



HAL
open science

Photosensibilisateurs porphyriniques pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique et pour la théranostique

Sébastien Jenni

► **To cite this version:**

Sébastien Jenni. Photosensibilisateurs porphyriniques pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique et pour la théranostique. Autre. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAF005 . tel-03226889

HAL Id: tel-03226889

<https://theses.hal.science/tel-03226889v1>

Submitted on 16 May 2021

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut de Chimie, LSAMM, UMR 7177

THÈSE présentée par :

Sébastien Jenni

Soutenue le : **12 avril 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Chimie et Biologie**

**Photosensibilisateurs porphyriniques
pour la PDT par excitation mono- et bi-
photonique et pour la théranostique**

THÈSE dirigée par :

**Prof. Valérie Heitz
Dr. Angélique Sour**

Université de Strasbourg
Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

**Dr. Fabienne Dumoulin
Prof. Gilles Lemercier**

Gebze Technical University, Turquie
Université de Reims Champagne-Ardenne

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Dr. CNRS Céline Frochot

Université de Lorraine

Remerciements

Je souhaite tout d'abord sincèrement remercier le Dr. Fabienne Dumoulin, le Pr. Gilles Lemerrier et le Dr. Céline Frochot pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens à remercier énormément le Pr. Valérie Heitz et le Dr. Angélique Sour, mes deux encadrantes de thèses. Un énorme merci pour m'avoir accepté dans votre laboratoire en M1, il y a 5 ans déjà. Cela a été une sacrée aventure. Merci pour votre encadrement, vos conseils, votre disponibilité et votre patience ! J'aimerais aussi vous remercier pour le grand nombre de domaines que j'ai pu explorer et de manipulations différentes que j'ai réalisés lors de cette thèse. Jamais je n'aurais pu imaginer un sujet de thèse aussi varié et dynamique ! Merci pour tout.

Je remercie chaleureusement le Dr. Frédéric Bolze. On a passé énormément de temps à essayer de tuer des cellules. Finalement, on aura réussi ! Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur constante et les discussions microscopies ou planctons fluorescents.

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui ont travaillé sur ce sujet. Merci au Dr. Barbara Ventura pour les mesures photophysiques et aux Dr. Célia Bonnet et Eva Tóth pour les mesures de relaxivité. Merci au Dr. Christelle Po pour les images IRM sur cellules et pour la présentation du laboratoire et de l'IRM. Un grand merci au Dr. Elvire Guiot et à Erwan Grangirard, en charge du laser biphoton à l'IGBMC. Merci pour votre formation, votre disponibilité et vos conseils. Je tiens aussi à remercier le Dr. Anne Boos pour les mesures ICP-AES. Un grand merci aux personnels des services communs de RMN, Lionel, Maurice et Bruno pour votre aide et vos conseils. Merci aux services communs de mesures physiques et de spectrométrie de masses. Je remercie aussi le ministère de la Recherche et de l'Enseignement pour avoir financé cette thèse.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire, Stéphanie, Henri Pierre, Geneviève, Lucas, Julie, Laetitia, Laure, Ryan, Charlie et ceux que j'ai oubliés. Merci Julie, pour ton encadrement en stage de master, c'était vraiment génial de travailler avec toi. Lucas, j'attends toujours que tu me rembourses les cafés. Ryan, bonne chance pour la fin, t'en auras besoin.

Merci à la belle brochette de biologistes d'Illkirch, Laurie, Kate et Juline d'avoir accepté un chimiste dans votre salle de culture et pour les soirées Karaoké. Promis les contaminations c'est pas moi !

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer depuis mon arrivée à Strasbourg et qui ont fait passer ces 8 années d'études en un clin d'œil. Merci à Clément, Jérémy, Romain, Thomas, Stephen, Adri, Margaux, Laurie, Maxime.

Merci à la team Summum et à l'amicale du café schnaps anciennement amicale du Ti'punch, Régis, Hervé, Ryan, Salen, Yann, Laurent, Morgane et Amaury. On en aura passé des soirées ensemble. Sans vous jamais je ne serais jamais allé aussi loin. Merci à vous !

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, mes parents et ma sœur pour m'avoir soutenu et toujours encouragé à faire ce qui me plaisait. Merci beaucoup !

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	9
CHAPITRE I: INTRODUCTION	11
I.1. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE.....	11
I.1.1. <i>Historique</i>	11
I.1.2. <i>Principe</i>	12
I.1.3. <i>Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques</i>	13
I.1.4. <i>Fenêtre thérapeutique optique</i>	15
I.2. L'ABSORPTION BIPHOTONIQUE	16
I.2.1. <i>Introduction et principe</i>	16
I.2.2. <i>Mesure de la section efficace d'absorption biphotonique (σ_2)</i>	18
I.2.2.a) La méthode Z-scan	18
I.2.2.b) La méthode TPEF.....	19
I.2.3. <i>Applications de l'absorption biphotonique</i>	20
I.2.4. <i>Photosensibilisateurs pour la PDT par excitation biphotonique</i>	20
I.2.4.a) Excitation biphotonique réalisée avec des photosensibilisateurs pour l'excitation monophotonique	20
I.2.4.b) Photosensibilisateurs basés sur des composés organiques	22
I.2.4.c) Photosensibilisateurs porphyriniques	23
I.2.4.d) Photosensibilisateurs basés sur des complexes de métaux de transition	26
I.3. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE	27
I.3.1. <i>Historique et principe</i>	27
I.3.2. <i>Agents de contraste pour l'IRM</i>	28
I.3.3. <i>Agents de contraste à base de Gd(III)</i>	29
I.3.4. <i>Facteurs influençant la relaxivité des agents de contraste</i>	30
I.4. AGENTS THERANOSTIQUES MOLECULAIRES POUR LA PDT ET L'IRM.....	32
I.5. PHOTOSENSIBILISATEURS VECTORISES POUR LA PDT	35
I.5.1. <i>Introduction</i>	35
I.5.2. <i>Acide folique</i>	36
I.5.3. <i>Biotine</i>	40
I.5.4. <i>Photosensibilisateurs vectorisés pour la PDT biphotonique</i>	41
I.6. PROJET DE THESE	42
CHAPITRE II: COMPOSE MOLECULAIRE POUR LA PDT PAR ABSORPTION MONO- ET BI-PHOTONIQUE ET L'IRM.....	45
II.1. RESULTATS ANTERIEURS OBTENUS AU LABORATOIRE.....	47
II.2. STRATEGIE DE SYNTHESE	47
II.3. SYNTHESE DE L'AGENT THERANOSTIQUE DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	48

II.3.1.	Synthèse de la porphyrine TIPS-ZnP-H	48
II.3.2.	Synthèse de l'espaceur	51
II.3.3.	Synthèse du photosensibilisateur 14	51
II.3.4.	Synthèse de DPP-ZnP-(GdDOTA)₂ et DPP-ZnP-(YDOTA)₂	53
II.4.	CARACTERISATIONS DE DPP-ZnP-(GdDOTA)₂ EN TANT QUE PHOTSENSIBILISATEUR POUR LA PDT PAR EXCITATION MONO- ET BI-PHOTONIQUE	58
II.4.1.	Spectroscopie d'absorption UV-visible	58
II.4.2.	Propriétés de luminescence.....	60
II.4.3.	Rendement quantique de formation d'oxygène singulet	61
II.4.4.	Spectre d'excitation biphotonique.....	62
II.4.5.	Récapitulatifs des propriétés photophysiques.....	63
II.5.	CARACTERISATIONS DE DPP-ZnP-(GdDOTA)₂ EN TANT QU'AGENT DE CONTRASTE POUR L'IRM	64
II.6.	ÉTUDES CELLULAIRES DE DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	66
II.6.1.	Localisation cellulaire	66
II.6.2.	Cytotoxicité.....	66
II.6.3.	Phototoxicité par excitation monophotonique.....	67
II.7.	CONCLUSION.....	68
CHAPITRE III:	ÉTUDES CELLULAIRES DE DEUX AGENTS THERANOSTIQUES	71
III.1.	AGENT THERANOSTIQUE P(GdDTTA)₄ POUR LA PDT PAR EXCITATION MONOPHOTONIQUE ET L'IRM.....	71
III.1.1.	Présentation de P(GdDTTA)₄	71
III.1.2.	Études cellulaires	73
III.1.2.a)	Localisation cellulaire	73
III.1.2.b)	Cytotoxicité	73
III.1.2.c)	Phototoxicité par excitation monophotonique	74
III.1.2.d)	Temps de relaxation T ₁ de P(GdDTTA)₄ dans les cellules	75
III.2.	AGENT THERANOSTIQUE COMBINANT UN PHOTSENSIBILISATEUR POUR LA PDT BIPHOTONIQUE ET DEUX COMPLEXES DE GADOLINIUM(III) POUR L'IRM	77
III.2.1.	Présentation de GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	77
III.2.2.	Études cellulaires	78
III.2.2.a)	Localisation cellulaire	78
III.2.2.b)	Internalisation cellulaire.....	79
III.2.2.c)	Cytotoxicité	79
III.2.2.d)	Phototoxicité par excitation monophotonique	80
III.2.2.e)	Phototoxicité par excitation biphotonique.....	81
III.3.	CONCLUSION.....	85
CHAPITRE IV:	PHOTSENSIBILISATEUR VECTORISE POUR LA PDT PAR EXCITATION BIPHOTONIQUE.....	87
IV.1.	STRATEGIE DE SYNTHÈSE	87
IV.2.	SYNTHÈSE DE DPP-ZnP-FA ET DPP-ZnP-BIOTINE	88

IV.2.1.	<i>Synthèse du synthon 19</i>	88
IV.2.2.	<i>Synthèse du photosensibilisateur 22</i>	89
IV.2.3.	<i>Synthèse et caractérisation de DPP-ZnP-FA</i>	91
IV.2.3.a)	<i>Synthèse de DPP-ZnP-FA</i>	91
IV.2.3.b)	<i>Caractérisation de DPP-ZnP-FA</i>	93
IV.2.4.	<i>Synthèse et caractérisation de DPP-ZnP-Biotine</i>	95
IV.2.4.a)	<i>Synthèse de DPP-ZnP-Biotine</i>	95
IV.2.4.b)	<i>Caractérisation de DPP-ZnP-Biotine</i>	96
IV.3.	CARACTERISATIONS PHOTOPHYSIQUES.....	99
IV.3.1.	<i>Absorption UV-Visible</i>	99
IV.3.2.	<i>Mesures de luminescence</i>	99
IV.3.3.	<i>Rendement quantique de formation d'oxygène singulet</i>	101
IV.3.4.	<i>Spectres d'excitation biphotonique</i>	103
IV.3.5.	<i>Récapitulatif des mesures photophysiques</i>	104
IV.4.	TESTS CELLULAIRES.....	104
IV.4.1.	<i>Cytotoxicité</i>	104
IV.4.2.	<i>Internalisation cellulaire</i>	105
IV.4.1.	<i>Phototoxicité par excitation monophotonique</i>	106
IV.4.2.	<i>Phototoxicité par excitation biphotonique</i>	107
IV.5.	CONCLUSION.....	109
CHAPITRE V:	CUBOSOMES POUR LA PDT MONO- ET BI-PHOTONIQUE	111
V.1.	INTRODUCTION.....	111
V.1.1.	<i>Cubosomes incorporant le composé YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA</i>	112
V.1.2.	<i>Cubosomes incorporant TIPS-ZnP-ZnP-TIPS</i>	115
V.2.	PHOTOSENSIBILISATEUR LIE PAR LIAISON COVALENTE AUX SURFACTANTS DES CUBOSOMES.....	117
V.2.1.	<i>Synthèse du photosensibilisateur et des cubosomes</i>	117
V.2.1.	<i>Études cellulaires</i>	120
V.2.1.a)	<i>Localisation cellulaire</i>	120
V.2.1.b)	<i>Cytotoxicité</i>	121
V.2.1.c)	<i>Phototoxicité par excitation monophotonique</i>	121
V.3.	PHOTOSENSIBILISATEUR LIE AU SURFACTANT DES VESICULES.....	122
V.3.1.	<i>Localisation cellulaire</i>	123
V.3.2.	<i>Cytotoxicité</i>	123
V.3.3.	<i>Phototoxicité par excitation monophotonique</i>	124
V.4.	CUBOSOMES ET VESICULES POUR LA PDT ET LA CHIMIOThERAPIE.....	125
V.4.1.	<i>Cytotoxicité induite par le Docétaxel</i>	126
V.4.2.	<i>Phototoxicité par excitation monophotonique du PS</i>	128
V.5.	CONCLUSION.....	130

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	131
ANNEXES.....	135
PARTIE EXPÉRIMENTALE	139
GENERAL INFORMATION	139
SPECTROSCOPY AND PHOTOPHYSICS	140
CELL EXPERIMENTS	141
SYNTHESIS	145
<i>Chapitre 2</i>	145
<i>Chapitre 4</i>	157
<i>Chapitre 5</i>	164
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	171
PUBLICATIONS	171
COMMUNICATIONS.....	172
<i>Orales</i>	172
<i>Par affiches</i>	172
REFERENCES	173

Liste des abréviations

ADPA – Acide anthracene-9,10-dipropionique
BSA - Bovine serum albumine
CCM – Chromatographie sur couche mince
CIS – Croisement inter-système
COSY – Correlation spectroscopy
Cryo-TEM – Cryogenic transmission electron microscopy
DCM – Dichlorométhane
DDQ – 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone
DEL – diode électroluminescente
DIPEA - N,N-Diisopropyléthylamine
DLS – Dynamic light scattering
DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium
DMF – Diméthylformamide
DMSO – Diméthylsulfoxyde
DPBF - 1,3-Diphenylisobenzofurane
DPP – Dicotépyrrolopyrrole
EPR – Enhanced permeability and retention effect
ES-MS – Electro-spray mass spectroscopy
GM – Goepfert-Mayer
HPLC – High pressure liquid chromatography
HR ES-MS – High resolution Electro-pray mass spectroscopy
IC₅₀ – Concentration inhibitrice médiane
ICP-AES – Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
IRM – Imagerie par résonance magnétique
LD₅₀ – Light dose médiane, dose lumineuse conduisant à 50 % de mort cellulaire
MTT - Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NBS – N-bromosuccinimide
NMRD - Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
PBS – Phosphate buffer saline
PDT – Thérapie photodynamique
PET – Positron emission tomography
PMT – Photomultiplicateur
PS - Photosensibilisateur
RMN – Résonance magnétique nucléaire
SAXS – Small angle X-ray scattering
SNC – Système nerveux central
TBTU - 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate
TFA – acide trifluoroacétique
TPA – Two-photon absorption
TPEF – Two-photon excitation fluorescence

Chapitre I: Introduction

I.1. La thérapie photodynamique

I.1.1. Historique

Les propriétés thérapeutiques de la lumière sont connues depuis longtemps. En effet en Égypte antique, Grèce antique ou dans les pays orientaux l'utilisation de la lumière permettait de traiter différentes maladies comme le psoriasis.¹

En 1903, Niels Finsen reçut le prix Nobel de médecine pour ses travaux sur la photothérapie. Il découvrit que la lumière pouvait soigner la tuberculose.² Néanmoins, la première observation de mort cellulaire induite par un composé irradié par de la lumière date de 1900.³ Oscar Rabb, un étudiant de l'équipe de Von Tappeiner et Jesionek à l'université de Munich, remarqua que l'ajout de colorants à des cultures de paramécie conduisait de façon inexplicable à la mort de celle-ci lors des expériences menées le jour et non la nuit.⁴ Ils découvrirent que le composé responsable était l'acridine et démontrèrent plus tard l'importance de la lumière et de l'oxygène.^{5,6} En 1905, ils réalisèrent les premiers tests cliniques de PDT avec d'excellents résultats sur des tumeurs de la peau et en 1907 Von Tappeiner introduit le terme PDT.^{1,7}

À la fin des années 70 Dougherty et al. utilisèrent un dérivé de l'hématoporphyrine, nommé HpD, injecté par voie intra veineuse suivie par une irradiation à la lumière rouge pour traiter 113 tumeurs malignes cutanées. Ils observèrent une rémission partielle ou totale pour 111 des tumeurs traitées.^{8,9}

Le photosensibilisateur (PS) HpD est obtenu en traitant l'hématoporphyrine avec de l'acide acétique et sulfurique donnant un mélange de monomère, dimère et oligomère de porphyrines.^{10,11} Par la suite le composé HpD a été partiellement purifié pour supprimer les monomères de porphyrine les moins actifs afin de donner Photofrin® (Figure 1).¹²

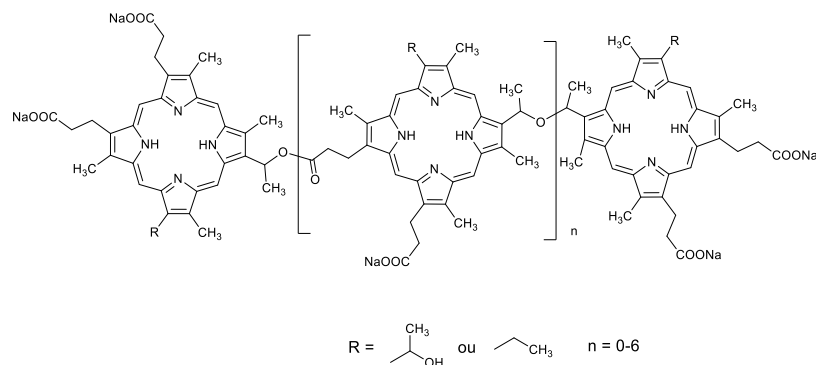


Figure 1. Structure de Photofrin[®], un mélange de dimères et d'oligomères de porphyrine.

Le composé Photofrin[®] est le premier PS à avoir été autorisé dans les années 90 pour une utilisation en clinique pour les traitements des cancers du poumon, de l'œsophage, de la vessie, du col de l'utérus ainsi que de certaines maladies de la peau.^{10,13} Bien que le Photofrin[®] soit actuellement encore le PS le plus utilisé en clinique, il possède plusieurs inconvénients. La composition exacte du mélange n'est toujours pas connue et les patients ne doivent pas s'exposer au soleil pendant au moins 4 semaines après le traitement à cause de l'élimination lente de ce PS par le corps humain.¹⁴ C'est pourquoi d'autres PSs ont été synthétisés.

I.1.2. Principe

Suite à l'absorption d'un photon, le PS va passer de l'état fondamental (S_0) à l'état excité singulet (S_1). À partir de cet état excité, trois types de transitions électroniques sont possibles. Une désactivation non radiative ou une émission de photons par fluorescence va conduire à un retour du PS à son état fondamental. La dernière possibilité est le croisement inter système (c.i.s) vers l'état triplet (T_1) (Figure 2).

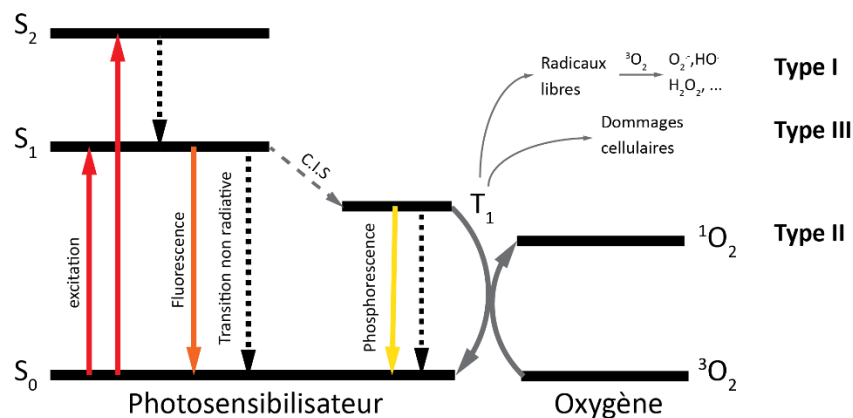


Figure 2. Illustration schématique des trois mécanismes cytotoxiques induits par un PS suite à son excitation par la lumière.

À partir de l'état triplet, le retour à l'état fondamental peut se faire selon différents processus. Une émission de photons par phosphorescence conduit à la désactivation du PS sans provoquer de cytotoxicité. Les autres processus sont impliqués dans la PDT et ces mécanismes peuvent être classés en trois types.¹⁵⁻¹⁷ Dans un mécanisme de type I le PS va réagir avec des substrats biologiques via un transfert d'électron ou d'hydrogène pour former des radicaux qui vont ensuite réagir avec l'oxygène pour générer des espèces réactives de l'oxygène. Dans un mécanisme de type II le PS va transférer son énergie à l'oxygène pour former de l'oxygène singulet. Les espèces réactives de l'oxygène incluant l'oxygène singulet produisent des stress oxydants conduisant à la mort cellulaire. Le troisième type, moins commun, résulte d'un transfert d'électrons vers des biomolécules comme l'ADN, les acides aminés ou encore les acides gras insaturés. Ce mécanisme n'implique pas d'oxygène et peut donc se produire dans des conditions hypoxiques. Il est admis que pour les PSs à usage clinique c'est le mécanisme de type II qui est le plus commun.¹⁵

1.1.3. Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques

Les caractéristiques d'un PS idéal pour la PDT donnés par Byrne et al.¹⁸ sont :

- Être un composé pur connu et stable à température ambiante
- Une faible toxicité en l'absence de lumière
- Avoir une bonne ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion)
- Posséder une longueur d'onde d'absorption se situant dans la fenêtre thérapeutique optique (700 -1000 nm) (voir Figure 5)
- Avoir un rendement quantique de formation d'oxygène singulet élevé
- Être peu chère et disponible commercialement
- Avoir une bonne sélectivité (accumulation dans les tumeurs)
- Ne doit pas induire d'effets mutagènes ou être cancérigène.

Bien qu'il existe des photosensibilisateurs organiques non tétrapyrroliques comme le Rose Bengal,¹⁹ les Bodipy,²⁰ des complexes de métaux de transitions comme le ruthénium²¹ ou l'iridium²² ou encore des produits naturels comme l'Hypéricine²³ ou l'Hypocréline,²⁴ la majorité des PSs utilisés pour des applications anticancéreuses ont des structures tétrapyrroliques.²⁵

Les composés tétrapyrroliques majoritaires qui sont utilisés en PDT sont les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phtalocyanines (Figure 3).

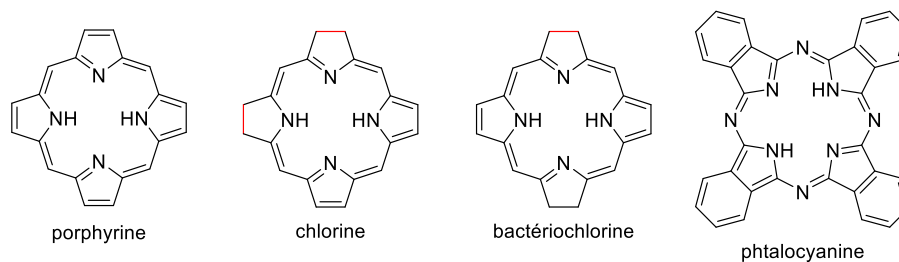


Figure 3. Structure des tétrapyrroles majoritaires utilisés en PDT.

Les PSs porphyriniques comme l'HpD ou la Photofrin® ont été les premiers à recevoir une autorisation pour l'utilisation en clinique et sont encore énormément utilisés.⁸ Les PSs appartenant à la famille des chlorines sont utilisés actuellement en clinique (Figure 4). On peut citer la m-tétrahydroxyphénylchlorine (Temoporfin® ou Foscan®),²⁶ la verteporphyne (visudyne®),²⁷ ou encore la chlorine e6.²⁸ L'avantage des chlorines par rapport aux porphyrines est une absorption plus forte vers 650 – 700 nm. Deux bactériochlorines, le Tookad²⁹ et Luz11³⁰, ont été étudiées en clinique et le Tookad a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe en 2017. Elles possèdent des bandes d'absorption entre 700 et 800 nm ce qui leur permet de traiter des tissus très pigmentés comme les mélanomes.³¹ Enfin, une phtalocyanine de Si(II) permettant une irradiation à 675 nm est en étude clinique.³²

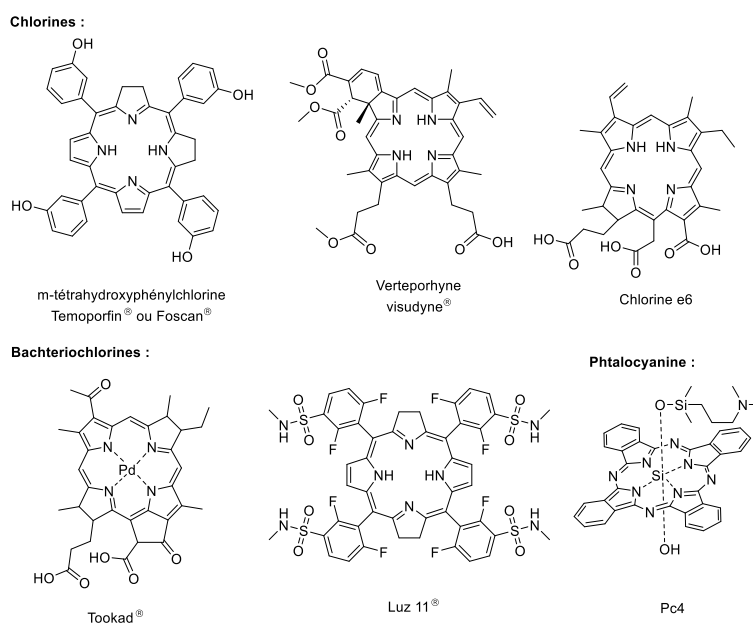


Figure 4. Structure de différents PSs utilisés en clinique ou en essai clinique.

I.1.4. Fenêtre thérapeutique optique

Malgré les avantages de la PDT par rapport aux autres traitements anticancéreux, la PDT est actuellement majoritairement utilisée en thérapie anticancéreuse pour traiter des patients qui n'ont pas pu être soignés par les thérapies classiques comme la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore la chirurgie.^{18,33,34} On peut néanmoins citer l'exemple de Tookad pour le traitement en première intention des patients atteints d'adénocarcinome de la prostate.

Deux des limitations qui empêchent la PDT de devenir une méthode de choix pour traiter le cancer sont la distribution de la lumière ainsi que la pénétration du faisceau lumineux à l'intérieur des tissus. Cette pénétration dépend fortement de la nature des tissus et de la longueur d'onde de la source lumineuse. Elle peut varier de 3 à 8 mm pour des longueurs d'onde allant de 630 à 800 nm.³⁵ Les acides aminés absorbent les photons en dessous de 300 nm et l'hémoglobine ou la mélanine absorbent essentiellement en dessous de 700 nm. À partir de 1000 nm l'eau commence à absorber fortement.^{35,36} La zone de longueurs d'onde entre 700 et 1000 nm constitue la fenêtre thérapeutique optique. La pénétration de la lumière à l'intérieur des tissus y est maximale et l'excitation des chromophores endogènes y est minimale (Figure 5).

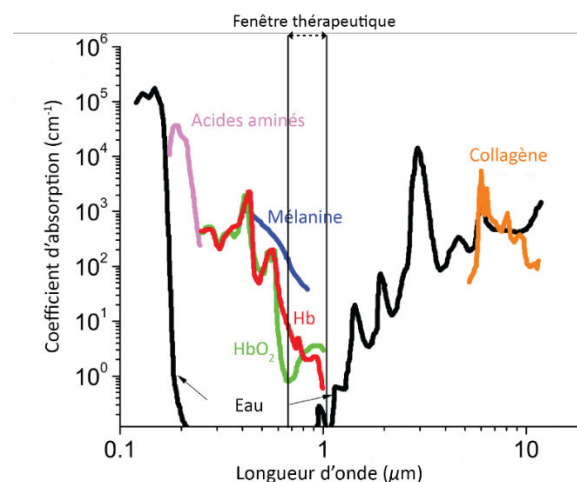


Figure 5. Absorbance de différents composés endogènes pour des longueurs d'onde allant de 200 à 10000 nm. Image adaptée avec autorisation du journal.³⁶

Cette limitation peut être réduite en synthétisant de nouveaux PSs pouvant être excités à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre thérapeutique optique ou en utilisant d'autres méthodes d'excitation comme l'excitation biphotonique.

1.2. L'absorption biphotonique

1.2.1. Introduction et principe

L'excitation biphotonique est définie comme l'absorption quasi-simultanée par une molécule, ou atome, de deux photons dont l'énergie est identique ou différente.^{37,38} Ce phénomène a été prédit théoriquement par Maria Goeppert-Mayer en 1931.³⁹ Mais, il a fallu attendre 30 années avant que Kaiser et Garret observent ce phénomène en 1961 en irradiant des cristaux de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ grâce au développement des premiers masers, ancêtre des lasers.³⁷ Le développement des lasers Ti:Saphire appliqués à la microscopie a été réalisé pour la première fois en 1992 par Curley *et al.*^{40,41}

Dans le cadre d'une excitation monophotonique le composé va passer de l'état fondamental (S_0) à un état excité (S_n) en absorbant un photon ($h\nu_1$). Pour une excitation biphotonique le composé va passer de l'état fondamental (S_0) à un état excité (S_n) en absorbant quasi simultanément deux photons ($\sim 0,05$ fs). Ces photons peuvent être d'énergie équivalente ($h\nu_2 = h\nu_3$) ou différente ($h\nu_2 \neq h\nu_3$) (Figure 6). Le composé excité va ensuite se désexciter par les mêmes processus électroniques que s'il avait absorbé uniquement un photon. Ainsi les différentes valeurs photophysiques et photochimiques (rendement et temps de vie de fluorescence, rendement de formation d'oxygène singulet, ...) sont identiques pour une excitation mono- ou biphotonique.

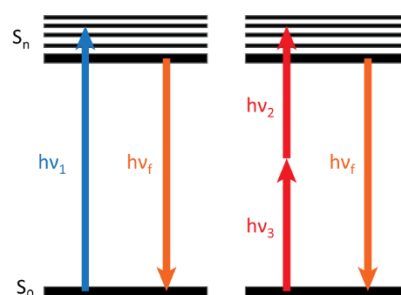


Figure 6. Absorption monophotonique (à gauche) ou biphotonique (à droite).

Contrairement à l'excitation monophotonique qui peut être obtenue par des intensités lumineuses relativement faibles, la probabilité de transition induite, R_{2p} , par une excitation biphotonique est proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse :

$$R_{2p} \propto \sigma_2 I^2$$

Avec σ_2 la section efficace d'absorption biphotonique et I l'intensité lumineuse. La section efficace d'absorption biphotonique (σ_2) est exprimée en Goeppert-Mayer (GM, 1 GM = 10^{-50} cm⁴.s.photon⁻¹.molecule⁻¹) en l'honneur de Maria Goeppert-Mayer qui a théoriquement prédit ce phénomène.³⁹

Cette dépendance quadratique implique que l'excitation biphotonique requiert une grande densité de photons nécessitant des lasers pulsés (Figure 7).

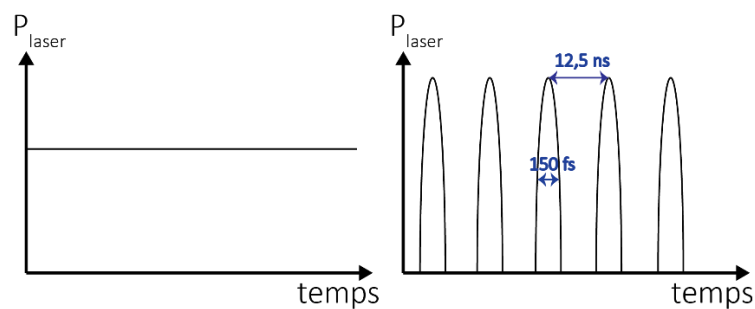


Figure 7. Profil de la puissance d'un laser continu (à gauche) et d'un laser pulsé (à droite).

Une autre conséquence de cette dépendance quadratique est le confinement de l'excitation du composé au point focal dans un volume d'environ $1 \mu\text{m}^3$ (Figure 8).⁴²

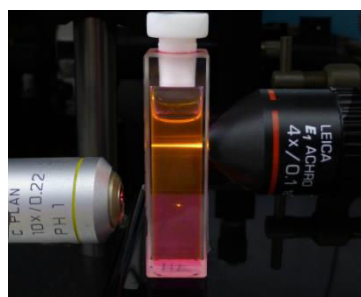


Figure 8. Fluorescence émise par un dicétopyrrolopyrrole après excitation par un laser UV (405 nm, en haut) et un laser femtoseconde (800 nm, en bas).

I.2.2. Mesure de la section efficace d'absorption biphotonique (σ_2)

De nos jours, deux méthodes sont principalement utilisées pour mesurer la section efficace d'absorption biphotonique d'un composé :

- La transmission non linéaire (Z-scan)
- La mesure de fluorescence émise par excitation biphotonique (TPEF)

Le choix de la méthode est déterminé par les caractéristiques du composé étudié.

I.2.2.a) La méthode Z-scan

La mesure de la section efficace d'absorption biphotonique par la méthode Z-scan a été décrite par Sheik-Bahae et al.⁴³ Elle consiste à mesurer la transmittance d'un échantillon en fonction de sa position sur l'axe z (Figure 9).

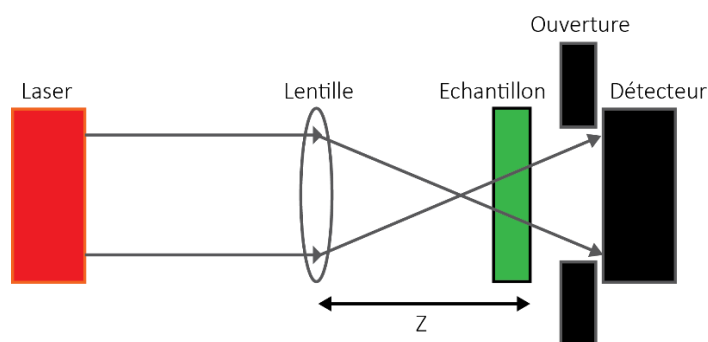


Figure 9. Schéma du montage pour la méthode z-scan.

Cette méthode permet de déterminer les sections efficaces d'absorption biphotonique pour des composés solides, liquides ou en solution possédant des propriétés de luminescences ou non. Néanmoins, elle requiert une forte intensité du laser et une concentration élevée en composé (300 GW.cm^{-2} et 10^{-2} - 10^{-3} M). De plus, la présence d'artéfacts produits par l'absorption d'état excité à longue durée de vie ou d'effet thermiques conduit à une surévaluation de la section efficace d'absorption biphotonique.^{44,45} C'est pourquoi, on peut observer une différence dans les σ_2 d'un facteur 10 – 100 entre la méthode Z-scan et TPEF ; ce qui rend la comparaison des σ_2 compliquées s'ils n'ont pas été mesurés par la même méthode.⁴⁶

I.2.2.b) La méthode TPEF

La méthode de fluorescence par excitation biphotonique (TPEF) a été introduite par Webb *et al* en 1996. Ils ont déterminé les sections efficaces de plusieurs fluorophores utilisés classiquement en microscopie de fluorescence.⁴⁷ Elle a ensuite été développée par Drobizhev, Rebane *et al* qui ont publié en 2008 les sections efficaces d'absorption biphotonique de plusieurs fluorophores commerciaux permettant d'avoir des références allant de 550 à 1600 nm.^{48,49}

La méthode TPEF consiste à mesurer la fluorescence émise par un composé suite à une excitation biphotonique (Figure 10). Les σ_2 sont déterminés en comparant la fluorescence émise par le composé et la référence dans les mêmes conditions d'irradiation. La méthode est décrite plus précisément en annexe.

