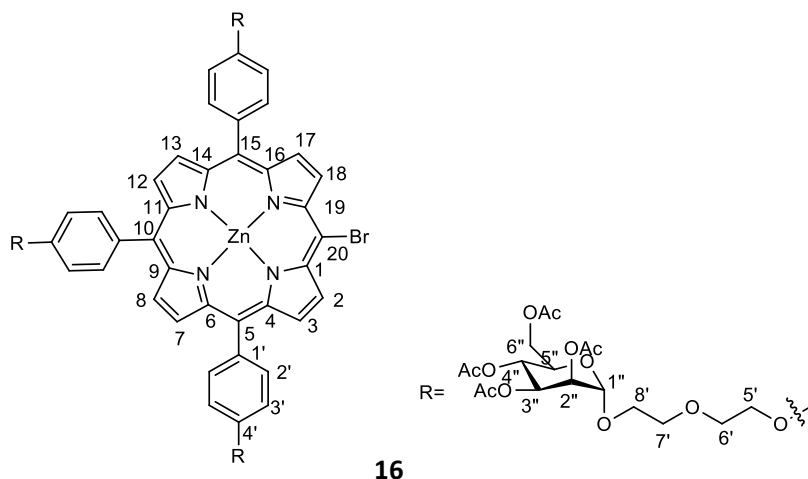
Elemental analysis: calc. C 60.70, H 5.61, N 4.80, found C 58.85, H 5.51, O 4.36. ($\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{BrN}_4\text{O}_{14}\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Cal . C, 58.88; H, 5.78; Br, 6.64).

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 429 (207.0), 564 (7.5), 605 (5.0).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.75 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-2-18), 8.99 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-3-17), 8.89 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.12 – 7.98 (m, 6H, H-2'), 7.23 – 7.13 (m, 6H, H-3'), 4.24 – 4.15 (m, 6H, H-5'), 3.87 – 3.77 (m, 6H, H-6'), 3.67 – 3.58 (m, 6H, H-7'), 3.56 – 3.49 (m, 6H, H-8'), 3.49 – 3.42 (m, 6H, H-9'), 3.38 – 3.33 (m, 6H, H-10'), 3.23 – 3.15 (m, 9H, H-11').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158.76 (C-4'), 151.21 (C-6-9-11-14), 150.31 (C-4-16), 149.93 (C-1-19), 135.77 (C-2'), 135.66 (C-5-10-15), 135.50 (C-20), 133.51 (C-3-17), 132.95 (C-2-18), 132.58 (C-7-8-12-13), 121.62 (C-1'), 113.03 (C-3'), 72.05 (C-10'), 71.04 (C-9'), 70.81 (C-8'), 70.69 (C-7'), 70.05 (C-6'), 67.84 (C-5'), 59.22 (C-11').

MALDI-TOF: m/z = 1164.30 [M]⁺ (expected: 1164.31).



Compound **13** (600 mg, 0.79 mmol, 1 equiv) and Cs_2CO_3 (11.60 g, 35.60 mmol, 45 equiv) was introduced in a two-necked round bottom flask and degassed with argon for 10 min. A solution of *Man-TEG-Ts* **27** (6.39 g, 11.86 mmol, 15 equiv) and KI (39 mg, 0.24 mmol, 0.3 equiv) in anhydrous DMF (240 ml) was added in the flask. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon during 24 h. The mixture was concentrated under vacuum, and then dissolved in CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water, dried with MgSO_4 , filtered and evaporated under vacuum. Compound **16** was purified by column chromatography as a purple solid after recrystallization from CH_2Cl_2 /n-heptane two times (1.24 g, 77%).

$\text{C}_{92}\text{H}_{101}\text{BrN}_4\text{O}_{36}\text{Zn}$, MW = 1984.08 g.mol⁻¹

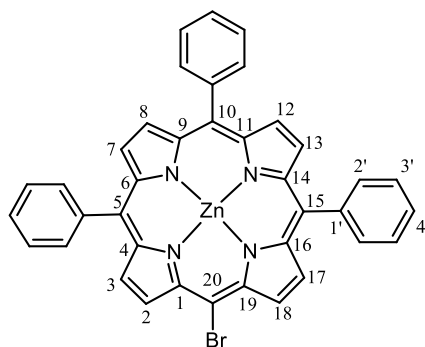
Elemental analysis: calc. C 55.69, H 5.13, N 2.82, found C 54.96, H 4.90 N 3.09. ($\text{C}_{92}\text{H}_{101}\text{BrN}_4\text{O}_{36}\text{Zn} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ calc. C 55.19, H 5.19, N 2.80).

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (λ mM⁻¹.cm⁻¹): 429.02 (486), 560.32 (23), 602 (13).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.68 (d, J = 4.1 Hz, 2H, H-2-18), 8.96 (d, J = 4.1 Hz, 2H, H-3-17), 8.89 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.10 – 7.99 (m, 6H, H-2'), 7.23 – 7.16 (m, 6H, H-3'), 5.46 – 5.12 (m, 9H, H-2''-3''-4''), 4.85 (s, 3H, H-1''), 4.31 – 4.14 (m, 9H, H-5'-H5''), 4.13 – 4.04 (m, 6H, H-6'), 3.87 – 3.75 (m, 9H, H-7'-6''a), 3.73 – 3.57 (m, 9H, H-8'-6''b), 2.11-1.95 (s, 12H, H-CH₃ acetyl).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.98-170.02 (C-C=O acetyl), 158.65 (C-1'), 151.05 (C-4-16), 151.00 (C-6-9-11-14), 149.75 (C-1-19), 135.74 (C-4'), 135.41 (C-2'), 133.44 (C-3-17), 132.86 (C-2-18), 132.55 (C-7-8-12-13), 121.82 (C-20), 121.52 (C-5-10-15), 112.98 (C-3'), 98.01 (C-13''), 70.44-66.37 (C-5'-6'-7'-8'-2''-3''-4''-6''), 62.68 (C-5''), 21.14-20.94 (C-CH₃ acetyl).

MALDI-TOF: m/z = 1980.49 [M]⁺ (expected: 1980.47).



22

TPP-Br (600 mg, 0.97 mmol, 1 equiv) was introduced in a round-bottom flask and dissolved in CHCl_3 (85 ml). A solution of zinc (II) acetate (1069 mg, 4.86 mmol, 5 equiv) in methanol (11 ml) was added and the mixture was heated to reflux for 2 h. After cooling to room temperature and evaporating, the solid residue was taken in CH_2Cl_2 and washed abundantly with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and the solvents removed under reduced pressure. The compound **22** was isolated as purple crystals (610 mg, 92 %) and was used without other purification.

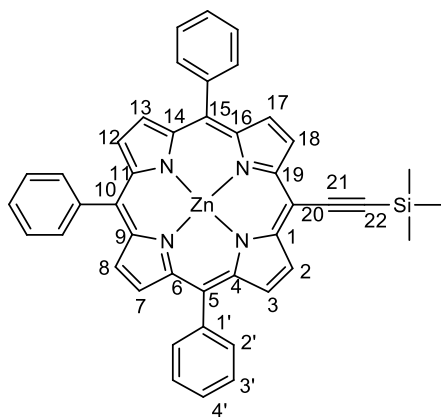
$\text{C}_{38}\text{H}_{23}\text{BrN}_4\text{Zn}$, MW = 680.90 g.mol⁻¹

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 426 (261.4), 562 (11.3), 602 (5.6).

¹H NMR (300 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm): 9.59 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-2-18), 8.78 (d, J = 4.7 Hz, 2H, H-3-17), 8.68 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.11 – 8.01 (m, 6H, H-2'), 7.73 – 7.58 (m, 9H, H-3'-4').

¹³C NMR (75 MHz, Acétone-d₆) δ (ppm): 151.41-151.33 (C-4-6-9-11-14-16), 150.31 (C-1-19), 143.79 (C-4'), 135.23-135.09 (C-2'), 133.73 (C-5-10-15), 133.20 (C-2-3-17-18), 132.87-127.45 (C-3'), 122.25 (C-1'), 104.13 (C-20).

MALDI-TOF: m/z = 678.04 [M]⁺ (expected: 678.04).



29

Compound **22** (300 mg, 0.44 mmol, 1 equiv), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (31 mg, 0.044 mmol, 0.1 equiv) and CuI (8.4 mg, 0.04 mmol, 0.1 equiv) were introduced into a round-bottom flask and degassed with argon for 20 min. The solids were dissolved in dry THF (18 ml) and Et₃N (2.4 ml). After degassing for an additional 10 min, it was then frozen in liquid nitrogen. Trimethylsilylacetylene (TMSA) (261 mg, 2.65 mmol, 6 equiv) was added and then the reaction mixture was stirred under argon pressure for 1 h. The gas was then allowed to escape and the mixture was warmed to room temperature. The mixture was stirred under argon at room temperature during 16 h after which the reaction was quenched with water. It was then extracted with CH₂Cl₂, washed with water and brine. The organic phase was dried with MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude product finally purified by column chromatography on silica gel eluted with CH₂Cl₂/n-heptane (1:1, v/v). Evaporation of the solvent afforded the title compound as a purple solid (compound **29**) (221 mg, 72 %).

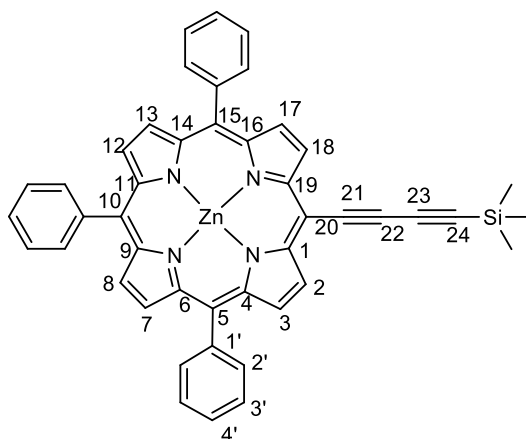
C₄₃H₃₂N₄SiZn, MW = 698.21 g.mol⁻¹

UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 433.25 (449), 564 (17.0), 606 (11.7).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 9.79 – 9.26 (m, 2H, H-2-18), 8.81 – 8.73 (m, 2H, H-3-17), 8.66 (s, 4H, H-7-8-12-13), 7.98 (s, 6H, H-2'), 7.56 (s, 9H, H-3'), 0.42 (s, 9H, H-Si(CH₃)₃).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 152.21 (C-1-19), 150.12 (C-4-16), 149.52 (C-6-9-11-14), 142.22 (C-1'), 134.01 (C-2'), 132.48 (C-3-17), 131.79 (C-2-18), 131.38, 130.63 (C-7-8-12-13), 127.14, 126.17 (C-3'-4'), 121.49 (C-5-10-15), 107.34 (C-20), 100.74 (C-6'), 99.15 (C-5'), -0.00 (C-SiCH₃).

MALDI-TOF: m/z= 696.17 [M]⁺ (expected: 696.17).



30

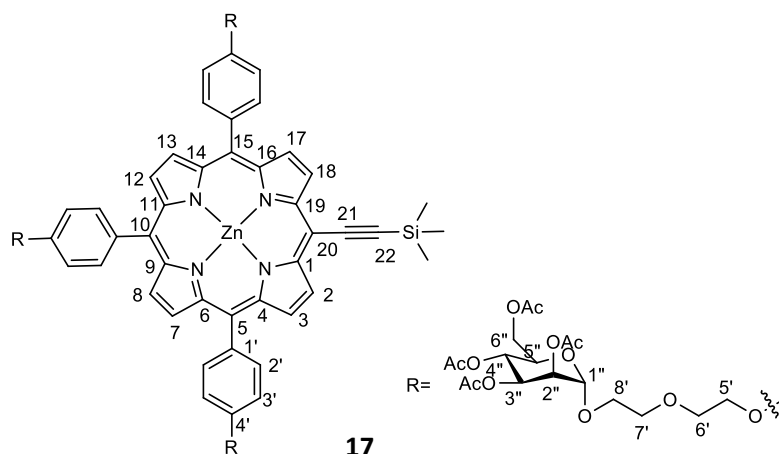
Compound **29** (25 mg, 0.036 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (0.5 ml) and THF (2.5 ml), and then Fluorure de tetra-*n*-butylammonium (TBAF) (12.3 mg, 0.047 mmol, 1.3 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 30 min followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl_2 . The mixture was stirred for 15 min, filtered, extracted with CH_2Cl_2 and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude intermediate combined with the trimethylsilylacetylene (TMSA) (174 mg, 1.77 mmol, 49.2 equiv) and CuCl (1.92 g, 19.4 mmol, 539 equiv) and (Tétraméthyléthylènediamine) TMEDA (2.6 ml, 17.4 mmol, 484 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (250 ml). The reaction mixture was stirred vigorously under dry air for 30 min and then quenched with water (500 ml). The organic layer was washed with water until all the CuCl had been removed. After evaporating, the desired product **30** (10 mg, 40 %) was isolated by column chromatography on silica gel using cyclohexane/AcOEt (4:1, v/v) as purple powder.

$\text{C}_{45}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{SiZn}$, MW = 722, 23

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 432.25 (445), 560 (16.7), 604 (11.3).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.79 – 9.26 (m, 2H, H-2-18), 8.81 – 8.73 (m, 2H, H-3-17), 8.66 (s, 4H, H-7-8-12-13), 7.98 (s, 6H, H-2'), 7.56 (s, 9H, H-3'-4'), 0.42 (s, 9H, H-Si CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 153.61 (C-1-19), 150.90 (C-6-9-11-14), 149.94 (C-4-16), 142.49 (C-2'), 134.48 (C-1'), 133.35 (C-2'), 132.45, 131.90 (C-7-8-12-13), 130.77 (C-2-18), 127.71, 126.71 (C-3'-4'), 122.38 (C-5-10-15), 97.04, 92.59, 89.42 (C-21-22-23-24), 0.00 (C-Si- CH_3).



Compound **16** (300 mg, 0.15 mmol, 1 equiv), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (10.6 mg, 0.015 mmol, 0.1 equiv) and CuI (2.9 mg, 0.015 mmol, 0.1 equiv) were introduced into a round-bottom flask and degassed with argon for 20 min. The solids were dissolved in dry THF (13 ml) and Et₃N (1.3 ml). After degassing for 10 min, it was then frozen in liquid nitrogen. TMSA (89.2 mg, 0.91 mmol, 6 equiv) was added and then the reaction mixture was stirred under argon pressure for 1 h. The gas was then allowed to escape and the mixture warmed to room temperature. The mixture was stirred under argon at room temperature during 16 h after which the reaction was quenched with water. It was then extracted with CH₂Cl₂, washed with water and brine. The organic phase was dried with MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude product was finally purified on silica gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v) and crystallization (CH₂Cl₂/n-heptane). Evaporation of the solvent afforded the title compound as a purple solid (compound **17**) (266 mg, 88 %).

C₉₇H₁₁₀N₄O₃₆SiZn, MW = 2001.38 g.mol⁻¹

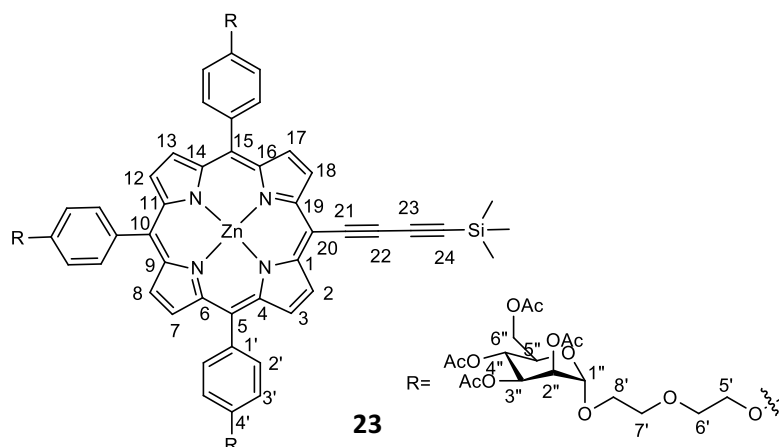
Elemental analysis: calc. C 58.21, H 5.54, N 2.80, found C 57.43, H 5.46, N 2.44. (C₉₇H₁₁₁ON₄O₃₆SiZn · 1H₂O calc. C 57.69, H 5.59, N 2.77).

UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 433 (467.6), 566 (18.4), 612 (15.7).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 9.74 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H-2-18), 8.99 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H-3-17), 8.88 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.17 – 8.02 (m, 6H, H-2'), 7.44 – 7.21 (m, 6H, H-3'), 5.49 – 5.40 – 5.25 (m, 9H, H-2''-3''-4''), 4.96 (s, 3H, H-1''), 4.48-3.64 (H-5'-6'-7'-8'-5''-6''), 2.16-1.99 (s, 9H, H-CH₃ acetyl), 0.62 (s, 12H, H-SiCH₃).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.32-169.36 (C-C=O, acetyl), 158.07 (C-4'), 152.16 (C-6-9-11-14), 150.44 (C-4-16), 149.71 (C-1-19), 135.01 (C-2'), 134.88 (C-1'), 132.97 (C-3-17), 132.67 (C-7-8-12-13), 130.41 (C-2-18), 121.17 (C-5-110-15), 112.38 (C-3'), 107.31 (C-9'), 101.05 (C-10'), 97.42 (C-1''), 77.04-62.05 (C-5'-6'-7'-8'-2''-3''-4''-5''-6''), 20.52-20.31 (C-CH₃ acetyl), 0.00 (C-SiCH₃).

MS MALDI-TOF: *m/z*=1998.62 [M]⁺ (expected: 1998.60).



Compound **17** (50 mg, 0.025 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (0.4ml) et THF (1.8 ml), and then TBAF (8.5 mg, 0.033 mmol, 1.3 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 15 min followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl₂. The mixture was stirred for 10 min, filtered, extracted with CH₂Cl₂ and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO₄, filtrated and evaporated. The crude intermediate combined with TMSA (121 mg, 1.23 mmol, 49.2 equiv) and CuCl (1.34 g, 13.5 mmol, 539 equiv) and TMEDA (1.8 ml, 12.1 mmol, 484 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (180 ml). The reaction mixture was stirred vigorously under dry air for 30 min and then quenched with water (500 ml). The organic layer was washed with water until all the CuCl had been removed. After evaporating, the desired product **23** (27 mg, 53 %) was isolated by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v) as purple powder.