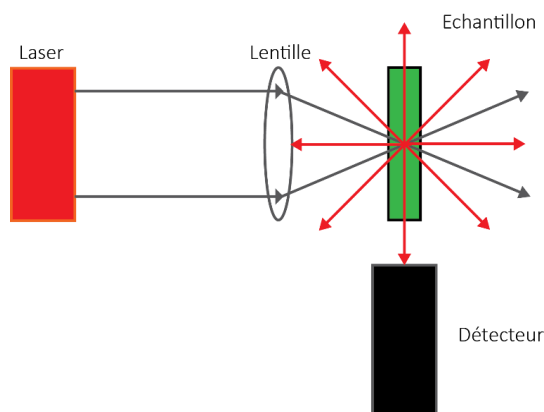


Figure 10. Schéma de montage pour la méthode TPEF.

La détermination des σ_2 par TPEF est une méthode de choix, car il n'est pas nécessaire de connaître les caractéristiques du laser comme pour la méthode Z-scan. Cette méthode présente néanmoins quelques limitations. En effet, le composé étudié doit être fluorescent et son rendement quantique de fluorescence doit être connu dans le solvant utilisé. Il est aussi important de vérifier à chaque longueur d'onde la dépendance quadratique entre la fluorescence et la puissance d'excitation pour exclure l'absorption monophotonique.

Dans cette thèse, la méthode TPEF a été utilisée pour déterminer les sections efficaces d'absorption biphotonique des composés, car les composés synthétisés sont solubles dans les solvants organiques et sont capables d'émettre de la fluorescence.

1.2.3. Applications de l'absorption biphotonique

La très bonne résolution spatiale de l'excitation biphotonique a conduit à un grand nombre d'applications comme la fabrication 3D,⁵⁰ le stockage de données,⁵¹ la microscopie de fluorescence^{38,41,52}, la photolibération localisée d'espèces actives⁵³ et la PDT par excitation biphotonique qui sera décrite dans le paragraphe suivant.

1.2.4. Photosensibilisateurs pour la PDT par excitation biphotonique

1.2.4.a) Excitation biphotonique réalisée avec des photosensibilisateurs pour l'excitation monophotonique

Les premières expériences de PDT par excitation biphotonique ont été réalisées avec des PSs développés pour l'absorption monophotonique. Ainsi, le groupe de Marchesini a réalisé au milieu des années 80, des études cellulaires et sur le petit animal avec le composé HpD en utilisant des lasers pulsés nanosecondes.⁵⁴ Très peu d'études ont été réalisées et les premiers résultats n'étaient pas concluants. Il a fallu attendre la démocratisation des lasers pulsés femtoseconde Ti : Saphire dans les années 90 pour observer un intérêt pour la PDT par excitation biphotonique.

Les premières études réalisées avec des lasers pulsés ont également impliqué des PSs développés pour la PDT par excitation monophotonique comme la Photofrin[®],^{55,56} la méso-tétrahydroxyphenylchlorine (m-THPC),⁵⁷ l'acide 5-aminolévulinique,⁵⁸ une phthalocyanine d'aluminium,⁵⁹ un dérivé de chlorophylle,⁶⁰ l'ester de méthyle de la pyrophéophorbide-a (MPPa)⁶¹ et la Visudyne (formulation liposomale de la vertéporphyne) (Figure 11).^{56,62}

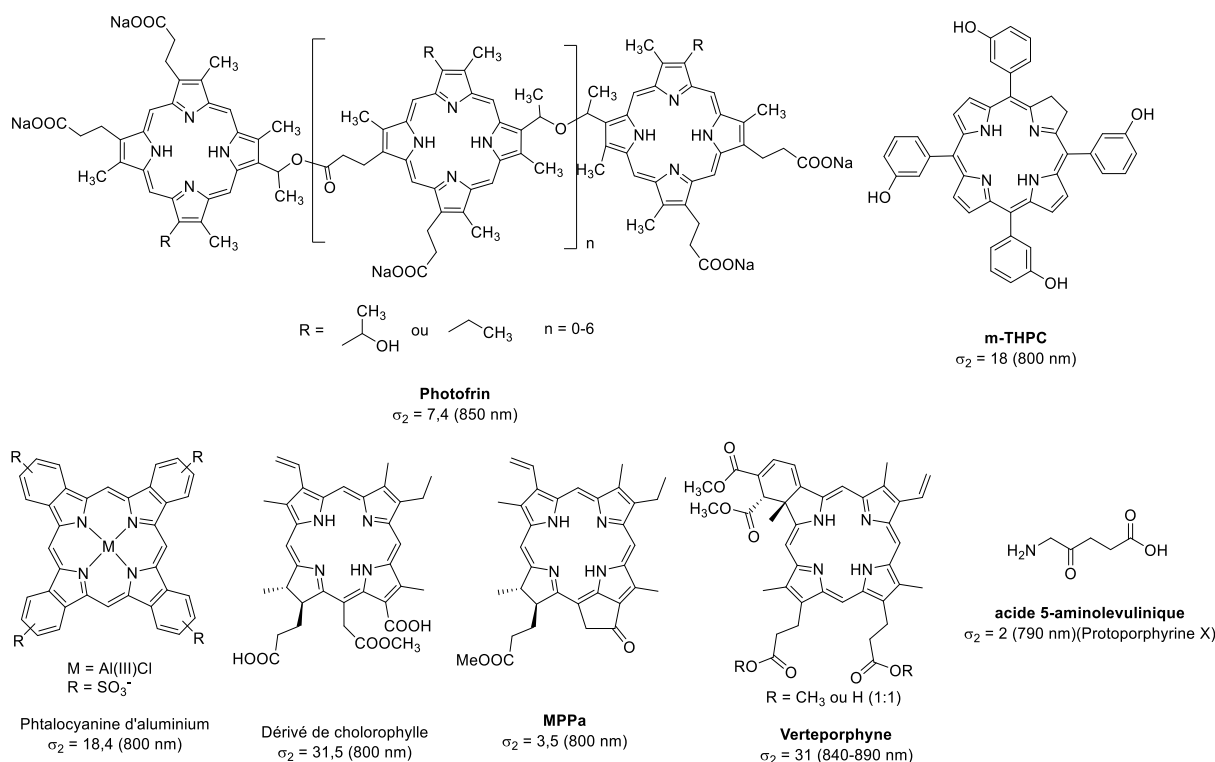


Figure 11. PSs développés pour la PDT par excitation monophotonique utilisés en excitation biphotonique et leurs sections efficaces d'absorptions biphotonique (en GM).

On peut notamment citer le groupe de Wilson qui a réalisé un travail important en utilisant la Photofrin® et la Visudyne®.^{55,56} Ils ont déterminé les sections efficaces d'absorption biphotoniques et réalisés des études de phototoxicité par excitation biphotonique sur des cellules endothéliales de la prostate du rat (YPEN-1). En développant une nouvelle méthode utilisant des colorants fluorescents pour mesurer la mort cellulaire, ils ont pu obtenir des résultats quantitatifs. Ils ont ainsi démontré pour la première fois la dépendance quadratique reliant la mort cellulaire et l'intensité lumineuse prouvant ainsi une mort cellulaire induite par une excitation biphotonique.

Malgré des résultats prometteurs sur des cellules, il est peu probable que ces PSs soient utilisés en clinique à cause des longs temps d'irradiation et des fortes puissances nécessaires. Ainsi, le développement de nouveaux PSs avec des sections efficaces d'absorption biphotonique plus élevés, mais en conservant un bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet, une bonne biodistribution et internalisation cellulaire est nécessaire.

1.2.4.b) Photosensibilisateurs basés sur des composés organiques

Un grand nombre de synthèses visant à améliorer l'absorption biphotonique en augmentant la conjugaison des électrons π et en introduisant des groupements donneurs et accepteurs a été effectué. La forte hydrophobicité et le faible croisement intersystème des composés organiques restent un inconvénient majeur.⁶³ Néanmoins, leurs faibles rendements quantiques de formation d'oxygène singulet peuvent être compensés par une très grande section efficace d'absorption biphotonique.

Les premiers essais de phototoxicité de type I induite par une excitation biphotonique en utilisant un laser femtoseconde ont été réalisés par le groupe de Wachter en 1997.⁶⁴ Ils ont utilisé des dérivés du psoralène pour tuer des bactéries. En 2002, Xia *et al.* ont déterminé les sections efficaces d'absorption biphotonique de l'hypocrelline a (35 GM) et b (21 GM) et les ont étudié en PDT par excitation biphotonique (Figure 12).⁶⁵

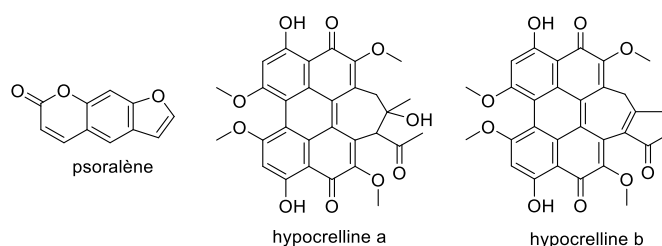


Figure 12. Structure du psoralène et de l'hypocrelline a et b.

Plus tard, à partir de 2011 plusieurs groupes décrivent la synthèse et l'étude de plusieurs PSs organiques pour la PDT par excitation biphotonique avec des chromophores basés des benzylidène cyclopentanone⁶⁶, sur des indenofluorènes⁶⁷, des cyclobutanones⁶⁸ ou encore des coumarines⁶⁹.

En 2015 et 2016, Teulade-Fichou, Deprez *et al.* décrivent la synthèse et l'étude de deux chromophores basés sur des triphénylaminés, **TP2Py** et **TP3Bzim**, portant respectivement des pyridiniums ou des N-méthylbenzylinium (Figure 13).^{70,71} Ces deux composés possèdent de bonnes sections efficaces d'absorption biphotonique (335 GM à 860 nm pour **TP2PY** et 764

GM à 760 nm pour **TP3Bzim**) dans une solution tampon contenant de l'ADN. Malgré un très faible rendement quantique de formation d'oxygène singulet de 0,04 dans le DMF pour **TP3Bzim**, l'irradiation à 760 nm a provoquée une relocalisation du PS du cytoplasme vers le noyau et a provoqué la mort cellulaire. De plus, les rendements de fluorescence corrects lorsque ces deux composés sont liés à l'ADN ($\phi_f = 0,07$ pour **TP2PY** et $\phi_f = 0,34$ pour **TP3Bzim**) permettent de réaliser de la microscopie de fluorescence induite par une excitation biphotonique. Ces deux composés sont donc des candidats thérapeutiques intéressants pour la microscopie de fluorescence et la PDT par excitation biphotonique.

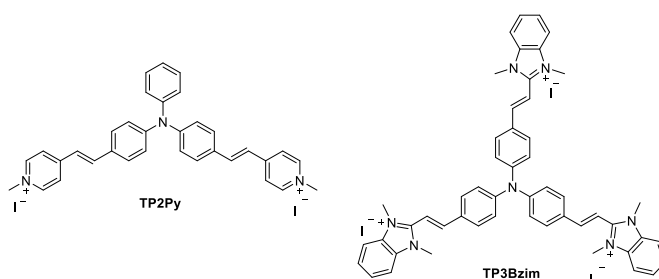


Figure 13. Structure des deux composés décrits par Teulade-Fichou, Deprez *et al.*

1.2.4.c) Photosensibilisateurs porphyriniques

Kobuke *et al.* ont été les premiers à développer plusieurs arrangements de porphyrines de zinc(II) avec des valeurs de sections efficaces d'absorption biphotoniques très élevées.⁷²⁻⁷⁵ Le composé présenté dans la Figure 14 est un assemblage de quatre porphyrines, deux monomères et un dimère, portant douze groupements carboxylates pour augmenter la solubilité dans l'eau. Les sections efficaces d'absorption biphotonique sont de 33000 GM à 890 nm et de 28000 GM à 780 nm. Ces valeurs très élevées ont été mesurées par la méthode Z-scan et un laser ns conduisant à une surévaluation de la section efficace d'absorption biphotonique. Ils ont démontré la formation d'oxygène singulet dans les cellules en utilisant l'ADPA comme piègeur fluorescent de l'oxygène singulet. Des tests de phototoxicité sur des cellules HeLa ont montré une dégradation de la membrane cellulaire observée uniquement au point focal du laser prouvant la sélectivité spatiale de l'irradiation.

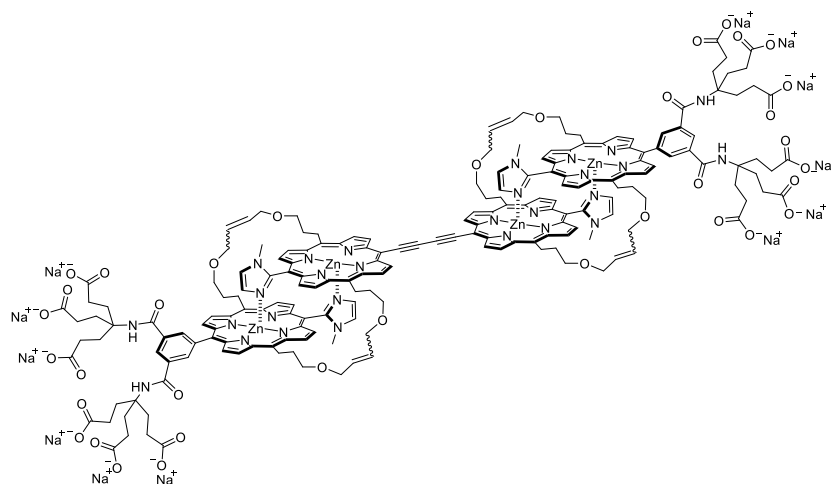


Figure 14. Structure de l'assemblage de porphyrines développé par Kobuke *et al.*⁷³

Les travaux les plus avancés dans ce domaine ont été réalisés par les groupes d'Anderson et de Wilson. Une étude poussée sur une série de 7 dimères de porphyrines fonctionnalisés avec différents substituent polaires cationiques ou anioniques a été réalisée (Figure 15).⁷⁶⁻⁷⁹

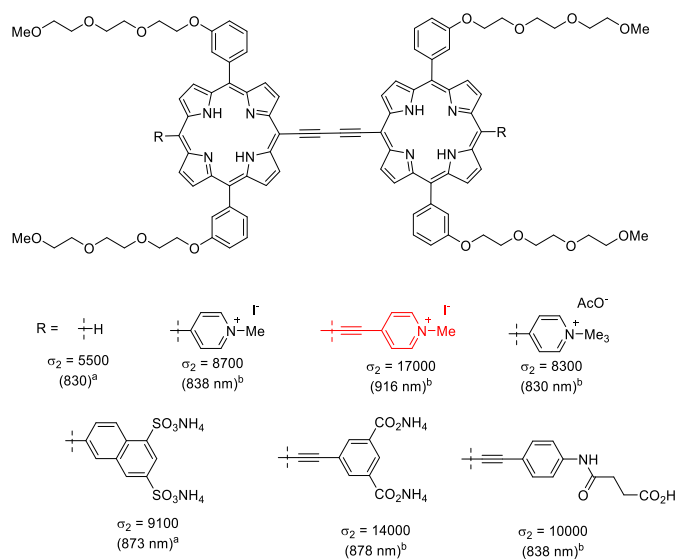


Figure 15. Structure des dimères de porphyrines développés par Anderson, Wilson *et al.* et leurs sections efficaces d'absorption biphotonique (a : DCM/pyr 1%, b : DMF/pyr 1%).

Les différents dimères de porphyrines possèdent de grandes sections efficaces d'absorption biphotonique ($5500 < \sigma_2 < 17000$ GM) et de bons voire de très bons rendements quantiques de formation d'oxygène singulet dans le méthanol ($0,2 < \phi_\Delta < 0,89$). Ils ne sont pas cytotoxiques dans la gamme de concentration utilisée ($0 - 40 \mu\text{M}$) et montrent une bonne

efficacité en PDT par excitation monophotonique. Ainsi le dimère portant les deux pyridiniums conjugués a été sélectionné pour la PDT par excitation biphotonique à cause de sa grande section efficace d'absorption biphotonique ($\sigma_2 = 17000 \text{ GM}$) et de son bon rendement de formation d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 0,60$ dans le méthanol). Ces études ont été réalisées sur des cellules humaines d'adénocarcinome de l'ovaire (SK-OV-3) et ont montré une augmentation de la phototoxicité d'un facteur 2 par rapport à la Visudyne®.⁷⁷ Le composé a aussi permis de fermer sélectivement un vaisseau sanguin d'une souris alors que la Visudyne ne le permettait pas dans ces conditions. C'est le premier PS spécialement synthétisé pour la PDT par excitation biphotonique qui a montré une efficacité *in vivo*.⁷⁸

En 2015 deux PSs composé d'une porphyrine de zinc conjugué à un ou deux groupements dicétopyrrolopyrrole ont été développés au laboratoire (Figure 16).⁸⁰ **DPP-ZnP** et **DPP-ZnP-DPP** possèdent une grande section efficace d'absorption biphotonique dans le DCM (respectivement 2000 et 4000 GM) ainsi que de bons rendements de formation d'oxygène singulet (respectivement 0,58 et 0,50). Les études de PDT par excitation biphotonique de **DPP-ZnP** avec une irradiation à 910 nm ont conduit à 90 % de mort cellulaire. Ces résultats font de **DPP-ZnP** un candidat intéressant pour la PDT par excitation biphotonique. De plus, il peut être fonctionnalisé à la fonction alcyne terminale avec d'autres groupements pour apporter la fonction d'imagerie ou alors de vectorisation.

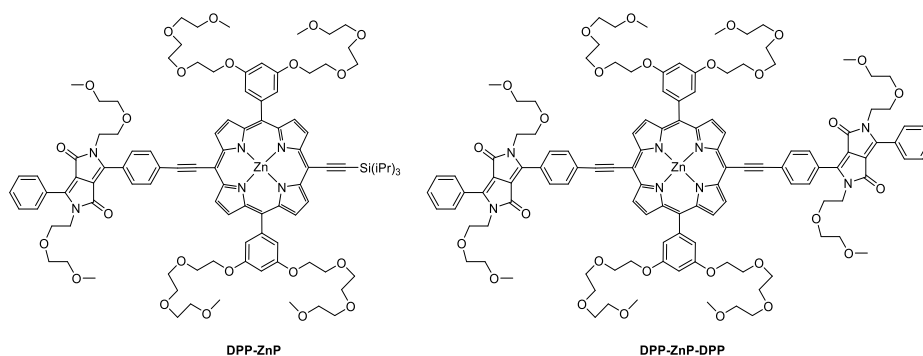


Figure 16. Structure des deux porphyrines développées au laboratoire.

I.2.4.d) Photosensibilisateurs basés sur des complexes de métaux de transition

Les complexes de Ru(II) et d'Ir(III) possèdent de bons croisements intersystèmes entre l'état singulet et triplet à cause de l'effet d'atome lourd. Ils peuvent ainsi générer de l'oxygène singulet et leur absorption biphotonique peut être modulée en fonction des ligands utilisés. En 2009 le groupe de Lemerrier a été le premier à utiliser un complexe de Ru(II) pour la PDT par excitation biphotonique (Figure 17a).⁸¹ Ce complexe possède une section efficace d'absorption biphotonique modéré de 40 GM à 740 nm (CH₃CN) et un rendement quantique de formation d'oxygène singulet faible de 0,09 (CH₃CN). L'incubation du complexe dans des cellules du glycome F98 suivi par une excitation biphotonique a montré un changement de morphologie de la cellule irradiée, indiquant une phototoxicité.

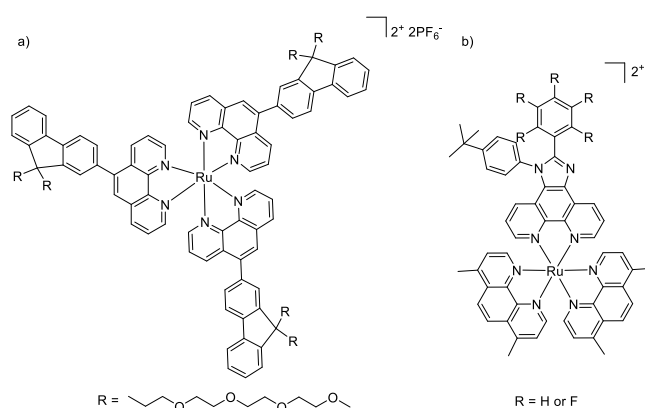


Figure 17. Structure des complexes de Ru(II) de Lemerrier⁸¹ (a) et Chao *et al.*⁸² (b).

Entre 2015 et 2017, Chao *et al.* ont publié plusieurs complexes de Ru(II).⁸²⁻⁸⁵ La série de complexes portant entre 1 et 5 atomes de fluor sur le groupement phényle (Figure 17 b) fait partie des travaux les plus avancés sur les complexes de Ru(II).⁸² Les sections efficaces d'absorption biphotoniques correctes dans le méthanol ($160 < \sigma_2 < 190$ GM) et les bons rendements quantiques de formation d'oxygène singulet dans l'acétonitrile ($0,50 < \phi_\Delta < 0,60$) font de ces complexes de bon candidat pour la PDT par excitation biphotonique. Ces complexes se localisent préférentiellement sur les membranes cellulaires et mitochondriales permettant une destruction simultanée de ces deux membranes, provoquant la mort cellulaire, suite à une irradiation biphotonique à 825 nm. Enfin, des études sur des souris avec

le composé portant 4 atomes de fluor ont montré une inhibition de la croissance des tumeurs de l'ordre de 90%.

Les complexes d'Ir(III) pour la PDT par excitation biphotonique sont, comme les complexes de Ru(II), très récents. En 2015, le groupe de Lemerrier synthétise un complexe d'Ir(III) possédant une section efficace d'absorption biphotonique de 45 GM à 740 nm et un rendement quantique de formation d'oxygène singulet de 0,23 (Figure 18 a).⁸⁶ L'irradiation de cellules incubées avec ce complexe à 740 nm ont montré une modification de la morphologie cellulaire alors que l'irradiation seule n'entraîne aucun changement. En 2017, le groupe de Tian a réalisé la synthèse de 5 complexes d'Ir(III) possédant une terpyridine portant plusieurs groupements donneur/attracteur pour modifier leurs propriétés électroniques (Figure 18 b).⁸⁷ Ces 5 complexes possèdent une absorption biphotonique entre 725 et 850 nm avec des valeurs de sections efficaces d'absorption biphotonique maximales entre 60 et 100 GM dans le DCM. Le composé **Ir-Es** a été testé sur des modèles murins du cancer du sein et a permis de réduire significativement la taille de la tumeur après une irradiation à 808 nm dans les mêmes proportions que la chlorine e6, un PS en test clinique.

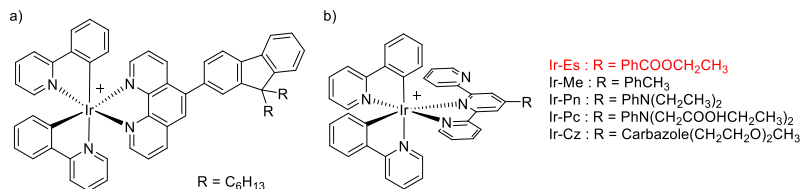


Figure 18. Structure des complexes d'Ir(III) de Lemerrier^{86,81} (a) et Tian⁸⁷ *et al.* (b).

I.3. Imagerie par résonance magnétique

I.3.1. Historique et principe

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une modalité d'imagerie non invasive basée sur le même principe que la résonance magnétique nucléaire (RMN) découverte en 1946.^{88,89}

Il a fallu attendre 1971 pour que la spectroscopie RMN soit utilisée pour des applications biomédicales. Damadian observa des temps de relaxation différents entre des tumeurs et des tissus sains dans des cerveaux de rats.⁹⁰ Les travaux de Lauterbur et de Mansfield ont mis en

place une méthode permettant de localiser des signaux RMN en utilisant un champ magnétique et une image en deux dimensions a été obtenue par Lauterbur en 1973.^{91,92} Ces découvertes ont mis en place les fondations de l'IRM et en 1977, les premières images de partie du corps humain ont été obtenues par les équipes de Damadian et les équipes de Mansfield.^{93,94} Ces travaux ont été récompensés par un prix Nobel en médecine pour Lauterbur et Mansfield en 2003.⁹⁵

L'IRM consiste à observer les temps de relaxation des protons de l'eau, qui dépendent de la nature des tissus, lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. L'IRM est une technique d'imagerie qui possède une très bonne résolution spatiale, mais qui souffre d'un manque de sensibilité. Il peut donc être difficile de différencier les différents tissus. C'est pourquoi des agents de contraste pour l'IRM peuvent être utilisés afin de moduler les temps de relaxation et d'améliorer la sensibilité (Figure 19).

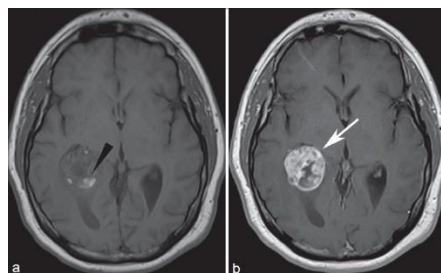


Figure 19. Cliché IRM réalisé en absence (a) ou en présence d'un agent de contraste (b).

Image issue du journal.⁹⁶

1.3.2. Agents de contraste pour l'IRM

Les premiers agents de contraste ont été développés dans les années 80⁹⁷ et ils sont utilisés dans 35 % des examens médicaux.⁹⁸ Un agent de contraste pour l'IRM est un composé qui va modifier les temps de relaxation des protons de l'eau dans les tissus. Il va permettre d'améliorer le contraste de l'image afin de différencier plus finement différents types de tissus.⁹⁹

Les agents de contraste peuvent être divisés en deux groupes, selon qu'ils modifient le temps de relaxation longitudinal (T_1) ou le temps de relaxation transversal (T_2). Les agents de

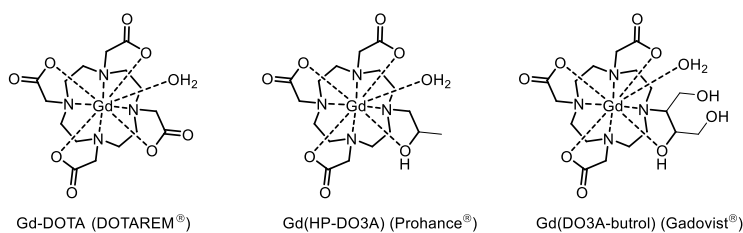
contraste de type T_1 vont diminuer le temps de relaxation T_1 . Ils sont aussi appelés agents de contraste positif, car ils vont produire une image plus blanche. Ils sont majoritairement composés d'ions métalliques paramagnétiques avec un grand nombre d'électrons célibataires comme le Mn(II) (5 électrons célibataires) ou le Gd(III) (7 électrons célibataires). Les agents de contraste de type T_2 vont diminuer le temps de relaxation T_2 . Ils sont aussi appelés agent de contraste négatif, car plus T_2 est faible plus l'image est noire. Ils sont généralement formés de nanoparticules d'oxyde de fer.¹⁰⁰

I.3.3. Agents de contraste à base de Gd(III)

Le gadolinium(III) est rapidement devenu l'ion métallique le plus utilisé pour les agents de contraste de type positif.^{101,102} Les sept électrons célibataires et un temps de relaxation électronique relativement long font du gadolinium le meilleur élément pour modifier le temps de relaxation des protons de l'eau.^{101,103}

L'ion Gd(III) libre est un métal lourd toxique possédant une taille proche de celle du calcium(II). Cette proximité dans la taille peut conduire à des inhibitions de processus biologiques impliquant du Ca^{2+} et provoquer de la toxicité.¹⁰⁴ C'est pourquoi l'ion Gd(III) est complexé par des ligands permettant d'éviter la démétallation du Gd(III) pendant la durée où le complexe est présent dans le corps du patient.¹⁰¹ Ces ligands sont de type polyaminocarboxylate et ils peuvent être cycliques ou linéaires (Figure 20).

Complexes de Gd(III) macrocycliques



Complexes de Gd(III) linéaires

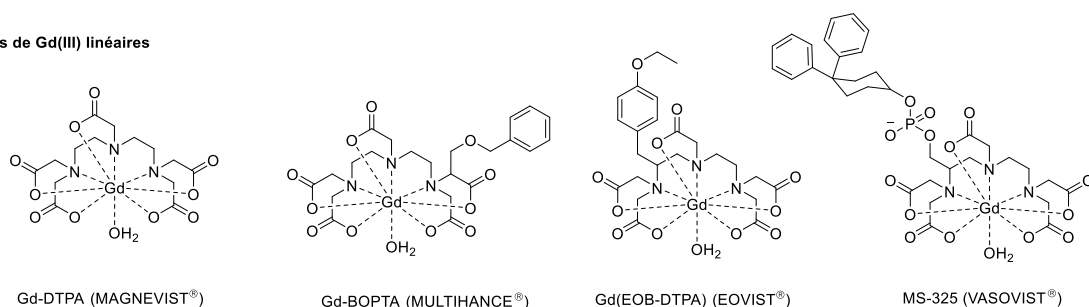


Figure 20. Structure chimique d'agents de contraste à base de Gd(III) utilisés en clinique.

Ces complexes possèdent de haute constante de stabilité thermodynamique ($21,8 < \log K < 25,6$) ce qui permet de diminuer les phénomènes de transmétallation avec des ions présents dans le corps.^{105,106} Leur faible relaxivité, entre $2,9$ et $5,0 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ à $1,5 \text{ T}$ nécessite l'injection d'une grande quantité d'agents de contraste au patient. Par exemple pour un homme de 80 kg il faut injecter environ $4,5 \text{ g}$ d'agent de contraste pour réaliser une IRM. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux agents de contraste avec des relaxivités plus élevées pour diminuer la quantité à administrer au patient.

I.3.4. Facteurs influençant la relaxivité des agents de contraste

L'efficacité d'un agent de contraste est évaluée par sa relaxivité, autrement dit de combien il va augmenter la vitesse de relaxation des protons de l'eau à une concentration de 1 mM . La théorie décrivant la relaxation des protons de l'eau en présence d'un composé paramagnétique a été développée par Solomon, Bloembergen et Morgan.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

Plusieurs facteurs vont influencer la relaxivité comme la température, le champ magnétique et des facteurs microscopiques inhérents au complexe de Gd(III) (Figure 21) : le nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd(III) q , le temps de corrélation rotationnelle τ_r et la vitesse d'échange des molécules d'eau τ_M .

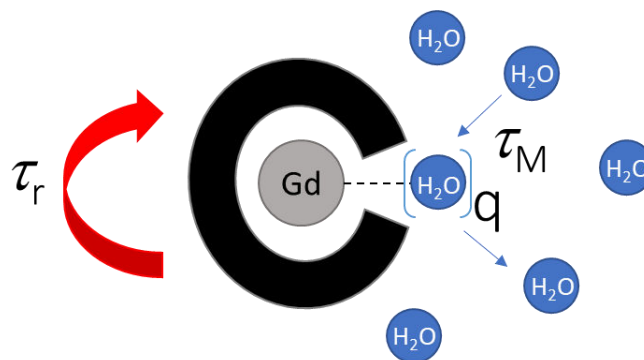


Figure 21. Schéma d'un complexe de Gd(III) et des facteurs influençant la relaxivité.

Ces différents facteurs peuvent être modulés par les ligands utilisés pour augmenter la relaxivité du complexe.

Les ligands actuellement utilisés en clinique sont octadentates et complètent huit sites de coordination du Gd(III). Il ne reste donc qu'un site de coordination pour les molécules d'eau. Plusieurs groupes ont donc développé des ligands heptadentates laissant deux sites de coordination pour les molécules d'eau.

On peut par exemple citer le ligand heptadentate DTTA qui a été développé par le groupe de Merbach, Helm et collaborateurs (Figure 22).¹¹¹⁻¹¹³ Ils ont réalisé la synthèse d'un complexe heptanucléaire composé d'un complexe de fer(II) portant six complexes de **GdDTTA**. Cet agent de contraste possède une relaxivité élevée de $16,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 200 MHz. L'étude de ce composé sur des souris avec un appareil à IRM de 200 MHz a montré une relaxivité *in vivo* quatre fois supérieure au composé commercial **GdDOTA** et une pharmacocinétique similaire.¹¹⁴

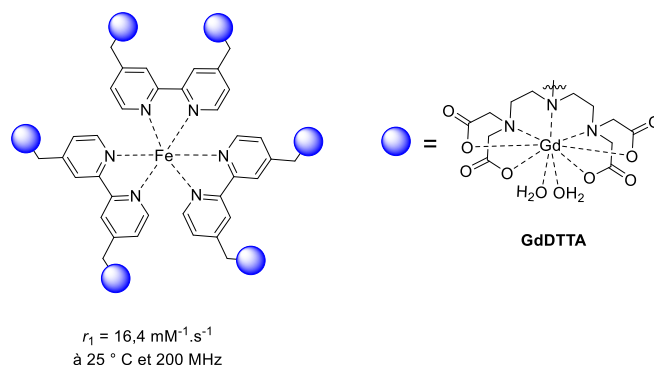


Figure 22. Complexes de Gd(III) développés par Merbach et le complexe **GdDTTA**.^{112,114}

L'utilisation de ce ligand heptadentate permet d'améliorer significativement la relaxivité du complexe, mais la stabilité du complexe est fortement impactée ($\log K_{\text{GdL}} = 18,6$ pour GdDTTA)¹¹⁵ ce qui rend impossible son utilisation chez l'homme.

Un autre moyen d'améliorer la relaxivité du complexe est d'augmenter son temps de corrélation rotationnelle, autrement dit de diminuer la vitesse à laquelle le complexe tourne sur lui-même. Un petit complexe tournera plus vite sur lui-même qu'une macromolécule. Ainsi il est intéressant de greffer le complexe à une molécule plus grande dans le but de diminuer cette vitesse de rotation et d'augmenter la relaxivité. Cette stratégie a été largement explorée et a permis d'augmenter significativement la relaxivité.

Le groupe de Gros a développé des agents de contraste multimodaux permettant de réaliser simultanément de l'imagerie IRM et du PET scan. Une porphyrine de Cu(II) a été reliée à un ou deux complexes de Gd(III) (Figure 23).¹¹⁶ Les relaxivités de ces composés sont respectivement de $16,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $21,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 20 MHz . L'augmentation de la taille du composé ainsi que la faible flexibilité expliquent cette augmentation.

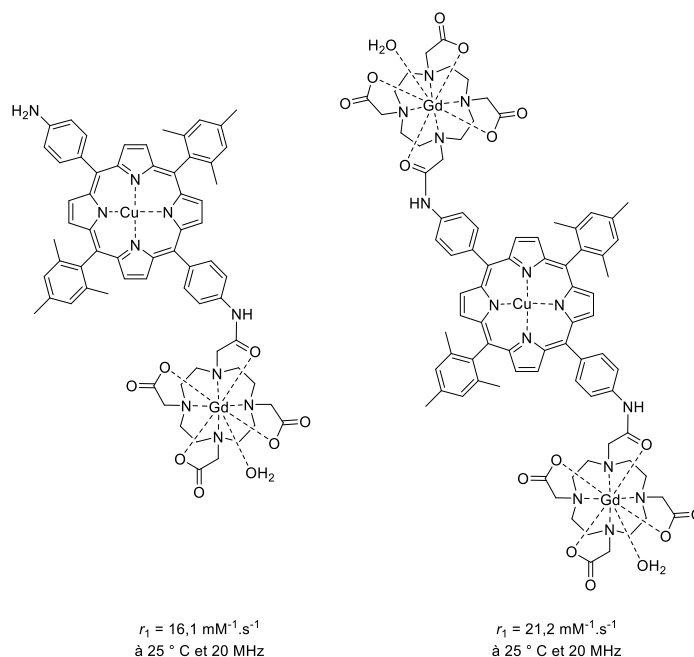


Figure 23. Systèmes bimodaux pour les imageries PET et IRM composés d'une porphyrine de Cu(II) et d'un ou deux complexes de Gd(III) développé par le groupe de Gros.¹¹⁶

I.4. Agents thérapeutiques moléculaires pour la PDT et l'IRM

Le mot thérapeutique provient de la contraction des mots thérapie et diagnostic. Il a été utilisé pour la première fois par Funkhouser en 2002 pour décrire des composés permettant de réaliser simultanément la thérapie et le diagnostic.