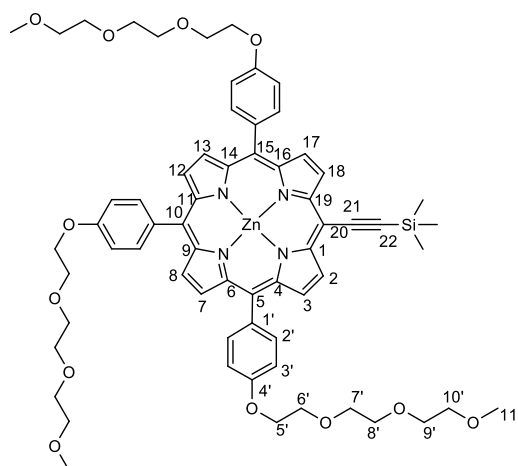
C₉₉H₁₁₀N₄O₃₆SiZn, MW = 2025.40 g.mol⁻¹

UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm₋₁): 430.5 (192.5), 440.7 (480.0), 625.7 (30.0).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 9.61 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-2-18), 8.90 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-3-17), 8.78 (d, *J* = 3.0 Hz, 4H, H-7-8-12-13), 8.05 – 7.93 (m, 6H, H-2'), 7.21 (d, *J* = 4.9 Hz, 6H, H-3'), 5.37-5.26 (m, 9H, H-2''-3''-4''), 4.90 (s, 3H, H-1''), 4.39-3.65 (H-5'-6'-7'-8'-5''-6''), 2.10 - 1.92 (s, 9H, H-CH₃ acetyl), 0.33 (s, 9H, H-SiCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 170.84-169.88 (C-C=O, acetyl), 158.63 (C-4'), 153.47 (C-6-9-11-14), 151.21 (C-4-16), 150.08 (C-1-19), 135.48 (C-1'-2'), 132.96 (C-3-17) 131.75 (C-7-8-12-13), 130.64 (C-2-18), 128.90 (C-5-10-15), 122.05 (C-5-10-15), 112.98 (C-3') , 107.28, 106.37, 102.69, 100.35 (C-9'-10'-11'-12'), 97.94 (C-1''), 77.55, 77.33, 77.12, 76.70, 70.47, 70.14, 69.73, 69.24, 68.58, 67.60, 66.26, 62.57 (C-5'-6'-7'-8'-2''-3''-4''-5''-6''), 21.04 (C-CH₃ acetyl), 0.00 (C-SiCH₃).

MS MALDI-TOF: m/z=2022.56 [M]⁺ (expected: 2022.60).



15

Compound **14** (200 mg, 0.17 mmol, 1 equiv), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (12 mg, 0.02 mmol, 0.1 equiv) and CuI (3.3 mg, 0.02 mmol, 0.1 equiv) were introduced into in a round-bottom flask and degassed with argon for 10 min. The solids were dissolved in dry THF (57 ml) and Et₃N (1.5 ml). After degassing for 10 min, it was then frozen in liquid nitrogen. TMSA (101 mg, 0.13 mmol, 6 equiv) was added and then the reaction mixture was stirred under argon pressure for 1h. The gas was then allowed to escape and the mixture warmed to room temperature. The mixture was stirred under argon at room temperature during 16 h after which the reaction was quenched with water. It was then extracted with CH₂Cl₂, washed with water and brine. The organic phase was dried with MgSO₄, filtered and the solvents removed under reduced pressure. The crude product finally purified on silica gel column eluted with CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v) and crystallization (CH₂Cl₂/n-heptane). Evaporation of the solvent afforded the title compound **15** as a purple solid (140 mg, 69 %).

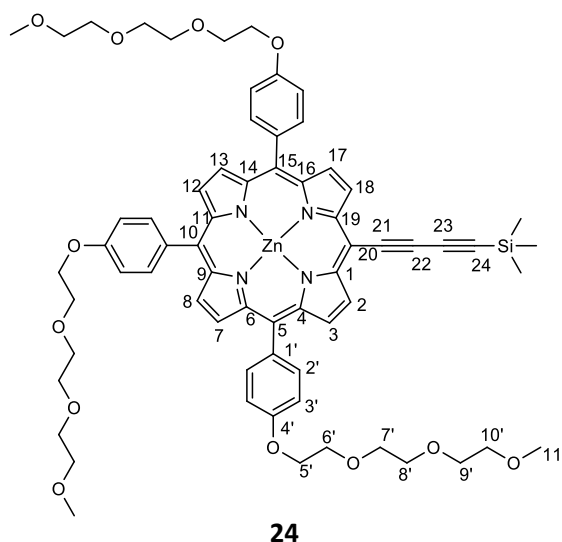
C₆₄H₇₄N₄O₁₂SiZn, MW = 1184.76 g.mol⁻¹

UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 435 (259.8), 572 (9.2), 619 (11.6).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 9.73 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2-18), 8.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3-17), 8.84 (s, 4H, H-7-8-12-13), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H, H-2'), 7.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 6H, H-3'), 4.06 – 3.87 (m, 6H, H-5'), 3.62 – 3.53 (m, 6H, H-6'), 3.40 – 3.35 (m, 6H, H-7'), 3.29 – 3.21 (m, 6H, H-8'), 3.23 – 3.16 (m, 6H, H-9'), 3.11 – 3.04 (m, 6H, H-10'), 2.97 (s, 9H, H-11'), 0.62 (s, 9H, H-SiCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 157.74 (C-4'), 152.01 (C-6-9-11-14), 150.33 (C-4-16), 149.59 (C-1-19), 134.93 (C-2'), 134.82 (C-3-17), 132.29 (C-2-18), 131.59-131.14 (C-7-8-12-13), 122.14 (C-5-10-15), 120.95 (C-1'), 112.12 (C-3'), 107.86 (C-20), 100.08 (C-21), 98.28 (C-22), 70.94 (C-10'), 69.92 (C-9'), 69.68 (C-8'), 69.56 (C-7'), 68.98 (C-6'), 66.79 (C-5'), 58.16 (C-11'), - 0.00 (C-SiCH₃).

MALDI-TOF: *m/z* = 1182.42 [M]⁺ (expected: 1182.44).



Compound **14** (100 mg, 0.084 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (1.4 ml) et THF (6.0 ml), and then TBAF (28.7 mg, 0.11 mmol, 1.3 equiv) was added. The reaction was stirred at room temperature for 15 min followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl_2 . The mixture was stirred for 10 min, filtered, extracted with CH_2Cl_2 , and washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude intermediate combined with TMSA (407 mg, 4.15 mmol, 49.2equiv) and CuCl (539 mg, 45.5 mmol, 539 equiv) and TMEDA (6.1 ml, 40.8 mmol, 484 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (350 ml). The reaction mixture was stirred vigorously under dry air for 30 min and then quenched with water (500ml). The organic layer was washed with water until all the CuCl had been removed. After evaporating, the desired product **24** (59 mg, 57 %) was isolated by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1, v/v) as purple powder.

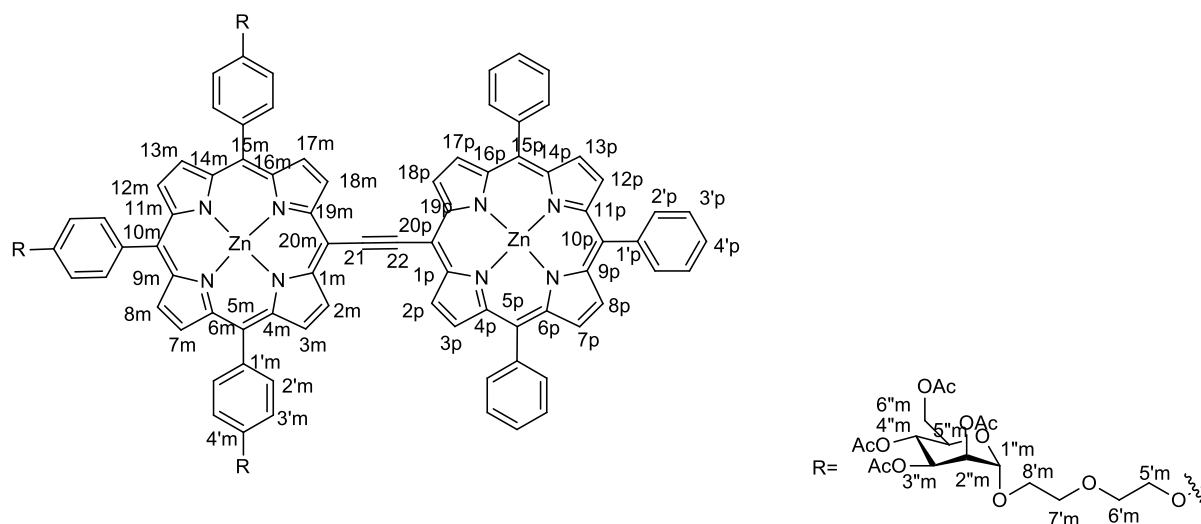
$\text{C}_{66}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{SiZn}$, MW = 1208.78 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 440.7 (457.5), 625 (30.0).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.66 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-2-18), 8.94 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-3-17), 8.80 (d, J = 3.8 Hz, 4H, H-7-8-12-13), 8.10 – 7.89 (m, 6H, H-2'), 7.16 – 6.99 (m, 6H, H-3'), 3.99 – 3.86 (m, 6H, H-5'), 3.61 – 3.44 (m, 6H, H-6'), 3.41 – 3.35 (m, 6H, H-7'), 3.33 – 3.25 (m, 6H, H-8'), 3.26 – 3.19 (m, 6H, H-9'), 3.19 – 3.11 (m, 6H, H-10'), 3.04 – 2.89 (m, 9H, H-11'), 0.41 (s, 9H, H-Si CH_3).

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158.28 (C4'), 153.47 (C-6-9-11-14), 151.14 (C4-16), 150.09 (C-1-19), 135.38 (C-2'), 133.44 (C-7-8-12-13), 132.31 (C-3-17), 131.71 (C-2-18), 123.75 (C-1'), 112.69 (C-3'), 100.32 (C-20), 96.34, 92.96, 90.10 (C-21-22-23-24), 71.52 (C-10'), 70.46 (C-9'), 70.25 (C-8'), 70.10 (C-7'), 69.53 (C-6'), 67.58 (C-5'), 58.72 (C-11'), 0.00 (C-Si CH_3).

MS MALDI-TOF: m/z =1206.45 $[\text{M}]^+$ (expected: 1206.44).



2-OAc

Compound **17** (100 mg, 0.05 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (16 ml) and THF (10 ml), then TBAF (0.14 ml, 0.15 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min, followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl_2 . The mixture was stirred for an additional 10 min, filtered, extracted with CH_2Cl_2 and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude intermediate combined with compound **22** (38.3 mg, 0.057 mmol, 1.13 equiv), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (7.9 mg, 0.009 mmol, 0.17equiv) and AsPh_3 (18 mg, 0.059 mmol, 1.17 equiv) was dried with under vacuum and degassed with argon for 30min. The reaction mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and dry Et_3N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated after which the crude product was dissolved in CH_2Cl_2 , washed with water, dried with MgSO_4 and filtered. After evaporating, the desired product **2-OAc** (60 mg, 45 %) was isolated by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1, v/v) and crystallization ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-heptane}$).

$\text{C}_{132}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{36}\text{Zn}_2$, MW = 2529.19 g.mol⁻¹

Elemental analysis: calc. C 62.68, H 4.94, N 4.43, found C 59.63, H 4.90, O 3.82. ($\text{C}_{132}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{36}\text{Zn}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: calc. C 59.71, H 5.24, N 4.22).

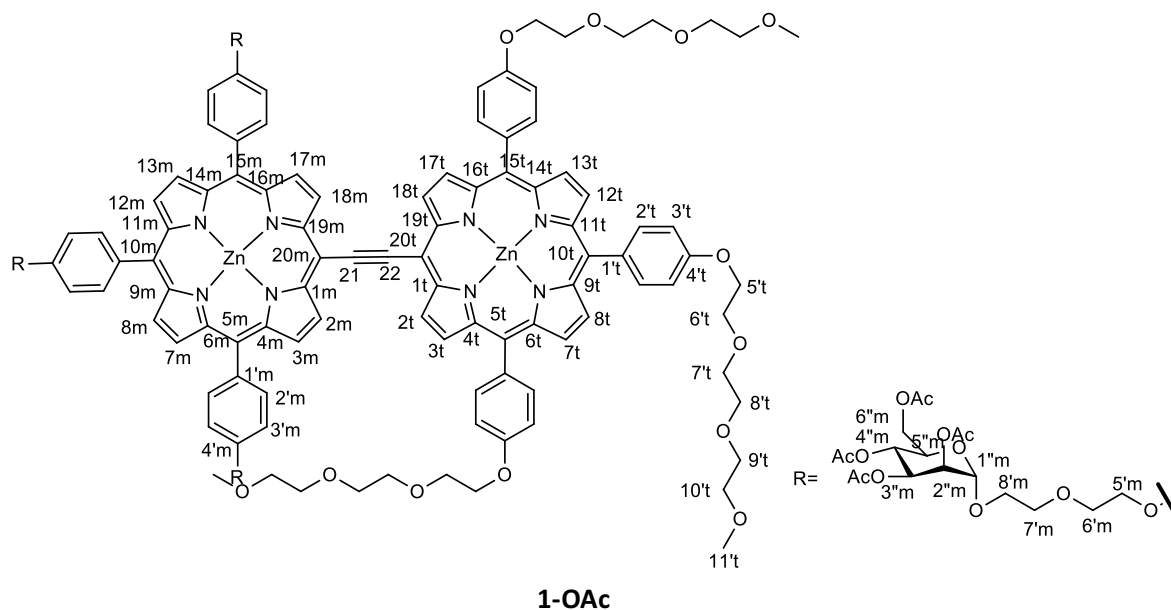
UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 419 (175.0), 483.2 (350.0), 706.5 (75.0).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.33 (d, J = 4.2 Hz, 2H, $\text{H}_{2\text{p}}\text{-18}_{\text{p}}$), 10.29 (d, J = 4.1 Hz, 2H, $\text{H}_{2\text{m}}\text{-18}_{\text{m}}$), 9.11 – 9.06 (m, 4H, $\text{H}_{3\text{m}}\text{-17}_{\text{m}}\text{-3}_{\text{p}}\text{-17}_{\text{p}}$), 8.85 – 8.78 (m, 8H, $\text{H}_{7\text{m}}\text{-8}_{\text{m}}\text{-12}_{\text{m}}\text{-13}_{\text{m}}$), 8.25 – 8.20 (m, 4H, $\text{H}_{2'\text{p}}\text{V}$), 8.16 – 8.13 (m, 2H, $2'\text{pH}$), 8.10 (d, J = 8.5 Hz, 4H, $\text{H}_{2'\text{m}}\text{V}$), 8.01 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $2'\text{mH}$), 7.79 – 7.69 (m, 9H, $\text{H}_{3'\text{p}}\text{-4}_{\text{p}}$), 7.26 – 7.19 (m, 6H, $\text{H}_{3'\text{m}}$), 5.42 – 5.33 (m, 3H, $\text{H}_{2''\text{m}}$), 5.32 – 5.20 (m, 6H, $\text{H}_{3''\text{m}}\text{-H}_{4''\text{m}}$), 4.90 (s, 3H, $\text{H}_{1''\text{m}}$), 4.34 – 4.21 (m, 9H, $\text{H}_{5''\text{m}}\text{-H}_{5'\text{m}}$),

4.16 – 4.05 (m, 6H, H6'_m), 3.97 – 3.91 (m, 6H, H7'_m), 3.88 – 3.82 (m, 3H, H6''_a_m), 3.81 – 3.65 (m, 9H, H6''_b_m, H8'_m), 2.10 (s, 9H, CH₃ acetyl), 2.04 (s, 9H, CH₃ acetyl), 1.98 (s, 9H, CH₃ acetyl), 1.93 (s, 9H, CH₃ acetyl).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.75-169.79 (C C=O acetyl), 158.47 (C4'_p-C4'_m), 152.79-149.88 (C1_p-4_p-6_p-9_p-11_p-14_p-16_p-19_p-1_m-4_m-6_m-9_m-11_m-14_m-16_m-19_m), 135.58 (C2'_p-2'_m), 134.54 (C3_p-17_p-3_m-17_m), 133.19 (C7_p-8_p-12_p-13_p-7_m-8_m-12_m-13_m), 132.04 (C2_p-18_p-2_m-18_m), 130.87 (C1'_p-C1'_m), 127.62 (C3'_p-C3'_m), 97.83 (C1''_m), 70.32-62.47 (C5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m), 20.92, 20.71 (CH₂ acetyl).

MS MALDI-TOF: m/z=2524.66 [M]⁺ (expected: 2524.67).



Compound **17** (100 mg, 0.05 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (16ml) et THF (10ml), then TBAF (0.14 ml, 0.15 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min, followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl₂. The mixture was stirred for an additional 10 min, filtered, extracted with CH₂Cl₂ and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO₄, filtered and evaporated. The crude intermediate combined with compound **14** (66 mg, 0.057 mmol, 1.13 equiv), Pd₂(dba)₃ (7.9 mg, 0.01 mmol, 0.17 equiv) and AsPh₃ (18 mg, 0.06 mmol, 1.17 equiv) was dried under vacuum and degassed with argon for 30 min. The reaction mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and dry Et₃N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated under reduced pressure after which the crude product was dissolved in CH₂Cl₂, washed with water, dried with MgSO₄ and filtered. After evaporating, the desired product **1-OAc** (50 mg, 33%) was isolated by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (99:3, v/v) and crystallization (CH₂Cl₂/n-heptane) as purple powder.

C₁₅₃H₁₆₆N₈O₄₈Zn₂, MW = 3015.74 g.mol⁻¹

Elemental analysis: calc. C 60.93, H 5.55, N 3.72, found C 59.11, H 5.39, O 3.37. (C₁₅₃H₁₆₆N₈O₄₈Zn₂ · 4H₂O : calc. C 59.51, H 5.68, N 4.63).