Les premiers composés thérapeutiques moléculaires associant la PDT et l'IRM ont été réalisés par le groupe de Pandey *et al.*¹¹⁷⁻¹¹⁹ Ils ont associé un dérivé de la pyrophéophorbide à 1, 2, 3 ou 6 complexes de GdDTPA. Le composé le plus prometteur est le PS portant 3 complexes de Gd(III) (Figure 24).

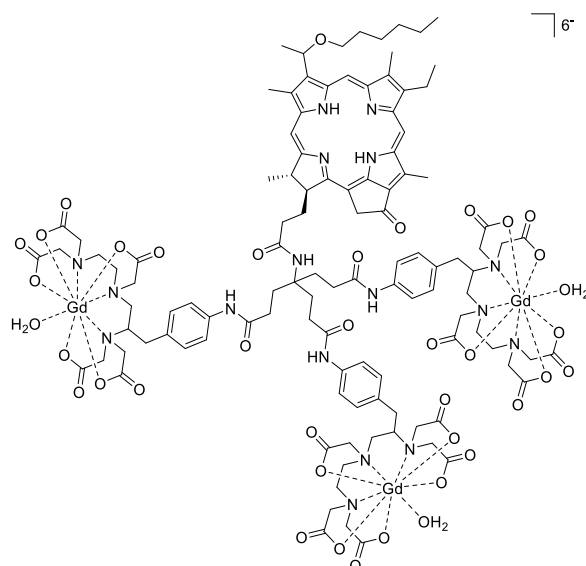


Figure 24. Composé théranostique associant un dérivé de la pyropheophorbide-a et 3 complexes de GdDTPA décrit par Pandey *et al.*¹¹⁹

Des études *in vivo* sur des souris portant des tumeurs du côlon ou des fibroblastes ont été réalisées en 2010. Les études de phototoxicité ont été réalisées 24 h après injection du PS à une concentration de $10 \mu\text{mol/kg}$, avec une irradiation à 665 nm, à une puissance de 70 J/cm^2 . Elles montrent une diminution de la croissance de la tumeur par rapport aux contrôles. Les études d'IRM réalisées à la même concentration montrent aussi une amélioration du contraste d'un facteur 10 par rapport au composé commercial Magnévist®. De plus, ce composé est aussi fluorescent, ce qui permet de réaliser simultanément de l'imagerie de fluorescence et de l'IRM. Le prochain objectif des auteurs est d'augmenter la sélectivité de ce composé envers les tumeurs en le couplant à des agents vectorisants.

En 2014 A.G. Gürek *et* F. Dumoulin décrivent une phthalocyanine de zinc(II) reliée à un complexe de GdDO3A-amide (un analogue de GdDOTA dans lequel un bras acétate a été remplacé par un bras amide) (Figure 25).¹²⁰

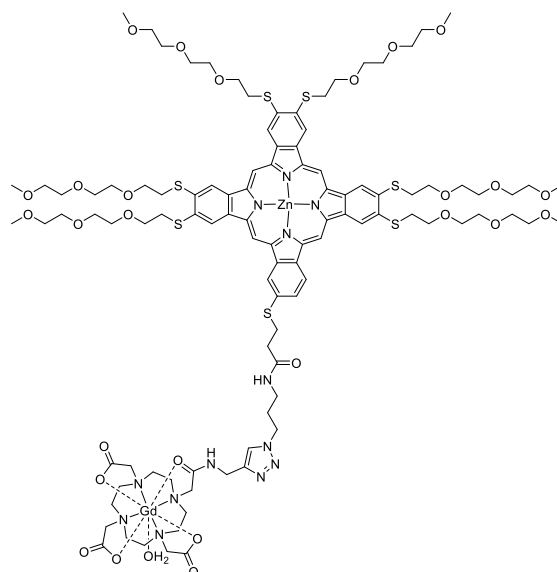


Figure 25. Structure du composé théranostique associant une phthalocyanine de zinc(II) et un complexe GdDO3A-amide décrit par Gürek *et al.*¹²⁰

Ce composé possède un bon rendement de formation d'oxygène singulet de 0,67 dans le DMSO. La relaxivité de ce composé est faible ($1,43 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37 °C et 128 MHz). Les auteurs attribuent cette faible relaxivité à la fonction amide présente sur l'espaceur qui peut bloquer le site de liaison de l'eau avec l'ion métallique. Malgré tout, les études *in vitro* montrent que ce composé semble prometteur pour la PDT par excitation monophotonique et l'IRM.

Au laboratoire, un agent théranostique permettant de réaliser la PDT par excitation biphotonique et de l'IRM a été étudié. Il est constitué d'une porphyrine de zinc conjuguée à un groupement dicétopyrrolopyrrole et reliée à un complexe GdDOTA (Figure 26).¹²¹

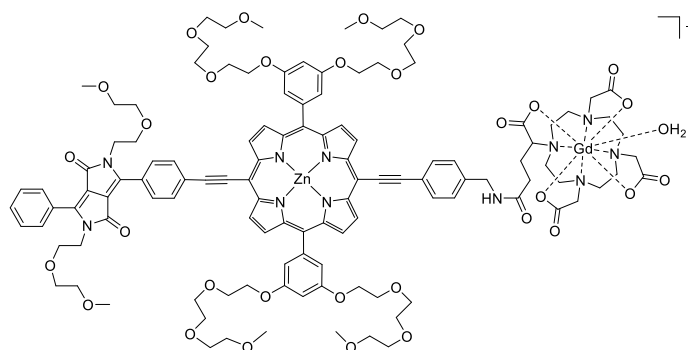


Figure 26. Structure du composé théranostique associant une porphyrine de zinc conjuguée à un dérivé de dicétopyrrolopyrrole et reliée à un complexe GdDOTA.

Ce composé possède une très bonne valeur de relaxivité de $19,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (20 MHz, 25 °C), une haute section efficace d'absorption biphotonique dans le DMSO (1000 GM à 930 nm) et un très bon rendement de formation d'oxygène singulet dans ce solvant (0,68). Les études dans des cellules HeLa ont montré une très bonne phototoxicité par excitation monophotonique ($\lambda_{\text{ex}} = 660 \text{ nm}$, $\text{LD}_{50} = 9 \text{ J/cm}^2$ et une concentration d'incubation de $1 \mu\text{M}$) et une phototoxicité modérée par excitation biphotonique à 930 nm.

I.5. Photosensibilisateurs vectorisés pour la PDT

I.5.1. Introduction

C'est au début du 20^{ème} siècle que Paul Ehrlich parle pour la première fois du concept de « bewitched bullets » ou encore « magic bullet ». ¹²² Il décrit la présence de récepteurs présents uniquement sur un parasite et non chez l'homme permettant de le cibler spécifiquement. Ce composé devrait « frapper le parasite de toutes ces forces sans être toxique pour les organes du corps humain ».

Néanmoins, jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des anticancéreux détruisent les cellules cancéreuses et les cellules saines. ¹²³ Ce n'est que dans les dernières décennies que l'idée d'amener sélectivement un anticancéreux vers les tumeurs a émergé.

Il existe deux types de vectorisation : la vectorisation passive et la vectorisation active. La vectorisation passive utilise les différences physiologiques et morphologiques entre les tissus sains et les tumeurs. En effet, en raison de la prolifération incontrôlée des cellules tumorales les tumeurs ont des architectures et des compositions anormales. ¹²⁴ Les vaisseaux sanguins des tumeurs sont désorganisés et mal connectés ce qui rend l'endothélium des tumeurs très poreux. ¹²⁵ De plus, les tumeurs solides possèdent un drainage lymphatique peu développé ce qui conduit à une accumulation des macromolécules dans les tumeurs. Ce phénomène est nommé « EPR effect » pour « enhanced permeability and retention effect ». ¹²⁶

La vectorisation active utilise le fait que certains récepteurs cellulaires sont surexprimés dans les cellules cancéreuses et non dans les tissus sains afin de délivrer sélectivement le principe actif. Il existe un grand nombre de composés permettant de cibler les cellules tumorales : les

anticorps, les peptides ou protéines du sérum, les lipides, les sucres, des petites molécules comme les vitamines ou les stéroïdes.¹²⁷ Plusieurs groupes ont réalisé la synthèse de PS reliés à différents vecteurs comme des stéroïdes,^{128,129} des anticorps¹³⁰, des protéines¹³¹ ou encore des carbohydrates¹³².

Le groupe de Vernon a décrit en 2008 la synthèse et l'évaluation *in vivo* d'une protoporphyrine IX reliée à un peptide cyclique cRGDfK (Figure 27).¹³³ Le motif arginine-glycine-acide aspartique se lie spécifiquement aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ qui sont surexprimées dans les vaisseaux sanguins proliférants des tumeurs.¹³⁴ Ils ont montré une augmentation de l'internalisation cellulaire du PS vectorisé par rapport au PS non vectorisé dans des cellules possédant des intégrines (cellules SiHa) (Figure 27). De plus, les analyses pharmacocinétiques de ce composé dans des souris portant une tumeur du cancer du sein (CaNT) ont montré une meilleure rétention et accumulation du PS vectorisé dans les tumeurs. Néanmoins, les essais de PDT n'ont pas donné de meilleurs résultats avec le PS vectorisé ou non. Les auteurs ont supposé que cela peut être dû à une localisation cellulaire différente entre les deux composés.

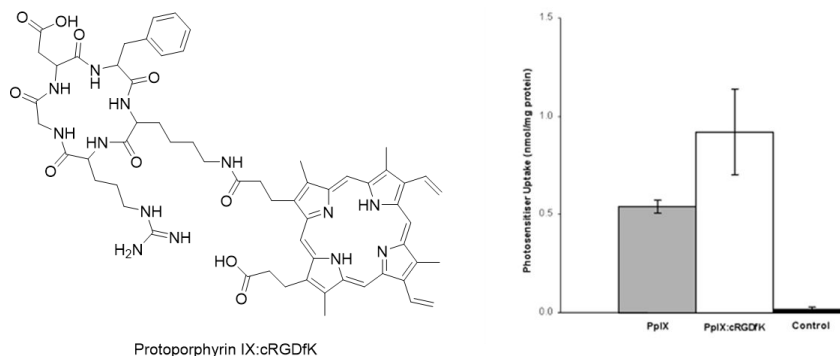


Figure 27. Structure de la Protoporphyrine IX : cRGDfK (gauche). Internalisation cellulaire de la Protoporphyrine IX et de la Protoporphyrine IX : cRGDfK (droite). Image adaptée de la publication.¹³³

1.5.2. Acide folique

L'acide folique ou encore vitamine B9 est un composant important pour le corps humain. En effet, les formes réduites de l'acide folique jouent un rôle essentiel pour la synthèse de l'ADN, l'ARN, le métabolisme des acides aminés et les réactions de méthylation.^{135,136} Les récepteurs

de l'acide folique sont des protéines qui possèdent une très forte affinité pour l'acide folique ($K_d = 10^{-9} - 10^{-10} \text{ M}$).¹³⁷ Il existe quatre isoformes des récepteurs de l'acide folique (α , β , γ et δ), mais seul les isoformes FR α et FR β sont des protéines membranaires.

Par ailleurs, l'expression de FR α est limitée, dans les tissus sains, à quelques organes comme les reins ou les poumons et FR β est majoritairement présent dans le placenta. Ces récepteurs ne sont donc pas en contact avec les dérivés de l'acide folique ou les composés conjugués à l'acide folique circulant dans le système sanguin et injectés par voie intraveineuse.¹³⁸ Ainsi, la sélectivité des PSs reliés à l'acide folique envers les tissus tumoraux s'en trouve augmentée.

Diverses études ont montré que FR α est surexprimé sur la surface d'un grand nombre de tumeurs (Figure 28).

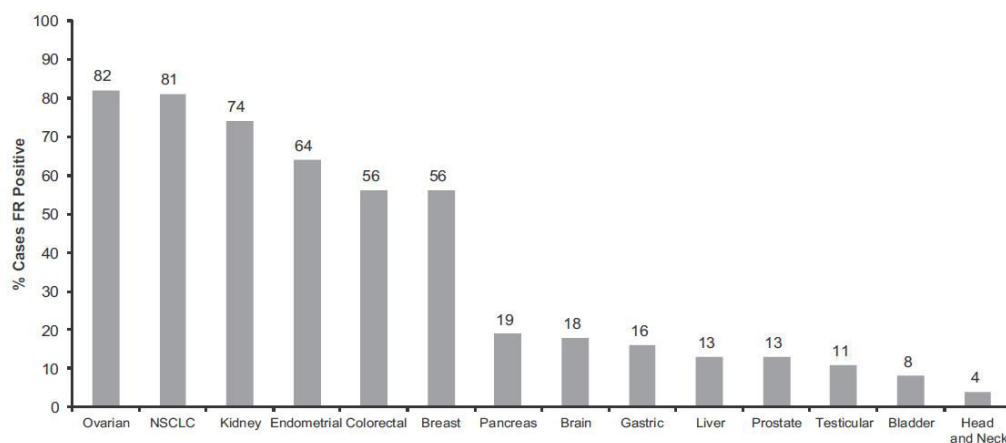


Figure 28. Expression du récepteur FR α de l'acide folique pour différents cancers humains.

Image adaptée du journal.¹³⁶

En 2013 Chen *et al.* ont résolu la structure cristallographique du récepteur FR α lié avec l'acide folique (Figure 29).¹³⁹

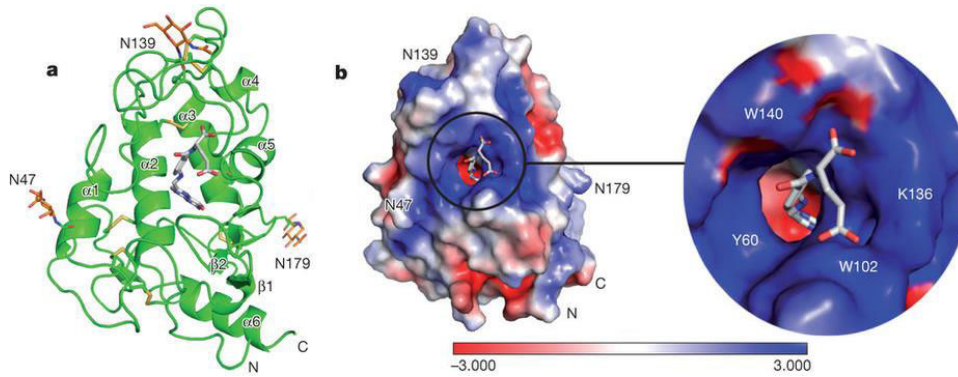


Figure 29. A) vue du complexe avec FR α (vert) et l'acide folique (gris). b) Distribution des charges de surface avec un zoom sur la poche de liaison. Barre d'échelle de -3 à +3 eV. Image adaptée du journal.¹³⁹

Ils ont ensuite réalisé des mutations sur les acides aminés qui sont impliqués dans les liaisons avec l'acide folique. Ils ont pu démontrer que la partie pterate de l'acide folique était absolument nécessaire pour garder une forte affinité avec FR α . Par contre, la partie glutamate est moins importante et elle permet donc de coupler l'acide folique à des anti cancéreux ou des composés permettant l'imagerie (Figure 30).¹⁴⁰

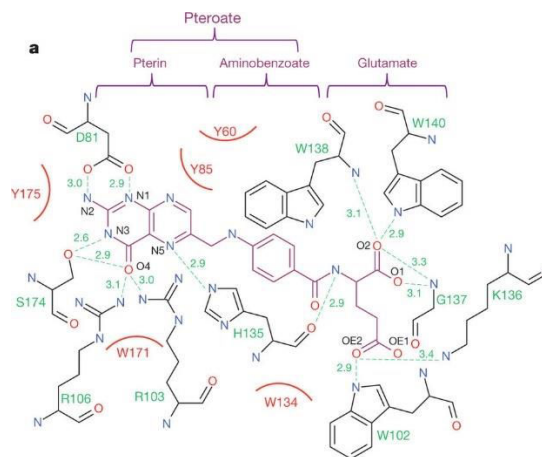


Figure 30. Carte des interactions entre l'acide folique et la poche du récepteur FR α . Acide folique en violet, liaisons hydrogène en vert, acides aminés de la poche en noir. Image issue de la publication.¹³⁹

Le premier PS pour l'absorption monophotonique conjugué à l'acide folique a été réalisé par Frochot *et al.* en 2005.¹⁴¹ Ils ont relié une tétraphénylporphyrine base libre à l'acide folique

via l'espaceur l'hexane-1,6-diamine ou l'espaceur 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthylamine (Figure 31).

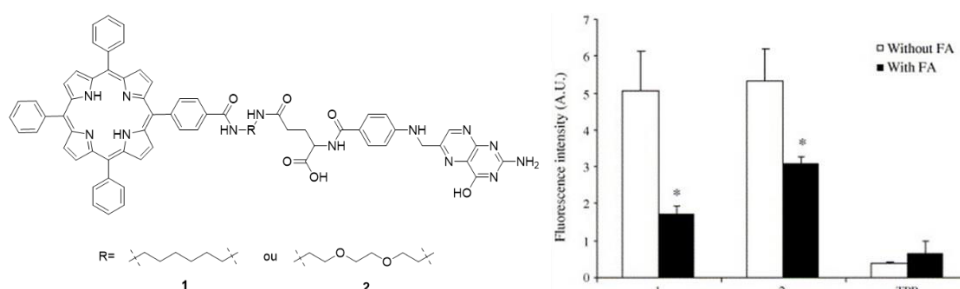


Figure 31. Structure du PS relié à l'acide folique développé par Frochot *et al.* et leur internalisation dans des cellules KB en présence ou non d'acide folique dans le milieu de culture. Image adaptée du journal. ¹⁴¹

Une mesure de fluorescence de cellules incubées avec les PS vectorisés ou la TPP (tétraphénylporphyrine) a été effectuée, en présence ou non d'un excès d'acide folique, dans le milieu de culture (Figure 31). Les résultats montrent que les deux PS pénètrent moins dans les cellules en présence d'un excès d'acide folique indiquant une internalisation par le récepteur de l'acide folique. Ainsi, la reconnaissance sélective de l'acide folique avec son récepteur est maintenue malgré sa conjugaison avec la porphyrine. Les tests de PDT réalisés avec une irradiation à 650 nm avec des cellules KB ont déterminé une LD₅₀ de 6,7 J/cm² et de 22,6 J/cm² pour les composés 1 et 2, respectivement, à une concentration d'incubation de 10 μM. Dans les mêmes conditions la TPP n'a pas montré de phototoxicité. Ces résultats montrent que ces deux PS possèdent une sélectivité envers les récepteurs de l'acide folique ce qui améliore leur pénétration cellulaire et en fait des PS intéressants pour la PDT vectorisée.

En 2008, ils ont conjugué la *méto*-tétrahydroxyphénylchlorine (Figure 11), un PS de seconde génération utilisée en clinique à l'acide folique.¹⁴² Plus récemment, en 2017, ils publient la synthèse de cinq PSs conjugués à l'acide folique et prévoient des essais *in cellulo* et *in vivo*.¹⁴³ D'autres groupes ont conjugué l'acide folique à des phtalocyanines¹⁴⁴ ou encore des Bodipy¹⁴⁵ pour la PDT vectorisée.

Bien qu'un grand nombre de groupes ait utilisé l'acide folique comme vecteur pour le traitement ou l'imagerie, peu se sont intéressés à sa dégradation. En effet, la lumière, la

température, la concentration, l'oxygène, le pH, l'oxygène singulet ou encore les faisceaux d'électrons sont des facteurs importants à tenir en compte pour limiter ou éviter sa dégradation.¹⁴⁶

1.5.3. Biotine

La biotine ou vitamine B7 est essentielle pour la division cellulaire, la croissance cellulaire, la production d'acide gras et leur métabolisme et joue un rôle dans la production d'énergie.¹⁴⁷ L'internalisation de la biotine semble être régulée par les SMVT (transporteur multivitamines dépendant du sodium) qui sont surexprimés dans certains cancers. Néanmoins, contrairement au récepteur de l'acide folique, ils n'ont pas été étudiés avant une étude de 2004 qui a montré qu'ils sont surexprimés en plus grande quantité que les récepteurs à l'acide folique dans plusieurs cancers du poumon, des reins, du côlon, des intestins, du sein ou de l'ovaire.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ Cela fait de la biotine un vecteur de choix pour la PDT vectorisée.

Bien que la biotine ait déjà été reliée à des fluorophores pour l'imagerie¹⁵² ou des anticancéreux pour le traitement¹⁵³, il y a peu d'exemples de PSs conjugués à la biotine.¹⁵⁴ Les groupes de Singh et Ghosh décrivent des nanoparticules de PEGs reliés à des coumarines, jouant le rôle de PS, et à des biotines.¹⁵⁵ En 2017, Lin *et al.* décrivent une phtalocyanine de silicium reliée à deux biotines (Figure 32).¹⁵⁶

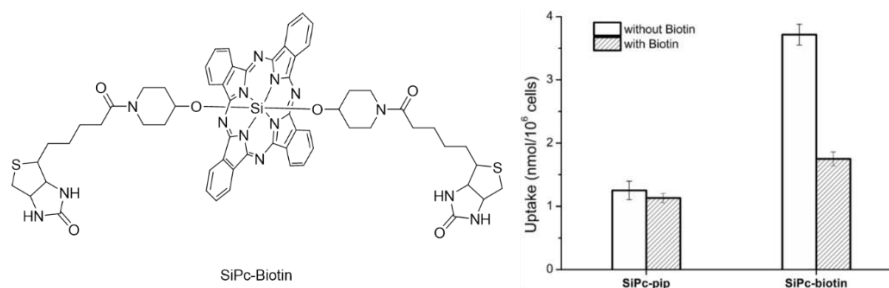


Figure 32. Structure de la phtalocyanine de silicium reliée à deux biotines décrite par Lin *et al.* Image adaptée du journal.¹⁵⁶

Les concentrations intracellulaires de **SiPc-Biotin** ont été mesurées, en présence ou non, d'un excès de biotine dans le milieu de culture (Figure 32). La concentration plus élevée en absence de biotine pour **SiPc-Biotin** indique que ce composé est internalisé par le récepteur de la biotine. Des études de phototoxicité ont été réalisées avec des cellules HeLa irradiées à 670

nm. Dans les mêmes conditions, la phtalocyanine portant les deux biotines ou son précurseur ont montré une phototoxicité. Néanmoins, la phototoxicité est moindre pour le PS vectorisé alors que son internalisation est supérieure à celle du PS ne portant pas la biotine. Les auteurs ont expliqué cette différence par une agrégation plus importante du PS vectorisé dans les milieux aqueux ce qui conduit à une diminution du rendement quantique de formation d'oxygène singulet.

I.5.4. Photosensibilisateurs vectorisés pour la PDT biphotonique

Il n'existe actuellement que deux exemples de PS vectorisé pour la PDT par excitation biphotonique. Le premier est une porphyrine avec un système π -étendu relié à deux peptides et décrit par Spangler *et al* (Figure 33).¹⁵⁷ Les deux peptides permettent de cibler les récepteurs de la somatostatine surexprimées par les tumeurs neuro-endocriniennes.¹⁵⁸

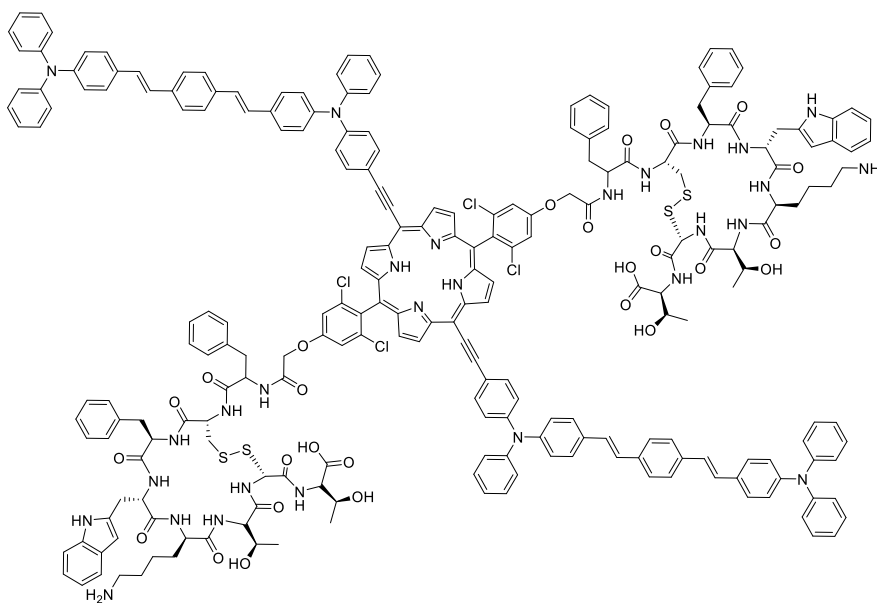


Figure 33. Structure du PS pour la PDT par excitation biphotonique vectorisé décrit par Spangler *et al*.

Ce composé possède des sections efficaces d'absorption biphotonique élevée ($\sigma_2 = 2000$ à 1000 GM entre 820 et 900 nm dans le DCM) et de bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 30-40 \%$ dans le toluène). La PDT par excitation biphotonique réalisée sur des souris portant des tumeurs du poumon ou du sein a montré une régression des tumeurs jusqu'à une profondeur surprenante de 2 cm .

Le second composé est une tétraminophthalocyanine reliée à l'acide folique et a été décrit par le groupe de Chen *et al* en 2014 (Figure 34).¹⁵⁹

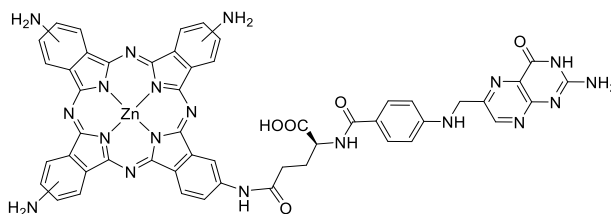


Figure 34. Structure de la phthalocyanine de zinc(II) reliée à l'acide folique par Chen *et al*.

Ils ont montré une internalisation rapide avec une concentration cellulaire élevée de ce composé au bout de 50 min d'incubation et les valeurs de section efficace d'absorption biphotonique sont élevées ($\sigma_2 = 1200 \text{ GM}$ à 780 nm dans le DMSO). La PDT par excitation biphotonique réalisée sur des cellules KB a montré une phototoxicité beaucoup plus importante de ce composé par rapport à la phthalocyanine AlPcS approuvée en clinique. Au bout de 10 minutes d'irradiation à 780 nm toutes les cellules sont mortes alors qu'il faut 40 min pour le composé AlPcS. Ces résultats suggèrent que ce PS est un candidat intéressant pour la PDT vectorisée par excitation biphotonique.

1.6. Projet de thèse

Ce travail de thèse a consisté à synthétiser, caractériser et à réaliser les études cellulaires de nouveaux PSs porphyriniques pour la PDT. Ces PSs possèdent des systèmes π étendus permettant de déplacer leurs absorptions vers la fenêtre thérapeutique optique et l'absorption biphotonique.

L'efficacité et le protocole de la PDT nécessitent une connaissance précise de la localisation et de la taille de la tumeur. Il est donc intéressant d'avoir des composés permettant d'imager la tumeur pour établir un diagnostic et pour suivre l'évolution du traitement. L'association de PS pour la PDT et d'agents de contraste pour l'IRM, une méthode d'imagerie non invasive, au sein d'un même composé est une idée intéressante pour former des agents théranostiques. Dans cette optique, la synthèse d'un composé théranostique permettant de réaliser la PDT par excitation mono- et bi-photonique et l'IRM a été réalisée. La synthèse, les propriétés

photophysiques ainsi que les études cellulaires sont présentées au chapitre 2. Le chapitre 3 est consacré aux études cellulaires que j'ai réalisé pour deux composés théranostiques synthétisés au laboratoire associant la PDT et l'IRM.

Un autre moyen d'améliorer la PDT est de relier le PS à un vecteur permettant de cibler plus sélectivement les cellules cancéreuses et d'améliorer son internalisation. La synthèse de deux nouveaux PSs vectorisés par l'acide folique ou la biotine a été réalisée et est présentée au chapitre 4 ainsi que les propriétés photophysiques des ces PSs et leurs études cellulaires.

Les PSs pour la PDT ont souvent une faible solubilité dans les solvants aqueux à cause de leur nature hydrophobe. Il est donc intéressant d'améliorer leur biodistribution. C'est dans cette optique que des PSs ont été incorporés ou reliés à des cubosomes. Cette approche est présentée dans le chapitre 5. De plus, cela devrait aussi améliorer leur sélectivité envers les tumeurs grâce à l'effet EPR.

Les études cellulaires et les mesures de sections efficaces d'absorption biphotonique ont été réalisées en collaboration avec Frédéric Bolze à la faculté de pharmacie d'Illkirch. Les mesures photophysiques ont été réalisées par Barbara Ventura de l'institut ISOF-CNR à Bologne (Italie). Les profils NMRD ont été réalisés par Célia Bonnet et Eva Tóth du centre de Biophysique moléculaire à Orléans. Les mesures de relaxivité dans les cellules ont été réalisées par Chrystelle Po à la faculté de médecine de Strasbourg (Icube). La synthèse et la caractérisation des cubosomes ont été effectuées par Claudia Caltagirone et Sergio Murgia à L'Université de Cagliari (Italie).

Chapitre II: Composé moléculaire pour la PDT par absorption mono- et bi-photonique et l'IRM

Ce chapitre de thèse est consacré à l'étude d'un agent théranostique permettant de réaliser le traitement par la PDT par absorption mono- et bi-photonique et le suivi par IRM (Figure 35). La partie PS est assurée par une porphyrine conjuguée à un chromophore dicétopyrrolopyrrole. Il est conjugué à un groupement phényle qui porte deux complexes de Gd(III) apportant la fonction d'imagerie.

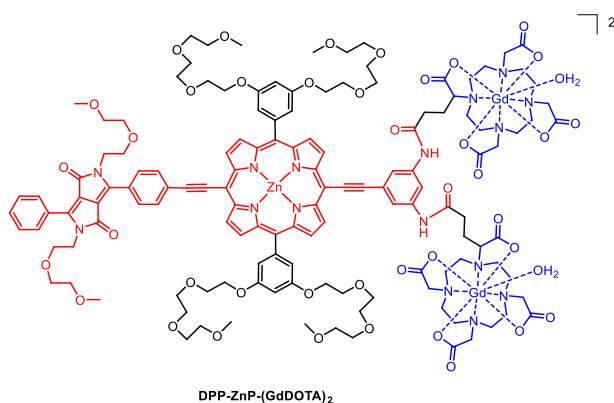


Figure 35. Structure du composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

Le PS a été décrit au laboratoire en 2015 (voir chapitre 1.2.4.c).⁸⁰ **DPP-ZnP** (Figure 36) possède de bonnes propriétés photophysiques pour la PDT par excitation biphotonique :

- Bonne section efficace d'excitation biphotonique (270 GM à 920 nm dans le DMSO)
- Bon rendement quantique de génération d'oxygène singulet ($\phi_{\Delta} = 0,54$ dans le DMSO)

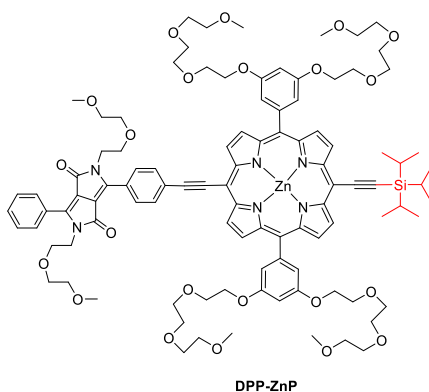


Figure 36. Structure du PS **DPP-ZnP**.

Le complexe de Gd(III) est le GdDOTA avec un bras propionate supplémentaire qui permet de le relier à d'autres composés l'IRM (Figure 37).

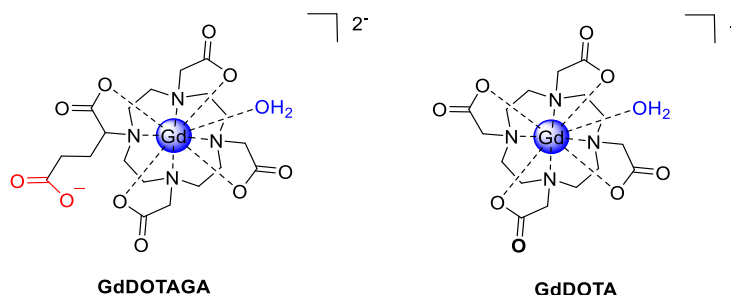


Figure 37. Structure des complexes **GdDOTAGA** et GdDOTA.

La fonction acide du complexe **GdDOTAGA** qui n'est pas impliqué dans la complexation du Gd(III) va pouvoir former une fonction amide avec l'espaceur pour relier le complexe au PS.

L'espaceur possède trois fonctions réactives et est présenté Figure 38. Un iodobenzène permettant de le coupler au PS par un couplage de Sonogashira et deux amines protégées permettent, après déprotection, de relier les agents de contraste à l'espaceur par formation de liaisons amide. Enfin, les fonctions amines sont ici directement reliées au système aromatique afin d'augmenter la rigidité du système dans le but d'accroître la relaxivité.¹⁰³

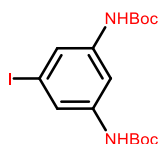


Figure 38. Structure de l'espaceur.

La synthèse de cet agent théranostique et les propriétés photophysiques permettant de le caractériser en tant que PS pour la PDT par excitation mono- ou bi-photonique et en tant qu'agent de contraste pour l'IRM seront présentés. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux études cellulaires.

II.1. Résultats antérieurs obtenus au laboratoire

Le premier composé théranostique permettant de réaliser la PDT par excitation biphotonique et l'IRM a été synthétisé au laboratoire en 2016 (voir chapitre I.4).¹²¹ L'efficacité de **DPP-ZnP-GdDOTA** (Figure 39) en tant que PS pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique et en tant qu'agent de contraste pour l'IRM ont été démontrés *in vitro* et *in cellulo* apportant une preuve de concept pour ce type de composé.

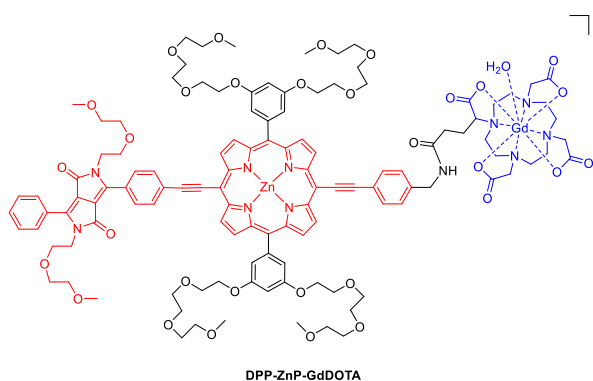


Figure 39. Structure du composé théranostique **DPP-ZnP-GdDOTA**.

Actuellement, les concentrations en PS pour la PDT sont plus faibles, d'environ 40 fois, que celles utilisées pour des agents de contraste pour l'IRM. Cet écart de concentration peut être diminué en augmentant le nombre de complexes par PS. C'est dans ce but que nous avons décidé de synthétiser **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** qui possède deux complexes de Gd(III) afin d'augmenter la relaxation moléculaire du composé.

II.2. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse utilisée est de type modulaire à partir de trois composants. Le premier est une porphyrine de zinc conjugué avec un groupement dicétopyrrolopyrrole pour former le PS capable d'être activé par excitation mono- et bi-photonique. Le second est un espaceur permettant de relier les différents composés et le troisième un agent de contraste pour l'IRM.