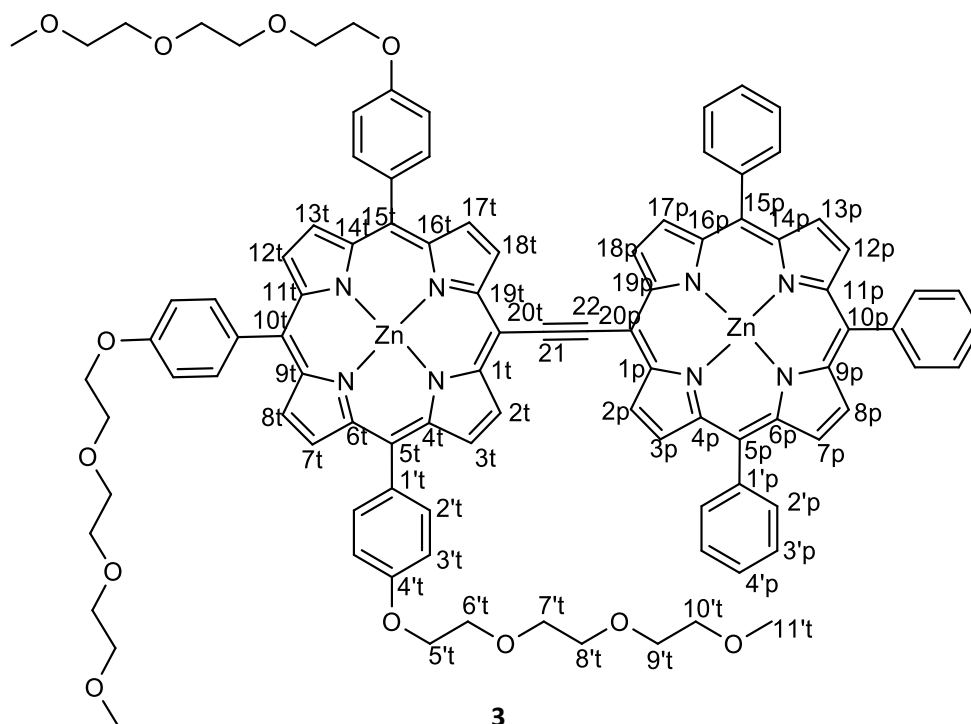
UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 430.5 (107.0), 483.7 (33.0), 705 (67.5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.62 – 10.34 (m, 4H, H-2_m-18_m-2_t-18_t), 9.20 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, H-3_m-17_m), 9.14 (d, 2H, H-3_t-17_t), 8.89 (s, 4H, H-7_m-8_m-12_m-13_m), 8.80 (s, 4H, H-7_t-8_t-12_t-13_t), 8.19 – 8.09 (m, 6H, H-2'_m), 8.08 – 8.02 (m, 4H, H-2'_t), 8.03 – 7.93 (m, 2H, H-2'_t), 7.32 – 7.28 (m, 2H, H-3'_m), 7.18 – 7.12 (m, 4H, H-3'_m), 7.08 – 7.03 (m, 2H, H-3'_t), 7.01 – 6.96 (m, 4H, H-3'_t), 5.50 – 5.11 (m, 9H, H-2''_m-3''_m-4''_m), 4.96 (s, 1H, H-1''_m), 4.77 (s, 2H, H-1''_m), 4.41 –

2.82 (m, 30H, H-5'-6'-7'-8'-9'-10'-5'-6'-7'-8'-5''-6''_m), 2.20 – 1.87 (m, 36H, H-CH₃ acetyl).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.74-170.03 (C-C=O acetyl), 169.89, 169.73 (C-4'_m-4'_t), 158.33-150.05 (C-1_m-4_m-6_m-9_m-11_m-14_m-16_m-19_m-1_t-4_t-6_t-9_t-11_t-14_t-16_t-19_t), 135.49 (C-2'_m-2'_t), 133.29 (C-3_m-17_m-3_t-17_t), 132.13 (C-7_m-8_m-12_m-13_m-7_t-8_t-12_t-13_t), 122.50 (C-2_m-18_m-2_t-18_t), 112.76 (C-1'_m-1'_t), 97.84, 97.70 (C-1''_m), 71.15-62.38 (C-5'-6'-7'-8'-9'-10'-5'-6'-7'-8'-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m), 58.46 (C-11''_t), 20.86, 20.71, 20.66 (C-CH₃ acetyl).

MS MALDI-TOF: m/z=3010.96 [M]⁺ (expected: 3010.94).



Compound **15** (50 mg, 0.04 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (15ml) et THF(9ml), and then TBAF (0.12 ml, 0.11 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl₂. The mixture was stirred for an additional 10 min, filtered, extracted with CH₂Cl₂ and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO₄, filtrated and evaporated. The crude intermediate combined with compound **22** (32.3 mg, 0.048 mmol, 1.13 equiv), Pd₂(dba)₃ (6.6 mg, 0.007 mmol, 0.17 equiv) and AsPh₃ (15 mg, 0.049 mmol, 1.17 equiv) was dried with under vacuum and degassed with argon for 30 min. The reaction mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and Et₃N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated under reduced pressure after which the crude product was dissolved in CH₂Cl₂, washed with water, dried with MgSO₄ and filtered. After evaporating, the desired product **3** (47 mg, 65%) was isolated as purple powder by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v) and crystallization (CH₂Cl₂/n-heptane).

C₉₉H₈₈N₈O₁₂Zn₂, MW = 1712.56 g.mol⁻¹

Elemental analysis: calc. C 69.43, H 5.18, N 6.54, found C 67.28, H 5.29, O 5.98. (C₉₉H₈₈N₈O₁₂Zn₂ · 3H₂O: calc. C 67.31 H 5.36 N 6.34).

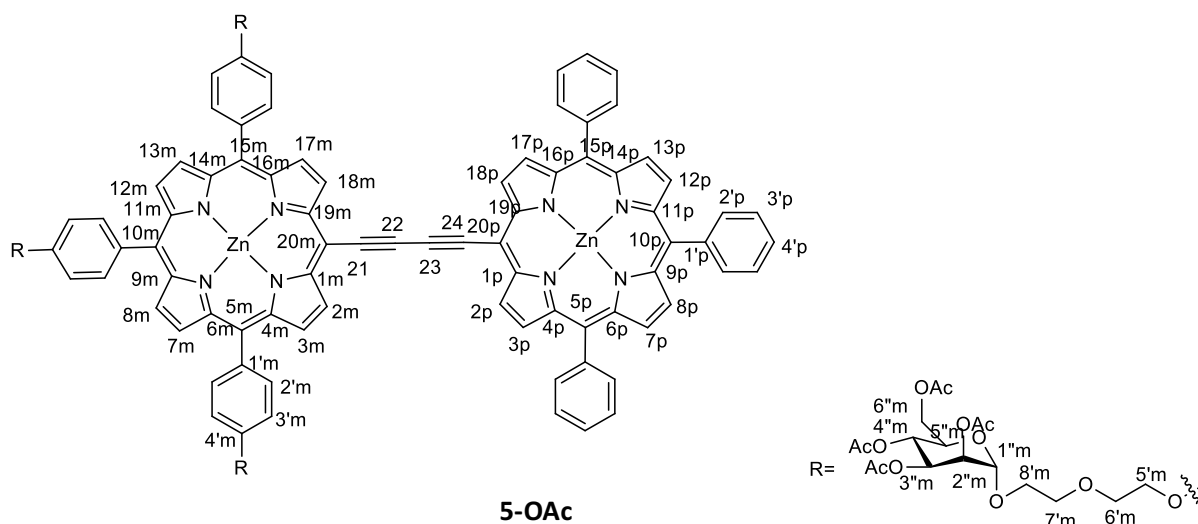
UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 424.7 (97.5) , 482.7 (177.5), 704.2 (37.5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.34 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H-2_p-18_p), 10.26 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, H-2_t-18_t), 9.12 – 9.07 (m, 2H, H-3_p-17_p), 9.00 – 8.91 (m, 2H, H-3_t-17_t), 8.86 – 8.80 (m, 4H, H-7_p-8_p-

12_p-13_p), 8.70 – 8.57 (m, 4H, H-7_t-8_t-12_t-13_t), 8.25 – 8.14 (m, 6H, H-2'_p), 7.97 – 7.81 (m, 6H, H-2'_t), 7.75 – 7.62 (m, 9H, H-3'_p-4'_p), 6.88 – 6.78 (m, 4H, H-3'_t), 3.89-2.64 (m, 36H, H-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 2.27 (s, 9H, H-11'_t).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.15 (C-4'_p-4'_t), 150.63-149.86 (C-1_p-4_p-6_p-9_p-11_p-14_p-16_p-19_p-1_t-4_t-6_t-9_t-11_t-14_t-16_t-19_t), 135.77-135.07 (C-2'_p-2'_t), 133.18-130.44 (C-2_p-3_p-7_p-8_p-12_p-13_p-17_p-18_p-2_t-3_t-7_t-8_t-12_t-13_t-17_t-18_t), 128.28 (C-1'_p-1'_t), 125.55 (C-3'_p-3'_t), 122.55, 122.25, 121.79 (C-5_p-10_p-15_p-5_t-10_t-15_t), 112.53 (C-20_p-20_t), 102.64, 101.45 (C-21-22), 70.96-69.15 (C-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 58.47 (C-11'_t).

MS MALDI-TOF: m/z=1708.52 [M]⁺(expected: 1708.51).



Compound **23** (97 mg, 0.05 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (16ml) et THF (10ml), then TBAF (0.14 ml, 0.12 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min, followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl_2 . The mixture was stirred for an additional 10 min, filtered and extracted with CH_2Cl_2 and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude intermediate combined with compound **22** (37 mg, 0.054 mmol, 1.13 equiv), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (7.5 mg, 0.008 mmol, 0.17 equiv) and AsPh_3 (17.2 mg, 0.056 mmol, 1.17 equiv) was dried under vacuum and degassed with argon for 30 min. The reaction mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and dry Et_3N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated after which the crude product was dissolved in CH_2Cl_2 , washed with water, dried with MgSO_4 and filtered. After evaporating, the desired product **5-OAc** (30 mg, 25 %) was isolated by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1, v/v) and crystallization ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-heptane}$) as purple solid.

$\text{C}_{134}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{36}\text{Zn}_2$, MW = 2553.21 g.mol⁻¹

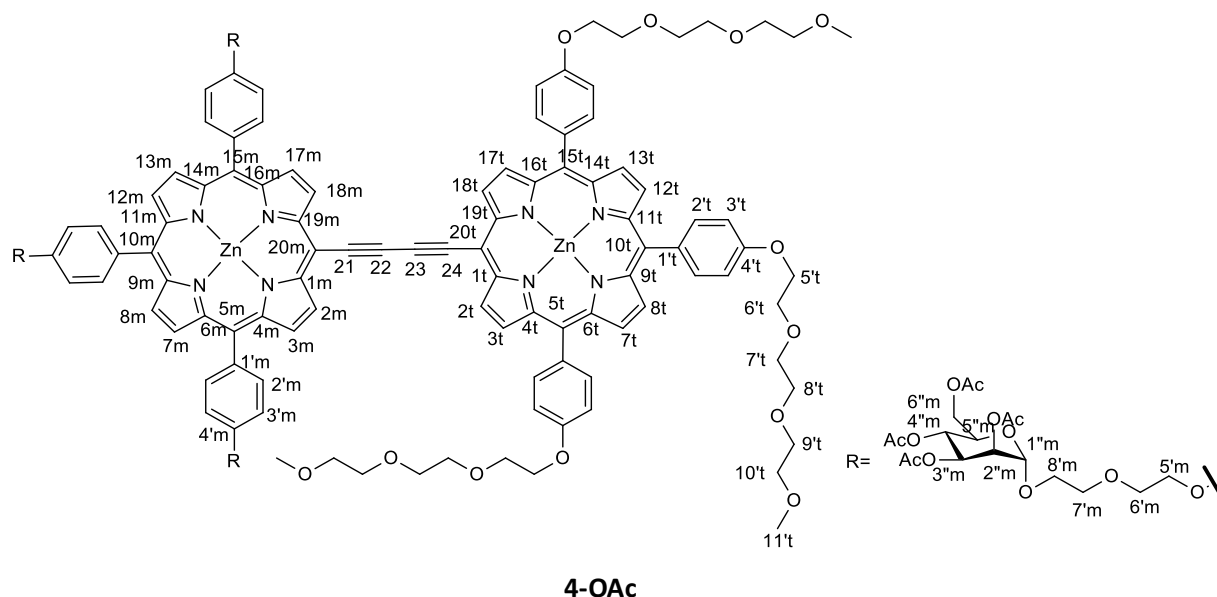
UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 425.4 (164.5), 452.5 (290.1), 484 (150.3), 640.1 (7.0), 691.2 (50.0).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 9.96 (d, J = 4.4 Hz, 2H, H-2_m-18_m), 9.71 (d, J = 4.0 Hz, 2H, H-2_p-18_p), 9.04 (d, J = 4.5 Hz, 2H, H-3_m-17_m), 8.95 – 8.73 (m, 10H, H-3_p-17_p-7_m-8_m-12_m-13_m-7_p-8_p-12_p-13_p), 8.31 – 8.14 (m, 6H, H-2'_p), 8.07 (s, 6H, H-2'_m), 7.77 (d, J = 3.3 Hz, 9H, H-3'_p-4'_p), 6.99 (s, 6H, H-3'_m), 5.61 – 5.15 (m, 9H, H-2''-3''-4''), 5.00 (m, 1H, H-1''H), 4.61 (m, 2H, H-1''V), 4.44 -3.55 (H-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-5''-6''), 2.20 – 1.84 (m, 36H, H-CH₃ acetyl).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.74-169.78 (C-C=O acetyl), 158.41 (C-4'_p-4'_m), 155.32-149.95 (C-1_p-4_p-6_p-9_p-11_p-14_p-16_p-19_p-1_m-4_m-6_m-9_m-11_m-14_m-16_m-19_m), 135.77 (C-2'_p-2'_m), 135.11-132.32 (C-2_p-3_p-7_p-8_p-12_p-13_p-17_p-18_p-2_m-3_m-7_m-8_m-12_m-13_m-17_m-18_m), 128.27 (C-1'_p-

1'_m), 127.66 (C-3'_p-3'_t), 122.41 (C-5_p-10_p-15_p-5_m-10_m-15_m), 112.80 (C-20_p-20_m), 97.79 (C-21-22-23-24), 70.20-62.45 (C-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m), 21.20-, 20.71 (C-CH₃ acetyl).

MS MALDI-TOF: m/z=2548.67 [M]⁺ (expected: 2548.67).



Compound **23** (50 mg, 0.025 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 ml) et THF (6 ml), then TBAF (0.07 ml, 0.07 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl_2 . The mixture was stirred for an additional 10 min, filtered, extracted with CH_2Cl_2 and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude intermediate combined with compound **14** (33 mg, 0.028 mmol, 1.13 equiv), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (4 mg, 0.005 mmol, 0.17 equiv) and AsPh_3 (9 mg, 0.029 mmol, 1.17 equiv) was dried under vacuum and degassed with argon for 30 min. The mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and dry Et_3N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated after which the crude product was dissolved in CH_2Cl_2 , washed with water, dried with MgSO_4 and filtered. After evaporating, the desired purple product **4-OAc** (21 mg, 28 %) was isolated by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1, v/v) and crystallization ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-heptane}$).

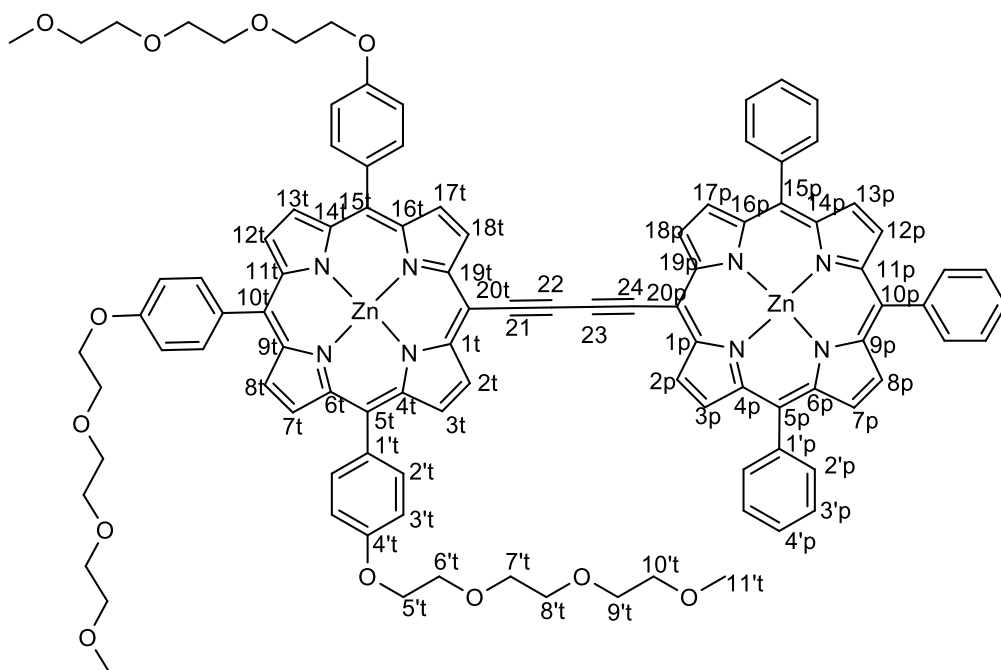
$\text{C}_{155}\text{H}_{166}\text{N}_8\text{O}_{48}\text{Zn}_2$, MW = 3039.76 g.mol⁻¹

UV-vis in CH_2Cl_2 : λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 425.9 (144.7), 453.2 (212.5), 484.7 (115.2), 688.2 (37.5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.13 – 9.73 (m, 2H, H-2_m-18_m), 9.59 – 9.35 (m, 2H, H-2_t-18_t), 9.04 – 8.89 (m, 2H, H-3_m-17_m), 8.84 – 8.63 (m, 8H, H-7_m-8_m-12_m-13_m-7_t-8_t-12_t-13_t), 8.67 – 8.57 (m, 2H, H-3_t-17_t), 8.14 – 7.97 (m, 8H, H-2'_mV-2'_tV), 7.94 – 7.79 (m, 4H, H-2'_mH-2'_tH), 7.18 – 7.08 (m, 8H? H-3'_mV-3'_tV), 7.03 (s, 2H? H-3'_mH-3'_tH), 5.25 (t, J = 12.6 Hz, 9H, H-2''_m-3''_m-4''_m), 4.91 (s, 1H, H-1''_mH), 4.81 (s, 2H, H-1''_mV), 4.38– 3.22 (69H, H, H-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-5''_m-6''_m-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 3.14 (s, 6H, H-11'_tH), 3.01 (s, 3H, H-11'_tV), 2.19 – 1.82 (m, 36H, H-CH₃ acétyl).

^{13}C NMR (73.3 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 170.08, 168.94 (C-C=O acetyl), 157.23 (C-4'_m-4'_t), 150.40, 149.00 (C-1_m-4_m-6_m-9_m-11_m-14_m-16_m-19_m-1_t-4_t-6_t-9_t-11_t-14_t-16_t-19_t), 134.71 (C-2'_m-2'_t), 133.81 (C-7_m-8_m-12_m-13_m-7_t-8_t-12_t-13_t), 132.08 (C-2_m-18_m-2_t-18_t), 129.23 (C-3_m-18_m-3_t-17_t), 120.14 (C-1'_m-1'_t), 112.10 (C-3'_m-3'_t), 104.73 (C-5_m-10_m-15_m-5_p-10_p-15_p), 97.01 (C-1''_m), 90.47 (C-20_m-20_p), 88.75 (C-21-22-23-24), 72.22, 69.36, 69.07, 68.75, 67.34, 66.72, 65.08, 61.63 (C-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-5''_m-6''_m-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 57.66 (C-11'_t), 19.96 (C-CH₃ acétyl).

MS MALDI-TOF: $m/z=3035.05$ $[\text{M}]^+$ (expected: 3034.94).



6

Compound **24** (50 mg, 0.04 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ (15 ml) et THF (9 ml), then TBAF (0.12 ml, 0.11 mmol, 2.6 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min, followed by addition of a spatula of anhydrous CaCl₂. The mixture was stirred for 10 min, filtered, extracted with CH₂Cl₂ and then washed three times with water. The organic phase was dried with MgSO₄, filtered and evaporated. The crude intermediate combined with compound **22** (32.3 mg, 0.047 mmol, 1.13 equiv), Pd₂(dba)₃ (6.4 mg, 0.007 mmol, 0.17 equiv) and AsPh₃ (15 mg, 0.049 mmol, 1.17 equiv) was dried under vacuum and degassed with argon for 30 min. The mixture was dissolved in dry THF (20 ml) and dry Et₃N (4 ml) under argon. The solution was degassed with argon for an additional 10 min and stirred at 40 °C for 20 h. The solvents were evaporated after which the crude product was dissolved in CH₂Cl₂, washed with water, dried with MgSO₄ and filtered. After evaporating, the desired purple product **6** (15 mg, 21 %) was isolated by column chromatography on silica gel using CH₂Cl₂/MeOH (99:1, v/v) and crystallization (CH₂Cl₂/n-heptane).

C₁₀₁H₈₈N₈O₁₂Zn₂, MW=1736.59 g.mol⁻¹

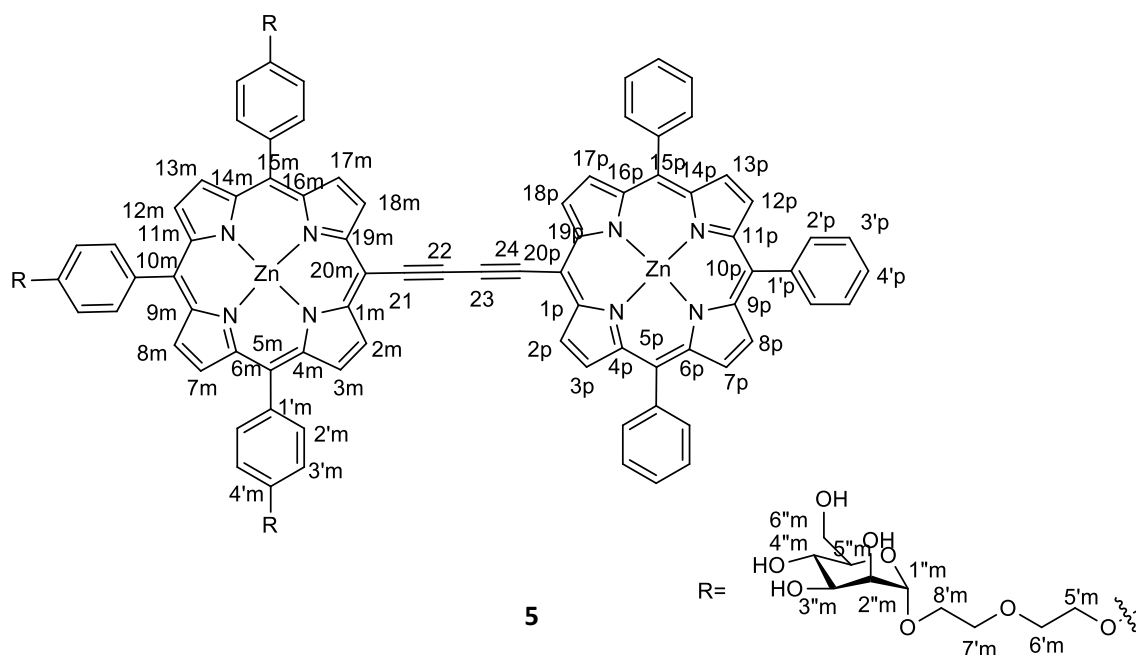
UV-vis in CH₂Cl₂: λ_{max} nm (ε mM⁻¹.cm⁻¹): 425.4 (164.5), 452.5 (290.3), 484 (197.5), 691.2 (60.2)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 9.93 (d, J = 4.3 Hz, 2H, H-2_p-18_p), 9.17 – 9.12 (m, 2H, H-2_t-18_t), 9.01 (d, J = 4.4 Hz, 2H, H-3_p-17_p), 8.85 (s, 4H, H-7_p-8_p-12_p-13_p), 8.82 – 8.68 (m, 4H, H-7_t-8_t-12_t-13_t), 8.39 (s, 2H, H-3_t-17_t), 8.24 – 8.16 (m, 6H, H-2'_p), 8.01 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-2'_tH), 7.84 (d, J = 7.2 Hz, 4H, H-2'_tV), 7.78 – 7.70 (m, 9H, H-3'_p-4'_p), 7.11 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-3'_tH),

6.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, H-2'_tV), 4.12 – 2.97 (m, 36H, H-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 2.90 (s, 9H, H-11'_t).

¹³C NMR (73.3 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 157.80 (C-4'_p-4'_t), 153.42-142.69 86 (C-1_p-4_p-6_p-9_p-11_p-14_p-16_p-19_p-1_t-4_t-6_t-9_t-11_t-14_t-16_t-19_t), 135.43 (C-2'_p), 134.56 (C-2'_t), 133.19 (C-3_p-17_p-3_t-17_t), 132.34-131.71 (C-7_p-8_p-12_p-13_p-7_t-8_t-12_t-13_t), 130.87 (C-2_p-18_p-2_t-18_t), 127.52 (C-1'_p-1'_t), 126.64 (C-3'_t-3'_t), 122.22-121.61 (C-5_p-10_p-15_p-5_t-10_t-15_t), 112.42 (C-20_p-20_t), 103.65-96.97 (C-21-22-23-24), 71.32-58.57 (C-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 58.35 (C-11'_t).

MS MALDI-TOF: $m/z=1732.57$ [M]⁺ (expected: 1732.51).



Three or four drops of freshly prepared sodium methoxide solution in dry MeOH(0.1Mm) was added dropwise to a solution of compound **5-OAc** (25 mg) in dry THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. IWT@ion exchange resin (700 mg) was added, and then the mixture was stirred carefully for 30 min, filtered, washed with a mixture of pyridine and MeOH (1:1, v/v). After evaporating, the desired product **5** (16 mg, 80%) was isolated as a brown solid and used without other purification.

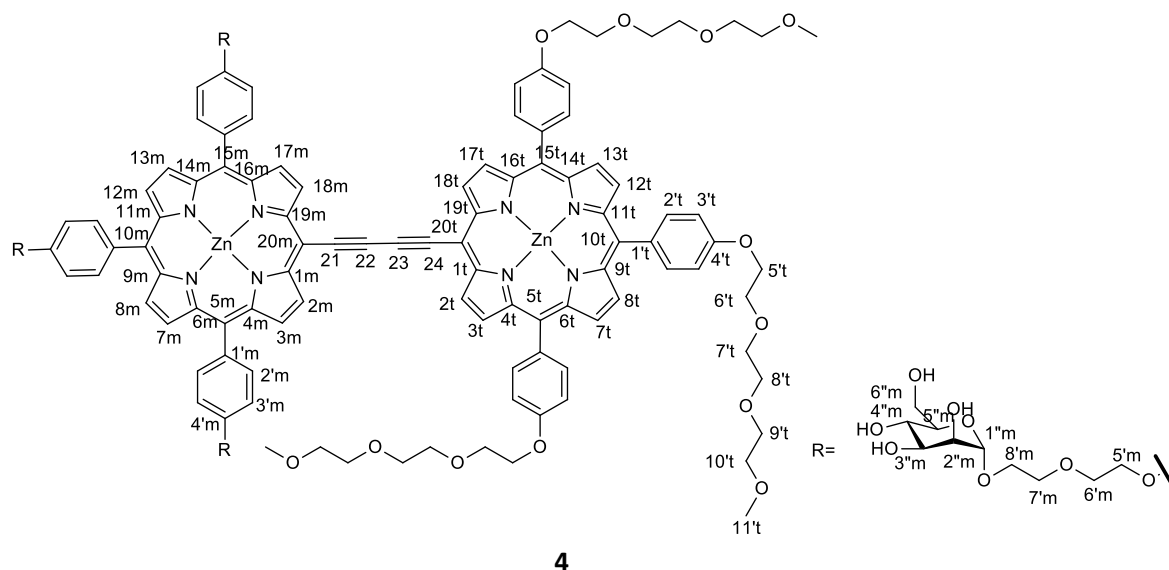
$C_{110}H_{100}N_8O_{24}Zn_2$, MW = 2048.77 g.mol⁻¹

UV-vis in MeOH/pyridine, 24/1, v/v: λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 424.9 (79.25) , 451 (130.1), 463.4 (22.6) , 481.7 (100.0), 699.2 (32.5).

¹H NMR (300 MHz, pyridine d₅) δ (ppm): 10.39 – 10.23 (m, 4H, H-2_m-18_m-2_p-18_p), 9.36 (d, J = 4.3 Hz, 2H, H-3_m-17_m), 9.26 (d, J = 4.4 Hz, 2H, H-3_p-17_p), 9.20 – 9.11 (m, 4H, H-7_m-8_m-12_m-13_m), 9.08 – 8.91 (m, 4H, H-7_p-8_p-12_p-13_p), 8.40 – 8.31 (m, 6H, H-2'_m), 8.26 (d, J = 8.0 Hz, 6H, H-2'_p), 7.81 – 7.70 (m, 6H, H-3'_m), 7.56 – 7.46 (m, 9H, H-3'_p-4'_p), 5.50 (s, 3H, H-1''_m), 5.18 – 4.91 (m, 12H, H-7''_m), 4.68-3.82 (m, 54H, H-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m).

¹³C NMR (75 MHz, pyridine d₅) δ (ppm): 168.40 (C-4'_m-4'_p), 159.66 (C-1'_m), 154.48 (C-1_m-4_m-16_m-19_m-1_p-4_p-16_p-19_p), 152.31, 151.85 (C-5_m-6_m-9_m-10_m-11_m-14_m-15_m-5_p-6_p-9_p-10_p-11_p-14_p-15_p), 147.01 (C-1'_p), 135.32 (C-2'_m-2'_p), 133.79, 133.62 (C-3_m-17_m-3_p-17_p), 132.89, 132.76, 132.63 (C-7_m-8_m-12_m-13_m-7_p-8_p-12_p-13_p), 131.98 (C-2_m-18_m-2_p-18_p), 129.76, 129.50, 129.34 (C-3'_m-3'_p-4'_p), 113.78 (C-20_m-20_p), 102.48 (C-1''_m), 98.41, 97.59 (C-21-22-23-24) 75.97, 73.58, 72.64, 71.37, 70.53, 69.73, 68.64, 67.49, 63.76 (C-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m).

MS MALDI-TOF: m/z=2044.55 [M]⁺ (expected: 2044.54)



Three or four drops of freshly prepared sodium methoxide solution in dry MeOH(0.1mM) was added dropwise to a solution of **4-OAc** (20 mg) in dry THF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. IWT@ion exchange resin (700mg) was added, and then the mixture was stirred carefully for 30 min, filtered, washed with a mixture of pyridine and MeOH (1:1, v/v). After evaporating, the desired product **4** (13 mg, 78%) was isolated as a brown solid and used without purification.

$C_{131}H_{142}N_8O_{36}Zn_2$, MW = 2535.32 g.mol⁻¹

UV-vis in MeOH/pyridine, 24/1, v/v: λ_{max} nm (ϵ mM⁻¹.cm⁻¹): 426.4 (118.8), 452 (165.1), 472.5 (115.0) , 644.6 (26.5), 700.5 (40.0).

¹H NMR (300 MHz, pyridine d₅) δ (ppm): 12.04 – 11.64 (m, 4H, H-2_m-18_m-2_t-18_t), 11.06 – 10.81 (m, 4H, H-3_m-17_m-3_t-17_t), 10.71 – 10.51 (m, 8H, H-7_m-8_m-12_m-13_m-7_t-8_t-12_t-13_t), 9.85 – 9.68 (m, 10H, H-2'_m-H-2'_t), 9.47 – 9.25 (m, 2H, H-2'_t), 8.99 – 8.80 (m, 12H, H-3'_m-3'_t), 7.00 (s, 3H, H-1''_m), 6.23 – 4.89 (H-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-2''_m-3''_m-4''_m-5''_m-6''_m-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 4.79 (s, 9H, H-11'_t).

¹³C NMR (75 MHz, pyridine d₅) δ (ppm): 169.91 (C-4'_m-4'_t), 161.17 (C-1_m-4_m-16_m-19_m-1_t-4_t-16_t-19_t), 155.99, 153.80, 152.85 (C-6_m-9_m-11_m-14_m-6_t-9_t-11_t-14_t), 136.80 (C-2_m-18_m-2_t-18_t), 135.12 (C-3_m-17_m-3_t-17_t), 133.49 (C-7_m-8_m-12_m-13_m-7_t-8_t-12_t-13_t), 131.27 (C-1'_m-1'_t), 115.30 (C-3'_m-3'_t), 110.45(C-5_m-10_m-15_m-5_t-10_t-15_t), 103.98 (C-1''_m), 88.82 (C-5_m-10_m-15_m-5_t-10_t-15_t), 77.46 (C-5'_m), 75.07, 74.28, 74.14, 73.16, 72.97, 72.79, 72.10, 71.19, 70.15, 68.99 (C-5'_m-6'_m-7'_m-8'_m-5''_m-6''_m-5'_t-6'_t-7'_t-8'_t-9'_t-10'_t), 65.23 (C-11'_t), 60.64 (C-2''_m-3''_m-4''_m).

MS MALDI-TOF: m/z= 2530.86 [M]⁺ (expected: 2530.81).

Matériaux

Le phospholipide 1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (SOPC, 99% pure, $M = 788,14$ g/mol) est fourni par Instruchemie (Delfzijl, The Netherlands). La concanavaline A (Con A, type IV, $M = 25500$ g/mol par monomère), l'HEPES (99,5% pur, $M = 238,31$ g/mol), le D(+)-saccharose (99,5% pur, $M = 342,30$ g/mol), le D-(+)-glucose (99,5% pur, $M = 180,16$ g/mol), le chlorure de sodium (NaCl, 99% pur, $M = 58,44$ g/mol), le chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 98% pur, $M = 147,02$ g/mol) et le chlorure de nickel (II) ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98% pur, $M = 237,69$ g/mol) proviennent de SIGMA (Saint-Louis, USA). La pyridine, le méthanol et le chloroforme (99% pure) de qualité analytique proviennent de Merck (Germany). L'eau ultra pure ($\gamma = 72,2$ mN/m à 22°C , résistivité = $18,2$ M Ω .cm) produite au laboratoire par un appareil Milli-Q Direct 8 de Millipore est utilisée dans toutes les expériences. Avant utilisation, toute la verrerie est nettoyée pendant une heure dans une solution détergente chaude de TFD4 (Franklab) fraîchement préparée (15 % v/v), puis rincée plusieurs fois à l'eau tiède et froide, ainsi qu'à l'eau Milli-Q avant d'être séchée à l'étuve.

Le tampon aqueux (pH 6,5) est constitué d'HEPES (10 mM), de NaCl (150 mM), de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mM), et de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mM). La présence d'ions divalents (Ca^{2+} et Ni^{2+}) est nécessaire pour l'activité de la Con A.

Monocouches de Langmuir

Le comportement interfacial des porphyrines dimères a été analysé par des mesures de tension à surface constante par un tensionmètre et dans des conditions dynamiques de compression à l'aide d'une balance à film de Langmuir.

Le caractère tensioactif et la stabilité des porphyrines à l'interface ont été déterminées par des mesures de tension superficielle après dépôts de petits volumes de solution de porphyrines dissoutes dans un mélange de chloroforme/méthanol/pyridine (60:38:2 v/v/v). La tension superficielle est enregistrée en fonction du temps pendant 18 h, à l'aide d'un tensiomètre Krüss K10 (Allemagne), par la méthode de la lame de Wilhelmy.^{274,310} Pour

maintenir un niveau constant de liquide et éviter une dérive de la tension superficielle pendant la mesure, toutes les expériences sont effectuées à 22°C sous pression de vapeur saturante, pour minimiser l'évaporation de l'eau au cours du temps. Les cellules de mesure contenant les monocouches de porphyrine sont tenues à l'abri de la lumière. La valeur de la tension de surface rapportée correspond à la moyenne de deux mesures indépendantes, au moins. L'incertitude expérimentale est estimée à 0,2 mN/m. La pression de surface est déduite à partir de la relation $\pi = \gamma_0 - \gamma$, dans laquelle γ_0 est la tension superficielle de l'eau (72,8 mN/m à 20°C) et γ , la tension superficielle mesurée en présence de la monocouche.

Les isothermes de compression sont réalisées à l'aide d'une balance de Langmuir (Bioline, Finlande) à double-barrière de compression. Avant chaque expérience, la surface du tampon est nettoyée par succion, à l'aide d'une pipette capillaire connectée à une pompe à vide. Les monocouches de porphyrine, de Sopc et de leur mélange (Sopc : porphyrine dimère 9 :1 mol/mol) sont déposées à l'aide d'une micropipette à la surface de la solution tampon. Après 15 minutes de repos pendant lesquelles le solvant s'évapore, les monocouches sont comprimées à la vitesse de 5 Å²/molécule.min à 22°C. Le résultat présenté est la valeur moyenne d'au moins deux mesures.

Le module de compressibilité (K) des monocouches est calculé à partir des données des isothermes en appliquant l'équation 12 : ²⁸²

$$K = -A \frac{d\pi}{dA} \text{ (Équation 12)}$$

L'énergie libre de mélange ΔG^M est calculée selon l'équation 13 :

$$\Delta G^M = \Delta G^{EXC} + \Delta G^{IDEAL} \text{ (Équation 13)}$$

avec ΔG^{EXC} l'excès d'énergie libre et ΔG^{IDEAL} l'énergie libre de mélange pour un mélange idéal où R est la constante des gaz parfaits et T est la température absolue.

$$\Delta G^{EXC} = \int_0^\pi \Delta A^{EXC} d\pi \text{ (Équation 14)}$$

et

$$\Delta G^{IDEAL} = RT(X_L \ln X_L + X_P \ln X_P) \quad (\text{Équation 15})$$

avec X_L et X_P , les fractions molaires du phospholipide et de la porphyrine, respectivement.

Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés par la méthode de Bangham, suivie de l'extrusion des vésicules à travers des membranes cellulosiques.^{310 311 312} Pour préparer des liposomes de SOPC seule, la solution de phospholipide dans le mélange chloroforme/méthanol (9:1 v/v) est séchée pendant 3 h sous pression réduite. Le film mixte obtenu est ensuite réhydraté par la solution tampon. La suspension de lipides est extrudée 15 fois à travers des membranes cellulosiques de taille de pore 200 nm, à une température 40°C (Mini-extruder, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Pour former des liposomes de SOPC-porphyrine, la porphyrine est dissoute dans le mélange chloroforme/méthanol (9:1 v/v), en même temps que le lipide. Après évaporation du solvant et réhydratation du film, la suspension de mélange de SOPC-porphyrine est extrudée dans les conditions décrites plus haut.