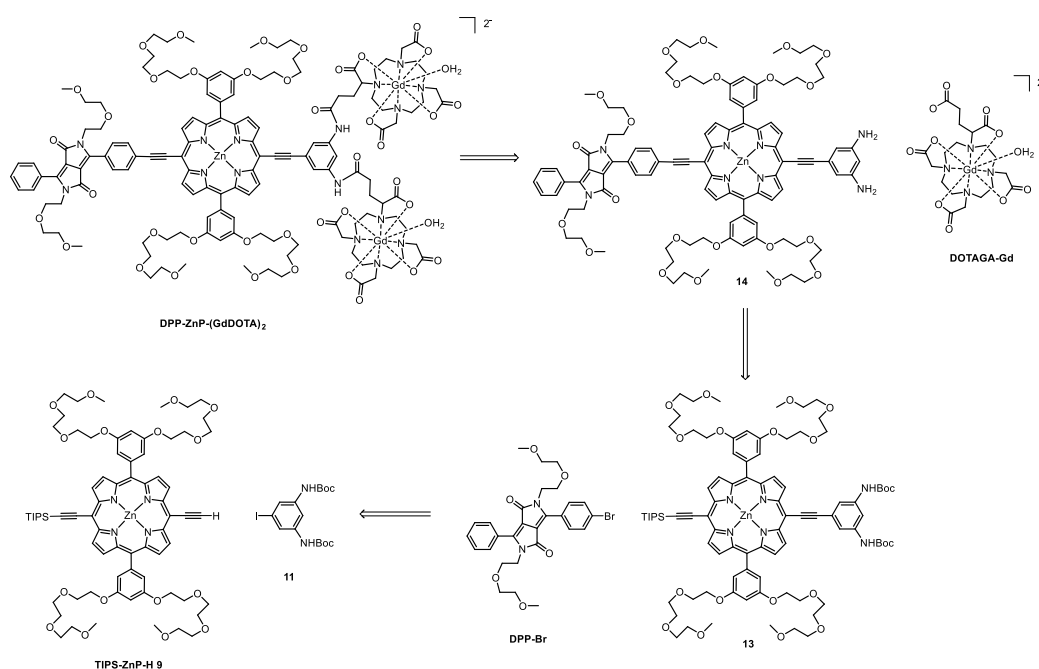


Figure 40. Rétrosynthèse de DPP-ZnP-(GdDOTA)₂.

II.3. Synthèse de l'agent théranostique DPP-ZnP-(GdDOTA)₂

II.3.1. Synthèse de la porphyrine TIPS-ZnP-H

La synthèse de la porphyrine **TIPS-ZnP-H** a été réalisée en neuf étapes et a été mise au point par Julie Schmitt lors de sa thèse.

Le schéma de synthèse des précurseurs porphyriniques est présenté dans la Figure 41. Le dipyrrométhane **1** a été obtenu par condensation du pyrrole sur du formaldéhyde catalysée par de l'acide chlorhydrique avec un rendement de 20 % après distillation sous vide et haute température à l'aide d'un kugelrohr. Dans ces conditions, le dipyrrométhane **1** peut être obtenu à l'échelle du gramme. Le précurseur benzaldéhyde **4** de la porphyrine est obtenu en trois étapes. La première est la tosylation de la chaîne triéthylène glycol en présence de chlorure de tosyloxy et de pyridine pour donner **2** avec un rendement de 97 %.¹⁶⁰ Le dihydroxybenzaldéhyde est oxydé avec le réactif de Jones pour donner **3** avec un rendement de 56 %.¹⁶¹ Enfin la dernière étape est une réaction de type Williamson entre **2** et **3** pour

donner **4** avec un rendement de 83 %.¹⁶⁰ Le benzaldéhyde **4** a pu être obtenu à l'échelle de 5 g.

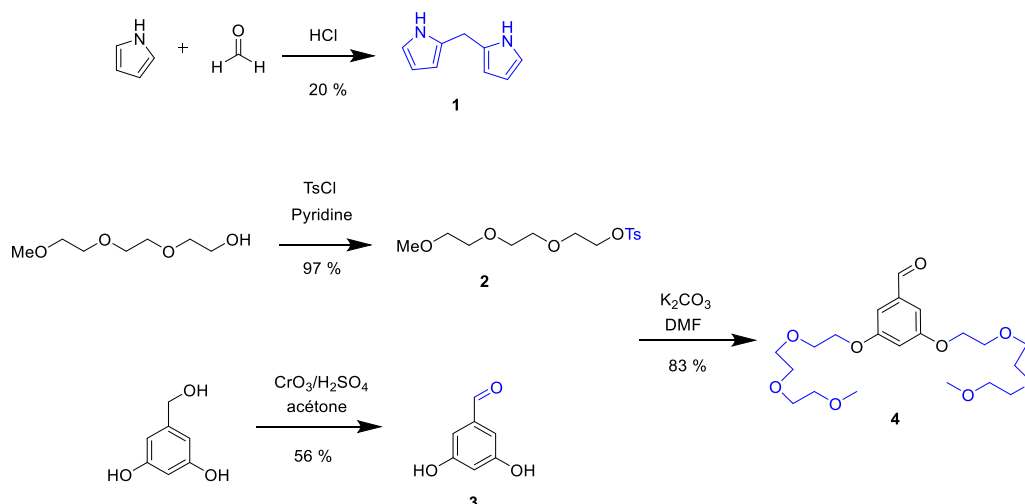


Figure 41. Schéma de synthèse des précurseurs porphyriniques **1** et **4**.

La synthèse de la porphyrine **5** a été réalisée en utilisant une condensation de type [2+2] de MacDonald avec les conditions décrites par le groupe de Lindsey.^{162,163} Elle consiste en une condensation de deux dipyrrométhanés sur deux aldéhydes. La réaction entre **1** et **4** catalysée par du TFA dans le DCM conduit au porphyrinogène qui est ensuite oxydé en porphyrine avec du DDQ afin de donner la porphyrine **5**. Le composé **5** est purifié par chromatographie sur colonne de silice pour donner un solide rouge avec un rendement de 33 %. La métallation de **5** avec de l'acétate de zinc dans un mélange CHCl₃/MeOH conduit au composé **6** et est confirmé par la disparition du signal des protons portés par les pyrroles observés en RMN ¹H. La suite de la synthèse consiste à fonctionnaliser les positions meso de la porphyrine. Le produit **7** est obtenu par bromation des positions méso de **6**. Lors de cette étape 1,97 équivalents de NBS sont utilisés, car un excès entraîne la bromation des positions β-pyrroliques de la porphyrine ce qui conduit à des produits secondaires inséparables par chromatographie. Un couplage de Sonogashira entre la porphyrine **7** et le triisopropylsilyl acétylène conduit au composé **8** avec un très bon rendement de 90 % et à l'échelle du gramme après purification par chromatographie sur colonne de silice. La déprotection statistique des fonctions alcynes du composé **8** a été réalisée avec 0,25 équivalent de TBAF dans le THF à température ambiante pendant 12 min. La purification a été réalisée par chromatographie sur colonne de silice et permet d'isoler le composé **TIPS-ZnP-H** avec un rendement de 42 %. De plus, le produit de départ **8** est récupéré lors de la chromatographie sur colonne de silice et le composé

entièrement déprotégé est négligeable (~5 à 10 %) ce qui résulte en une très faible perte de produit.

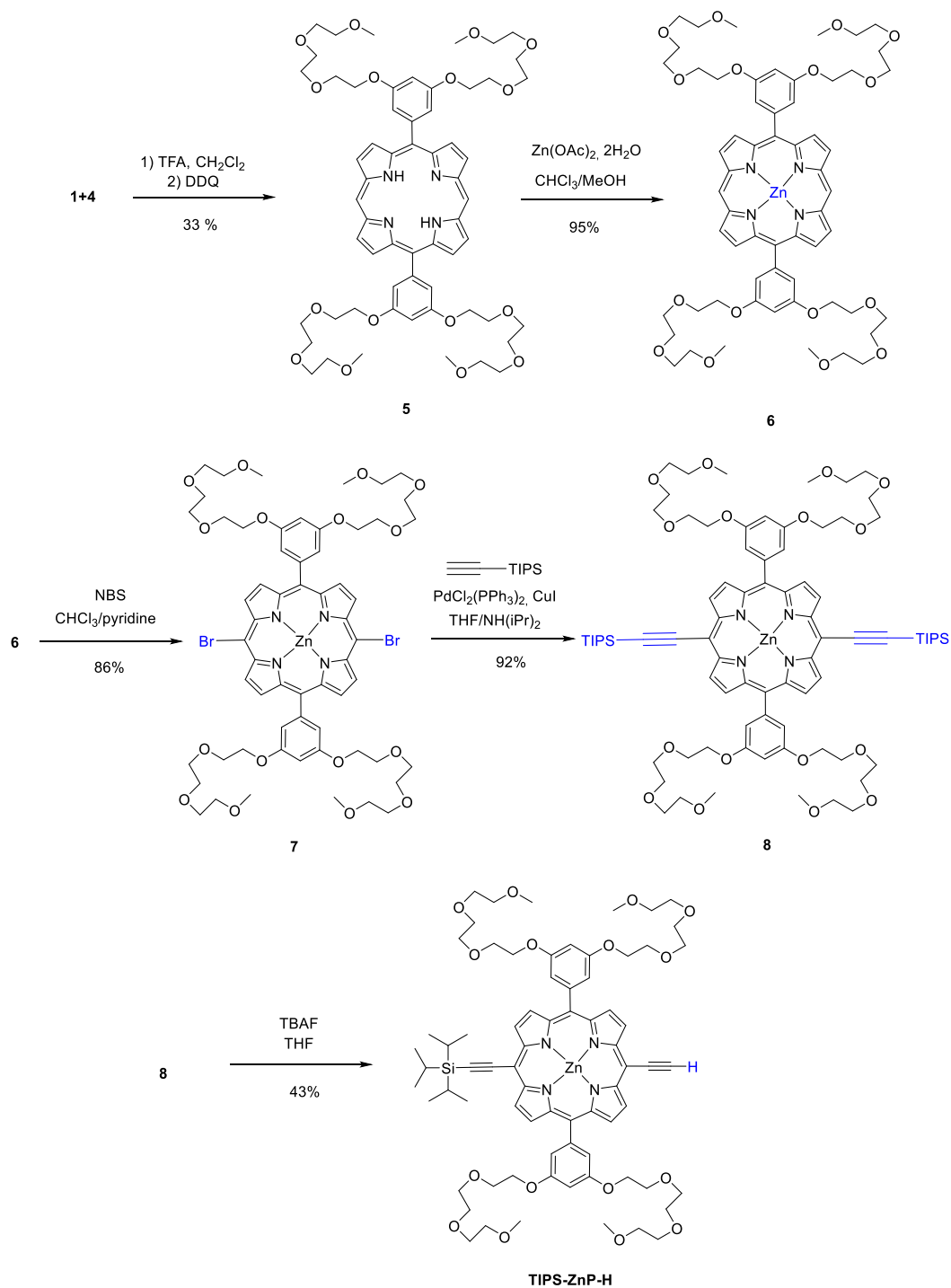


Figure 42. Schéma de synthèse de la porphyrine **TIPS-ZnP-H**.

II.3.2. Synthèse de l'espaceur **11**

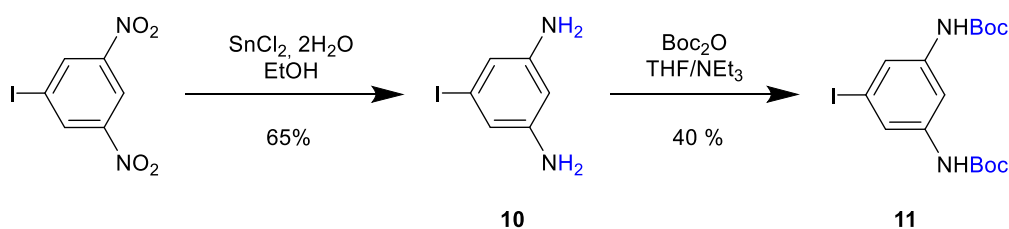


Figure 43. Schéma de synthèse de l'espaceur **11**.

L'espaceur **11** a été obtenu en deux étapes à partir du composé commercial 1-iodo-3,5-dinitrobenzène. La première étape est la réduction des groupements nitro en amine avec du chlorure d'étain.¹⁶⁴ Le composé **10** est obtenu avec un rendement de 65 % après purification sur colonne d'alumine. La deuxième étape est la protection des fonctions amines avec le Di-tert-butyl dicarbonate pour donner l'espaceur **11** avec un rendement de 40 % après purification par chromatographie sur colonne de silice.

II.3.3. Synthèse du photosensibilisateur **14**

Le schéma de synthèse de la porphyrine **14** est présenté dans la Figure 44. La première étape est le couplage de Sonogashira entre **DPP-ZnP-H** et l'espaceur **11** pour donner le composé **12** avec un rendement de 63 % après purification par chromatographie sur colonne de silice. La fonction alcyne est ensuite déprotégée avec du TBAF et le produit est isolé par une colonne de silice rapide. Il est directement engagé dans la seconde réaction de Sonogashira avec **DPP-Br** à cause de son instabilité. Le produit **13** est purifié par colonne de silice puis par colonne d'exclusion stérique pour séparer **13** du dimère de porphyrine, sous-produit lors de la réaction. Le composé **13** est obtenu avec un rendement de 50 %. Enfin les fonctions amines sont déprotégées avec du TBAF et la porphyrine est remétallée au zinc(II) pour donner le précurseur **14** avec un rendement quantitatif. Le composé **14** a été caractérisé par RMN ¹H, ¹³C, HR ESI-MS et spectroscopie d'absorption UV-visible.

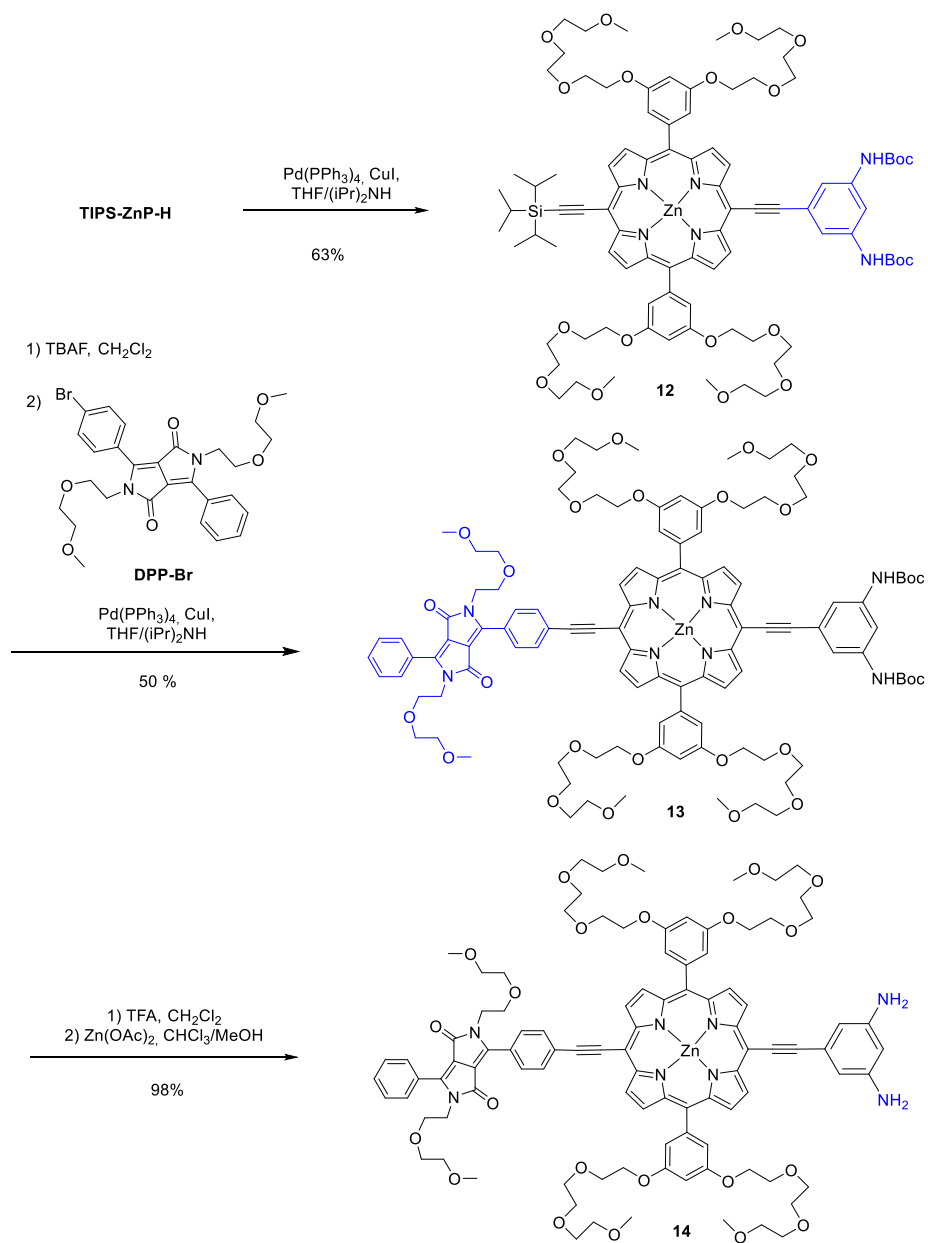


Figure 44. Schéma de synthèse du PS 14.

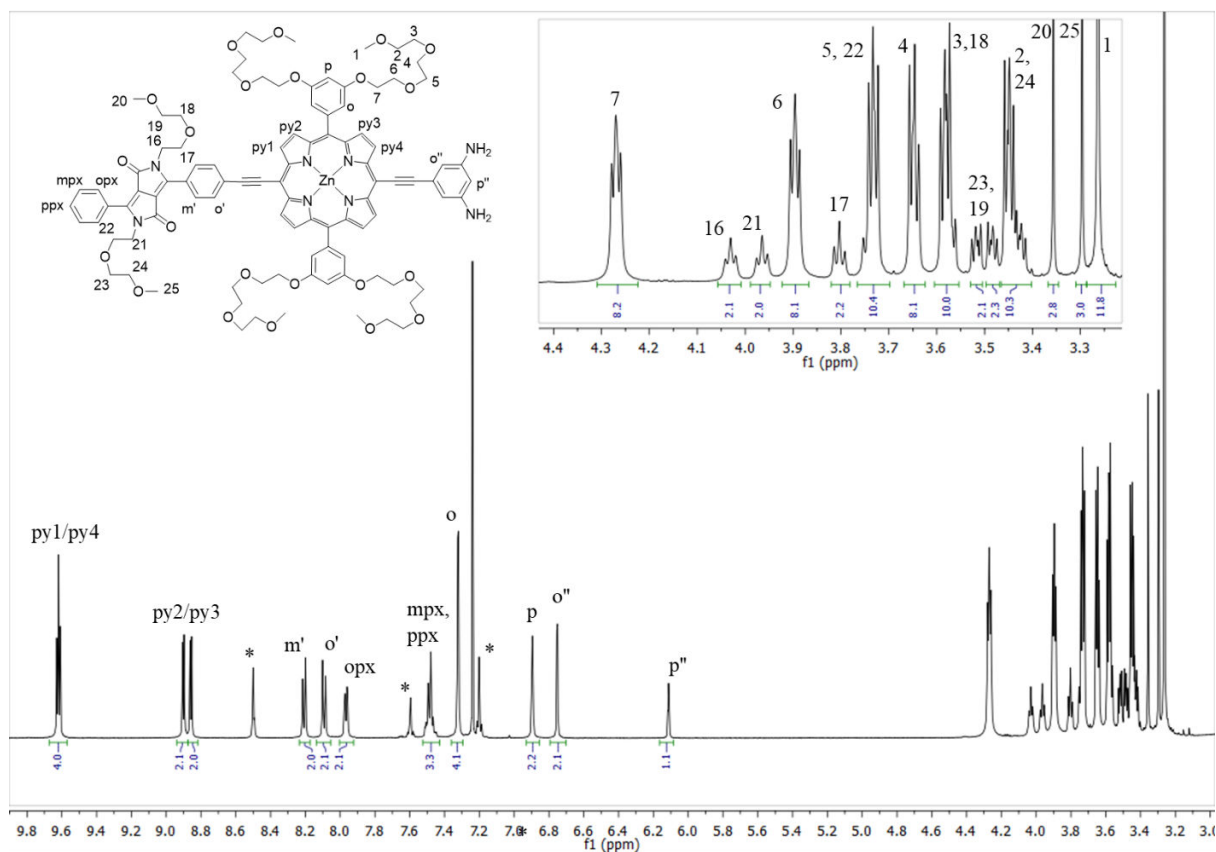


Figure 45. Spectre RMN ^1H de la molécule **14** (400 MHz, 298K, $\text{CDCl}_3/\text{pyridine-}d_6^*$).

Les protons ont été attribués en utilisant les spectrométries RMN 2D COSY et NOESY. La présence de pyridine est nécessaire pour éviter la formation d'oligomères résultant de la coordination de l'amine au zinc (II) d'une porphyrine voisine. Les protons correspondants aux chaînes éthylène glycol se situent entre 3,2 et 4,4 ppm. Les protons aromatiques se situent entre 6 et 8,2 ppm. Les protons β -pyrroliques de la porphyrine forment 4 doublets, caractéristique d'une porphyrine non symétrique, entre 8,8 et 9,8 ppm.

II.3.4. Synthèse de $\text{DPP-ZnP-(GdDOTA)}_2$ et DPP-ZnP-(YDOTA)_2

Les composés DPP-ZnP-(YDOTA)_2 et $\text{DPP-ZnP-(GdDOTA)}_2$ ont été synthétisés selon le schéma réactionnel de la Figure 46. L'yttrium(III) permet de mettre au point les conditions de réactions et de purification de cette synthèse grâce à son caractère diamagnétique qui permet la caractérisation par RMN. Le complexe **YDOTAGA** est obtenu en une étape à partir du ligand commercial DOTAGA (Figure 46). Le ligand DOTAGA est solubilisé dans l'eau et une solution du sel métallique (YCl_3 ou GdCl_3) est ajoutée à la solution (1,1 éq.). Le pH est ajusté à 6,5 et la

solution est agitée à 50°C pendant une nuit. Pour confirmer que tous les ligands ont été complexés on effectue un test au xylénol orange qui permet de détecter l'excès d'ions libres.¹⁶⁵ Le complexe n'étant pas purifié avant la formation de la liaison amide avec la porphyrine **14** il est important de ne plus avoir de ligands libres à cause des 5 liaisons carboxyliques qui pourrait réagir lors de la réaction et conduisant à des produits secondaires.

Les complexes de Gd(III) ou d'Y(III) (3 équivalents) sont dissous dans le DMSO en chauffant à 45°C pendant 3 h. Puis l'agent de couplage TBTU et la base DIPEA sont ajoutés. Enfin, la porphyrine **14**, en solution dans le DMSO, est ajoutée et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 h. La réaction est suivie par CCM (Figure 47) et l'on note l'apparition de deux produits majoritaires. Une purification par chromatographie d'exclusion stérique suivie d'une CCM préparative permet d'isoler ces deux produits.

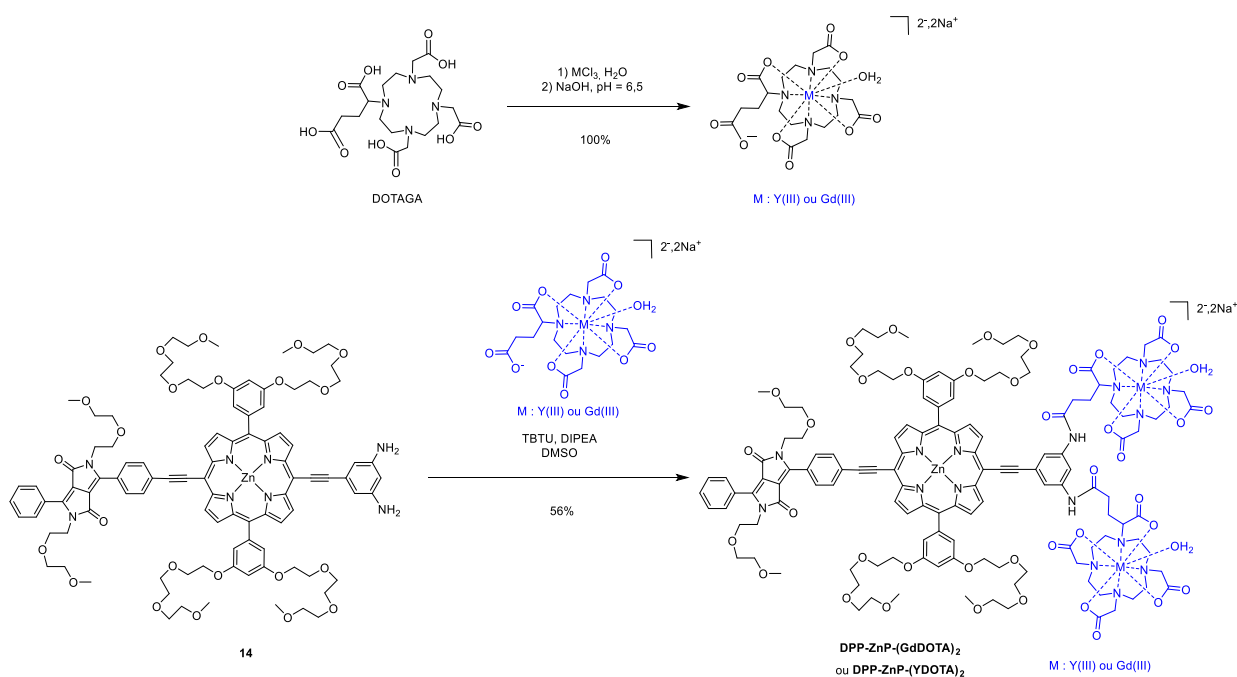


Figure 46. Synthèse des complexes **YDOTAGA** et **GdDOTAGA** ainsi que des composés **DPP-ZnP-(YDOTA)₂** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

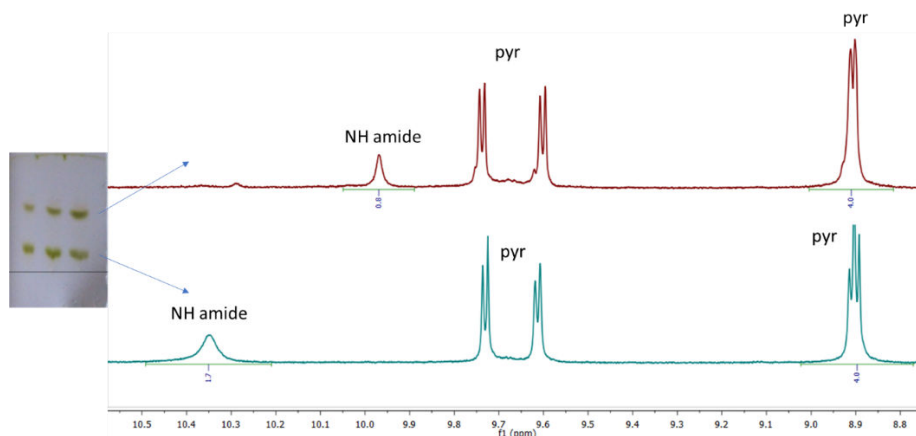


Figure 47. CCM du milieu réactionnel (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ aq, 4/1/0,25) et spectres RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) correspondant aux produits isolés.

Les deux produits ont été caractérisés par RMN ^1H dans le DMSO. En intégrant les signaux correspondants aux protons portés par les liaisons amides et des protons pyrroliques, on trouve que le produit le moins polaire sur la CCM correspond au PS conjugué à un seul complexe d'Y(III) (15 mg, 48 %) et celui du bas au PS conjugué à deux complexes d'Y(III) (13 mg, 33 %).

Le composé diamagnétique **DPP-ZnP-(YDOTA)₂** a été caractérisé par RMN ^1H (Figure 48) et l'attribution des protons a été réalisée avec les spectres COSY et NOESY. Les signaux caractéristiques du complexe d'Y(III) sont présents entre 1,5 et 3 ppm, ceux des chaînes glycols entre 3 et 4,5 ppm et les aromatiques entre 7 et 10 ppm. Il est difficile d'attribuer les protons des complexes d'Y(III), car ce type de complexe possède différents stéréoisomères.¹⁶⁶ Il est intéressant de noter que les protons portés par l'amide sont fortement déblindés et sortent vers 10,5 ppm. Ce fort déblindage a déjà été observé par le groupe de Claude Gros pour des liaisons amides reliant une porphyrine à des complexes.¹¹⁶

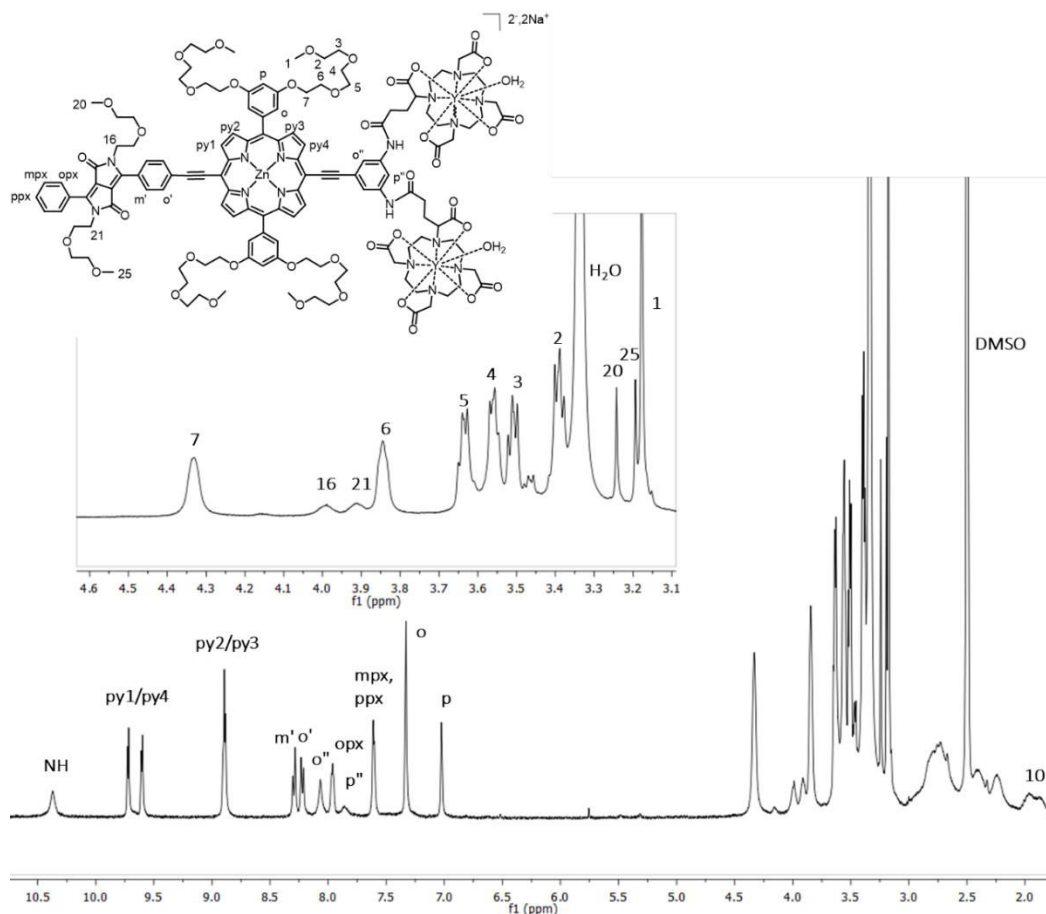


Figure 48. Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **DPP-ZnP-(YDOTA) $_2$** .

Un spectre de masse HR ESI-MS a aussi été obtenu (Figure 49). Le profil isotopique de l'espèce $[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{Na}]^{2-}$, détecté à 1452,4280 correspond au profil théorique et confirme l'obtention de **DPP-ZnP-(YDOTA) $_2$** .

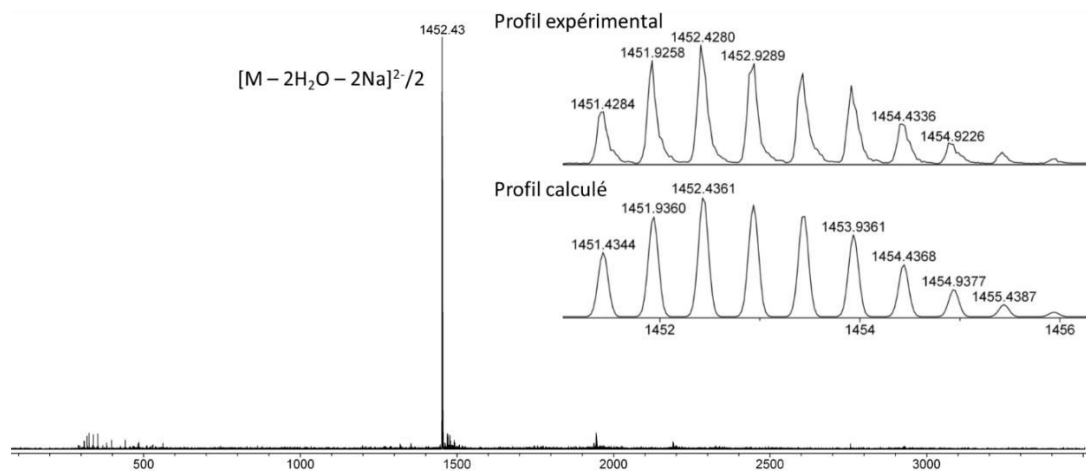


Figure 49. Spectre HR ESI-MS de **DPP-ZnP-(YDOTA) $_2$** et profils isotopiques expérimentaux et calculés.

La synthèse de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** a été réalisée dans les mêmes conditions que la synthèse de **DPP-ZnP-(YDOTA)₂** et suivie par CCM. Néanmoins afin de favoriser la formation du composé avec deux complexes, le TBTU et de la DIPEA ont été rajoutés et la solution agitée 20 h de plus. On observe par CCM la diminution de la formation du composé avec un complexe au profit de celui avec deux complexes. Cela a permis d'augmenter le rendement à 56 % pour **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** (contre 33 % pour **DPP-ZnP-(YDOTA)₂**). Ce composé a pu être obtenu à l'échelle de 40 mg après 17 étapes de synthèse.

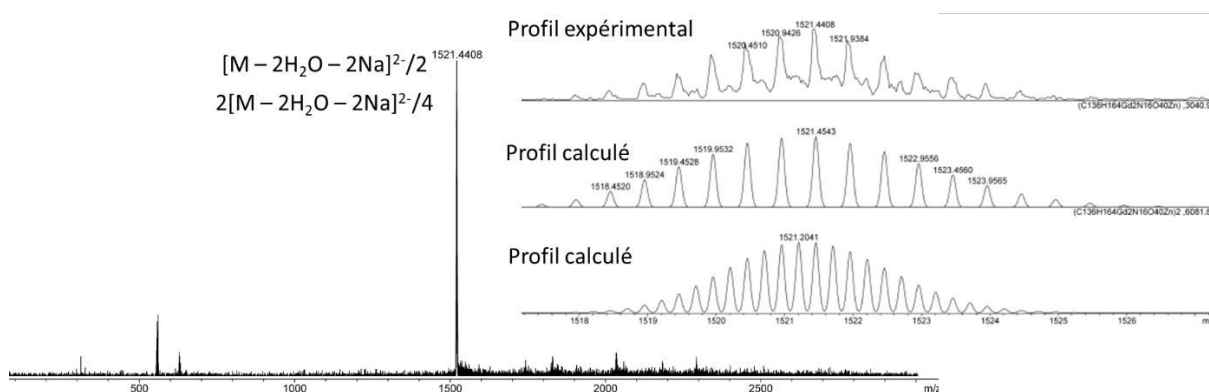


Figure 50. Spectre HR ESI-MS de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et profils isotopiques expérimentaux et calculés.

Le spectre HR ESI-MS confirme la formation de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**. Le profil isotopique de $[M - 2H_2O - 2Na]^{2-}/2$ est détectée à 1521,4408 et correspond au profil théorique. De plus, on observe aussi le profil isotopique d'un dimère du composé de $2 [M - 2H_2O - 2Na]^{2-}/4$ qui se superpose à celui de $[M - 2H_2O - 2Na]^{2-}/2$.