DLS

Le diamètre des liposomes formés par extrusion a été mesuré en utilisant un Zetasizer (Nano ZS90, Malvern). Les mesures ont été effectuées après dilution de la suspension des liposomes avec de l'eau déminéralisée. Pour évaluer l'agrégation des liposomes en présence de Concanavaline A, 0,5 ml de suspension de liposomes de SOPC (2 mM) portant ou ne portant pas les porphyrines est laissée en contact avec une solution de Con A (0,5 mg/ml) pendant 1 h à température ambiante. Les diamètres des vésicules sont mesurés avant et après l'addition de Con A. Toutes les mesures sont effectuées à 25°C.

Détermination du coefficient de partage des porphyrines entre la phase aqueuse et la bicouche phospholipidique

Les porphyrines ont été conservées à l'abri de la lumière, dans une solution mère de chloroforme/méthanol/pyridine (60:38:2 v/v/v) à la concentration de 10^{-3} M puis diluées jusqu'à 10^{-5} M dans le mélange chloroforme/méthanol (9:1 v/v). 10 μ l de la solution porphyrine est ajouté à 990 μ l de suspension SOPC avec des concentrations croissantes en phospholipide. La concentration finale de porphyrine est de 10^{-7} M et le rapport porphyrine/phospholipide varie entre 0 et 2000. Après agitation, le mélange est conservé à 37°C, à l'abri de lumière, pendant 36 h avant les mesures.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à 37°C en utilisant un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Agilent Technologies). L'excitation est réalisée au maximum de la bande (485 nm). Les mesures sont enregistrées à température ambiante avec des solutions de DO < 0,1 pour éviter la ré-absorption de la lumière émise.

Le coefficient de partage des porphyrines entre la phase aqueuse et la bicouche liposomale est déterminé à partir l'enregistrement des spectres d'émission des porphyrines incubées avec les suspensions de liposomes à différentes concentrations de lipide.^{313 302,314}

Le coefficient de partage K_p est la constante d'équilibre de l'équation 16 :

$$K_p = (P_b/L)/(P_f/W) \quad (\text{Équation 16})$$

Où P_b , P_f , L , et W sont, respectivement, les concentrations molaires de la porphyrine incubée avec les liposomes, de la porphyrine libre, du phospholipide et de l'eau. La porphyrine analysée ne fluoresce pas dans l'eau, donc l'intensité de la fluorescence F dans les liposomes

est proportionnelle à la concentration de porphyrine incubée avec les liposomes selon la relation donnée par l'équation 17 :

$$F = \alpha \cdot P_b \text{ (Équation 17)}$$

où α est une constante proportionnelle. En considérant que la concentration totale de porphyrine est $P = P_b + P_f$, l'insertion de l'équation 17 dans l'équation 16 et le réarrangement de l'équation 16 donnent l'équation 18 :

$$F = F_0 \cdot L / (W/K_p + L) \text{ (Équation 18)}$$

Où $F_0 = \alpha \cdot P$ est l'intensité maximale de fluorescence lorsque toutes les molécules de porphyrines sont insérées dans les liposomes. W est la concentration molaire de l'eau dans les liposomes, considérée comme l'eau pure (i.e. $W = 55,6 \text{ M}$), et l'équation 18 peut être écrite sous forme des équations 19 ou 20 :

$$F = F_0 \cdot L / (55,6/K_p + L) \text{ (Équation 19)}$$

ou

$$1/F = [55,6/(K_p \cdot F_0)] \cdot (1/L) + 1/F_0 \text{ (Équation 20)}$$

Le coefficient de partage est obtenu à partir de la fluorescence des porphyrines F_0 , par titration des liposomes de SOPC jusqu'à la saturation. La relation entre l'inverse réciproque de la fluorescence et la concentration du phospholipide doit être linéaire.

Préparation de vésicules unilamellaires géantes (GUV)

Des GUV de diamètre variant entre 10 et 100 μm ont été préparées par la méthode d'électroformation.³¹⁵ Quelques dizaines de microlitres de solution de SOPC ou de mélange SOPC-porphyrine dissous dans le mélange de chloroforme/méthanol (9:1 v/v) sont prélevés à l'aide d'une micro-seringue en verre et déposés sur deux lames de verre métallisées à l'oxyde d'indium-étain (Indium Tin Oxide, ITO) portant chacune une électrode. Chaque dépôt de goutte est effectué après évaporation du solvant du précédent dépôt. Ensuite, une pâte modulable (Vitrex, Danemark) est utilisée pour sceller les deux lames de verre ITO en vis-à-vis, de façon à former une chambre fermée d'environ 0,5 ml de volume (**Figure 77**). Cette chambre est remplie avec une solution de saccharose (200 mM), en veillant à éviter la formation de bulles d'air. Enfin, les deux électrodes sont branchées à un générateur de tension d'une amplitude de 1,5 V et d'une fréquence de 10 Hz pendant 2 h, puis la suspension de vésicules géantes formées dans la chambre est collectée par aspiration à l'aide d'une pipette à piston. La formation des vésicules géantes est vérifiée à l'aide d'un microscope droit Zeiss AxioScope, muni d'une caméra JENOPTIK ProgRes® MFcool.

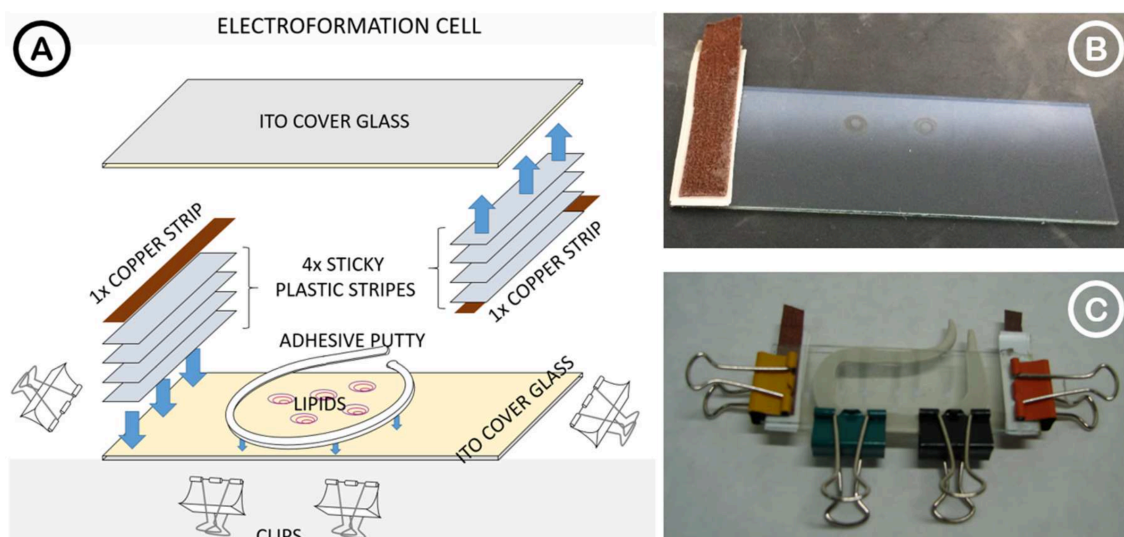


Figure 77. A) Le montage permettant de fabriquer les vésicules géantes ; B) Les dépôts de solution sur une lame de verre ITO ; C) La chambre d'électroformation des GUV.³¹⁶

Bibliographie

1. Daniell, M. D. & Hill, J. S. A history of photodynamic therapy. *Aust. N.Z. J. Surg.* **61**, 340–348 (1991).
2. Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **74**, 656–669 (2001).
3. Spikes, J. D. in *Primary Photo-Processes in Biology and Medicine* (eds. Bensasson, R. V., Jori, G., Land, E. J. & Truscott, T. G.) 209–227 (Plenum Press, New York, 1985).
4. Finsen, N. R. *Phototherapy*. (Edward Arnold, London, 1901).
5. Raab, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitung Biol.* **39**, 524–526 (1900).
6. Polieard, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C. R. Soc. Biol.* **91**, 1423–1424 (1924).
7. Lipson, R. L. & Baldes, E. J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol.* **82**, 508–516 (1960).
8. Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl Cancer Inst.* **26**, 1–11 (1961).
9. Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Gray, M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer* **20**, 2255–2257 (1967).
10. Lipson, R. L., Baldes, E. J. & Olsen, A. M. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **42**, 623–629 (1961).
11. Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R. & Boyle, D. G. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl Cancer Inst.* **55**, 115–121 (1975).
12. Dougherty, T. J. & Mang, T. S. Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component*. *Photochem. Photobiol.* **46**, 67–70 (1987).
13. Macdonald, I. J. & Dougherty, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **05**, 105–129 (2001).
14. Sternberg, E. D., Dolphin, D. & Brückner, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **54**, 4151–4202 (1998).
15. Moan, J. & Peng, Q. An outline of the history of PDT. <http://pubs.rsc.org> 1–18 (2007). doi:10.1039/9781847551658-00001
16. Kessel, D. Photodynamic therapy: from the beginning. *Photodiagn. Photodyn.* **1**, 3–7 (2004).
17. Jabłoński, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **131**, 839–840 (1933).
18. Josefsen, L. B. & Boyle, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/276109> **2008**, 1–23 (2008).
19. Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn.*

- Photodyn.* **1**, 279–293 (2004).
20. O'Connor, A. E., Gallagher, W. M. & Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **85**, 1053–1074 (2009).
 21. Ormond, A. & Freeman, H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* **6**, 817–840 (2013).
 22. Ogawa, K. & Kobuke, Y. Recent advances in two-photon photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **8**, 269–279 (2008).
 23. Tromberg, B. J. *et al.* Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia* **2**, 26–40 (2000).
 24. Baas, P., van Mansom, I., van Tinteren, H., Stewart, F. A. & van Zandwijk, N. Effect of N-acetylcysteine on photofrin-induced skin photosensitivity in patients. *Lasers in Surgery and Medicine* **16**, 359–367 (1995).
 25. Orenstein, A. *et al.* A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. *Br. J. Cancer* **73**, 937–944 (1996).
 26. Spikes, J. D. New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **8**, 1–16 (1990).
 27. Kessel, D. & Thompson, P. Purification and analysis of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative by gel exclusion and reverse-phase chromatography*. *Photochem. Photobiol.* **46**, 1023–1025 (1987).
 28. Scherer, V. J. Chemisch-physiologische untersuchungen. *Ann. Chem. Pharm.* **40**, 1–64 (1841).
 29. Schwartz, S., Absolon, K. & Vermund, H. *Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors.* (Univ. Minn. Med. Bull, 1955).
 30. Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380–387 (2003).
 31. Missailidis, S. *Anticancer Therapeutics.* (John Wiley & Sons, 2008). doi:10.1002/9780470697047
 32. van Gemert, J. C., Berenbaum, M. C. & Gijsbers, G. H. Wavelength and light-dose dependence in tumour phototherapy with haematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer* **52**, 43–49 (1985).
 33. Webber, J., Herman, M., Kessel, D. & Fromm, D. Current concepts in gastrointestinal photodynamic therapy. *Ann. Surg.* **230**, 12–23 (1999).
 34. Edell, E. S. & Cortese, D. A. Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection. *CHEST* **102**, 1319–1322 (1992).
 35. *Pharmacokinetics of photofrin in man.* (Elsevier science, Amsterdam).
 36. Fernandez, J. M., Bilgin, M. D. & Grossweiner, L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **37**, 131–140 (1997).
 37. Usuda, J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J. Thorac. Oncol.* **1**, 489–493 (2006).
 38. Pushpan, S. K. *et al.* Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**, 187–207 (2002).
 39. Dougherty, T. J. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* **20**, 3–7 (2002).
 40. Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M. & Nesland, J. M. 5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy: Principles and Experimental Research. *Photochem. Photobiol.* **65**, 235–251 (1997).
 41. Fingar, V. H. *et al.* Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br. J. Cancer* **79**, 1702–1708 (1999).
 42. Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Aalders, M., Baas, P. & Stewart, F. A. Outcome of

- mTHPC Mediated Photodynamic Therapy is Primarily Determined by the Vascular Response. *Photochem. Photobiol.* **81**, 1161–1167 (2005).
43. Bugaj, A. M. Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **10**, 1097–1109 (2011).
 44. Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* **15**, 842–850 (2010).
 45. Maeda, H., Seymour, L. W. & Miyamoto, Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. *Bioconjugate Chem.* **3**, 351–362 (1992).
 46. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
 47. Li, S.-D. & Huang, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* **5**, 496–504 (2008).
 48. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**, 271–284 (2000).
 49. Danhier, F., Feron, O. & Préat, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* **148**, 135–146 (2010).
 50. Danhier, F., Ucakar, B., Magotteaux, N., Brewster, M. E. & Préat, V. Active and passive tumor targeting of a novel poorly soluble cyclin dependent kinase inhibitor, JNJ-7706621. *International Journal of Pharmaceutics* **392**, 20–28 (2010).
 51. Chatterjee, D. K., Fong, L. S. & Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Delivery Rev.* **60**, 1627–1637 (2008).
 52. Bechet, D. *et al.* Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology* **26**, 612–621 (2008).
 53. Konan, Y. N., Gurny, R. & Allémann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **66**, 89–106 (2002).
 54. Li, W.-T. Nanotechnology-Based Strategies to Enhance the Efficacy of Photodynamic Therapy for Cancers. *Curr. Drug Metab.* **10**, 851–860 (2009).
 55. Orive, G., Anitua, E., Pedraz, J. L. & Emerich, D. F. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 682–692 (2009).
 56. Lassalle, H.-P. *et al.* Correlation between in vivo pharmacokinetics, intratumoral distribution and photodynamic efficiency of liposomal mTHPC. *J Control Release* **134**, 118–124 (2009).
 57. Jones, H. J., Vernon, D. I. & Brown, S. B. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br. J. Cancer* **89**, 398–404 (2003).
 58. Derycke, A. S. L. & de Witte, P. A. M. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 17–30 (2004).
 59. Marcucci, F. & Lefoulon, F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discovery Today* **9**, 219–228 (2004).
 60. Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Delivery Rev.* **47**, 113–131 (2001).
 61. Van Nostrum, C. F. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 9–16 (2004).
 62. Hu, F.-Q. *et al.* Enhanced cellular uptake of chlorin e6 mediated by stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles. *Journal of Drug Targeting* **17**, 384–391 (2015).
 63. Wissing, S. A., Kayser, O. & Müller, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 1257–1272 (2004).
 64. Küchler, S. *et al.* Nanoparticles for skin penetration enhancement - a comparison of a

- dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **71**, 243–250 (2009).
65. Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M. & Xu, T. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration. *J Pharm Sci* **97**, 123–143 (2007).
 66. Tekade, R. K., Kumar, P. V. & Jain, N. K. Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon. *Chem. Rev.* **109**, 49–87 (2009).
 67. Battah, S. *et al.* Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 876–885 (2007).
 68. Yan, F. & Kopelman, R. The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochem. Photobiol.* **78**, 587–591 (2003).
 69. Podbielska, H. *et al.* Silica sol–gel matrix doped with Photolon molecules for sensing and medical therapy purposes. *Biomolecular Engineering* **24**, 425–433 (2007).
 70. Rossi, L. M. *et al.* Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir* **24**, 12534–12538 (2008).
 71. Brevet, D. *et al.* Mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* 1475–1477 (2009). doi:10.1039/b900427k
 72. Hocine, O. *et al.* Silicalites and Mesoporous Silica Nanoparticles for photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **402**, 221–230 (2010).
 73. Gary-Bobo, M. *et al.* Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *International Journal of Pharmaceutics* **423**, 509–515 (2012).
 74. Gary-Bobo, M. *et al.* Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **432**, 99–104 (2012).
 75. Gary-Bobo, M. *et al.* Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 11425–11429 (2011).
 76. Secret, E. *et al.* Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **49**, 4202–4204 (2013).
 77. Gallud, A. *et al.* Functionalized Nanoparticles for Drug Delivery, One- and Two-photon Photodynamic Therapy as a Promising Treatment of Retinoblastoma. *J Clin Exp Ophthalmol* **04**, 1–4 (2013).
 78. Secret, E. *et al.* Two-Photon Excitation of Porphyrin-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Adv. Mater.* **26**, 7643–7648 (2014).
 79. Croissant, J. G. *et al.* Synthesis of disulfide-based biodegradable bridged silsesquioxane nanoparticles for two-photon imaging and therapy of cancer cells. *Chem. Commun.* **51**, 12324–12327 (2015).
 80. Rogers, L. *et al.* Synthesis and biological evaluation of Foscan® bile acid conjugates to target esophageal cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**, 2495–2499 (2013).
 81. Yang, X. *et al.* Angiogenin-Mediated Photosensitizer-Aptamer Conjugate for Photodynamic Therapy. *ChemMedChem* **6**, 1778–1780 (2011).
 82. Del Governatore, M. *et al.* Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin(e6) immunoconjugate. *Cancer Res.* **60**, 4200–4205 (2000).
 83. Alonso, C. M. A. *et al.* Site-Specific and Stoichiometric Conjugation of Cationic Porphyrins to Antiangiogenic Monoclonal Antibodies. *Bioconjugate Chem.* **21**, 302–313 (2010).
 84. Vrouenraets, M. B. *et al.* Targeting of a hydrophilic photosensitizer by use of internalizing monoclonal antibodies: A new possibility for use in photodynamic therapy. *Int. J. Cancer* **88**, 108–114 (2000).

85. Hudson, R. *et al.* The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate-mono-clonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *Br. J. Cancer* **92**, 1442–1449 (2005).
86. Hamblin, M. R., Del Governatore, M., Rizvi, I. & Hasan, T. Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **83**, 1544–1551 (2000).
87. Vrouenraets, M. B. *et al.* Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-mono-clonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy in vitro. *Int. J. Cancer* **98**, 793–798 (2002).
88. Carcenac, M. *et al.* Preparation, Phototoxicity and Biodistribution Studies of Anti-Carcinoembryonic Antigen Mono-clonal Antibody-Phthalocyanine Conjugates. *Photochem. Photobiol.* **70**, 930–936 (1999).
89. Vrouenraets, M. B. *et al.* Targeting of Aluminum (III) Phthalocyanine Tetrasulfonate by Use of Internalizing Mono-clonal Antibodies Improved Efficacy in Photodynamic Therapy. *Cancer Res.* **61**, 1970–1975 (2001).
90. Poiroux, G. *et al.* Morniga G: a plant lectin as an endocytic ligand for photosensitizer molecule targeting toward tumor-associated T/Tn antigens. *Photochem. Photobiol.* **87**, 370–377 (2011).
91. Savellano, M. D. *et al.* Photodynamic tumor eradication with a novel targetable photosensitizer: strong vascular effects and dependence on treatment repetition versus potentiation. *Photochem. Photobiol.* **89**, 687–697 (2013).
92. Savellano, M. D., Pogue, B. W., Hoopes, P. J., Vitetta, E. S. & Paulsen, K. D. Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpressing cancer cells with pyropheophorbide-a immunoconjugates. *Cancer Res.* **65**, 6371–6379 (2005).
93. MS, A. M. M., BS, Y. Q., PhD, N. L. O. & Gupta PhD, Sen, A. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **8**, 655–664 (2012).
94. Ongarora, B. G. *et al.* Phthalocyanine–Peptide Conjugates for Epidermal Growth Factor Receptor Targeting. *J. Med. Chem.* **55**, 3725–3738 (2012).
95. Savellano, M. D. & Hasan, T. Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study. *Clin Cancer Res* **11**, 1658–1668 (2005).
96. Zhang, F.-L., Huang, Q., Liu, J.-Y., Huang, M.-D. & Xue, J.-P. Molecular-target-based anticancer photosensitizer: synthesis and in vitro photodynamic activity of erlotinib-zinc(II) phthalocyanine conjugates. *ChemMedChem* **10**, 312–320 (2015).
97. Zhang, F.-L. *et al.* A novel strategy for targeting photodynamic therapy. Molecular combo of photodynamic agent zinc(II) phthalocyanine and small molecule target-based anticancer drug erlotinib. *Chem. Commun.* **49**, 9570–9572 (2013).
98. Lutsenko, S. V. *et al.* Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates. *Tumour Biol.* **20**, 218–224 (1999).
99. Gijssens, A., Missiaen, L., Merlevede, W. & de Witte, P. Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e6 selectively potentiates its photodynamic activity. *Cancer Res.* **60**, 2197–2202 (2000).
100. Obaid, G., Chambrier, I., Cook, M. J. & Russell, D. A. Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 737–747 (2015).
101. Stephanopoulos, N., Tong, G. J., Hsiao, S. C. & Francis, M. B. Dual-Surface Modified Virus Capsids for Targeted Delivery of Photodynamic Agents to Cancer Cells. *ACS Nano* **4**, 6014–6020 (2010).
102. Palumbo, A. *et al.* A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels. *Br. J. Cancer* **104**, 1106–1115 (2011).

103. Fabbrini, M. *et al.* Selective occlusion of tumor blood vessels by targeted delivery of an antibody-photosensitizer conjugate. *Int. J. Cancer* **118**, 1805–1813 (2006).
104. Mayo, G. L., Melendez, R. F., Kumar, N., McKinnon, S. J. & Glickman, R. D. Antibody-targeted photodynamic therapy. *American Journal of Ophthalmology* **136**, 1151–1152 (2003).
105. Gamaleia, N. F. *et al.* Chronobiological approaches to antiangiogenic photodynamic therapy of tumors: the first experimental evaluation. *Exp. Oncol.* **34**, 364–366 (2012).
106. Pereira, P. M. R. *et al.* Galactodendritic phthalocyanine targets carbohydrate-binding proteins enhancing photodynamic therapy. *PLoS ONE* **9**, e95529 (2014).
107. Ranyuk, E., Cauchon, N., Klarskov, K., Guérin, B. & van Lier, J. E. Phthalocyanine–Peptide Conjugates: Receptor-Targeting Bifunctional Agents for Imaging and Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **56**, 1520–1534 (2013).
108. Storrie, B., Tarrago-Trani, M. & ENGLISH, S. B/b-like fragment targeting for the purposes of photodynamic therapy and medical imaging. (2001).
109. Amessou, M. *et al.* Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-beta-GluOH)₃ selectively potentiates its photodynamic activity. *Bioconjugate Chem.* **19**, 532–538 (2008).
110. Rahimipour, S. *et al.* Receptor-mediated targeting of a photosensitizer by its conjugation to gonadotropin-releasing hormone analogues. *J. Med. Chem.* **46**, 3965–3974 (2003).
111. Zhen, Z. *et al.* Tumor Vasculature Targeted Photodynamic Therapy for Enhanced Delivery of Nanoparticles. *ACS Nano* **8**, 6004–6013 (2014).
112. Zhen, Z. *et al.* Ferritin Nanocages To Encapsulate and Deliver Photosensitizers for Efficient Photodynamic Therapy against Cancer. *ACS Nano* **7**, 6988–6996 (2013).
113. Ke, M.-R., Ng, D. K. P. & Lo, P.-C. Synthesis and In Vitro Photodynamic Activities of an Integrin-Targeting cRGD-Conjugated Zinc(II) Phthalocyanine. *Chem. Asian J.* **9**, 554–561 (2013).
114. Zhou, A., Wei, Y., Wu, B., Chen, Q. & Xing, D. Pyropheophorbide A and c(RGDyK) comodified chitosan-wrapped upconversion nanoparticle for targeted near-infrared photodynamic therapy. *Mol. Pharmaceutics* **9**, 1580–1589 (2012).
115. Chen, H., Tian, J., He, W. & Guo, Z. H₂O₂-activatable and O₂-evolving nanoparticles for highly efficient and selective photodynamic therapy against hypoxic tumor cells. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1539–1547 (2015).
116. Chaleix, V. *et al.* RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486–1493 (2003).
117. Chaleix, V., Sol, V., Guilloton, M., Granet, R. & Krausz, P. Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide–porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tetrahedron Letters* **45**, 5295–5299 (2004).
118. Sol, V., Chaleix, V., Granet, R. & Krausz, P. An efficient route to dimeric porphyrin–RGD peptide conjugates via olefin metathesis. *Tetrahedron* **64**, 364–371 (2008).
119. Frochot, C. *et al.* Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg. Chem.* **35**, 205–220 (2007).
120. Conway, C. L. *et al.* In vivo and in vitro characterisation of a protoporphyrin IX–cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 290–298 (2008).
121. Kopelman, R. *et al.* Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 404–410 (2005).
122. Renno, R. Z. *et al.* Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch. Ophthalmol.* **122**, 1002–1011 (2004).

123. Schmidt-Erfurth, U., Diddens, H., Birngruber, R. & Hasan, T. Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *Br. J. Cancer* **75**, 54–61 (1997).
124. Reddi, E., Zhou, C., Biolo, R. & Menegaldo, E. Liposome-or LDL-administered Zn (II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency. *Br. J. Cancer* **61**, 407–411 (1990).
125. Polo, L., Valduga, G., Jori, G. & Reddi, E. Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 10–23 (2002).
126. Hamblin, M. R. & Newman, E. L. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **23**, 3–8 (1994).
127. Hamblin, M. R. & Newman, E. L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **26**, 45–56 (1994).
128. Hamblin, M. R. & Newman, E. L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **26**, 147–157 (1994).
129. Allison, B. A., Pritchard, P. H. & Levy, J. G. Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer* **69**, 833–839 (1994).
130. Schmidt-Erfurth, U. *et al.* Photodynamic therapy of experimental choroidal melanoma using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Ophthalmology* **101**, 89–99 (1994).
131. Miller, J. W. *et al.* Photodynamic therapy of experimental choroidal neovascularization using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Arch. Ophthalmol.* **113**, 810–818 (1995).
132. Schmidt-Erfurth, U. *et al.* Benzoporphyrin-lipoprotein-mediated photodestruction of intraocular tumors. *Exp. Eye Res.* **62**, 1–10 (1996).
133. de Vries, H. E., Moor, A. C. E., Dubbelman, T. M. A. R., van Berkel, T. J. C. & Kuiper, J. Oxidized Low-Density Lipoprotein as a Delivery System for Photosensitizers: Implications for Photodynamic Therapy of Atherosclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 528–534 (1999).
134. Urizzi, P., Allen, C. M., Langlois, R. & Ouellet, R. Low-density lipoprotein-bound aluminum sulfophthalocyanine: targeting tumor cells for photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **05**, 154–160 (2001).
135. de Smidt, P. C., Versluis, A. J. & van Berkel, T. J. Properties of incorporation, redistribution, and integrity of porphyrin-low-density lipoprotein complexes. *Biochemistry* **32**, 2916–2922 (1993).
136. Sehgal, I., Li, H., Ongarora, B., Devillier, D. & Vicente, M. G. H. Synthesis and biological investigations of a ZnPc-antiCEA bioconjugate for imaging of colorectal cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **17**, 150–156 (2013).
137. Shieh, Y.-A., Yang, S.-J., Wei, M.-F. & Shieh, M.-J. Aptamer-Based Tumor-Targeted Drug Delivery for Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **4**, 1433–1442 (2010).
138. Yin, M. *et al.* Photosensitizer-incorporated G-quadruplex DNA-functionalized magnetofluorescent nanoparticles for targeted magnetic resonance/fluorescence multimodal imaging and subsequent photodynamic therapy of cancer. *Chem. Commun.* **48**, 6556–6558 (2012).
139. Reddy, G. R. *et al.* Vascular Targeted Nanoparticles for Imaging and Treatment of Brain Tumors. *Clin Cancer Res* **12**, 6677–6686 (2006).
140. Morris, R. L. *et al.* The peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Photochem. Photobiol.* **75**, 652–661 (2002).
141. Mitsunaga, M. *et al.* Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat. Med.* **17**, 1685–1691 (2011).
142. Hu, Z., Rao, B., Chen, S. & Duanmu, J. Targeting tissue factor on tumour cells and

- angiogenic vascular endothelial cells by factor VII-targeted verteporfin photodynamic therapy for breast cancer in vitro and in vivo in mice. *BMC Cancer* **10**, 235 (2010).
143. Kim, J., Tung, C.-H. & Choi, Y. Smart dual-functional warhead for folate receptor-specific activatable imaging and photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **50**, 10600–10603 (2014).
 144. Wang, B. S., Wang, J. & Chen, J.-Y. Conjugates of folic acids with zinc aminophthalocyanine for cancer cell targeting and photodynamic therapy by one-photon and two-photon excitations. *J. Mater. Chem. B* **2**, 1594–9 (2014).
 145. Liang, R. *et al.* A monomeric photosensitizer for targeted cancer therapy. *Chem. Commun.* **50**, 14983–14986 (2014).
 146. Choi, Y. *et al.* Highly Biocompatible Carbon Nanodots for Simultaneous Bioimaging and Targeted Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 5781–5789 (2014).
 147. Mackowiak, S. A. *et al.* Targeted drug delivery in cancer cells with red-light photoactivated mesoporous silica nanoparticles. *Nano Lett.* **13**, 2576–2583 (2013).
 148. Qualls, M. M. & Thompson, D. H. Chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate delivered via acid-labile diplasmenylcholine-folate liposomes: Intracellular localization and synergistic phototoxicity. *Int. J. Cancer* **93**, 384–392 (2001).
 149. Jang, Y. *et al.* A folic acid conjugated silica-titania porous hollow nanosphere for improved topical photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **50**, 15345–15347 (2014).
 150. Schneider, R. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* **13**, 2799–2808 (2005).
 151. Ling, D., Bae, B.-C., Park, W. & Na, K. Photodynamic efficacy of photosensitizers under an attenuated light dose via lipid nano-carrier-mediated nuclear targeting. *Biomaterials* **33**, 5478–5486 (2012).
 152. Li, D. *et al.* A novel chlorin-PEG-folate conjugate with higher water solubility, lower cytotoxicity, better tumor targeting and photodynamic activity. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **127**, 28–37 (2013).
 153. Gravier, J. *et al.* Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies. *J. Med. Chem.* **51**, 3867–3877 (2008).
 154. Linares, R., Pacheco, J. R. & Good, T. A. Efficacy of different targeting agents in the photolysis of interleukin-2 receptor bearing cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **77**, 17–26 (2004).
 155. Cavanaugh, P. G. Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability. *Breast Cancer Res. Treat.* **72**, 117–130 (2002).
 156. Derycke, A. S. L. *et al.* Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer ALPcS4 to Rat Bladder Carcinoma Cells. *J. Natl Cancer Inst.* **96**, 1620–1630 (2004).
 157. Hamblin, M. R., Miller, J. L. & Ortel, B. Scavenger-Receptor Targeted Photodynamic Therapy¶. *Photochem. Photobiol.* **72**, 533–540 (2000).
 158. James, D. A., Swamy, N., Paz, N., Hanson, R. N. & Ray, R. Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 2379–2384 (1999).
 159. Khan, E. H. *et al.* Synthesis and biological activities of phthalocyanine–estradiol conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, 1287–1290 (2003).
 160. Swamy, N., Purohit, A., Fernandez-Gacio, A., Jones, G. B. & Ray, R. Nuclear estrogen receptor targeted photodynamic therapy: Selective uptake and killing of MCF-7 breast cancer cells by a C17 α -alkynylestradiol-porphyrin conjugate. *J. Cell. Biochem.* **99**, 966–977 (2006).
 161. Gacio, A. F., Fernandez-Marcos, C., Swamy, N., Dunn, D. & Ray, R. Photodynamic cell-kill

- analysis of breast tumor cells with a tamoxifen-pyropheophorbide conjugate. *J. Cell. Biochem.* **99**, 665–670 (2006).
162. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J.-C. & Souchard, J.-P. Synthesis of estradiol-pheophorbide conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 996–999 (2006).
 163. Yoon, H. Y. *et al.* Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy. *Biomaterials* **33**, 3980–3989 (2012).
 164. Rosàs, E. *et al.* Modifications of microvascular EC surface modulate phototoxicity of a porphycene anti-ICAM-1 immunoconjugate; therapeutic implications. *Langmuir* **29**, 9734–9743 (2013).
 165. Benachour, H. *et al.* Multifunctional Peptide-conjugated hybrid silica nanoparticles for photodynamic therapy and MRI. *Theranostics* **2**, 889–904 (2012).
 166. Tirand, L. *et al.* Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An in Vivo and in Vitro Study. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 806–813 (2007).
 167. Thomas, N. *et al.* Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 226–235 (2010).
 168. Thomas, N. *et al.* Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **96**, 101–108 (2009).
 169. Bechet, D. *et al.* Neuropilin-1 Targeting Photosensitization-Induced Early Stages of Thrombosis via Tissue Factor Release. *Pharm. Res.* **27**, 468–479 (2010).
 170. Starkey, J. R. *et al.* New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clin Cancer Res* **14**, 6564–6573 (2008).
 171. Starkey, J. R., Pascucci, E. M., Drobizhev, M. A., Elliott, A. & Rebane, A. K. Vascular targeting to the SST2 receptor improves the therapeutic response to near-IR two-photon activated PDT for deep-tissue cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4594–4603 (2013).
 172. Ke, M. R., Yeung, S. L., Fong, W.-P. & Ng, D. A Phthalocyanine–Peptide Conjugate with High In Vitro Photodynamic Activity and Enhanced In Vivo Tumor-Retention Property. *Chem. Eur. J.* (2012). doi:10.1002/chem.201103516
 173. Ménard, F. *et al.* Synthesis of tetraglucosyl- and tetrapolyamine-tetrabenzoporphyrin conjugates for an application in PDT. *Bioorg Med Chem* **17**, 7647–7657 (2009).
 174. Leung, S. C. H. *et al.* Photodynamic activity of BAM-SiPc, an unsymmetrical bisamino silicon(IV) phthalocyanine, in tumour-bearing nude mice. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 4–12 (2008).
 175. Jiang, X.-J. *et al.* Phthalocyanine-Polyamine Conjugates as pH-Controlled Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Chem. Eur. J.* **16**, 4777–4783 (2010).
 176. Jiang, X.-J., Yeung, S.-L., Lo, P.-C., Fong, W.-P. & Ng, D. K. P. Phthalocyanine–Polyamine Conjugates as Highly Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **54**, 320–330 (2011).
 177. Lamarche, F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of polyamine-porphyrin conjugates as potential agents in photodynamic therapy (PDT). *J. Porphyrins Phthalocyanines* **06**, 130–134 (2002).
 178. Sol, V. *et al.* Polyamine conjugates of meso-tritolyldiporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg Med Chem* **14**, 1364–1377 (2006).
 179. Garcia, G. *et al.* Synthesis and photocytotoxic activity of new chlorin–polyamine conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**, 3188–3192 (2006).
 180. Garcia, G. *et al.* DNA photocleavage by porphyrin–polyamine conjugates. *Bioorg Med*

- Chem* **17**, 767–776 (2009).
181. Sarrazy, V. *et al.* Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **103**, 201–206 (2011).
 182. Drogat, N. *et al.* Chlorin-PEI-labeled cellulose nanocrystals: Synthesis, characterization and potential application in PDT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 3648–3652 (2012).
 183. Drogat, N., Gady, C., Granet, R. & Sol, V. Design and synthesis of water-soluble polyaminated chlorins and bacteriochlorins - With near-infrared absorption. *Dyes and Pigments* **98**, 609–614 (2013).
 184. Byrne, J. D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **60**, 1615–1626 (2008).
 185. Candide, C. *et al.* In vitro interaction of the photoactive anticancer porphyrin derivative photofrin II with low density lipoprotein, and its delivery to cultured human fibroblasts. *FEBS Lett.* **207**, 133–138 (1986).
 186. Barel, A. *et al.* Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo. *Cancer Lett.* **32**, 145–150 (1986).
 187. Sharman, W. M., van Lier, J. E. & Allen, C. M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 53–76 (2004).
 188. Stallivieri, A., Baros, F., Jetpisbayeva, G., Myrzakhmetov, B. & Frochot, C. The Interest of Folic Acid in Targeted Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.* **22**, 3185–3207 (2015).
 189. Ross, J. F., Chaudhuri, P. K. & Ratnam, M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* **73**, 2432–2443 (1994).
 190. Dausse, E., Da Rocha Gomes, S. & Toulmé, J.-J. Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline? *Curr Opin Pharmacol* **9**, 602–607 (2009).
 191. Ray, P. & White, R. R. Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals* **3**, 1761–1778 (2010).
 192. Singh, S. *et al.* Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics. *Chem. Rev.* 150828120724007–46 (2015). doi:10.1021/acs.chemrev.5b00244
 193. Moylan, C., Scanlan, E. & Senge, M. Chemical Synthesis and Medicinal Applications of Glycoporphyrins. *Curr. Med. Chem.* **22**, 2238–2348 (2015).
 194. Griegel, S., Rajewsky, M. F., Ciesiolka, T. & Gabius, H. J. Endogenous sugar receptor (lectin) profiles of human retinoblastoma and retinoblast cell lines analyzed by cytological markers, affinity chromatography and neoglycoprotein-targeted photolysis. *Anticancer Res.* **9**, 723–730 (1989).
 195. Gallud, A. *et al.* Identification of MRC2 and CD209 receptors as targets for photodynamic therapy of retinoblastoma using mesoporous silica nanoparticles. **xx**, 1–9 (2015).
 196. Lovell, J. F., Liu, T. W. B., Chen, J. & Zheng, G. Activatable Photosensitizers for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **110**, 2839–2857 (2010).
 197. Verhille, M. *et al.* Modulation of Photosensitization Processes for an Improved Targeted Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.* **17**, 3925–3943 (2010).
 198. Liu, T. W. B., Chen, J. & Zheng, G. Peptide-based molecular beacons for cancer imaging and therapy. *Amino Acids* **41**, 1123–1134 (2010).
 199. Shieh, M.-J. *et al.* Reduced skin photosensitivity with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded micelles based on a poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(d,l-lactide) diblock copolymer in vivo. *Mol. Pharmaceutics* **7**, 1244–1253 (2010).
 200. Chen, J. *et al.* Protease-Triggered Photosensitizing Beacon Based on Singlet Oxygen