Les dosages du gadolinium et du zinc ont été réalisés par ICP-AES après minéralisation avec de l'acide nitrique à chaud. Un rapport d'un pour deux entre le zinc et le gadolinium est obtenu, apportant une preuve supplémentaire de la formation de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** (Figure 51).

Composé	Gd (mmol/kg)	Zn (mmol/kg)
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	1,1 ± 0,1	0,58 ± 0,04

Figure 51. Dosage par ICP-AES de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

II.4. Caractérisations de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en tant que photosensibilisateur pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique

II.4.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**, réalisés dans le DMSO et l'eau sont présentés dans la Figure 52.

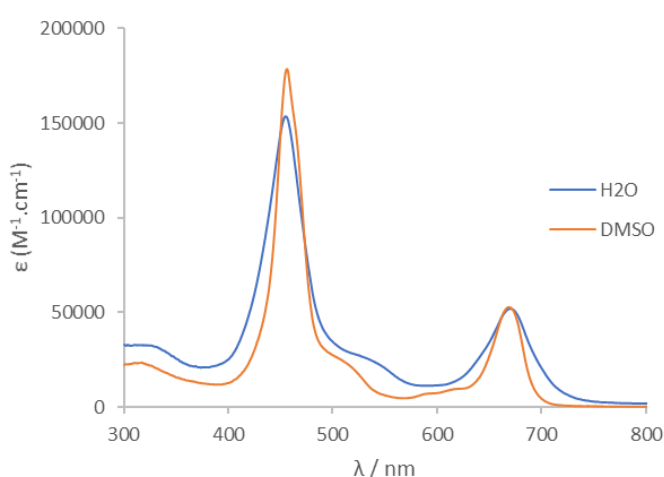


Figure 52. Spectres d'absorption du composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** dans le DMSO et H₂O.

La plus intense des bandes d'absorption de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** se situe dans la région de Soret entre 400 et 550 nm et la seconde, moins intense, se situe dans la région des bandes Q entre 600 et 700 nm. Des calculs théoriques ont été réalisés par le groupe de C. daniel pour le composé **DPP-ZnP**.¹⁶⁷ L'élargissement de la bande de Soret est expliqué par des transitions π - π localisées sur la porphyrine ou délocalisés sur le groupement dicétopyrrolopyrrole. La bande Q de plus faible énergie montre un déplacement bathochrome ainsi qu'une augmentation de son intensité par rapport à une porphyrine classique. Ce phénomène a déjà été observé pour des porphyrines conjuguées.^{168,169} Le spectre d'absorption dans l'eau est légèrement moins intense que celui dans le DMSO et présente un élargissement des bandes. Ce phénomène peut être expliqué par l'agrégation du composé plus importante dans l'eau que dans le DMSO. Néanmoins on remarque que même si la bande de plus faible énergie est plus fine dans le DMSO elle n'est pas plus intense.

Les longueurs d'onde correspondant aux maxima d'absorption ainsi que les coefficients d'extinction molaire correspondants sont donnés dans la Figure 53. On note un déplacement bathochrome d'environ 20 nm entre les maxima d'absorption de la bande Q de **DPP-ZnP** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** pouvant être expliqués par l'augmentation de la conjugaison des électrons π introduit par l'espaceur. Les longueurs d'onde d'absorption maximales sont identiques pour **DPP-ZnP-GdDOTA** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** dans le DMSO.

	Solvants	$\lambda_{abs} / \text{nm} (\epsilon / \text{M.cm}^{-1})$	$\lambda_{abs} / \text{nm} (\epsilon / \text{M.cm}^{-1})$
DPP-ZnP	DMSO	453 (170000)	640 (63000)
DPP-ZnP-GdDOTA	DMSO	455 (300000)	669 (98000)
	H ₂ O	453 (145000)	667 (42000)
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	DMSO	456 (179000)	668 (53000)
	H ₂ O	455 (153000)	670 (52000)

Figure 53. Longueur d'onde d'absorbance maximale pour la bande de Soret et la bande de plus faible énergie avec le coefficient d'extinction molaire correspondant pour **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-GdDOTA** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

Les spectres d'absorption de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**, la chlorine e6 et la tétraphénylporphyrine sont présentés dans la Figure 54. Le spectre d'absorption de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est plus proche de la chlorine e6 que celui de la tétraphénylporphyrine avec une forte absorption dans la région des bandes Q par rapport à une porphyrine « classique ». Le coefficient d'extinction molaire est du même ordre de grandeur que la chlorine e6 (55 000 M.cm⁻¹ dans l'éther diéthylique à 667 nm).¹⁷⁰ Cela peut être expliqué par une forte délocalisation des électrons π et permet à **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** d'être un bon candidat pour la PDT par excitation monophotonique à des longueurs d'onde proche de la fenêtre thérapeutique ($\lambda_{max} = 668 \text{ nm}$).

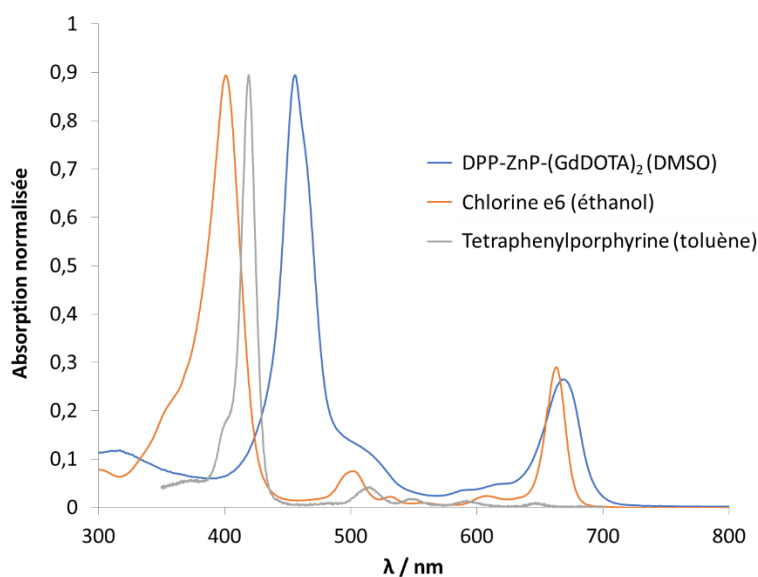


Figure 54. Spectre d'absorption, normalisée sur la bande de Soret, de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**, la chlorine e6 et la tétraphénylporphyrine.

II.4.2. Propriétés de luminescences

Les mesures de luminescence ont été réalisées par Barbara Ventura (Université de Bologne). Les spectres d'émission de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** ont été réalisés dans le DMSO et l'eau et ont été enregistrés avec une excitation à 590 et 620 nm (Figure 55).

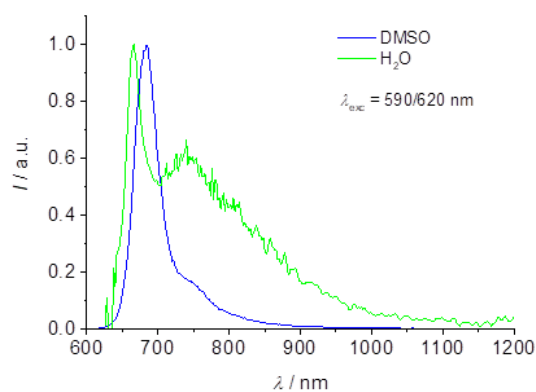


Figure 55. Spectres d'émission du composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** dans le DMSO et H₂O.

Les spectres d'émission de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** sont proches de ceux de **DPP-ZnP** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)**. La bande principale présente un maximum à 684 nm dans le DMSO et à 666 nm dans l'eau. Les données de luminescence sont présentées dans la Figure 56.

	Solvants	λ_{em} / nm	ϕ_{fl}	τ / ns
DPP-ZnP	DMSO	672, 734	0,15	1,00
	H ₂ O/1% DMSO	684, 750 sh	$4,2 \times 10^{-3}$	<0,05
DPP-ZnP-(GdDOTA)	DMSO	684, 750	0,14	0,86
	H ₂ O	762	$2,2 \times 10^{-3}$	0,41 (60%), 1,10 (40%)
DPP-ZnP-(GdDOTA) ₂	DMSO	684, 746 sh	0,13	0,90
	H ₂ O	666, 742	$4,7 \times 10^{-3}$	<0,2 (60%); 0,71 (40%)

Figure 56. Données de luminescence de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-(GdDOTA)** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

Le rendement de fluorescence de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est de 0,13 dans le DMSO. Cette valeur est très proche de celle de **DPP-ZnP** et **DPP-ZnP-GdDOTA**. De plus, les temps de vie de fluorescence sont aussi très proches et aux alentours de 1 ns dans le DMSO. Dans l'eau, les rendements de fluorescence sont très faibles (<0,01 %) pour les trois composés. La décroissance de fluorescence biexponentielle de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** dans l'eau suggère un phénomène d'agrégation dans ce solvant. Cette agrégation a aussi été observée pour le composé **DPP-ZnP-GdDOTA**. Pour conclure, la présence d'un ou deux complexes de Gd(III) influe peu sur les rendements de fluorescence.

II.4.3. Rendement quantique de formation d'oxygène singulet

La détermination du rendement quantique de formation d'oxygène singulet, réalisée par Barbara Ventura a été effectuée dans le DMSO par une méthode indirecte en utilisant le DPBF (1,3-Diphenylisobenzofuran) comme piègeur d'oxygène singulet et la phtalocyanine de zinc (ZnPc) comme référence. L'irradiation a été réalisée à 672 nm et la diminution de l'absorbance du DPBF a été mesurée à 417 nm pendant 9 min. La diminution de l'absorbance du DPBF en présence de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est présentée dans la Figure 57.

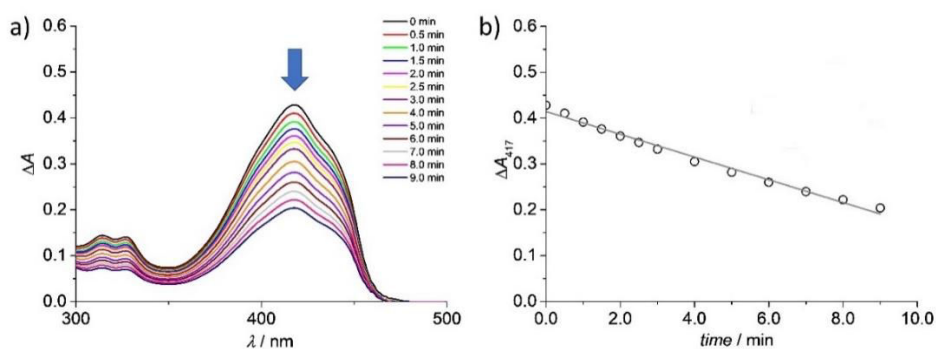


Figure 57. A) Absorbance du DPBF avec soustraction de l'absorbance de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**
 b) Diminution de l'absorbance du DPBF à 417 nm en fonction du temps d'irradiation.

Les rendements quantiques de formation d'oxygène singlet de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-GdDOTA** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** sont présentés dans la Figure 58. Le rendement quantique de formation d'oxygène singlet dans le DMSO est de 0,54 pour **DPP-ZnP**, de 0,68 pour **DPP-ZnP-GdDOTA** et de 0,58 pour **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**. Les rendements de formation d'oxygène singlet sont peu affectés par la présence des complexes de Gd(III) et restent élevés dans le DMSO. Ce composé thérapeutique présente une bonne capacité à former de l'oxygène singlet lors d'une irradiation lumineuse.

	ϕ_{Δ}
DPP-ZnP	0,54
DPP-ZnP-GdDOTA	0,68
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	0,58

Figure 58. Rendements quantiques de formation d'oxygène singlet dans le DMSO.

II.4.4. Spectre d'excitation biphotonique

Le spectre d'excitation biphotonique a été réalisé en collaboration avec Frédéric Bolze à la faculté de pharmacie à Illkirch. Il a été obtenu en mesurant l'intensité de fluorescence émise par le composé suite à une excitation biphotonique (TPEF). La mesure a été effectuée dans le DMSO et le spectre est montré dans la Figure 59. La mesure dans l'eau ou dans un mélange eau/1 % DMSO est impossible, car la fluorescence de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est trop faible en milieu aqueux.

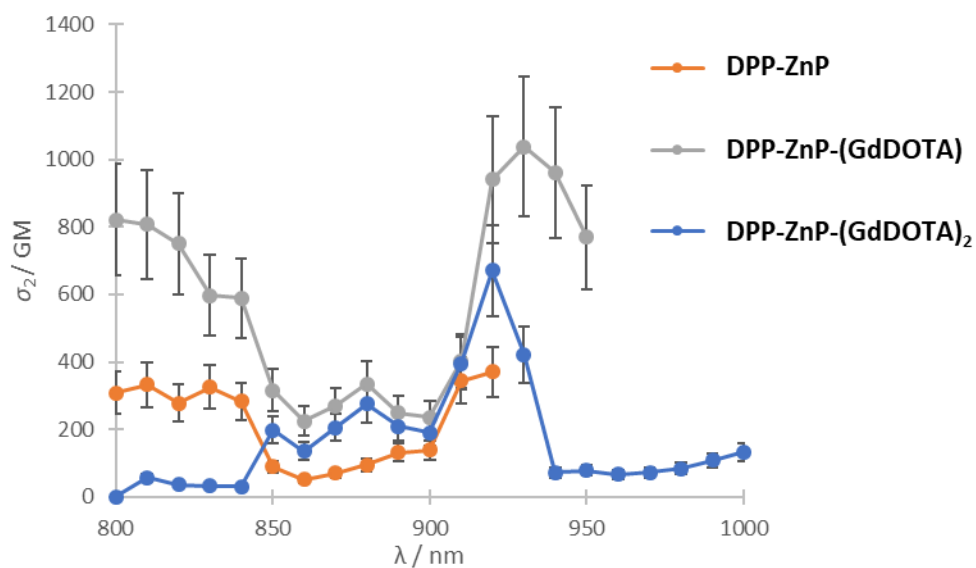


Figure 59. Spectres d'excitation biphotonique de **DPP-ZnP** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** dans le DMSO ($C = 10^{-4}$ M).

Les spectres d'excitation biphotonique présentent un maximum à 920 nm dans le DMSO. Le spectre d'excitation biphotonique de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** possèdent une bande d'absorption principale entre 910 et 930 nm avec un maximum d'environ 700 GM. Cette valeur est augmentée par rapport à celle de **DPP-ZnP** qui se situe vers 400 nm à 920 nm. La section efficace d'absorption biphotonique est néanmoins plus faible que celle de **DPP-ZnP-GdDOTA** qui possède une valeur d'environ 1000 GM à 930 nm (Figure 60).

	$\sigma_2 / \text{GM} (\lambda / \text{nm})$
DPP-ZnP	270 (920)
DPP-ZnP-GdDOTA	1050 (930)
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	670 (920)

Figure 60. Sections efficaces d'absorption biphotonique maximum dans le DMSO de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-GdDOTA** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

II.4.5. Récapitulatifs des propriétés photophysique

Le bon rendement de formation d'oxygène singulet ainsi que la valeur élevée du coefficient d'extinction molaire à 669 nm et celle relativement élevée de la section efficace d'absorption biphotonique à 920 nm font du composé thérapeutique **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** un candidat potentiel intéressant pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique avec une irradiation située dans la fenêtre thérapeutique optique (700-1000 nm).

	Solvant	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\epsilon \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	ϕ_{fl}	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\sigma_2 / \text{GM})$	ϕ_{Δ}
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	DMSO	668 (53000)	684, 746 sh	0,13	920 (670)	0,58
	H ₂ O	669 (41000)	666, 742	4,7x10 ⁻³	-	-

Figure 61. Tableau récapitulatif des mesures photophysiques de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**.

II.5. Caractérisations de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en tant qu'agent de contraste pour l'IRM

Les agents de contraste pour l'IRM se caractérisent par leur relaxivité qui varie en fonction du champ magnétique. Le profil relaxométrique ou NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) correspond au tracé de la relaxivité en fonction du champ magnétique et est obtenu par la mesure du temps de relaxation en fonction du champ magnétique. Ces mesures ont été réalisées à haut champ au service commun de RMN par Bruno Vincent (faculté de chimie de Strasbourg) et à bas champs en collaboration par Célia Bonnet et Eva Toth (Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans). Les valeurs de relaxivité ont été enregistrées à 25 et 37 °C pour des champs magnétiques allant de 43 kHz à 600 MHz et sont présentées dans la Figure 62. Sur cette figure, est également présenté le profil NMRD de l'agent de contraste commercial **GdDOTA** à 25 °C.¹⁷¹

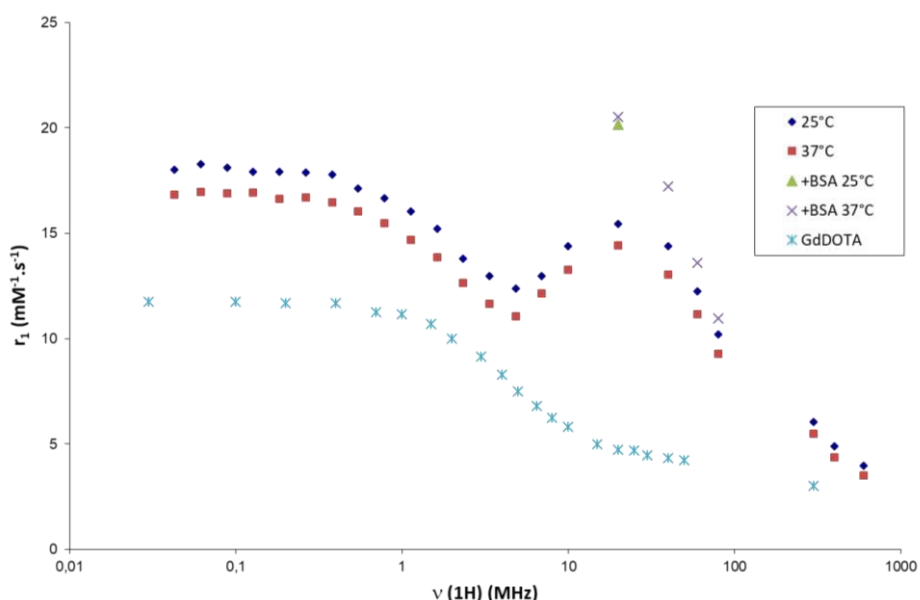


Figure 62. Profil NMRD de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** (1,02 mM dans H₂O/1 % DMSO, pH = 7,3) et **GdDOTA** (eau, pH = 5,1, 25 °C).

Le profil NMRD de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** montre des relaxivités élevées à bas champs et un pic de relaxivité avec une valeur maximum de $15,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37 °C. Ce pic de relaxivité est caractéristique d'un phénomène de rotation lente qui s'explique par l'augmentation de la taille du composé théranostique par rapport à celle du complexe **GdDOTA**. Cette valeur peut être comparée avec celles d'autres composés portant un ou deux complexes de **GdDOTA** synthétisés au laboratoire (Figure 63). On remarque que la relaxivité de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** ($r_1 = 15,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est plus faible que celle de **DPP-ZnP-GdDOTA** ($r_1 = 19,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) alors que la masse molaire est plus grande et le système légèrement plus rigide. Cela peut être expliqué par un phénomène d'agrégation plus important dans l'eau pour ce composé. La relaxivité de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** (voir Figure 77) ($r_1 = 11,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est plus faible car elle a été déterminée en présence de pyridine pour empêcher les agrégats. Enfin, la relaxivité de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est diminuée lorsque la température augmente indiquant qu'elle est toujours limitée par la rotation de la molécule malgré la formation d'agrégat.

Composé	Relaxivité à 20 MHz et 25 °C ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
GdDOTA	4,7
DPP-ZnP-GdDOTA	19,9
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	15,5
GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	11,8

Figure 63. Relaxivité mesuré à 20 MHz et 25 °C de **GdDOTA**, **DPP-ZnP-GdDOTA**, **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** (voir Figure 77).

L'albumine est une protéine présente dans le sang à une concentration de 37 mg/mL. Elle est capable dans certains cas de se lier via des interactions hydrophobes à d'autres molécules. Pour vérifier la présence ou l'absence d'interaction entre le composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et l'albumine, la relaxivité a aussi été mesurée dans l'eau en présence de BSA (Bovine serum albumine). La valeur de relaxivité à 25 °C et 20 MHz est de $20,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui correspond à une augmentation de 30% par rapport à la valeur obtenue en l'absence de BSA. Cette augmentation indique l'existence d'une interaction supramoléculaire entre la partie hydrophobe du composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et la BSA. Cela conduit à un ralentissement de la rotation du composé qui entraîne une augmentation de la relaxivité.

II.6. Études cellulaires de DPP-ZnP-(GdDOTA)₂

II.6.1. Localisation cellulaire

L'efficacité de la PDT dépend fortement de la localisation du PS à l'intérieur de la cellule. La fluorescence de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** a permis de déterminer sa localisation cellulaire par microscopie confocale. Pour déterminer celle-ci, des cellules HeLa ont été co-incubées avec **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et un marqueur du noyau (Hoescht), des mitochondries (Mitotracker green®) ou des lysosomes (lysotracker yellow®). Les images de fluorescence ont été prises au microscope confocal (Figure 64).

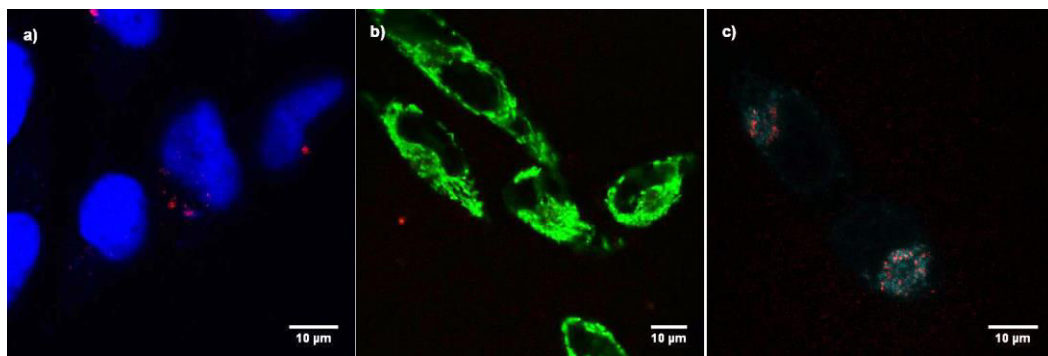


Figure 64. Images confocales de cellules HeLa après 24h d'incubation avec **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** (1 µM). **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en rouge, a) Hoescht (bleu), b) mitotracker (vert) et c) lysotracker (cyan).

Ces images ne montrent aucune colocalisation entre **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et le Hoescht ou le Mitotracker montrant que le composé ne pénètre ni dans le noyau ni dans les mitochondries. Néanmoins, on trouve une colocalisation entre la fluorescence de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** et lysotracker indiquant que la localisation de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** est majoritairement lysosomale. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de **DPP-ZnP-GdDOTA** qui s'accumule aussi préférentiellement dans les lysosomes.

II.6.2. Cytotoxicité

Il est important de connaître la zone de concentration d'incubation pour laquelle on a une absence de toxicité du composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en l'absence d'irradiation lumineuse dans les cellules étudiées. Pour évaluer la cytotoxicité de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** des cellules

HeLa ont été incubées pendant 24 h avec des concentrations croissantes du composé. Le test de viabilité cellulaire au MTT a ensuite été réalisé afin de déterminer la toxicité induite par le composé. On trouve un IC_{50} d'environ $12 \mu\text{M}$ pour **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**. Cette valeur est proche de celle de **DPP-ZnP-GdDOTA** qui possède un IC_{50} de $10 \mu\text{M}$. Ainsi, même avec la présence d'un complexe de Gd(III) en plus la toxicité du composé n'est pas augmentée. De plus, on note une toxicité faible à $2 \mu\text{M}$, concentration utilisée pour les études de phototoxicité.

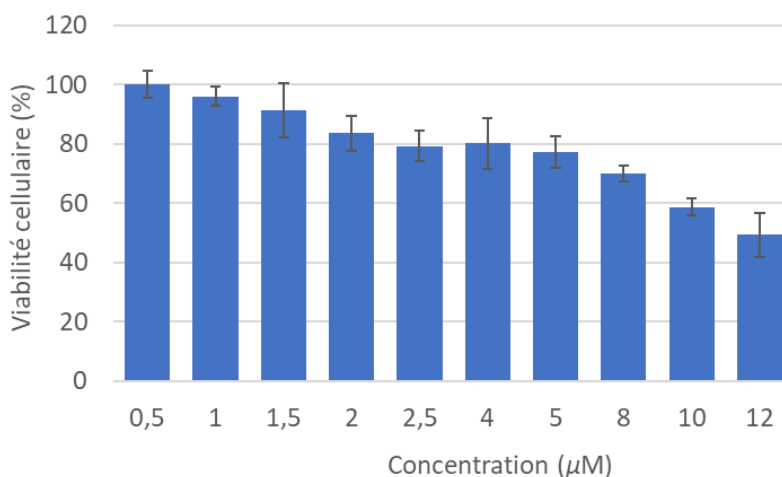


Figure 65. Cytotoxicité induite par le composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** après 24 h d'incubation à différentes concentrations ($C_{\text{mère}} = 10^{-3} \text{ M}$ dans le DMSO).

II.6.3. Phototoxicité par excitation monophotonique

Pour évaluer la capacité du composé thérapeutique **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** à induire la mort cellulaire par irradiation lumineuse, des études de phototoxicité sont réalisées. Des cellules HeLa ont été incubées pendant 24 h avec **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** à une concentration de $2 \mu\text{M}$ avant d'être irradiées à une puissance de 36 mW/cm^2 pendant 15 (32 J/cm^2) ou 30 min (64 J/cm^2) à l'aide d'un montage composé de DELs (voir annexe). La toxicité a ensuite été déterminée avec le test de viabilité cellulaire au MTT 24 h après l'irradiation. Le composé seul et l'irradiation sans composé ne provoquent aucune toxicité. L'irradiation des cellules incorporant le composé conduit à 30 % de mort cellulaire pour 15 min d'irradiation et 70 % suite à 30 min d'irradiation. Ces données permettent d'estimer une LD_{50} d'environ 45 J/cm^2 avec une concentration d'incubation de $2 \mu\text{M}$. Cette valeur peut être comparée avec celle de **DPP-ZnP-GdDOTA** qui possède une LD_{50} de 9 J/cm^2 à une concentration d'incubation de $1 \mu\text{M}$. Une hypothèse plausible expliquant cette différence de phototoxicité peut être

l'internalisation plus faible de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** due à la présence de deux charges négatives. Meade *et al.* ont aussi observé une diminution de la phototoxicité en fonction du nombre de complexes de Gd(III). Ils ont publié en 2010 une porphyrazine reliée à 1, 4 ou 8 complexes de Gd(III).¹⁷² Le composé relié à un complexe de Gd(III) est capable d'engendrer de la phototoxicité alors que les composés reliés à 4 ou 8 complexes ne sont pas internalisés par les cellules et ne provoquent donc pas phototoxicité. Ainsi, malgré les deux charges négatives de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** ce composé théranostique est capable d'être internalisé et d'engendrer de la phototoxicité.

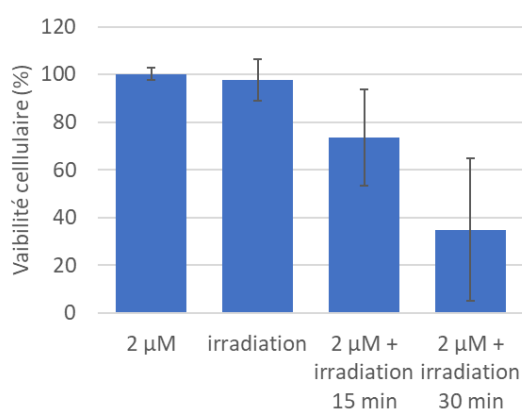


Figure 66. Phototoxicité induite par irradiation monophotonique de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** (2 μM) à 660 nm et 36 mW/cm² (C_{mère} = 10⁻³ M dans le DMSO).

II.7. Conclusion

Un nouvel agent théranostique moléculaire **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** constitué d'un PS pour la PDT relié à deux complexes de Gd(III) pour la fonction d'imagerie a été synthétisé. Les principales caractéristiques de l'agent théranostique **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** permettant de le caractériser en tant que PS pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique sont indiquées dans la Figure 67.

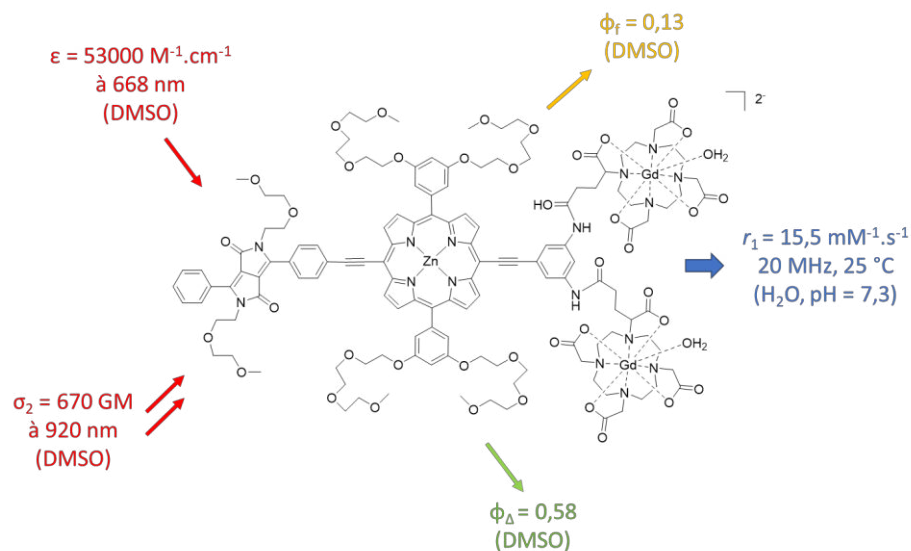


Figure 67. Principales caractéristiques de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en tant que PS et agent de contraste.

Les valeurs élevées de coefficient d'absorption molaire et de section efficace d'absorption biphotonique dans la fenêtre thérapeutique, ainsi que le bon rendement de formation d'oxygène singulet font de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** un PS intéressant pour la PDT. De plus, les études cellulaires ont montré le potentiel de ce composé pour la PDT par excitation monophotonique. Il reste cependant à réaliser les études de phototoxicité par excitation biphotonique afin de confirmer le potentiel de ce composé.

Les hautes valeurs de relaxivité de $15,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25 °C permettent à ce composé d'être un agent de contraste intéressant pour l'IRM. De plus, aux champs magnétiques utilisés en clinique (60 MHz ou 1,5 T) et à 37 °C, le composé **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** possède une relaxivité de $11,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, une valeur quasiment quatre fois supérieure à celle du composé commercial Dotarem® ($r_1 = 2,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)¹⁷³ dans les mêmes conditions. Enfin **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** possédant deux complexes de Gd(III) sa relaxivité molaire est de $22,2 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ à 37 °C et 60 MHz ce qui permet de diminuer l'écart de concentration entre la PDT et l'IRM.

Ainsi, les différentes propriétés de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** permettent d'envisager ce composé comme agent théranostique pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique et l'IRM.

Chapitre III: Études cellulaires de deux agents théranostiques

Ce chapitre de thèse est consacré aux études cellulaires de deux composés théranostiques permettant la PDT par excitation mono- et/ou bi-photonique et l'IRM. Le premier composé est une porphyrine portant 4 complexes de Gd(III)¹⁷⁴ (Figure 68 a) et le second un dimère de porphyrine portant deux complexes de Gd(III) (Figure 68 b). Ces études ont été réalisées au laboratoire de conception et d'application de molécules bioactives (LCAMB) à la faculté de pharmacie de Illkirch sous la supervision de Frédéric Bolze.

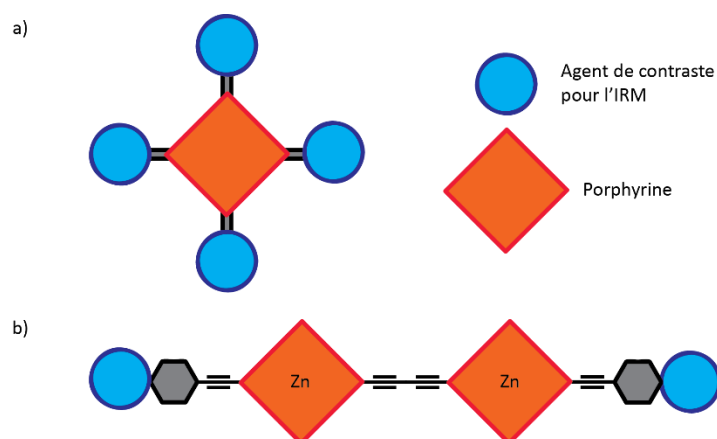


Figure 68. Schéma des deux composés théranostiques étudiés dans le chapitre III.

III.1. Agent théranostique $P(\text{GdDTTA})_4$ pour la PDT par excitation monophotonique et l'IRM

III.1.1. Présentation de $P(\text{GdDTTA})_4$

Le composé $P(\text{GdDTTA})_4$ a été synthétisé au laboratoire par Angélique Sour. Il est composé d'une tétraphénylporphyrine base libre et de 4 complexes de Gd(III)DTTA (Figure 69). Un lien rigide court a été choisi pour connecter les agents de contraste et la porphyrine. Cela permet de limiter la flexibilité du système et optimise sa relaxivité. Le complexe Gd(III)DTTA permet la coordination de deux molécules d'eau au Gd(III) ce qui va aussi augmenter la relaxivité du composé.

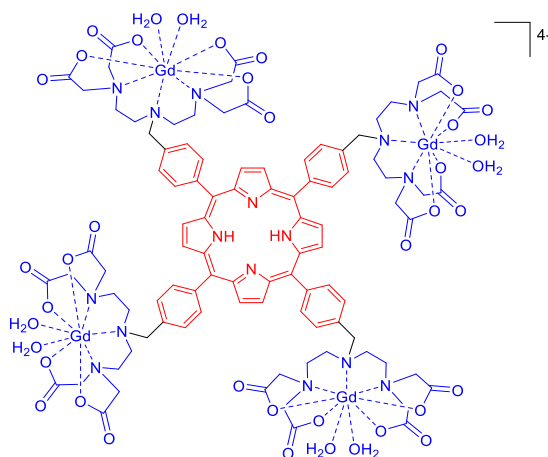
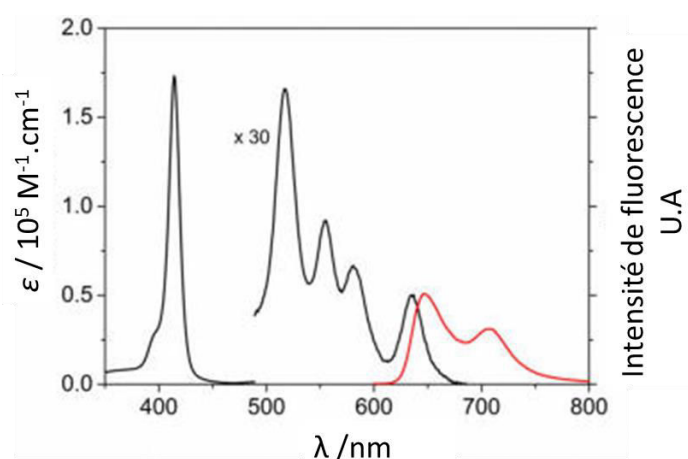


Figure 69. Structure de **P(GdDTTA)₄**.

La tétraphénylporphyrine permet la PDT par excitation monophotonique et les 4 complexes de Gd(III) apportent la fonction d'imagerie. Les principales données photophysiques pour la PDT sont résumées dans la Figure 70. **P(GdDTTA)₄** possède dans l'eau un rendement quantique de formation d'oxygène singulet élevé de 0,45 et un bon rendement de fluorescence de 0,14 permettant de suivre le PS par microscopie de fluorescence. Le coefficient d'extinction molaire à 634 nm est faible ($1700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mais du même ordre de grandeur que celui du PS Photofrin[®] utilisé en clinique.

La très haute valeur de relaxivité de $37,1 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour **P(GdDTTA)₄** à 60 MHz et 37 °C est remarquable et elle valide le design de la molécule pour obtenir un agent de contraste possédant une grande relaxation.



	Solvants	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	ϕ_{fl}	ϕ_{Δ}
$\text{P}(\text{GdDTTA})_4$	H_2O	634 (1700)	0,14	0,45

Figure 70. Spectres d'absorption UV-visible (noir) et d'émission de fluorescence (rouge) de $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$ dans l'eau (pH 7). Principales données photophysiques pour la PDT de $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$.

III.1.2. Études cellulaires

III.1.2.a) Localisation cellulaire

La localisation cellulaire a été déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre II.6.1. Les cellules HeLa ont été incubées avec le composé théranostique $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$ pendant 24 h. Une heure avant la prise des images le Hoescht, le mitotracker ou le lysotracker a été ajouté (Figure 71).

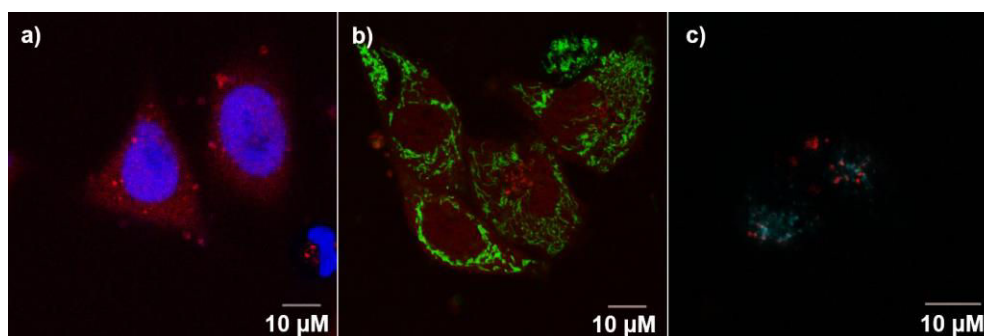


Figure 71. Images confocales de cellules HeLa après 24h d'incubation avec $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$ (1 μM). Fluorescence de $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$ en rouge, a) Hoescht (bleu), b) mitotracker (vert) et c) lysotracker (cyan).

Comme précédemment on trouve une localisation majoritairement lysosomale, mais on observe aussi de la fluorescence dans le cytoplasme indiquant une localisation peu spécifique.

III.1.2.b) Cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité de $\text{P}(\text{GdDTTA})_4$ a été réalisée dans des cellules HeLa après 24 h d'incubation avec le test de viabilité cellulaire au MTT (Figure 72). L' IC_{50} est estimé à 50 μM .

Cette concentration se rapproche plus des porphyrines base libre (0 – 30 μM)^{175,176} que des agents de contraste pour l'IRM (15 – 20 mM).^{177,178}

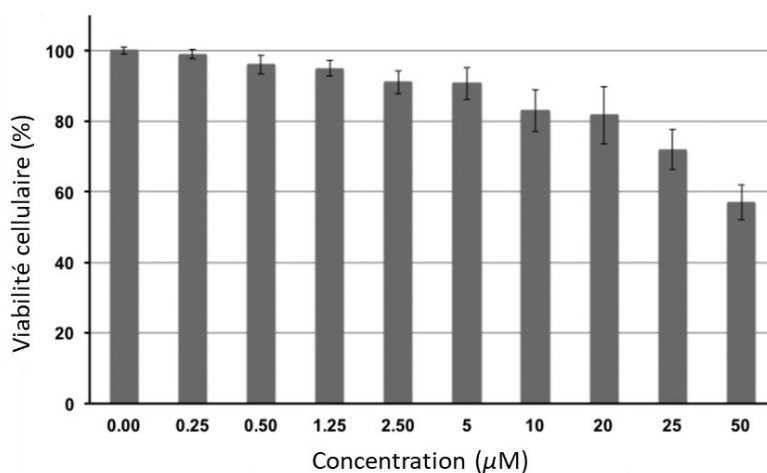


Figure 72. Viabilité des cellules HeLa après 24 h d'incubation avec le composé **P(GdDTTA)₄** ($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans H_2O).

III.1.2.c) Phototoxicité par excitation monophotonique

L'efficacité de **P(GdDTTA)₄** en tant que PS a été évaluée sur des cellules HeLa. Celles-ci ont été incubées à deux concentrations molaires, 2,5 μM ou 6 μM pendant 24 h puis irradiées pendant 1 h à 636 nm à différentes puissances lumineuses (2, 5, 8 et 16 mW/cm^2). Il est important de noter que ni l'irradiation seule ni la présence de composé sans irradiation n'induisent de la toxicité. On estime la LD_{50} , dose de lumière nécessaire pour provoquer 50 % de mort cellulaire, à 40 J/cm^2 et de 29 J/cm^2 pour des concentrations d'incubations de 2,5 et 6 μM respectivement.

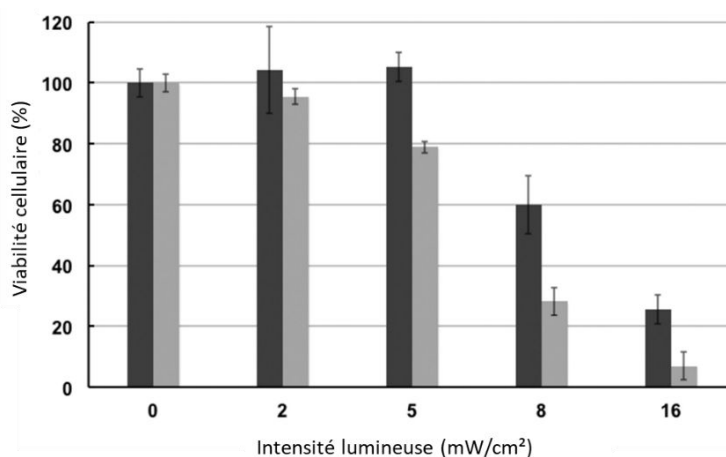


Figure 73. Toxicité induite par irradiation à 636 nm de **P(GdDTTA)₄** à la concentration de 2,5 μM (noir) et 6 μM (gris) pendant 1 h en fonction de la puissance d'irradiation.

III.1.2.d) Temps de relaxation T_1 de $P(\text{GdDTTA})_4$ dans les cellules

Les mesures des temps de relaxation T_1 ont été déterminées dans des cellules HeLa incubées avec $P(\text{GdDTTA})_4$ à trois concentrations différentes. Pour ce faire, les cellules ont été incubées avec le composé pendant 24 h puis le milieu de culture est retiré et les cellules rincées avec du PBS. Elles sont ensuite décrochées de la plaque de culture avec de la trypsine et comptées avec une cellule de Malassez. Enfin, elles sont centrifugées à faible vitesse (60 x g) pour éviter de les tuer et former un culot au fond de l'épendorf (Figure 74).

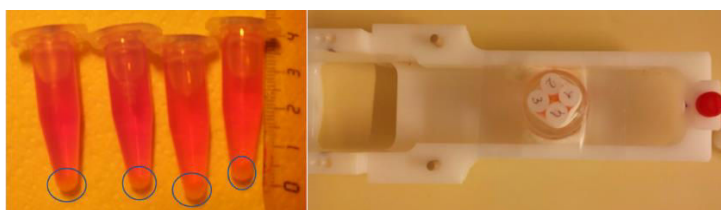


Figure 74. A gauche : eppendorfs contenant les culots cellulaires. A droite : eppendorfs placés dans le dispositif allant dans l'appareil IRM (7 T).

Les mesures de T_1 ont été réalisées en collaboration par Chrystelle Po à la faculté de médecine de Strasbourg. Les échantillons ont été fixés à l'aide du dispositif présenté dans la Figure 74 et insérés dans un spectromètre 7 T Biospec (Bruker).

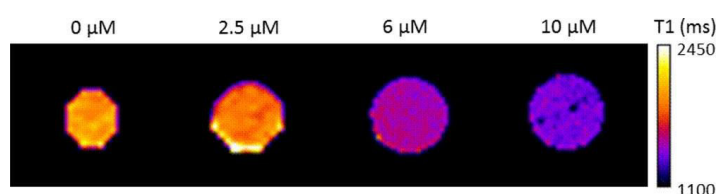
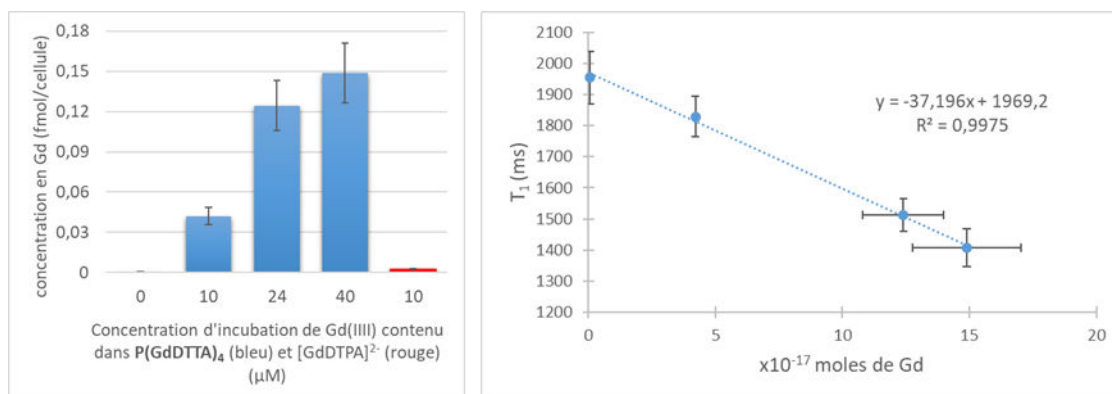


Figure 75. Carte en T_1 à 7 T de fantômes constitués de culots de cellules HeLa. Les cellules ont été incubées avec $P(\text{GdDTTA})_4$ à différentes concentrations (0 – 10 μM).

On remarque qu'en présence de $P(\text{GdDTTA})_4$, même avec une faible concentration d'incubation de 2,5 μM et à un champ magnétique élevé (300 MHz) on a une diminution du temps de relaxation T_1 (Figure 75). Cette valeur diminue d'environ 30 % en utilisant des concentrations d'incubation plus élevées (6 ou 10 μM). Une fois les mesures effectuées, le milieu de culture a été retiré, les cellules détruites pendant 24 h avec de l'acide nitrique (concentré) et la concentration en Gd de chaque échantillon a été déterminée par ICP-AES

(Figure 76). La relation linéaire entre le temps de relaxation T_1 et la quantité de Gd(III) internalisé est cohérente avec l'incorporation cellulaire de **P(GdDTTA)₄** et indique que la molécule est stable dans les cellules pendant l'acquisition qui durent plusieurs heures (Figure 76).



Produit	Concentration d'incubation (μM)	Nombre de moles de Gd par cellule	T ₁ (ms)
P(GdDTTA)₄	0	0,71 ± 0,1 × 10 ⁻¹⁸	1954 ± 85
	2,5	42,11 ± 7,0 × 10 ⁻¹⁸	1829 ± 66
	6	12,4 ± 1,59 × 10 ⁻¹⁷	1512 ± 53
	10	14,9 ± 2,14 × 10 ⁻¹⁷	1407 ± 60
Na₂[GdDTPA]²⁻	10	2,47 ± 0,1 × 10 ⁻¹⁸	

Figure 76. Nombre de moles de Gd par cellule en fonction de la concentration d'incubation de gadolinium(III) contenu dans **P(GdDTTA)₄** ou Na₂[GdDTPA]²⁻ (à gauche). Mesure de T₁ en fonction de la concentration en Gd(III) internalisé dans les cellules mesurée par ICP-AES (à droite). Tableau récapitulatif des valeurs (en bas).

Le nombre de moles de Gd par cellules est 15 fois supérieur pour **P(GdDTTA)₄** comparé à Na₂[GdDTPA]²⁻ pour des concentrations d'incubation en Gd identique de 10 μM (2,5 μM pour **P(GdDTTA)₄**). Bien que les complexes de Gd(III) commerciaux contenant des ligands polyaminocarboxylates soient des agents de contraste extracellulaires la présence de la porphyrine apporte un caractère lipophile qui permet d'augmenter sa pénétration cellulaire. Ce résultat est d'autant plus surprenant que **P(GdDTTA)₄** est chargé 4 fois négativement.

III.2. Agent théranostique combinant un photosensibilisateur pour la PDT biphotonique et deux complexes de gadolinium(III) pour l'IRM

III.2.1. Présentation de GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA

La synthèse et les caractérisations d'un nouvel agent théranostique **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ont été réalisées par Julie Schmitt au laboratoire lors de sa thèse. Il est constitué d'un dimère de porphyrine de Zn(II) relié à deux complexes de Gd(III) (Figure 77). Le choix du dimère de porphyrine conjugué permet d'augmenter fortement la délocalisation des électrons ce qui permet d'avoir une bonne section efficace d'absorption biphotonique. De plus, contrairement à la molécule précédente le complexe relié à la porphyrine est le GdDOTA, un complexe utilisé en clinique.

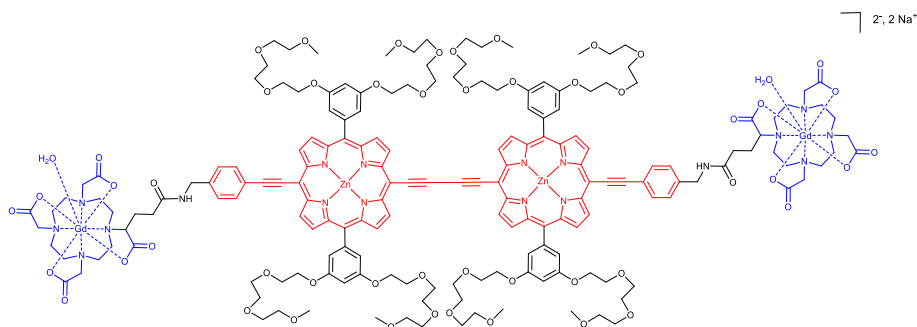


Figure 77. Structure de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**.

Les principales données photophysiques pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique sont résumées dans la Figure 78. Le composé **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** possède une très forte absorption dans le proche infrarouge à 745 nm avec un coefficient d'absorption molaire de $117000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et un rendement quantique de formation d'oxygène singulet de 0,36 indiquant un fort potentiel pour la PDT par excitation monophotonique avec une irradiation dans la fenêtre thérapeutique. La section efficace élevée d'absorption biphotonique est très élevée avec une valeur de 9000 GM à 910 nm dans le DMSO ce qui démontre aussi la possibilité de réaliser de la PDT par excitation biphotonique.

	Solvants	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\sigma_2 / \text{GM})$	ϕ_{fl}	ϕ_{Δ}
GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	DMSO	745 (117000)	910 (9000)	0,21	0,36

Figure 78. Principales données photophysiques pour la PDT de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**.

La valeur de relaxivité de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** mesurée à 20 MHz et 25 °C est de 11,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et permet aussi d'envisager ce composé comme agent de contraste pour l'IRM.

Les très fortes valeurs de sections efficaces d'absorption biphotoniques ainsi que les bonnes valeurs de relaxivité valident le design de cette molécule pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique ainsi que l'IRM.

III.2.2. Études cellulaires

III.2.2.a) Localisation cellulaire

La localisation cellulaire a été déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre II.6.1. Les cellules HeLa ont été incubées avec **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** pendant 24 h et 1 h avant la prise des images avec le Hoescht, le mitotracker et le lysotracker (Figure 79).

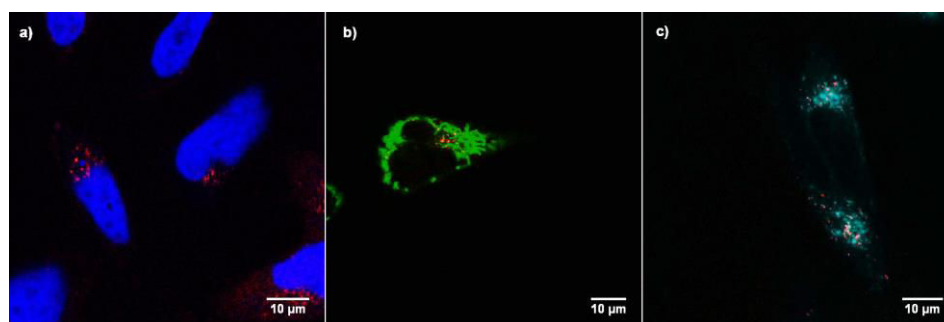
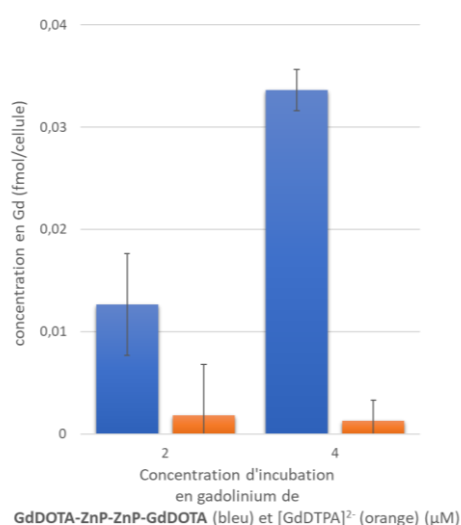


Figure 79. Images confocales de cellules HeLa après 24h d'incubation avec **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** (1 μM). **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** en rouge , a) Hoescht (bleu), b) mitotracker (vert) et c) lysotracker (cyan).

Comme pour **DPP-ZnP-GdDOTA** et **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂**, la fluorescence de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** montre que la molécule semble se localiser préférentiellement dans les lysosomes.

III.2.2.b) Internalisation cellulaire

L'internalisation de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** par des cellules HeLa a été déterminée par ICP-AES et comparée à l'agent commercial $\text{Na}_2[\text{GdDTPA}]^{2-}$ à des concentrations équivalentes de gadolinium (Figure 80). Contrairement à l'agent commercial, qui rentre difficilement dans les cellules, le composé **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** est internalisé. Après 24h d'incubation à une concentration de 4 μM en Gd(III) (ou 2 μM en **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**) la concentration de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** est 13 fois plus importante que celles de l'agent commercial. Ce résultat peut être expliqué par le caractère amphiphile de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** qui permet de favoriser l'internalisation cellulaire.



Composé	Concentration d'incubation en Gd (μM)	Mol de Gd par cellule
$\text{Na}_2[\text{GdDTPA}]^{2-}$	2	$1,8 \pm 0,5 \times 10^{-18}$
$\text{Na}_2[\text{GdDTPA}]^{2-}$	4	$1,3 \pm 0,2 \times 10^{-18}$
GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	2	$12,6 \pm 0,5 \times 10^{-18}$
GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	4	$33,6 \pm 0,2 \times 10^{-18}$

Figure 80. Concentration en Gd en fonction de la concentration d'incubation de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ou $\text{Na}_2[\text{GdDTPA}]^{2-}$.

III.2.2.c) Cytotoxicité

La cytotoxicité envers des cellules HeLa de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** a été évaluée au bout de 24 h par le test de viabilité cellulaire au MTT (Figure 81). On observe une cytotoxicité pour

des concentrations supérieures à 2,5 μM et l'IC₅₀ est estimé à 10 μM . Cette toxicité est comparable à beaucoup d'autres PSs de type porphyrinique possédant des IC₅₀ entre 1 et 30 μM .^{175,176}

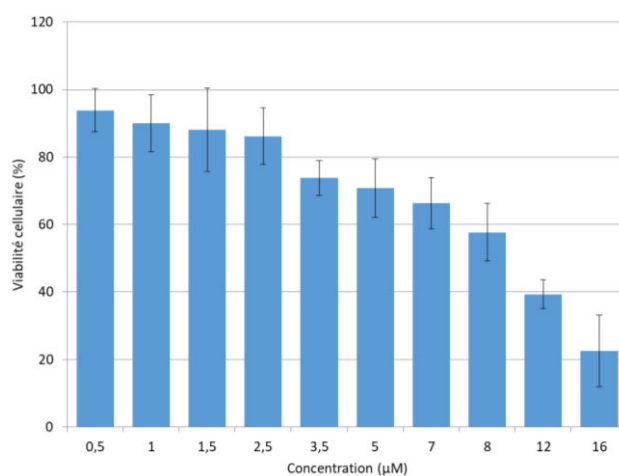


Figure 81. Viabilité cellulaire après 24 h d'incubation avec **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** de cellules HeLa. ($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans le DMSO).

III.2.2.d) Phototoxicité par excitation monophotonique

La phototoxicité par irradiation monophotonique a été évaluée pour des cellules HeLa (Figure 82). Les cellules ont été incubées avec 1 μM de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** pendant 24 h puis irradiées avec des DELs, possédant une longueur d'onde dans la fenêtre thérapeutique optique (740 nm, cf annexe) à une puissance de 36 mW/cm^2 pendant 15 ou 30 min correspondant à des doses lumineuses de 32 ou 65 J/cm^2 respectivement. Il est important de noter que ni l'irradiation ni le composé seul n'entraîne une toxicité. À une concentration faible en PS (1 μM), on observe une phototoxicité significative au bout de 15 min d'irradiation et d'environ 60 % pour 30 min d'irradiation. La quantité de lumière nécessaire pour induire 50 % de mort cellulaire est estimée à 60 J/cm^2 .

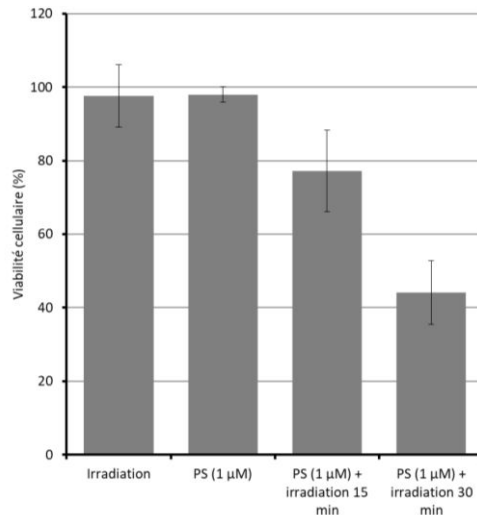


Figure 82. Toxicité induite par une irradiation à 740 nm et 36 mW/cm² de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans le DMSO)

III.2.2.e) Phototoxicité par excitation biphotonique

Les tests de phototoxicité induite par excitation biphotonique ont été réalisés à la plateforme d'imagerie de l'IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire). Les puissances ont été mesurées par Elvire Guiot (plateforme imagerie IGMBMC) en bleachpoint, soit juste avant que le laser passe à travers l'objectif. Malheureusement, ils n'ont pas la possibilité de mesurer la puissance arrivant sur les cellules et la courbe de transmission de cet objectif est inconnue. Il est à noter que bien que l'information de la puissance arrivant sur les cellules soit importante, elle est souvent difficile à trouver dans la littérature, mais avec des objectifs classiques la transmission à ces longueurs d'onde est d'environ 80 % ce qui correspond à une perte de puissance d'environ 20 %. Le système utilisé est constitué d'un microscope confocal SP5 de Leica monté avec une chambre permettant de maintenir la température à 37 °C pendant la durée de l'expérience. Il est équipé d'un laser pulsé Ti :sapphire coherent chameleon ultra II permettant de réaliser une excitation biphotonique avec des longueurs d'onde allant de 680 à 1080 nm (Figure 83).



Figure 83. Photo du microscope confocal équipé d'un laser femtoseconde utilisé pour la PDT par excitation biphotonique.

La phototoxicité induite par une excitation biphotonique a été évaluée sur des cellules HeLa incubées avec **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ($2 \mu\text{M}$) 24 h avant irradiation. Contrairement à une excitation monophotonique pour laquelle il est facile d'irradier un puits entier d'une plaque 96 puits cela reste difficile par excitation biphotonique à cause du faible volume d'irradiation ($1 \mu\text{m}^3$). Il est donc plus difficile de réaliser des tests de viabilité colorimétrique classique comme le test au MTT.

Dans un premier temps, afin de mettre au point les conditions d'irradiation, nous avons visualisé la modification de la morphologie cellulaire après l'irradiation. Les meilleurs résultats ont été obtenus en irradiant les cellules sur 10 plans espacés de $1 \mu\text{m}$ avec 30 scans par plan (300 scans en tout). L'objectif utilisé est un 40x et la durée de l'irradiation est d'environ 3 min. L'irradiation a été réalisée une puissance de 77 mW mesurée en Bleachpoint. Directement après l'irradiation on observe une cellule qui gonfle et après 10 min on remarque la destruction de la membrane cellulaire avec la formation de bulles (Figure 84).

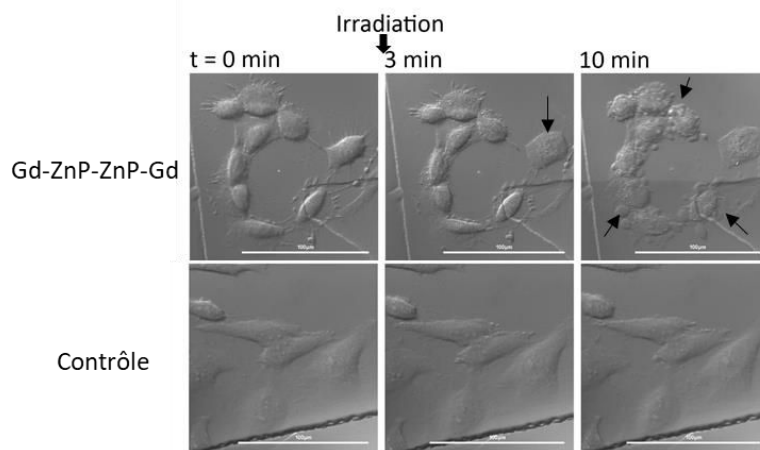


Figure 84. Image DIC pour des cellules irradiées pendant 3 min (300 scans) à 910 nm (77 mW) incubées ou non avec **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** (2 μm).

Une fois les conditions d'irradiation mise au point la puissance d'irradiation a été variée et la mort cellulaire évaluée par une méthode colorimétrique décrite par Wilson *et al.*⁷⁷ La zone d'irradiation peut facilement être retrouvée, car les cellules sont mises en culture dans des ibidi grid, boîte possédant un quadrillage de 500 μm de côté (Figure 85). L'irradiation est réalisée avec un objectif 40x et un zoom réglé sur 1,5x afin d'obtenir une zone d'irradiation carrée de 250 μm de côté.

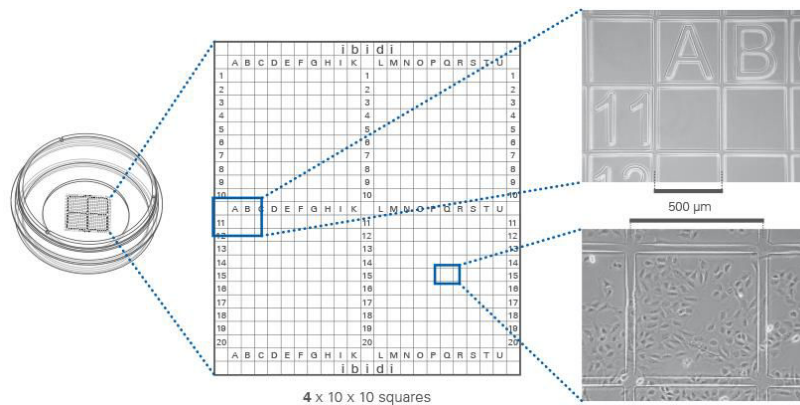


Figure 85. Schéma des boîtes ibidi grid issue du site ibidi.com.

Les cellules ont été irradiées dans des conditions identiques à celle décrite précédemment, mais pour des puissances variant de 30 à 198 mW. 3 h 30 après l'irradiation les cellules ont été incubées avec les marqueurs fluorescents Hoescht et Sytox orange. Le Hoescht va marquer les noyaux de toutes les cellules alors que le Sytox orange va uniquement marquer les noyaux des cellules possédant une membrane cellulaire abimée indiquant la mort cellulaire. En

observant la fluorescence des deux marqueurs, les cellules vivantes et mortes pourront être comptées. Les images avant irradiation ont été réalisées par microscopie CID (Contraste interférentiel différentiel) et celles après irradiation par microscopie confocale avec deux détecteurs de fluorescence, un pour le marqueur Hoescht et un pour le marqueur Sytox orange (Figure 86).

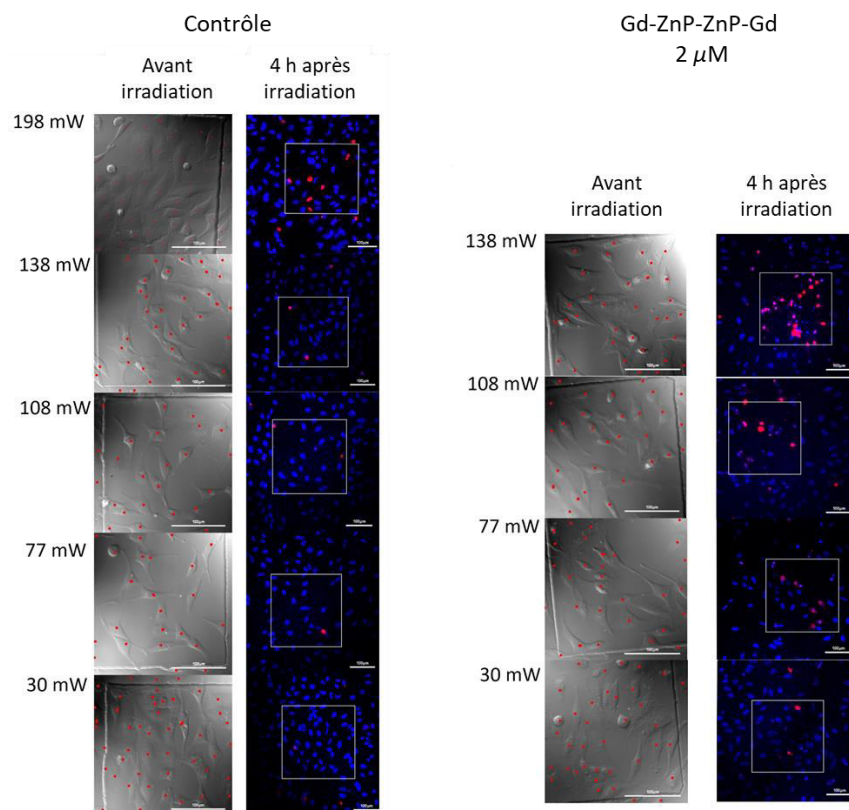


Figure 86. Images CID (avant irradiation) et confocales (4 h après irradiation) de cellules HeLa irradiés) à 910 nm à différentes puissances. En bleu fluorescence du marqueur Hoescht et en rouge fluorescence du marqueur Sytox orange.

Les images de la colonne contrôle ont été réalisées dans les mêmes conditions d'irradiation, mais sans incubation de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**. On ne note pas de toxicité induite par le laser pour des puissances allant de 30 à 138 mW. À partir de 198 mW on commence à observer de la mort cellulaire indiquant que le seuil de puissance induisant de la toxicité uniquement par le laser se situe entre 138 et 198 mW dans ces conditions d'irradiation. La viabilité cellulaire a été estimée en comptant les cellules avant et après irradiation (Figure 87). On commence à observer de la mort cellulaire 4 h après irradiation pour des puissances de 30

mW (~15 %) et 100 % de mort cellulaire pour une puissance de 138 mW alors que les cellules situées à l'extérieur de la zone d'irradiation ne sont pas affectées démontrant la grande sélectivité spatiale de l'irradiation biphotonique.

P (910 nm) / mW	Viabilité cellulaire (%)	
	Contrôle	GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA
198	72	-
138	109	0
108	108	15
77	104	65
30	98	85

Figure 87. Estimation de la viabilité cellulaire 4 h après irradiation à 910 nm à différentes puissances.

III.3. Conclusion

Les études cellulaires réalisées avec des cellules HeLa incubées avec les composés **P(GdDTTA)₄** et **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ont permis de déterminer la localisation cellulaire, la cytotoxicité et l'efficacité de ces molécules théranostiques à se comporter en tant que PS pour la PDT et en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

L'internalisation cellulaire de l'agent théranostique **P(GdDTTA)₄** a été mise en évidence par la diminution du temps de relaxation T_1 et des dosages de Gd(III) par ICP-AES. Cette diminution de la relaxivité permet d'envisager ce composé pour des applications en IRM. De plus, l'excitation de ce composé à une longueur d'onde de 636 nm conduit à une toxicité cellulaire ce qui en fait un candidat intéressant pour la PDT. Ces deux fonctions permettent au composé **P(GdDTTA)₄** d'être un agent théranostique intéressant pour la PDT et le suivi du traitement par l'IRM.

Les études cellulaires de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** ont montré le potentiel de ce composé pour la PDT par excitation monophotonique à une longueur d'onde de 740 nm qui se situe dans la fenêtre thérapeutique optique. De plus, une phototoxicité induite par une excitation biphotonique à 910 nm a été obtenue ce qui permet d'envisager ce composé pour la PDT par

excitation biphotonique. Ces caractéristiques font de **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** un composé thérapeutique intéressant pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique ainsi que le suivi du traitement par l'IRM.

Ces résultats ont conduit à une publication pour le composé **P(GdDTTA)₄**¹⁷⁴ et le manuscrit pour **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** est en cours de finalisation.

Chapitre IV: Photosensibilisateur vectorisé pour la PDT par excitation biphotonique.

Ce chapitre de thèse est consacré à l'étude de deux PS vectorisés (**DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**) permettant de réaliser le traitement par la PDT par absorption mono- et bi-photonique. La vectorisation du PS permet d'augmenter la sélectivité de ce composé envers les cellules cancéreuses et d'augmenter son internalisation cellulaire afin d'augmenter l'efficacité du traitement. Le PS est constitué d'une porphyrine conjuguée à un chromophore dicétopyrrolopyrrole. Il est relié à un espaceur diéthylèneglycol, lui-même connecté à un vecteur, l'acide folique ou la biotine (Figure 88).

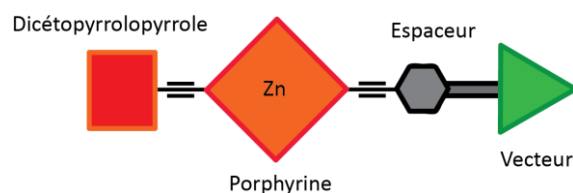


Figure 88. Schéma du PS vectorisé.

La synthèse de ces deux PS vectorisés (**DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**) et les propriétés photophysiques permettant de le caractériser en tant que PS pour la PDT par excitation mono- ou bi-photonique seront présentées. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux études cellulaires.

IV.1. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse utilisée est de type modulaire à partir de trois composants. Le premier est le PS **DPP-ZnP** déjà présenté au chapitre I.2.4.c et II.3. Le second est un espaceur permettant de relier la porphyrine au vecteur et le troisième est le vecteur. L'espaceur est introduit sur la porphyrine avant le composé **DPP-Br** pour deux raisons : la première est que la déprotection de la fonction alcyne de **DPP-ZnP** (voir Figure 36), bien que totale, conduit à

un produit de dégradation ce qui diminue les rendements globaux de la synthèse. La deuxième raison est que l'espaceur est plus facilement synthétisable que **DPP-Br**.