- Quenching and Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11450–11451 (2004).
201. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik* **401**, 273–294 (1931).
 202. Kaiser, W. & Garrett, C. G. Two-Photon Excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. *Phys. Rev. Lett.* **7**, 229–231 (1961).
 203. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–76 (1990).
 204. Marder, S. R. Organic nonlinear optical materials: where we have been and where we are going. *Chem. Commun.* 131–134 (2006). doi:10.1039/b512646k
 205. Hammerer, F. Synthèse et Caractérisation de Photosensibilisateurs pour Application à la Photothérapie Dynamique : Ciblage du Rétinoblastome. 1–426 (2012).
 206. He, G. S., Tan, L.-S., Zheng, Q. & Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **108**, 1245–1330 (2008).
 207. Boggess, T. F. J. *et al.* Simultaneous measurement of the two-photon coefficient and free-carrier cross section above the bandgap of crystalline silicon. *Quantum Electronics, IEEE Journal of* **22**, 360–368 (1986).
 208. Sheik-Bahae, M., Said, A. A., Wei, T.-H., Hagan, D. J. & Van Stryland, E. W. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. *Quantum Electronics, IEEE Journal of* **26**, 760–769 (1990).
 209. Fischer, A., Cremer, C. & Stelzer, E. H. K. Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium–sapphire laser. *Appl. Opt., AO* **34**, 1989–2003 (1995).
 210. Xu, C., Guild, J., Webb, W. & Denk, W. Determination of absolute two-photon excitation cross sections by in situ second-order autocorrelation. *Opt. Lett.* **20**, 2372–4 (1995).
 211. Albota, M. A., Xu, C. & Webb, W. W. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt., AO* **37**, 7352–7356 (1998).
 212. Lars O, S. Optical dosimetry for direct and interstitial photoradiation therapy of malignant tumors. *Prog. Clin. Biol. Res.* **170**, 91–114 (1984).
 213. Wilson, B. C., Jeeves, W. P. & Lowe, D. M. *In vivo* and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem. Photobiol.* **42**, 153–162 (1985).
 214. Wilkinson, F., Helman, W. P. & Ross, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22**, 113–262 (1993).
 215. Balaz, M., Collins, H. A., Dahlstedt, E. & Anderson, H. L. Synthesis of hydrophilic conjugated porphyrin dimers for one-photon and two-photon photodynamic therapy at NIR wavelengths. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 874–16 (2009).
 216. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3244–3266 (2009).
 217. Collins, H. A. *et al.* Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation. *Nat. Photonics.* **2**, 420–424 (2008).
 218. Ogawa, K. *et al.* Water-soluble bis(imidazolylporphyrin) self-assemblies with large two-photon absorption cross sections as potential agents for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **49**, 2276–2283 (2006).
 219. Ogawa, K., Dy, J. T., Kobuke, Y., Ogura, S.-I. & Okura, I. Singlet Oxygen Generation and Photocytotoxicity against Tumor Cell by Two-Photon Absorption. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **471**, 61–67 (2007).
 220. Hammerer, F. *et al.* Synthesis and Characterization of Glycoconjugated Porphyrin Triphenylamine Hybrids for Targeted Two-Photon Photodynamic Therapy. *J. Org. Chem.* **79**, 1406–1417 (2014).
 221. Eren Cerman, M. F. A. P. & Osman Çekiç, M. P. Clinical Use of Photodynamic Therapy in

- Ocular Tumors. *Survey of Ophthalmology* 1–41 (2015).
doi:10.1016/j.survophthal.2015.05.004
222. Doz, F. Rétinoblastome : aspects récents. *Archives de Pédiatrie* **13**, 1329–1337 (2006).
 223. Aerts, I. *et al.* Retinoblastoma. *Orphanet J Rare Dis* **1**, 1–11 (2006).
 224. <http://www.asile-aveugles.ch/fondation-asile-des-aveugles/actualités/percée-dans-le-traitement-des-cancers-de-loeil-chez-lenfant.aspx>.
 225. <http://curie.fr/actualites-scientifiques-medicales/dossier-presse-dernieres-avancees-dans-prise-charge-retinoblastome>
 - .
 226. Lumbroso, L. *et al.* Diode laser thermotherapy and chemothermotherapy in the treatment of retinoblastoma. *J Fr Ophtalmol* **26**, 154–159 (2003).
 227. Aerts, I. *et al.* Outcome of second malignancies after retinoblastoma: a retrospective analysis of 25 patients treated at the Institut Curie. *European Journal of Cancer* **40**, 1522–1529 (2004).
 228. Achelle, S., Couleaud, P., Baldeck, P., Teulade-Fichou, M.-P. & Maillard, P. Carbohydrate-Porphyrin Conjugates with Two-Photon Absorption Properties as Potential Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1271–1279 (2011).
 229. Garcia, G. *et al.* Carbohydrate-conjugated porphyrin dimers: Synthesis and photobiological evaluation for a potential application in one-photon and two-photon photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* **21**, 153–165 (2013).
 230. Laville, I. *et al.* Photodynamic Efficiency of Diethylene Glycol-Linked Glycoconjugated Porphyrins in Human Retinoblastoma Cells. *J. Med. Chem.* **49**, 2558–2567 (2006).
 231. Makky, A., Michel, J. P., Maillard, P. & Rosilio, V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *BBA* **1808**, 656–666 (2011).
 232. Poyer, F. *et al.* PDT induced bystander effect on human xenografted colorectal tumors as evidenced by sodium MRI. *Photodiagn. Photodyn.* **9**, 303–309 (2012).
 233. Sharon, N. & Lis, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**, 227–234 (1989).
 234. Lee, Y. C. & Lee, R. T. Carbohydrate-protein interactions: basis of glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **28**, 321–327 (1995).
 235. Birnbaum, M. J., Haspel, H. C. & Rosen, O. M. Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science* **235**, 1495–1498 (1987).
 236. Loris, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 198–208 (2002).
 237. Sears, P. & Wong, C. Carbohydrate Mimetics: A New Strategy for Tackling the Problem of Carbohydrate-Mediated Biological Recognition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2300–2324 (1999).
 238. Monsigny, M., Roche, A. C., Kieda, C., Midoux, P. & Obrénovitch, A. Characterization and biological implications of membrane lectins in tumor, lymphoid and myeloid cells. *Biochimie* **70**, 1633–1649 (1988).
 239. Fülling, G., Schröder, D. & Franck, B. Water-Soluble Porphyrin Diglycosides with Photosensitizing Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **28**, 1519–1521 (1989).
 240. Maillard, P., Gaspard, S., Guerquin-Kern, J. L. & Momenteau, M. Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9125–9127 (1989).
 241. Chen, X., Hui, L., Foster, D. A. & Drain, C. M. Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry* **43**, 10918–10929 (2004).
 242. Fujimoto, K., Miyata, T. & Aoyama, Y. Saccharide-Directed Cell Recognition and Molecular Delivery Using Macrocyclic Saccharide Clusters: Masking of Hydrophobicity

- to Enhance the Saccharide Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3558–3559 (2000).
243. Pasetto, P., Chen, X., Drain, C. M. & Franck, R. W. Synthesis of hydrolytically stable porphyrin C- and S-glycoconjugates in high yields. *Chem. Commun.* 81–82 (2001). doi:10.1039/b008489I
 244. Garcia, G., Naud-Martin, D., Carrez, D., Croisy, A. & Maillard, P. Microwave-mediated 'click-chemistry' synthesis of glycoporphyrin derivatives and in vitro photocytotoxicity for application in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **67**, 4924–4932 (2011).
 245. Ballut, S., Naud-Martin, D., Loock, B. & Maillard, P. A strategy for the targeting of photosensitizers. Synthesis, characterization, and photobiological property of porphyrins bearing glycodendrimeric moieties. *J. Org. Chem.* **76**, 2010–2028 (2011).
 246. Senge, M. O. *et al.* Nonlinear Optical Properties of Porphyrins. *Adv. Mater.* **19**, 2737–2774 (2007).
 247. Aratani, N., Kim, D. & Osuka, A. π -Conjugation Enlargement Toward the Creation of Multi-Porphyrinic Systems with Large Two-Photon Absorption Properties. *Chem. Asian J.* **4**, 1172–1182 (2009).
 248. Kim, K. S. *et al.* Charge transfer induced enhancement of near-IR two-photon absorption of 5,15-bis(azulenylethynyl) zinc(ii) porphyrins. *Chem. Commun.* 2479–2481 (2007). doi:10.1039/b704986b
 249. Taylor, P. N. *et al.* Conjugated porphyrin oligomers from monomer to hexamer. *Chem. Commun.* 909–910 (1998). doi:10.1039/a801031e
 250. Drobizhev, M. *et al.* Extremely Strong Near-IR Two-Photon Absorption in Conjugated Porphyrin Dimers: Quantitative Description with Three-Essential-States Model. *J. Phys. Chem.* **109**, 7223–7236 (2005).
 251. Hammerer, F. *et al.* Glycoconjugated porphyrin dimers as robust ratiometric temperature sensors. *Chem. Commun.* **50**, 9529–9532 (2014).
 252. Senge, M. O. Porphyrins Like Boron After All. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1071–1072 (1998).
 253. Senge, M. O. & Feng, X. Regioselective reaction of 5,15-disubstituted porphyrins with organolithium reagents—synthetic access to 5,10,15-trisubstituted porphyrins and directly meso-meso-linked bisporphyrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 3615–3621 (2000). doi:10.1039/b005411i
 254. Littler, B. J. *et al.* Refined Synthesis of 5-Substituted Dipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **64**, 1391–1396 (1999).
 255. Tamaru, S.-I. *et al.* A Tin-Complexation Strategy for Use with Diverse Acylation Methods in the Preparation of 1,9-Diacyldipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **69**, 765–777 (2004).
 256. Thamyongkit, P., Bhise, A. D., Taniguchi, M. & Lindsey, J. S. Alkylthio Unit as an α -Pyrrole Protecting Group for Use in Dipyrromethane Synthesis. *J. Org. Chem.* **71**, 903–910 (2006).
 257. Williamson, A. Theory of oetherification. *Philosophical Magazine Series 3* **37**, 350–356 (1850).
 258. Sonogashira, K., Tohda, Y. & Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters* **16**, 4467–4470 (1975).
 259. Heck, R. F. Palladium-catalyzed vinylation of organic halides. *Organic Reactions* 345–390 (1982). doi:10.1002/0471264180.or027.02
 260. Glaser, C. Untersuchungen über einige Derivate der Zimmtsäure. *Ann. Chem. Pharm.* **154**, 137–171 (1870).
 261. Anderson, H. L. & Anderson, H. L. Conjugated Porphyrin Ladders. *Inorg. Chem.* **33**, 972–981 (1994).
 262. Zemplén, G. Abbau der reduzierenden Biosen,
VII.: Konstitutions-Ermittlung der Maltose
. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **60**, 1555–1564 (1927).

263. Becker, E. D. & Brandley, R. B. *J. Chem. Phys.* **1413** (1959).
264. JOBIN YVON HORIBA-A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields.
265. Pineiro, M. *et al.* Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies. *Chem. Eur. J.* **4**, 2299–2307 (1998).
266. Xu, C. & Webb, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **13**, 481–491 (1996).
267. Chen, B., Pogue, B. W. & Hasan, T. Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opin Drug Deliv* **2**, 477–487 (2005).
268. Seddon, A. M. *et al.* Drug interactions with lipid membranes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2509–2519 (2009).
269. Robertson, C. A., Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **96**, 1–8 (2009).
270. Spikes, J. D. & Jori, G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Lasers Med Sci* **2**, 3–15 (1987).
271. Rosilio, V., Makky, A., Michel, J. P. & Maillard, P. Interfacial behaviour of glycoconjugated tetraphenylporphyrins and their interaction with biomimetic models of the cell membrane. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **70**, 219–226 (2012).
272. Peetla, C., Stine, A. & Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **6**, 1264–1276 (2009).
273. Brezesinski, G. & Möhwald, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **100-102**, 563–584 (2003).
274. Desroches, M.-C. *et al.* Incorporation of Glycoconjugated Porphyrin Derivatives into Phospholipid Monolayers: A Screening Method for the Evaluation of Their Interaction with a Cell Membrane. *Langmuir* **20**, 11698–11705 (2004).
275. BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 438–443 (1999).
276. Reig, F. *et al.* Mixed monolayers composed of PC/PS/Chol. Interaction with opioid molecules. *Colloid & Polymer Science* **267**, 139–144 (1989).
277. García, M. L., Egea, M. A., Valero, J., Valls, O. & Alsina, M. A. Interaction of flurbiprofen sodium with cornea model monolayers at the air–water interface. *Thin Solid Films* **301**, 169–174 (1997).
278. Teixeira, H., Rosilio, V., Laigle, A., Lepault, J. & Erk, I. Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. *Biophysical ...* **92**, 169–181 (2001).
279. Ménez, C., Legrand, P., Rosilio, V., Lesieur, S. & Barratt, G. Physicochemical Characterization of Molecular Assemblies of Miltefosine and Amphotericin B. *Mol. Pharmaceutics* **4**, 281–288 (2007).
280. Fernández-Botello, A., Comelles, F., Alsina, M. A., Cea, P. & Reig, F. A Monolayer Study on Interactions of Docetaxel with Model Lipid Membranes. *J. Phys. Chem.* **112**, 13834–13841 (2008).
281. Filho, J. M. N. *et al.* Thermodynamic investigation of mixed monolayers of trans-dehydrocrotonin and phospholipids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **358**, 42–49 (2010).
282. Makky, A. *et al.* Effect of Cholesterol and Sugar on the Penetration of Glycodendrimeric Phenylporphyrins into Biomimetic Models of Retinoblastoma Cells Membranes. *Langmuir* **26**, 11145–11156 (2010).
283. Sessa, G. & Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological

- membranes. *J. Lipid Res.* **9**, 310–318 (1968).
284. Pinto-Alphandary, H., Andremont, A. & Couvreur, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**, 155–168 (2000).
 285. Larabi, M. *et al.* Toxicity and Antileishmanial Activity of a New Stable Lipid Suspension of Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 3774–3779 (2003).
 286. De Oliveira, M. C., Fattal, E., Couvreur, P. & Lesieur, P. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi- *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1372**, 301–310 (1998).
 287. Fattal, E. 'Smart' delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.* **56**, 931–946 (2004).
 288. Urbinati, G. *et al.* Liposomes loaded with histone deacetylase inhibitors for breast cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **397**, 184–193 (2010).
 289. Oku, N., Namba, Y. & Okada, S. Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1126**, 255–260 (1992).
 290. Niggemann, G. & Kummrow, M. The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: dependences on experimental method, sample cell sealing and temperature. *Journal de Physique II* **5**, 413–425 (1995).
 291. Seifert, U. Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics* **46**, 13–137 (1997).
 292. Baumgart, T., Hess, S. T. & Webb, W. W. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**, 821–824 (2003).
 293. Lipowsky, R. & Seifert, U. Adhesion of Vesicles and Membranes. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **202**, 17–25 (1991).
 294. Morone, N. *et al.* Surface Pressure Analysis of Poly(ethylene oxide)-Modified Fusogenic Liposomes Incorporated into a Phospholipid Monolayer. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **22**, 5–18 (2007).
 295. Toyran, N. & Severcan, F. Competitive effect of vitamin D2 and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study. *Chemistry and Physics of Lipids* **123**, 165–176 (2003).
 296. Hoebeke, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **28**, 189–196 (1995).
 297. Angelova, M. I. & Tsoneva, I. Interactions of DNA with giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **101**, 123–137 (1999).
 298. Fischer, A., Oberholzer, T. & Luisi, P. L. Giant vesicles as models to study the interactions between membranes and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 177–188 (2000).
 299. Romanowski, M. *et al.* Interaction of a highly potent dimeric enkephalin analog, biphalin, with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1329**, 245–258 (1997).
 300. Kępczyński, M. *et al.* Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? *Chemistry and Physics of Lipids* **155**, 7–15 (2008).
 301. Maiti, N. C., Mazumdar, S. & Perisamy, N. J- and H-aggregates of porphyrins with surfactants: fluorescence, stopped flow and electron microscopy studies. *Journal of Porphyrins and ...* **02**, 369–376 (1998).
 302. Huang, Z. J. & Haugland, R. P. Partition coefficients of fluorescent probes with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 166–171 (1991).
 303. Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*. (Courier Corporation, 2013).
 304. Matsuzaki, K. *et al.* Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 219–226 (2000).
 305. Ballut, S. *et al.* New strategy for targeting of photosensitizers. Synthesis of glycodendrimeric phenylporphyrins, incorporation into a liposome membrane and interaction with a specific lectin. *Chem. Commun.* 224–226 (2009).
doi:10.1039/B816128C

306. Makky, A. *et al.* Evaluation of the Specific Interactions between Glycodendrimeric Porphyrins, Free or Incorporated into Liposomes, and Concanavaline A by Fluorescence Spectroscopy, Surface Pressure, and QCM-D Measurements. *Langmuir* **26**, 12761–12768 (2010).
307. Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. (CRC Press, 2000).
308. Blume, A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **557**, 32–44 (1979).
309. Schindler, H. Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. *FEBS Lett.* **122**, 77–79 (1980).
310. Faivre, V., Costa, M. de L., Boullanger, P., Baszkin, A. & Rosilio, V. Specific interaction of lectins with liposomes and monolayers bearing neoglycolipids. *Chemistry and Physics of Lipids* **125**, 147–159 (2003).
311. Bangham, A. D., Standish, M. M. & Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **13**, 238–IN27 (1965).
312. Faivre, V., Rosilio, V., Boullanger, P., Almeida, L. M. & Baszkin, A. Fucosylated neoglycolipids: synthesis and interaction with a phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids* **109**, 91–101 (2001).
313. Gross, E. & Ehrenberg, B. The partition and distribution of porphyrins in liposomal membranes. A spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta* **983**, 118–122 (1989).
314. Maman, N. & Brault, D. Kinetics of the interactions of a dicarboxylic porphyrin with unilamellar lipidic vesicles: interplay between bilayer thickness and pH in rate control. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 31–42 (1998).
315. Collins, M. D. & Gordon, S. E. Giant Liposome Preparation for Imaging and Patch-Clamp Electrophysiology. *JoVE* 1–9 (2013). doi:10.3791/50227
316. Vedia, V. G. A., Natale, P., Chen, S. & van Lopez- Montero. iGUVs: preparing giant vesicles with a smartphone and eggs. 1–21 (2015).

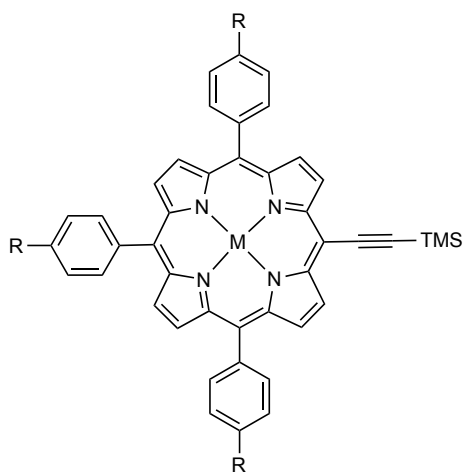
Liste des abréviations

ALA	Acide 5-AminoLevulinique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Absorption à deux photon
ADPA	Acide 9,10-anthracènedipropionique disodique
AMM	Autorisation de Mise sur la Marché
AMP	Absorption MonoPhotoique
ASBT	Apical sodium dependent bile acide transporter
AsPh ₃	Triphénylarsine
BBr ₃	Boron tribromide
BPD-MA	Monoacide de la benzoporphyrine
BSA	Albumine de serum bovin
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CBC	Carcinome basocellulaire
CCD	Récepteurs à transferts de charge
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CHCl ₃	Chloroforme
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CI	Conversion Interne
CIS	Croisement Inter-Système
Con A	Concanavaline A
COSY	Corrélation Spectroscopy
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cs ₂ CO ₃	Carbonate de Césium
CuCl	Chlorure de cuivre (I)
CuI	Indure de cuivre (I)
CW	Continous wave
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEG	Diéthylène glycol
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DPBF	DiPhénylisoBenzoFurane
DPPC	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol
DMAP	Dimethylaminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	DiMéthyFormamide
DMSO	Diméthylsufoxyde
EGF/EGFR	Facteur de croissance épidermique
EPR	Eenhanced permeability and retention effect
Et ₃ N	Triéthylamine
Et ₂ O	Diéthyl Éther
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Éthanol
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Transfert d'énergie de resonance Förster
GLUT1	Glucose transporter 1

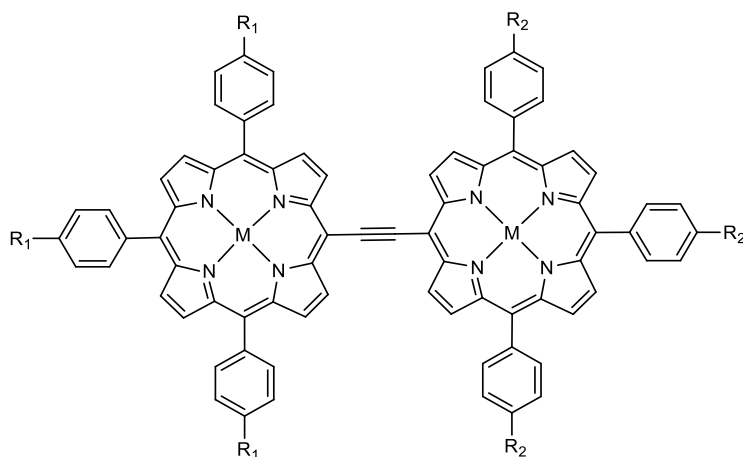
GM	Goeppert-Mayer
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GRP	Gastrin releasing peptide
GUV	Liposome unilamellaire géant
Hb	Héماغlobine
HbO ₂	Oxyhéماغlobine
HCl	Hydroxyde de sodium
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
HER-2	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hp	HématoPorphyrine
HpD	HematoPorphyrine Derivative
HVD	Hydroxyéthyl-vinyldeutéroporphyrine
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IL-2R	Récepteur de l'interleukin-2
InCl ₃	Chlorure d'Indium (III)
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie médicale
ITO	Oxyde d'indium-étain
K ₂ CO ₃	Carbonate de Potassium
KI	Iodure de potassium
LDL	Lipoprotéine à faible densité
LUV	Gros liposome unilamellaire
mAb	Anticorps monoclonal
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight
Man	Mannose
MEG	MonoÉthylène Glycol
MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MSN	Nanoparticule mésoporeuse de silice
<i>m</i> -THPC	<i>Méso</i> -tétra-(<i>mé</i> ta-hydroxyphényl)chlorine
<i>m</i> -THPP	Tétra(<i>mé</i> ta-hydroxyphényl)porphyrine
MTT	Bromo 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaH	Hydruide de sodium
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NBS	N-BromoSuccinimide
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -ButylLithium
NiCl ₂ •H ₂ O	Chlorure de nickel
NMP	Nanoparticules Mésoporeuse
PBR	Peripheral benzodiazepine receptor
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	Bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride
PDT	Thérapie PhotoDynamique
PDT-ADP	PhotoThérapie Dynamique à Absorption à Deux Photons
PDTC	PhotoThérapie Dynamique Ciblée
PMB	Photodynamic molecular beacons

PP	Protoporphyrine
PpIX	Protoporphyrine IX
PBS	Phosphate buffered saline
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium
Ps	Photosensibilisateur
Ps-ADP	Photosensibilisateur Absorption à Deux Photons
PTS	Up-regulated Polyamine Transport Systems
Pyr	Pyridine
RE	Réticulum Endoplasmique
RES	Système réticulo-endothélial
RGD	Arginylglycylaspartic acid
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RV	Relaxation Vibrationnelle
ROS	Espèce reactive de l'oxygène
SLN	Nanoparticule lipidique solide
SOPC	1-stéaroyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
SUV	Petite liposome unilamellaire
TBAF	Fluorure de tetra-n-butylammonium
TEG	TriÉthylène Glycol
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TPEF	Two-Photon Excited Fluorescence
TPP	TriPhénylporphyrine
TMEDA	Tétraméthyléthylènediamine
TMPyP4	Tétra-méthyl-pyridinum porphyrine
TMS	Triméthylsilyl
TMSA	TriMéthylSilylAcétylène
TNL	Transmission Non linéaire
TsCl	Chlorure de Tosyle
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR2	Le récepteur 2 du facteur de croissance vasculaire endothéliale
Zn(OAc) ₂	Diacétate de Zinc

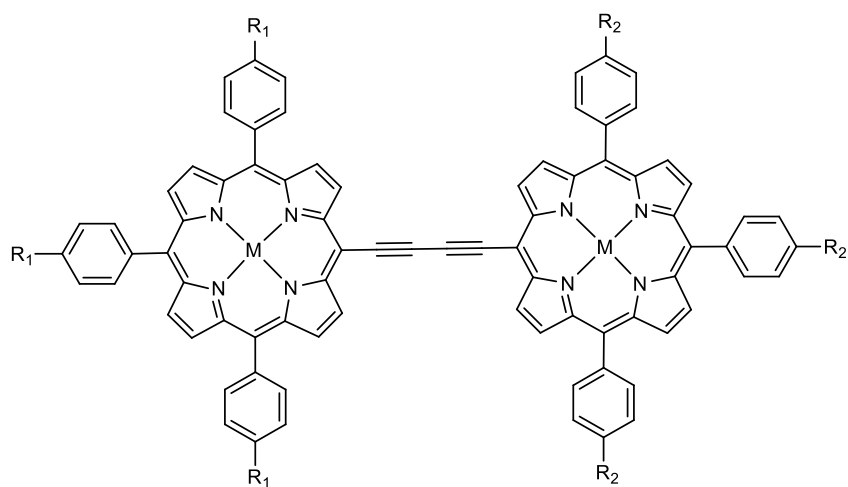
Nomenclature



M-TPP(R)-YSi



M-TPP(R₁)-Y-M-TPP(R₂)



M-TPP(R₁)-Y₂-M-TPP(R₂)

Résumé

Titre : Photothérapie dynamique vectorisée contre le rétinoblastome : conception, synthèse et études photobiologiques de photosensibilisateurs excitables à deux photons

Mots clés : PDT-ADP, rétinoblastome, Liposome

La photothérapie dynamique (PDT) est un nouveau traitement n'induisant potentiellement pas de mutation et utilisable pour lutter contre le rétinoblastome. Les dérivés de porphyrine utilisés comme Ps dans la Thérapie PhotoDynamique (PDT) sont largement étudiés depuis la naissance du premier Ps de synthèse (l'HpD). Une limitation importante de la PDT provient de la faible profondeur (confinée près de la surface) de pénétration de la lumière ($\lambda < 700$ nm) employée pour l'excitation du Ps. Afin de fournir une énergie d'activation suffisante pour produire l'oxygène singulet dans la fenêtre thérapeutique entre 700-1300, le processus d'absorption à deux photons a été proposé. Les Ps excitables par l'absorption simultanée de deux photons conduisent au concept de PDT à deux photons (PDT-ADP). Ce processus ayant une faible probabilité, son application demande le développement de nouveaux Ps avec une section efficace importante. Une autre limitation de la PDT est la faible sélectivité et spécificité des Ps actuels pour les cellules tumorales. Un ciblage actif de récepteurs membranaires spécifiques des cellules tumorales représente une solution possible. Il a été rapporté que des récepteurs de type lectine reconnaissant certains sucres sont surexprimés par des cellules malignes. Nous présenterons la synthèse et les résultats photocytotoxiques de dimères dissymétriques de porphyrine P-Y-P', inspirée d'études précédentes du laboratoire, privilégiant l'introduction de trois chaînes *para*-phénoxy-diéthylène glycol mannose sur trois des positions *méso* de porphyrines optimisés pour l'absorption à deux photons et vectorisés vers des lectines membranaires.

Pour contourner le problème de solubilité des porphyrines dimères en milieu aqueux et améliorer l'internalisation de Ps dans les cellules tumorales, nous avons analysé le comportement interfacial des porphyrines dimères à l'interface air-tampon, étudié leur incorporation dans les liposomes à l'aide de la technique de la fluorescence, et évalué l'interaction entre porphyrin dimères et la Concanavalline A (une lectine extraite de *Canavalia ensiformis* qui reconnaît de manière spécifique l'alpha-D-mannose).

Abstract

Title: Photodynamic therapy vectorized against retinoblastoma: Design, Synthesis and Photobiological studies of two-photon excitable photosensitizers

Keywords: TPE-PDT, retinoblastoma, liposome

Photodynamic therapy (PDT) is a new potential treatment against retinoblastoma, which doesn't induce mutations. The porphyrin derivatives used as Ps in PDT are widely studied since the birth of the first synthesis Ps (HpD). An important limitation of PDT comes from low penetration of light ($\lambda < 700$ nm) used for excitation of the Ps. In order to provide enough energy to enable production of singlet oxygen in the phototherapeutic window between 700-1300, the absorption of two relatively low-energy photons simultaneously has been proposed. Ps excited by simultaneous absorption of two photons leads to the concept of two-photon PDT (TPE-PDT). This process has very low probability; its application in the PDT needs develop new Ps with intensive cross section. Another limitation is the low selectivity and specificity of current Ps for tumor cells. Active targeting to appropriate receptors expressed at the tumor cells give a possible solution. It has been reported that the lectin-like receptors recognizing certain sugars are overexpressed in malignant cells. We will present the synthesis and *in vitro* photocytotoxic results of asymmetric porphyrin dimers P-Y-P', inspired by previous studies of our laboratory, introducing three *para*-phenoxy-diethylene glycol mannose chains at the meso positions of porphyrin core which optimized for two-photon absorption and targeted to membrane lectins.

To circumvent the solubility problem of porphyrin dimers in aqueous medium and improve internalization of Ps into tumor cells, we analyzed the interfacial behavior of the porphyrin dimers in the air-buffer interface, studied the incorporation of porphyrin dimers in liposomes using the technique of fluorescence, and evaluated the interaction between porphyrin dimers and Concanavalin A (*Canavalia ensiformis* lectin derived from that specifically recognizes the α -D-mannose).

摘要

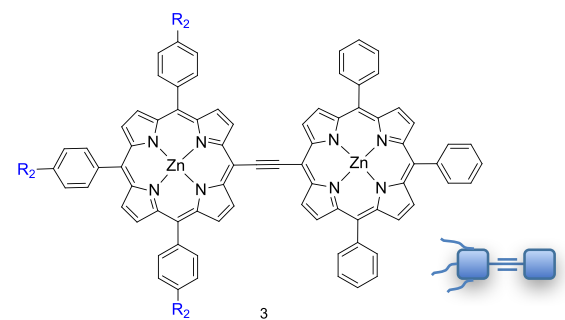
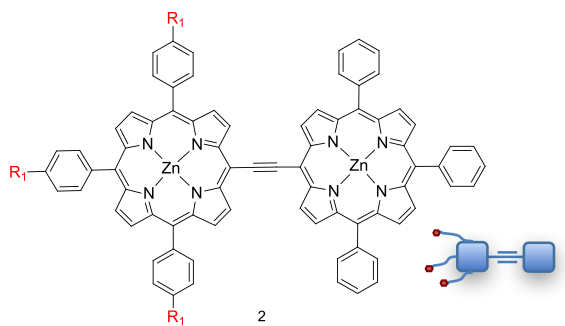
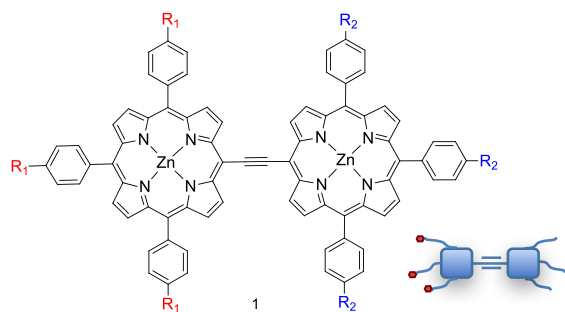
光动力疗法 (Photodynamic therapy, PDT) 对靶组织具有可选择性, 可减少正常组织的损伤, 是一种治疗视网膜细胞瘤的一个新的潜在的疗法。在第一个合成光敏剂 (血卟啉衍生物, HPD) 诞生之后, 卟啉衍生物被广泛的研究用于发现新的光敏剂。

由于光动力学疗法所使用的激发波长 ($\lambda < 700\text{nm}$) 穿透的组织深度有限, 限制来它治疗较大肿瘤上的应用。近年来新兴的双光子光动力学治疗技术, 通过采用吸收近红外波段光, 且具有较大双光子截面的光敏剂, 可以大大提高该技术的有效性与使用范围。由于双光子吸收的概率非常低, 目前一直缺乏高效的双光子光疗药物。甘露糖 (Mannose) 可以靶向刀豆凝集素 A (Concanavaline A), 而且该凝集素在某些恶性细胞细胞上过度表达, 因此甘露糖分子修饰光敏剂可以提高对肿瘤细胞的选择性。基于实验室以往的研究成果, 我们合成了两组甘露糖修饰不对称卟啉二聚: 单炔二聚体 (P-Y-P') 和双炔二聚体 (P-Y₂-P')。并且分析了他们的物理化学和光化学特性, 以及在人结肠癌细胞 (HT-29) 和人视网膜母细胞瘤细胞 (Y79) 检测了他们的细胞毒性和光化学毒性。

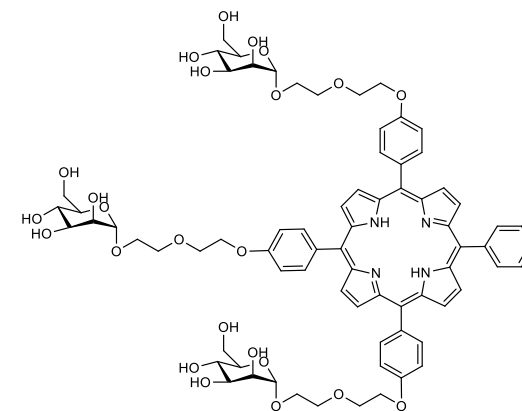
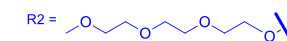
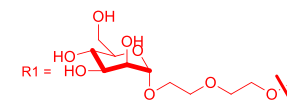
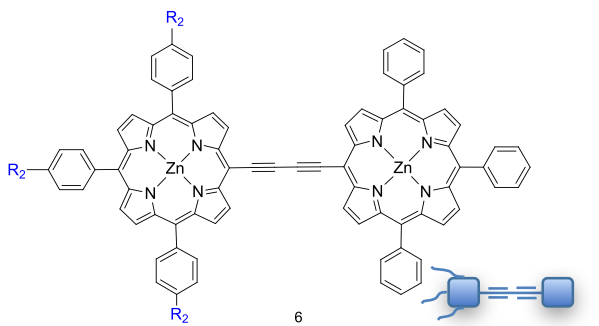
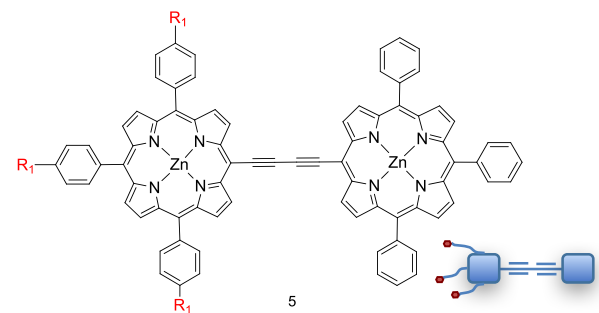
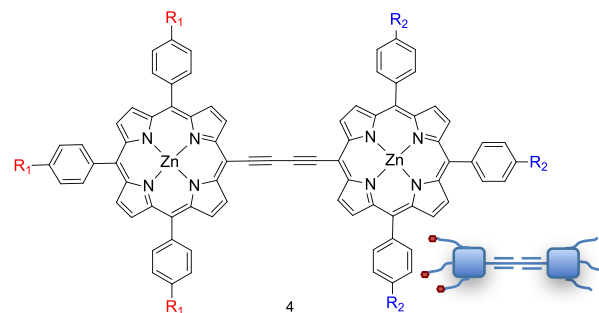
为了避免, 卟啉二聚体在水性介质的溶解性问题, 提高卟啉二聚光敏剂内化进入肿瘤细胞的数量, 我们分析了卟啉二聚体的界面性质, 使用荧光技术研究了卟啉二聚体嵌入的脂质体 (liposomes), 并且研究了卟啉二聚体和伴刀豆凝集素 A 之间的相互作用。

Structures chimiques des porphyrines dimères avec leurs icônes abrégées et molécule référence

P-Y-P



P-Y₂-P



TPP(ODegOManOH)-Ph