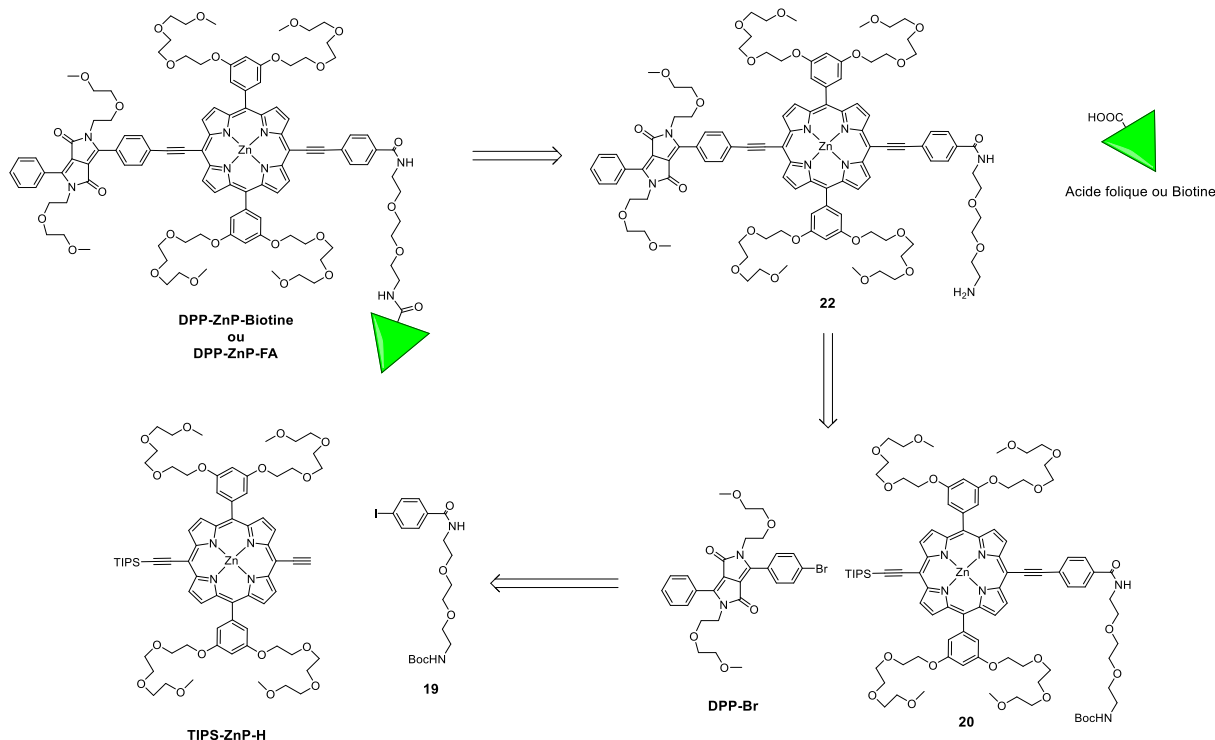


Figure 89. Rétrosynthèse des PSs vectorisés.

IV.2. Synthèse de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**

IV.2.1. Synthèse du synthon **19**

L'espaceur **19** possède deux groupements réactifs. Le premier est un iodobenzène qui va permettre de coupler l'espaceur **19** à la porphyrine par un couplage de Sonogashira. Le second est une amine protégée qui, une fois déprotégée, formera une liaison amide avec le vecteur. La chaîne 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-éthyl-amine permet de séparer le PS du vecteur afin de ne pas modifier l'affinité du ligand pour son récepteur.¹³⁹

La synthèse de l'espaceur s'effectue en deux étapes (Figure 90). La première est la monoprotection d'une des fonctions amine de la 2,2'-(éthylènedioxy)bis(éthylamine) pour donner le composé **18** avec un rendement de 96 % en suivant le mode opératoire décrit par Frochot *et al.*¹⁴¹ La seconde étape est la formation de la liaison amide entre l'acide p-iodobenzoïque et le composé **18** en présence de TBTU et de DIPEA dans le DMF afin de donner

l'espaceur **19** avec un rendement de 83 % après purification par chromatographie flash sur colonne de silice. L'espaceur **19** obtenue à l'échelle de 200 mg a été caractérisé par spectroscopie RMN ^1H , ^{13}C et spectrométrie HR ESI-MS.

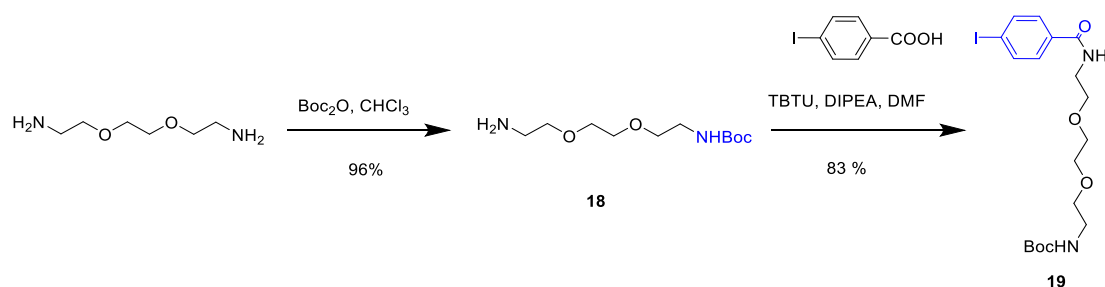


Figure 90. Schéma de synthèse de l'espaceur **19**.

IV.2.2. Synthèse du photosensibilisateur **22**

La DPP-porphyrine-espaceur **22** est synthétisée en cinq étapes (Figure 91). La première étape est un couplage de Sonogashira entre **TIPS-ZnP-H** et le synthon iodophenyl-espaceur **19** pour donner le composé **20**, après purification par chromatographie sur colonne de silice suivie d'une colonne d'exclusion stérique, sous forme de solide vert avec un rendement de 82%. La fonction alcyne de **20** est ensuite déprotégée avec du TBAF dans le DCM. Ce produit intermédiaire n'étant pas stable, il est rapidement engagé dans un couplage de Sonogashira avec **DPP-Br** afin de donner **21** après purification par colonne de silice avec un rendement de 52 %. La fonction amine de **21** est ensuite déprotégée avec du TFA entraînant la démétallation de la porphyrine. Celle-ci est ensuite remétallée avec de l'acétate de zinc à 40 °C pendant une nuit pour donner la porphyrine **22** avec un rendement quantitatif. Les rendements de cette synthèse sont bons et la porphyrine **22** a été obtenue à l'échelle de 50 mg. Ce composé a été caractérisé par spectroscopie RMN ^1H (Figure 92), ^{13}C , absorption UV-visible et spectrométrie HR ESI-MS.

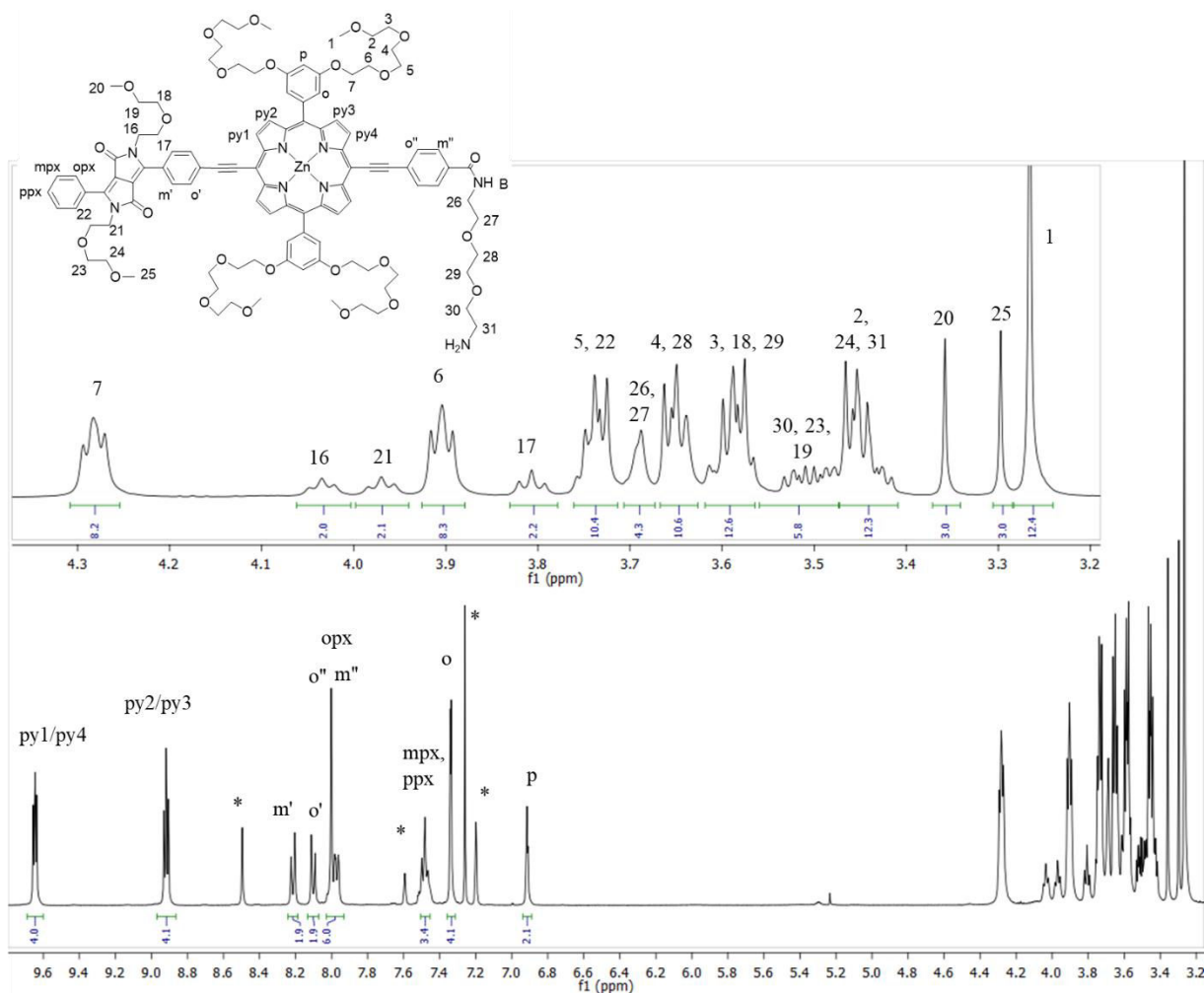


Figure 92. Spectre RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3^*/\text{pyridine-}d_6^*$) de la porphyrine-espacer **22**.

Les protons ont été attribués en utilisant les spectroscopies RMN 2D COSY et NOESY. La présence de pyridine est nécessaire pour éviter la formation d'agrégats formés par la coordination de l'amine avec le zinc de la porphyrine.

IV.2.3. Synthèse et caractérisation de DPP-ZnP-FA

IV.2.3.a) Synthèse de DPP-ZnP-FA

Le PS vectorisé **DPP-ZnP-FA** a été obtenu selon le schéma réactionnel de la Figure 93. Le mode opératoire utilisé est différent de celui classiquement utilisé qui active l'acide folique avec le DCC et NHS dans le DMSO.^{141,179–181} Ici l'acide folique est dissous dans un mélange DMSO/DMF (50/50) et la solution est refroidie à 0°C. Le choix de ce mélange de solvant permet de refroidir la réaction et devrait favoriser l'activation de l'acide γ . En effet, l'acide α est plus encombré et

peut former des liaisons hydrogène ce qui limite sa réactivité par rapport à l'acide γ .¹⁸² Le TBTU et la morpholine sont ajoutés et la solution est agitée pendant 1 h à 0°C pour activer l'acide. Puis une solution du PS **22** dans le DMF, refroidie à 0°C, est ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité une nuit à 0°C puis 8 h à température ambiante. La solution est ensuite versée dans Et₂O et le précipité est lavé avec de l'éther diéthylique, de l'eau et de l'acétonitrile. Enfin le solide est purifié par HPLC semi-prep (C18) pour donner **DPP-ZnP-FA** avec un rendement de 35 %. Le composé **DPP-ZnP-FA** a été obtenu à l'échelle de 10 mg. A ce stade nous ne pouvons pas exclure un mélange de deux isomères α et γ . Ce rendement relativement faible limite les rendements globaux de la synthèse et peut être expliqué par la méthode de purification utilisée. Néanmoins, il est cohérent avec les rendements obtenus par d'autres groupes, entre 28 % et 62 %, pour la synthèse de porphyrines reliées à l'acide folique par liaison amide.^{143,181,183}

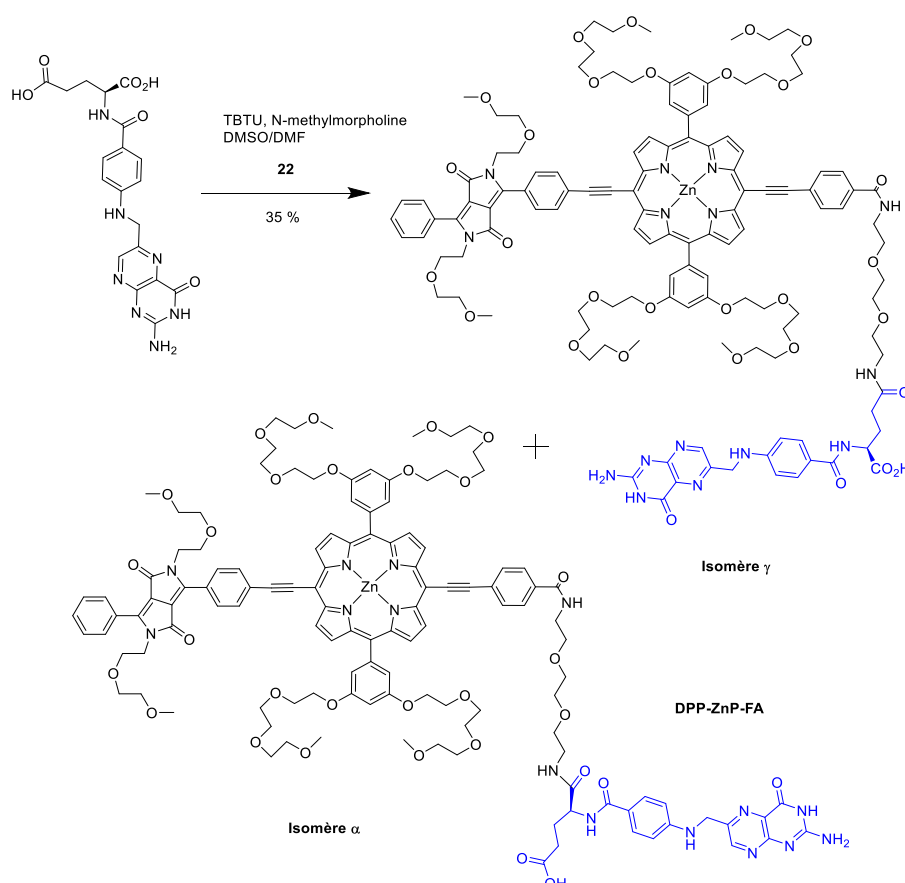


Figure 93. Réaction de formation de la liaison amide pour l'obtention de **DPP-ZnP-FA**, avec la présentation des deux isomères α et γ .

IV.2.3.b) Caractérisation de DPP-ZnP-FA

L'influence de la position de la liaison de l'acide folique sur un composé fait débat dans la communauté scientifique. Certains groupes ont observé une perte de sélectivité de l'acide folique vis-à-vis de son récepteur lorsqu'il est couplé en position α alors qu'elle est maintenue lorsque la position γ est utilisée.^{184,185} D'autres groupes, n'ont pas observé de différence sur l'affinité de l'acide folique envers son récepteur en fonction de la position α ou γ .¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Pour pallier à ce problème, Ametamey *et al.* réalisent en 2015 la synthèse multi-étapes de l'acide folique en protégeant sélectivement chaque fonction acide.¹⁸⁸ Ils ont ensuite lié ces dérivés à des radiotraceurs à base de ^{18}F . Des études d'affinités avec les radiotraceurs vectorisés ont été réalisés et ne montrent pas de différences d'affinité entre les deux isomères de position. Mais, de manière surprenante, les études sur souris ont montré que les radiotraceurs liés par la position α se sont légèrement plus accumulés dans les tumeurs que les radiotraceurs liés par la position γ .

Afin de garantir une pureté suffisante pour les tests biologiques et photophysiques et de déterminer le ratio entre les deux isomères de position, **DPP-ZnP-FA** a été purifié par HPLC préparative. Le chromatogramme du produit obtenu par HPLC analytique montre un temps de rétention de 31,4 min et une pureté supérieure à 95 % (Figure 94). Le pic correspondant au volume mort est intense, car le composé étant très insoluble, il a été nécessaire de faire l'injection au DMSO ce qui conduit à un entraînement d'une partie du produit. La chromatographie HPLC a été réalisée avec un grand nombre de solvants et de conditions d'élutions mais nous n'avons pas détecté deux isomères.

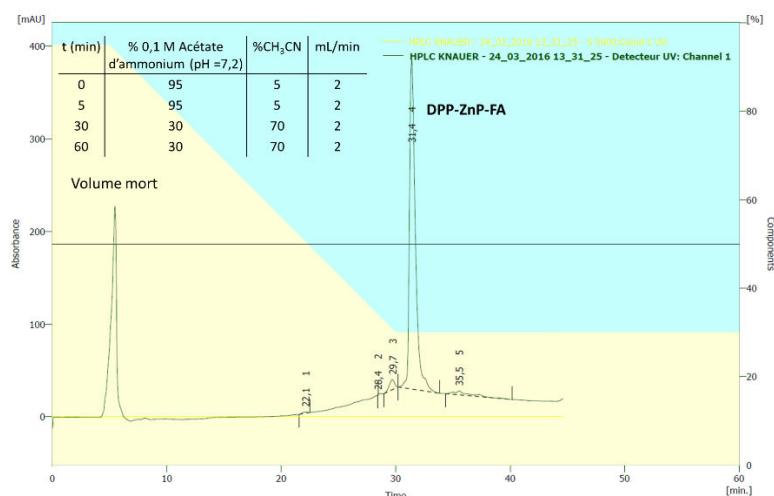


Figure 94. Chromatogramme de **DPP-ZnP-FA** et le gradient d'élution. Injection de **DPP-ZnP-FA** dans le DMSO.

Le spectre RMN ^1H **DPP-ZnP-FA** dans le $\text{DMSO-}d_6$ est montré Figure 95. À cause de la très faible solubilité de **DPP-ZnP-FA** à 10^{-3} M dans les solvants classiques l'analyse par RMN a été réalisée dans le DMSO. De plus, afin d'affiner les pics et d'augmenter la résolution la RMN a été réalisée à 80°C . On retrouve les pics caractéristiques du PS et de l'acide folique.

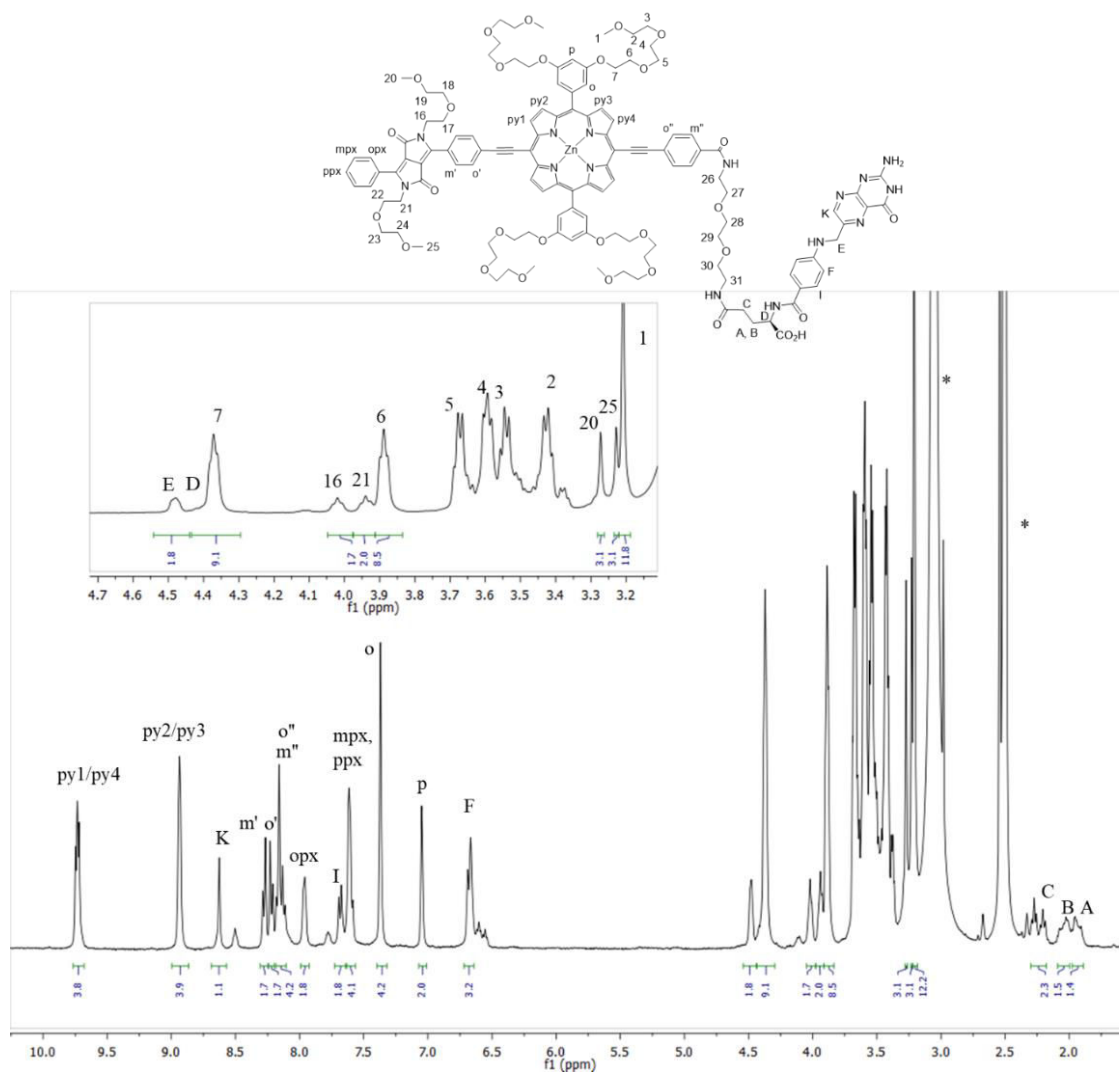


Figure 95. Spectre RMN ^1H de **DPP-ZnP-FA** (400 MHz, 350 K, $\text{DMSO-}d_6$).

Un spectre de masse haute résolution a été obtenu et confirme la formation de **DPP-ZnP-FA**. Le pic à $m/z = 1212,9477$ correspond à l'espèce ionisée $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^{2+}$ et le pic à $2396,9319$ à l'espèce $[\text{M}+\text{H}^+]$ (Figure 96). Les profils isotopiques expérimentaux de ces deux espèces ionisées sont en accord avec les profils isotopiques calculés.

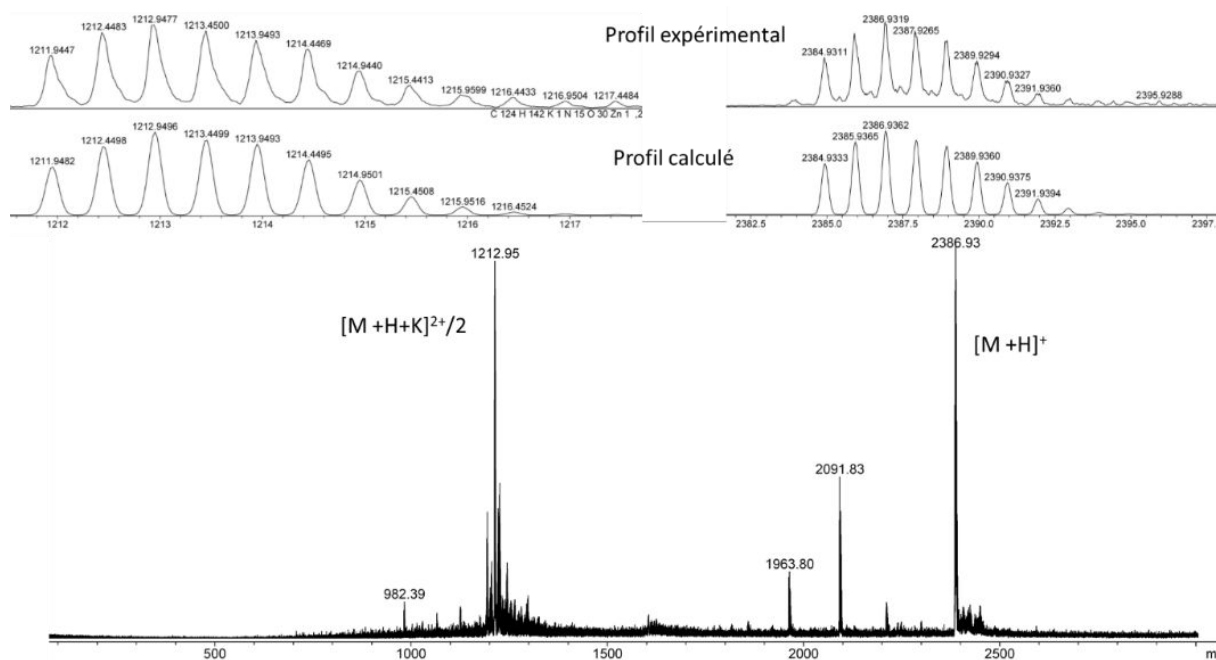


Figure 96. Spectre HR ESI-MS de **DPP-ZnP-FA** et profils isotopiques expérimentaux et calculés.

Pour conclure aucune de ces méthodes analytiques n'a permis de déterminer la présence des deux isomères de positions α et γ . On peut donc faire l'hypothèse que la méthode de synthèse qui conduit majoritairement à l'isomère γ d'après la littérature, a également conduit à l'isomère γ en grande majorité pour le PS **DPP-ZnP-FA**.

IV.2.4. Synthèse et caractérisation de **DPP-ZnP-Biotine**

IV.2.4.a) Synthèse de **DPP-ZnP-Biotine**

Le PS vectorisé **DPP-ZnP-Biotine** a été obtenu par formation de la liaison amide entre **DPP-ZnP-NH₂** et la biotine commerciale dans des conditions classiques en présence de TBTU et de base DIPEA pour activer l'acide carboxylique (Figure 97). Le composé **DPP-ZnP-NH₂**, dissout dans le DMF, est ajouté et le mélange réactionnel est agité à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Le produit est purifié par chromatographie flash sur colonne de silice puis par HPLC semi-préparative (C18) afin d'obtenir un solide brun avec un excellent rendement de 82 %.

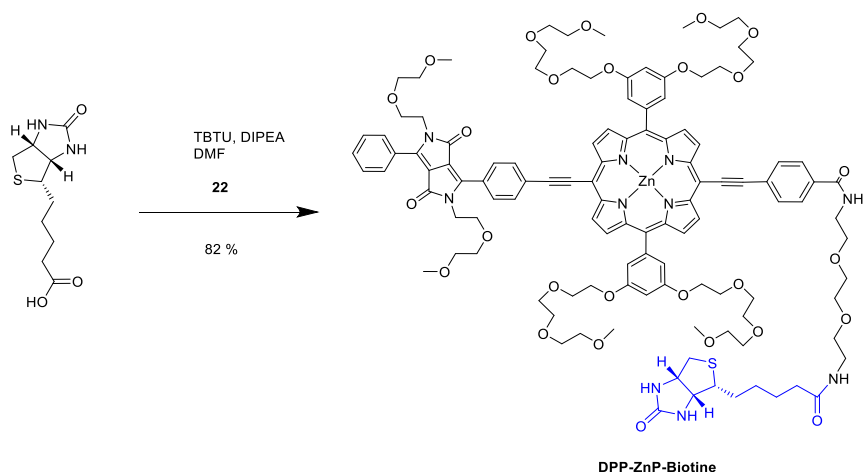


Figure 97. Réaction de formation de la liaison amide pour l'obtention de **DPP-ZnP-Biotine**.

Le composé **DPP-ZnP-biotine** a été caractérisé par RMN ^1H et ^{13}C , HR-MS et spectroscopie UV-vis. Le meilleur rendement pour le couplage de la biotine par rapport à l'acide folique permet d'obtenir **DPP-ZnP-Biotine** à l'échelle de 20 mg en partant de 20 mg de la porphyrine-espaceur **22**. La biotine ne possédant qu'une fonction acide réactive pour le couplage il n'y a pas de problème d'isomère pour ce composé. De plus, la solubilité de **DPP-ZnP-Biotine** dans les solvants organiques classiques permet des méthodes de purifications classiques.

IV.2.4.b) Caractérisation de **DPP-ZnP-Biotine**

Afin de garantir une pureté suffisante pour les tests biologiques et photophysiques **DPP-ZnP-Biotine** a aussi été purifié par HPLC semi-préparative. Le chromatogramme du produit obtenu par HPLC analytique montre un temps de rétention de 38 min et une pureté évaluée supérieure à 95 %.

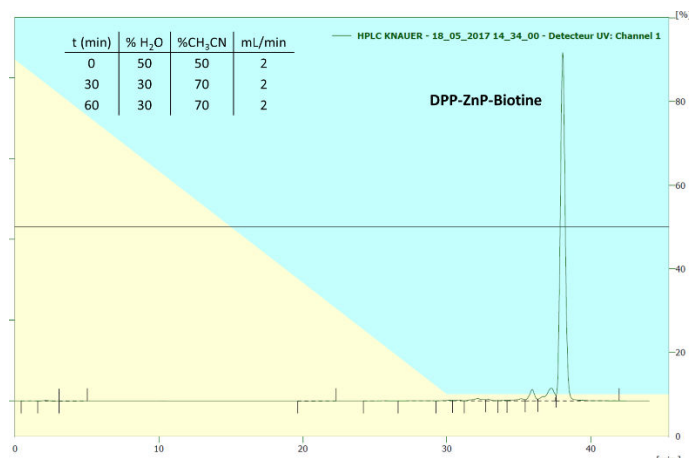


Figure 98. Chromatogramme HPLC de **DPP-ZnP-Biotine** et le gradient d'élution.

Le spectre RMN ^1H a été obtenu dans le DMSO- d_6 à 298 K (Figure 99). Bien que le composé soit soluble dans le chloroforme, les spectres RMN, obtenus avec ou sans ajout de pyridine, ne sont pas bien définis. Cela peut être expliqué par la formation d'agrégats entre les nombreux hétéroatomes de la biotine et le zinc de la porphyrine. Le DMSO permet de les supprimer et d'obtenir un spectre résolu. Les protons ont été attribués en utilisant les spectroscopies RMN 2D COSY et NOESY. La corrélation dans l'espace entre le proton porté par l'amide A et le proton B15 de la biotine confirme la formation de la liaison amide et la formation de **DPP-ZnP-Biotine** (Figure 100).

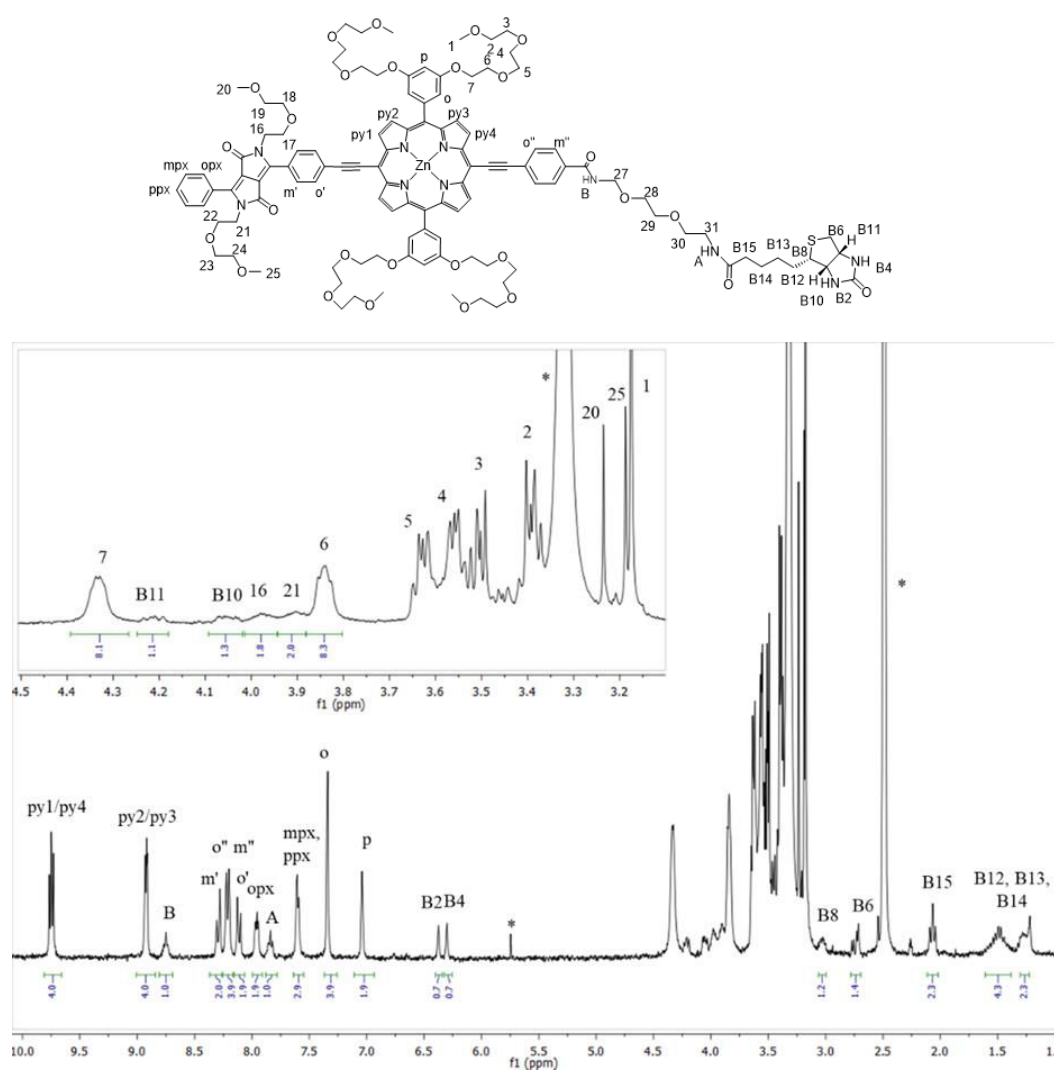


Figure 99. Spectre RMN ^1H (400 MHz, 298 K, DMSO) de **DPP-ZnP-Biotine**.

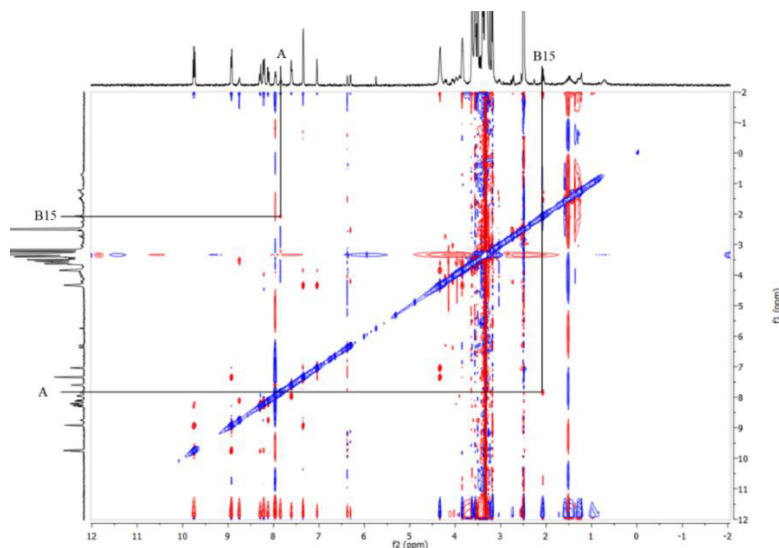


Figure 100. Spectre RMN NOESY de **DPP-ZnP-Biotine** (500 MHz, 298 K, DMSO).

Un spectre de masse haute résolution a été obtenu et confirme aussi la formation de **DPP-ZnP-Biotine**. Le pic à $m/z = 1106,4323$ correspond à l'espèce ionisée $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$ et le pic à $2211,8536$ à l'espèce $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Figure 101).

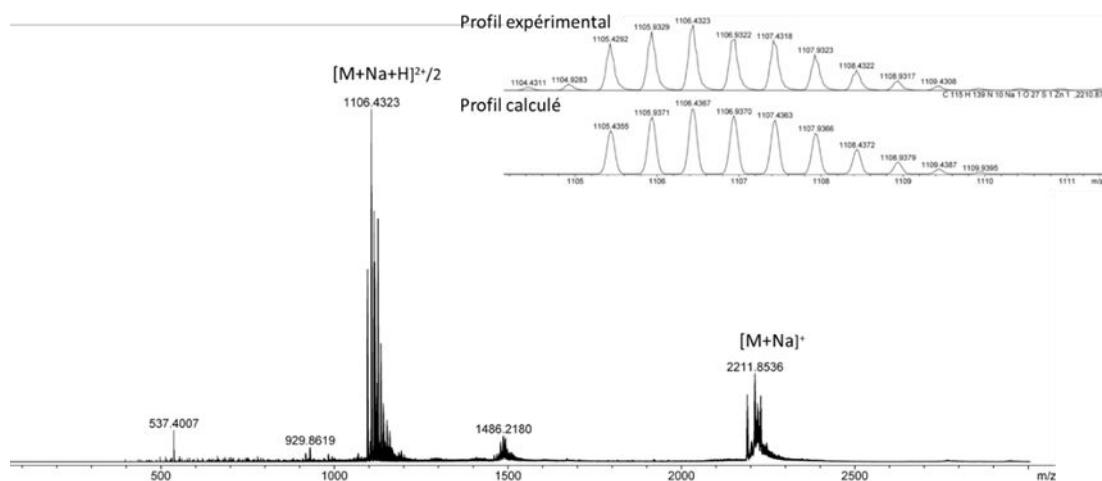


Figure 101. Spectre HR ESI-MS de **DPP-ZnP-Biotine** et profils isotopiques expérimental et calculé.

IV.3. Caractérisations photophysiques

IV.3.1. Absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption de **DPP-ZnP-FA**, **DPP-ZnP-Biotine** ont été obtenus dans le DMSO (Figure 102). Ils montrent un léger déplacement bathochrome d'environ 7 nm pour la bande Q de plus faible énergie par rapport à **DPP-ZnP**. Ce déplacement peut être expliqué par l'augmentation de la délocalisation des électrons apportée par le groupement phényle relié à l'alcyne. L'introduction des vecteurs, acide folique ou biotine, ne modifie pas énormément le spectre d'absorption du PS. De plus, les coefficients d'extinction molaires restent élevés et sont d'environ 60000 mM.cm⁻¹ à 670 nm.

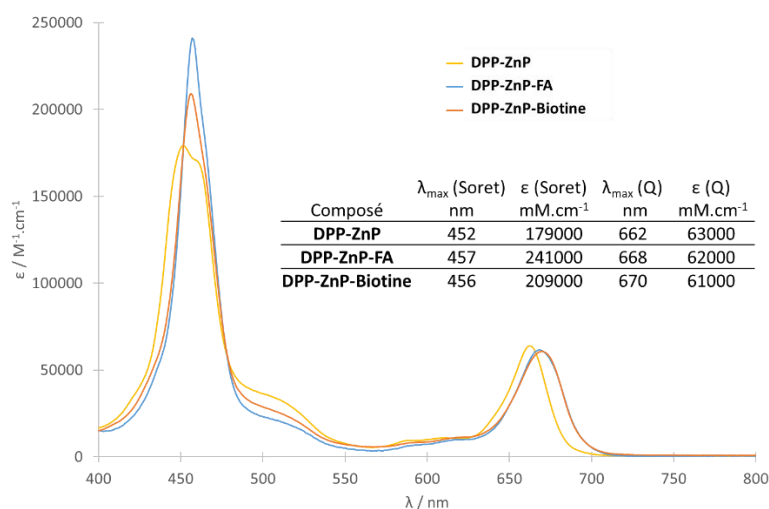


Figure 102. Absorption UV-Vis de **DPP-ZnP-FA**, **DPP-ZnP-Biotine**, et **DPP-ZnP** dans le DMSO.

IV.3.2. Mesures de luminescence

Comme pour les composés thérapeutiques présentés dans le chapitre II, les mesures de luminescence ont été réalisées par Barbara Ventura.

Les spectres d'émission de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-biotine** ont été réalisés dans le DMSO et H₂O/1 % DMSO (Figure 103). **DPP-ZnP-Biotine** étant soluble dans le DCM, le spectre d'émission a également pu être réalisé dans ce solvant.

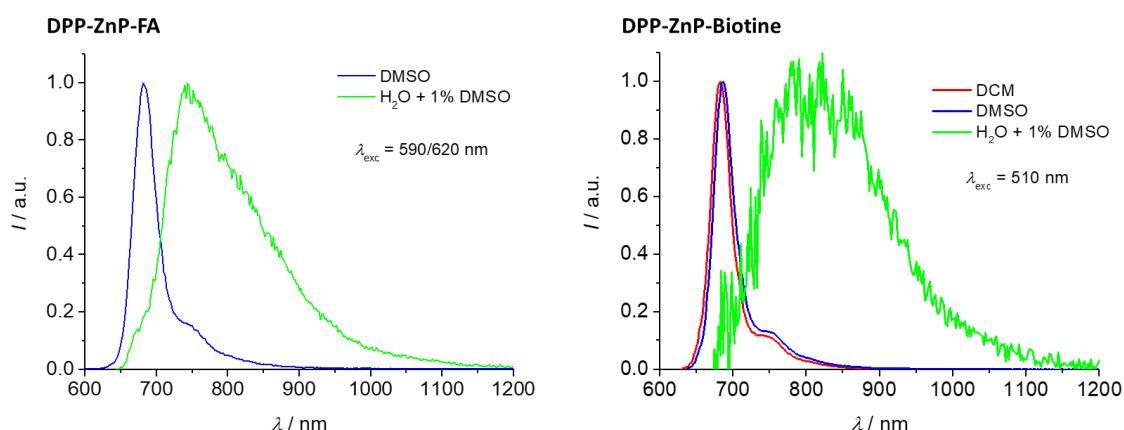


Figure 103. Spectres d'émission de **DPP-ZnP-FA** dans le DMSO et H₂O/1 % DMSO et de **DPP-ZnP-Biotine** dans le DCM, le DMSO et H₂O/1 % DMSO.

Les données de luminescence de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** sont résumées dans la Figure 104.

	Solvants	λ_{em} / nm	ϕ_{fl}	τ / ns
DPP-ZnP	DMSO	672, 734	0,15	1,00
	H ₂ O/1 % DMSO	684, 750 sh	$4,2 \times 10^{-3}$	< 0,05
	DCM	658, 724	0,15	1,06
DPP-ZnP-FA	DMSO	682, 748 sh	0,14	0,94
	H ₂ O/1 % DMSO	744	$6,0 \times 10^{-3}$	0,62 (75 %); 1,94 (25 %)
DPP-ZnP-Biotine	DMSO	686, 754 sh	0,14	0,96
	H ₂ O/1 % DMSO	778	$3,1 \times 10^{-3}$	0,62 (75 %); 1,94 (25 %)
	DCM	682, 748 sh	0,14	0,92

Figure 104. Données de luminescence de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**.

Les spectres d'émission dans les solvants organiques de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** ont une allure similaire à celle de **DPP-ZnP**. On observe néanmoins un déplacement bathochrome d'environ 10 nm de l'émission entre **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** en accord avec le déplacement bathochrome de la bande Q des spectres d'absorptions UV-Visible. Les rendements de fluorescence dans les solvants organiques pour les deux nouveaux composés sont de 0,14, valeurs quasi identiques à celle du composé de référence **DPP-ZnP**. Les rendements de fluorescence chutent en milieu aqueux avec des valeurs de rendements quantiques quasi nulles dans H₂O/1 % DMSO. La durée de vie de fluorescence de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** est inférieure à 1 ns et les courbes de luminescence montrent une décroissance biexponentielle suggérant l'agrégation de ces composés dans ce solvant, agrégation qui explique le faible rendement de fluorescence.

IV.3.3. Rendement quantique de formation d'oxygène singulet

La détermination des rendements quantiques de formation d'oxygène singulet a été réalisée par la même méthode indirecte que celle décrite dans le paragraphe II.4.3. Elle consiste à mesurer la variation de l'absorbance du DPBF dans le DMSO en fonction du temps d'irradiation de **DPP-ZnP-FA** ou de **DPP-ZnP-Biotine** (Figure 105).

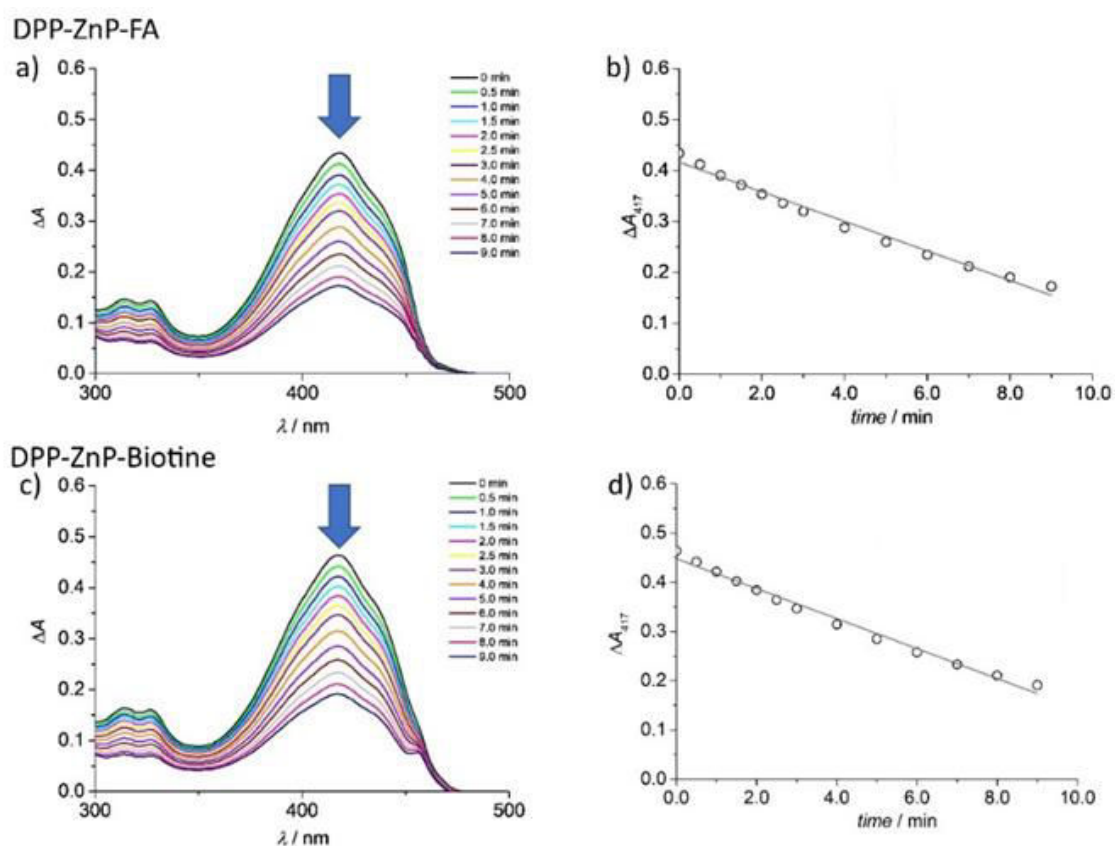


Figure 105. Diminution de l'absorbance du DPBF en fonction de la durée d'irradiation pour **DPP-ZnP-FA** (a et b) et **DPP-ZnP-Biotine** (c et d).

Pour le composé **DPP-ZnP-Biotine**, soluble dans le DCM, une mesure directe a été possible. La luminescence de l'oxygène singulet produit par **DPP-ZnP-Biotine** a été mesurée et comparée à celle produite par le Rose Bengal (Figure 106).

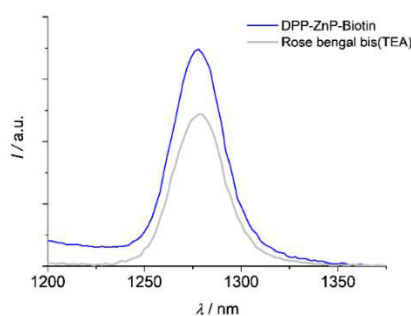


Figure 106. Luminescence de l'oxygène singulet produit dans le DCM suite à l'excitation du PS **DPP-ZnP-Biotine** et la référence, le Rose Bengal.

Les rendements quantiques de formation d'oxygène singulet sont présentés dans la Figure 107. On observe qu'en fonction du solvant utilisé, les rendements quantiques de formation d'oxygène singulet sont identiques ou légèrement supérieurs à ceux du composé de référence **DPP-ZnP**. L'introduction des vecteurs sur le PS n'affecte donc pas la capacité du PS à générer de l'oxygène singulet.

Produit	Solvant	φ_{Δ}
DPP-ZnP	DCM	0,58
	DMSO	0,54
DPP-ZnP-FA	DMSO	0,69
DPP-ZnP-Biotine	DCM	0,58
	DMSO	0,70

Figure 107. Rendement quantique de formation d'oxygène singulet de **DPP-ZnP**, **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**.

IV.3.4. Spectres d'excitation biphotonique

Les spectres d'excitation biphotonique dans le DMSO ont été réalisés par la méthode TPEF (Figure 108).

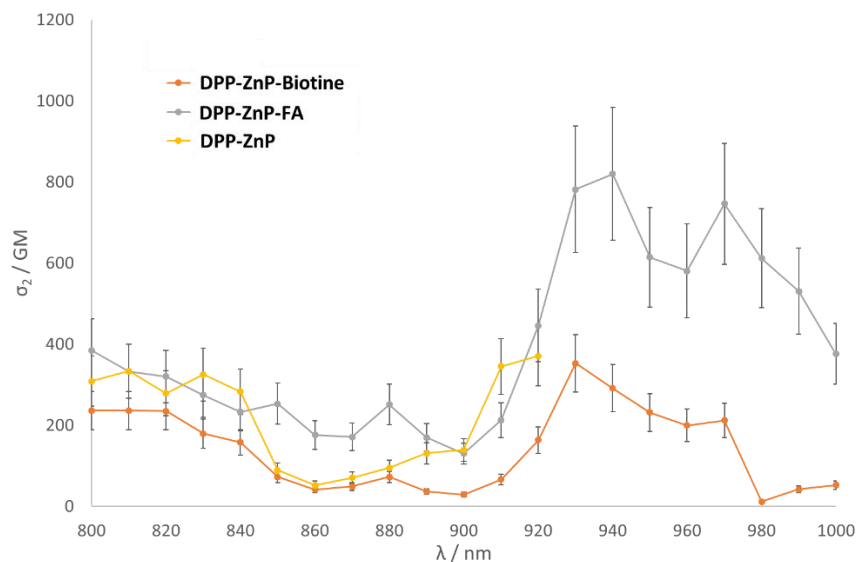


Figure 108. Spectres d'excitation biphotonique de **DPP-ZnP-FA**, **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP** dans le DMSO.

Les spectres d'excitation biphotonique des deux PS vectorisés présentent deux bandes d'absorption similaires à celles du composé **DPP-ZnP**. La première se situe entre 800 et 850 nm et la seconde entre 910 et 960 nm. La seconde bande d'absorption montre un déplacement bathochrome de 10 nm entre le précurseur **DPP-ZnP** et les PSs vectorisés pouvant être expliqué par une augmentation de la conjugaison introduite par l'espaceur. Les valeurs maximales de section efficace d'absorption biphotonique se situent entre 930 et 940 nm pour **DPP-ZnP-FA** (800 GM à 930 nm) et **DPP-ZnP-Biotine** (400 GM à 930 nm). De manière surprenante, on observe que les valeurs de section efficace d'absorption biphotonique de **DPP-ZnP-Biotine** entre 920 et 970 nm sont environ deux fois moins élevées que celles de **DPP-ZnP-FA**. En effet, les autres propriétés photophysiques (rendement quantique de fluorescence, absorbance...) sont très proches pour ces deux composés. Les bonnes sections efficaces d'absorption biphotonique de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** permettent d'envisager ces PSs vectorisés pour la PDT par excitation biphotonique.

IV.3.5. Récapitulatif des mesures photophysiques

Les mesures photophysiques permettant d'évaluer l'aptitude des PS pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique sont montrées dans la Figure 109. Les bonnes valeurs de section efficace d'absorption biphotonique à 930 nm ainsi que les excellents rendements de formation d'oxygène singulet font des composés **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** de bons candidats pour la PDT par excitation biphotonique. De plus, la forte absorption vers 670 nm fait de ces composés des candidats potentiels pour la PDT par excitation monophotonique.

	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{mM.cm}^{-1}$)	ϕ_{fl}	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ (σ_2 / GM)	ϕ_{Δ}
DPP-ZnP	640 (63000)	0,15	920 (370)	0,54
DPP-ZnP-FA	668 (62000)	0,14	940 (820)	0,69
DPP-ZnP-Biotine	670 (61000)	0,14	930 (350)	0,70

Figure 109. Récapitulatif des mesures photophysiques pour la PDT dans le DMSO.

IV.4. Tests cellulaires

Les études cellulaires ont été réalisées sur des cellules HeLa connues pour surexprimer les récepteurs de la biotine¹⁵⁴ et de l'acide folique.¹⁸⁹

IV.4.1. Cytotoxicité

La détermination de la cytotoxicité de **DPP-ZnP-FA** (Figure 110) et **DPP-ZnP-Biotine** (Figure 111) a été effectuée pour des cellules HeLa après 24 h d'incubation par le test MTT. Les IC_{50} obtenus sont de 11 μM et 7 μM pour **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** respectivement. Le PS relié à la biotine est plus toxique en l'absence de lumière envers les cellules HeLa que celui relié à l'acide folique.

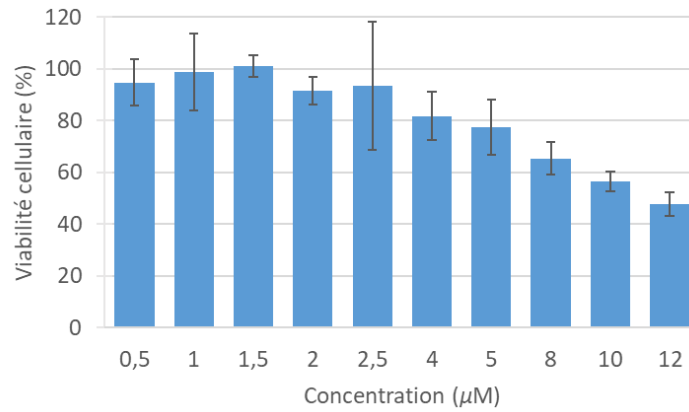


Figure 110. Cytotoxicité induite par **DPP-ZnP-FA** après 24 h d'incubation
($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans le DMSO).

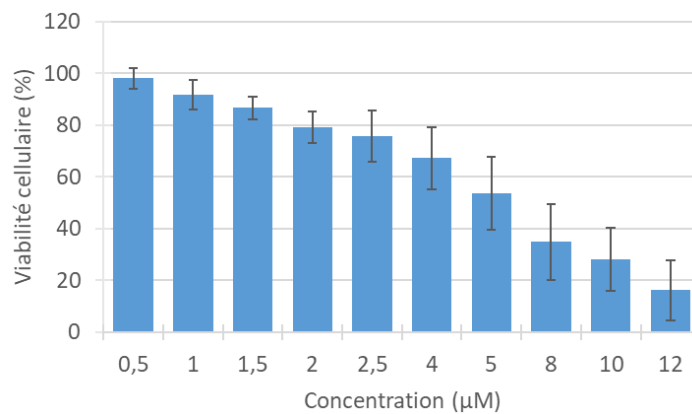


Figure 111. Cytotoxicité induite par **DPP-ZnP-Biotine** après 24 h d'incubation
($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans le DMSO).

IV.4.2. Internalisation cellulaire

Les cellules HeLa surexprimant les récepteurs de l'acide folique et de la biotine, des études d'internalisation compétitive, en présence du ligand naturel du récepteur, ont été réalisées. Le but a été de déterminer si les PS **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP-FA** sont internalisés dans les cellules par le récepteur. Les cellules HeLa ont été incubées avec **DPP-ZnP-NHBoc**, **DPP-ZnP-Biotine** ou **DPP-ZnP-FA** (1 µM) en présence ou non d'un excès d'acide folique (4 mM) ou de biotine (1 mM) pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, décrochées avec de la trypsine, comptées avec une cellule de Malassez et centrifugées. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est lyophilisé avant d'être redissout dans du DMSO. L'intensité de fluorescence est mesurée et rationalisée avec le nombre de cellules (Figure 112).

Le composé **DPP-ZnP-NHBoc 21**, qui n'est pas relié à un vecteur, s'internalise faiblement dans les cellules HeLa en présence ou non d'un excès d'acide folique. En revanche, Le PS vectorisé **DPP-ZnP-FA** est internalisé 3 fois plus lorsqu'il n'y a pas un excès d'acide folique dans le milieu de culture indiquant une internalisation spécifique via le récepteur de l'acide folique. Le composé **DPP-ZnP-Biotine** s'internalise légèrement plus que le PS non vectorisé, mais ne s'internalise pas plus en présence ou non d'un excès de biotine. Ce résultat indique que pour cette lignée cellulaire, **DPP-ZnP-Biotine** ne semble pas être internalisé via le récepteur de la biotine.

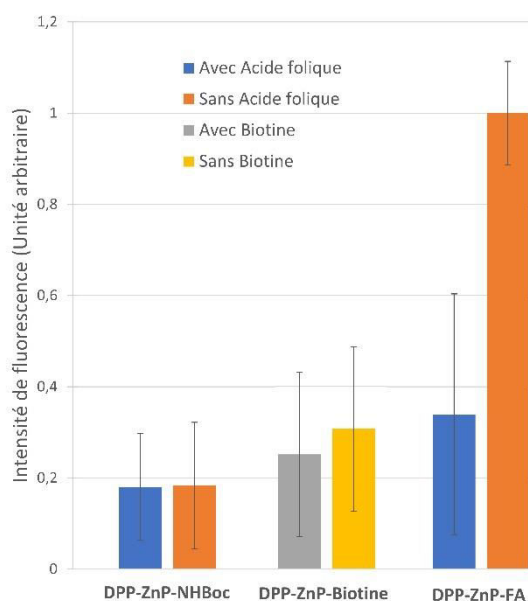


Figure 112. Concentration intracellulaire en PS dans des cellules HeLa incubés avec **DPP-ZnP-NHBoc**, **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP-FA** à une concentration de 1 μ M en présence ou non de biotine (1 mM) ou d'acide folique (4 mM).

IV.4.1. Phototoxicité par excitation monophotonique

Dans le but de déterminer la capacité de ces composés à induire une toxicité suite à une irradiation lumineuse envers des cellules HeLa, une étude de phototoxicité a été réalisée avec des DELs émettant à 660 nm (voir annexe). Les phototoxicités de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** ont été comparées à celle du précurseur **DPP-ZnP-NHBoc**. Les cellules ont été incubées avec les composés pendant 24 h puis irradiées pendant 15 ou 30 min à 36 mW/cm², une irradiance correspondant à des doses lumineuses de 32 ou 65 J/cm² respectivement. La détermination de la viabilité cellulaire a été effectuée par le test MTT 20 h après irradiation (Figure 113).

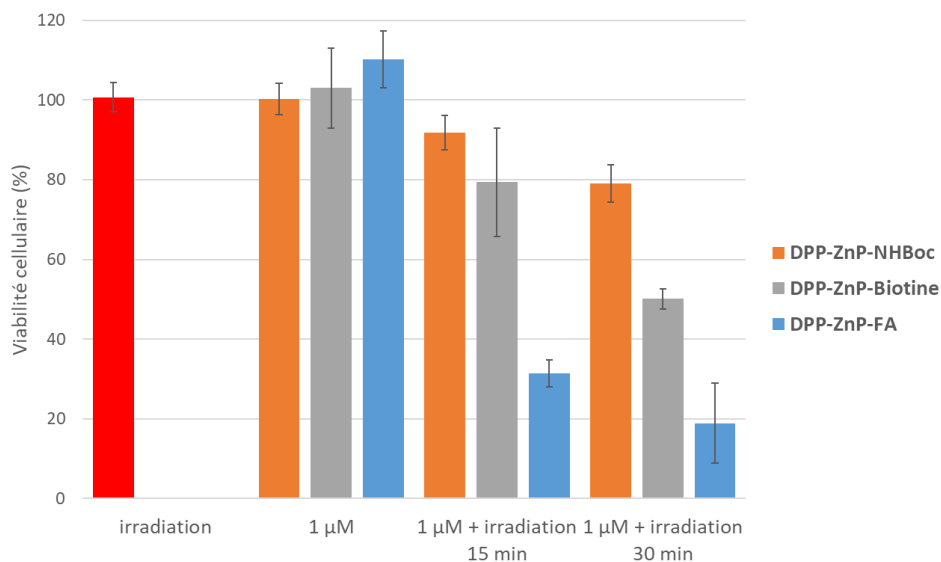


Figure 113. Phototoxicité induite par irradiation monophotonique de **DPP-ZnP-NHBoc**, **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP-FA** à 660 nm et 36 mW/cm² ($C_{\text{mère}} = 10^{-3}$ M dans le DMSO).

La Figure 113 montre que l'irradiation seule, ou la présence des PS (à une concentration d'incubation de 1 μM) n'induit aucune mort cellulaire. Alors qu'une toxicité importante est observée en présence à la fois du PS vectorisé et de l'irradiation à 660 nm. Les deux PS vectorisés induisent une toxicité beaucoup plus importante que le PS non vectorisé **DPP-ZnP-NHBoc**. De plus, pour le PS vectorisé avec l'acide folique le pourcentage de mort cellulaire est de 70 % après 15 min d'irradiation à 36 mW/cm². Les doses de lumière induisant 50% de mort cellulaire (LD₅₀) de **DPP-ZnP-NHBoc**, **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP-FA** ont été estimées à 152 J/cm², 66 J/cm² et 25 J/cm² respectivement pour des concentrations d'incubation de 1 μM. Ces résultats sont cohérents avec l'internalisation cellulaire qui montre que le PS vectorisé avec l'acide folique est plus internalisé que celui vectorisé avec la biotine.

IV.4.2. Phototoxicité par excitation biphotonique

Pour pouvoir déterminer la capacité de ces composés à induire une toxicité suite à une irradiation biphotonique, les cellules HeLa ont été irradiées en utilisant le même protocole que celui décrit au chapitre III.2.2.e), mais en utilisant une longueur d'onde de 920 nm.

Dans un premier temps, les cellules HeLa ont été incubées avec **DPP-ZnP-FA** pendant 24 h puis irradiées avec une puissance d'irradiation mesurée en bleachpoint de 12 mW. La modification de la morphologie cellulaire a été observée (Figure 114) 10 min après l'irradiation. On

remarque que 10 min après irradiation à une faible puissance, 5 cellules (flèches rouges) sont en train de rétrécir ce qui est un indicateur de la mort cellulaire. Les cellules HeLa irradiées dans les mêmes conditions, mais sans incubation avec le PS n'ont montré aucun signe de modification de la morphologie cellulaire.

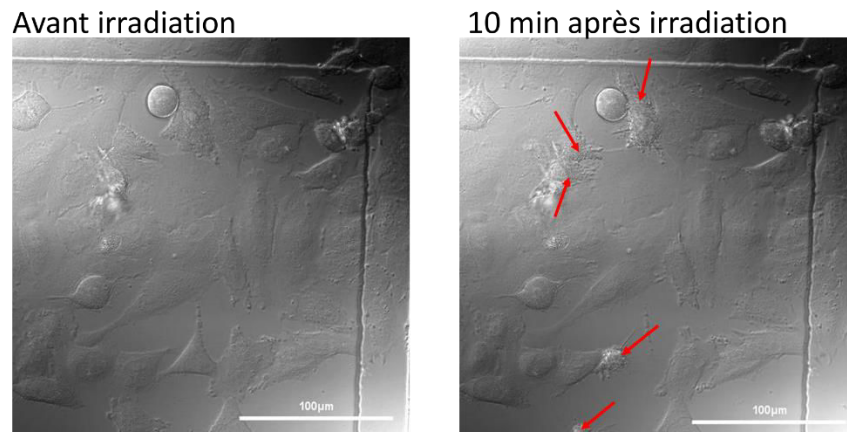


Figure 114. Image en microscopie DIC de cellules HeLa incubées avec **DPP-ZnP-FA** avant et après irradiation pendant 3 min (300 scans) à 920 nm (12 mW).

3 h 30 après irradiation les marqueurs fluorescents Hoescht et Sytox orange ont été incubés pendant 30 min avant de prendre des images au microscope confocal (Figure 115). Dans la zone irradiée on compte 20 cellules vivantes 4 h après l'irradiation ce qui conduit à une phototoxicité d'environ 50 % suite à une excitation biphotonique à 920 nm. Ce résultat préliminaire est encourageant, car il a été obtenu à une très faible puissance d'irradiation de 12 mW en bleachpoint. Des études de phototoxicité par excitation biphotonique complémentaires sont en cours de réalisation en faisant varier la puissance d'irradiation. Des études de phototoxicité par excitation biphotonique seront également réalisées avec le PS vectorisé **DPP-ZnP-Biotine**.

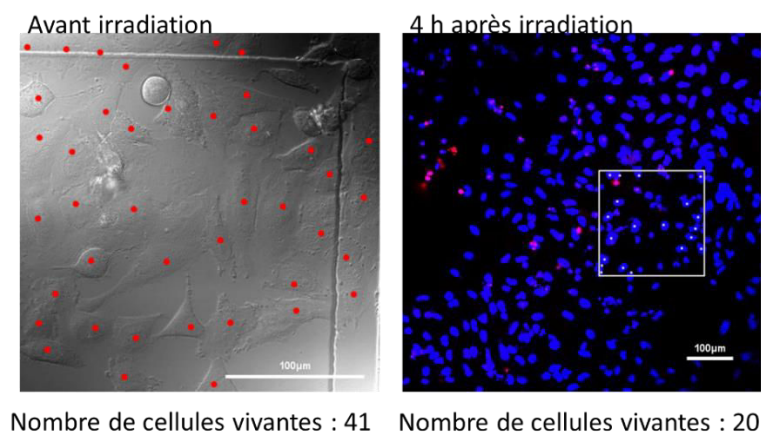


Figure 115. Image en microscopie DIC (avant irradiation) et confocales (4 h après irradiation) de cellules HeLa incubées avec **DPP-ZnP-FA** après irradiation pendant 3 min (300 scans) à 920 nm (12 mW). En bleu fluorescence du marqueur Hoescht et en rouge fluorescence du marqueur Sytox orange.

IV.5. Conclusion

Les principales caractéristiques des deux PSs vectorisés, **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine**, permettant d'évaluer leur efficacité pour la PDT par excitation mono- et biphotonique sont présentées Figure 116.

	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M.cm}^{-1}$)	ϕ_{fl}	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ (σ_2 / GM)	ϕ_{Δ}	$\text{IC}_{50} / \mu\text{M}$	$\text{LD}_{50} / \text{J/cm}^2$ ($1 \mu\text{M}$)
DPP-ZnP-FA	668 (39000)	0,14	930 (820)	0,69	11	25
DPP-ZnP-Biotine	670 (61000)	0,14	930 (350)	0,70	7	66

Figure 116. Principales caractéristiques photophysiques et cellulaires de **DPP-ZnP-FA** en tant que PS.

Une voie de synthèse modulaire a été développée pour synthétiser deux PSs vectorisés. La dernière étape est la formation de la liaison amide entre le PS et le vecteur. Cette stratégie permet d'envisager la conjugaison d'un grand nombre de vecteurs à ce PS. **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** ont été purifiés par HPLC afin de les obtenir avec des puretés supérieures à 95 %.

Les valeurs élevées de coefficient d'extinction molaire proches de la fenêtre thérapeutique optique (660 nm), les sections efficaces d'absorption biphotonique correctes ainsi que les bons rendements quantiques de formation d'oxygène singulet permettent de considérer **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** comme des candidats intéressants pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique.

Les phototoxicités de **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** envers des cellules HeLa suite à une irradiation à 660 nm sont plus élevées que pour le PS non vectorisé. Des études d'internalisation compétitives pour **DPP-ZnP-FA** dans des cellules HeLa ont montré que ce composé était internalisé via le récepteur de l'acide folique montrant sa sélectivité envers les cellules cancéreuses. De plus, une phototoxicité a pu être induite avec le composé **DPP-ZnP-FA** suite à une irradiation biphotonique à 920 nm et à faible puissance (12 mW) ce qui permet d'envisager ce PS vectorisé pour la PDT par excitation biphotonique. Les études de phototoxicité par excitation biphotonique sont en cours pour le composé **DPP-ZnP-Biotine**.

Chapitre V: Cubosomes pour la PDT mono- et bi-photonique

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Claudia Caltagirone (Université de Cagliari, Sardaigne). Les synthèses des PSs ainsi que les tests cellulaires ont été réalisés à Strasbourg. La synthèse des cubosomes et des vésicules ainsi que leurs caractérisations ont été réalisées par l'équipe de Claudia Caltagirone.

Ce chapitre de thèse décrit la synthèse de trois PSs qui ont été incorporés ou reliés aux surfactants des cubosomes. Enfin, les études cellulaires des cubosomes et des vésicules pour la PDT seront présentées.

V.1. Introduction

Un grand nombre de nanomatériaux ont été utilisés pour améliorer la solubilité et la livraison des PS dans les tumeurs. On peut séparer ces nanomatériaux en deux familles : les nanomatériaux organiques et les matériaux inorganiques.¹⁹⁰ Parmi les nanomatériaux organiques pour la PDT on peut citer les liposomes,¹⁹¹ les nanoparticules à base de polymères¹⁹² et les nanomatériaux à base de carbones incluant les fullerènes, les nanotubes de carbones et le graphène.¹⁹³ Pour les nanomatériaux inorganiques on peut citer les nanoparticules à base d'or,¹⁹⁴ à base de silice¹⁹⁵ ou encore les quantum dots.¹⁹⁶

La structure amphiphile des lipides polaires, comme la monooléine, conduit à des autoassemblages comme des micelles, des vésicules, des hexosomes ou des cubosomes. Les cubosomes possèdent une structure nommée phase inverse bicontinue cubique.^{197,198} L'utilisation de surfactant comme le PF-108 permet de formuler les cubosomes pour former des dispersions de nanoparticules stables dans l'eau (Figure 117).^{199,200} L'utilisation de surfactants est essentiel pour la structure des cubosomes afin d'empêcher la coalescence. Grâce à leur structure, ils peuvent incorporer des composés hydrophile, lipophile ou amphiphile. Un des plus grands avantages des cubosomes par rapport aux vésicules est le grand volume hydrophobe qui leurs permet d'incorporer une plus grande quantité de

composés, comme des anticancéreux ou des sondes d'imagerie. Ainsi, des cubosomes ont été utilisés pour délivrer des anticancéreux comme le Docetaxel¹⁹⁸ ou encore des peptides.²⁰¹ Bien que les cubosomes s'accumulent dans les tumeurs par l'effet EPR, des cubosomes portant la biotine²⁰² ou l'acide folique²⁰³ ont été réalisés afin d'apporter une vectorisation active et d'augmenter l'internalisation cellulaire. Néanmoins, Il n'existe pas à ma connaissance d'exemple de cubosomes incorporant des PSs pour la PDT.

L'incorporation de PS dans les cubosomes va permettre, d'obtenir une formulation soluble dans l'eau ce qui va permettre d'augmenter leur biodistribution. De plus, la taille des cubosomes permettra la vectorisation par effet EPR.

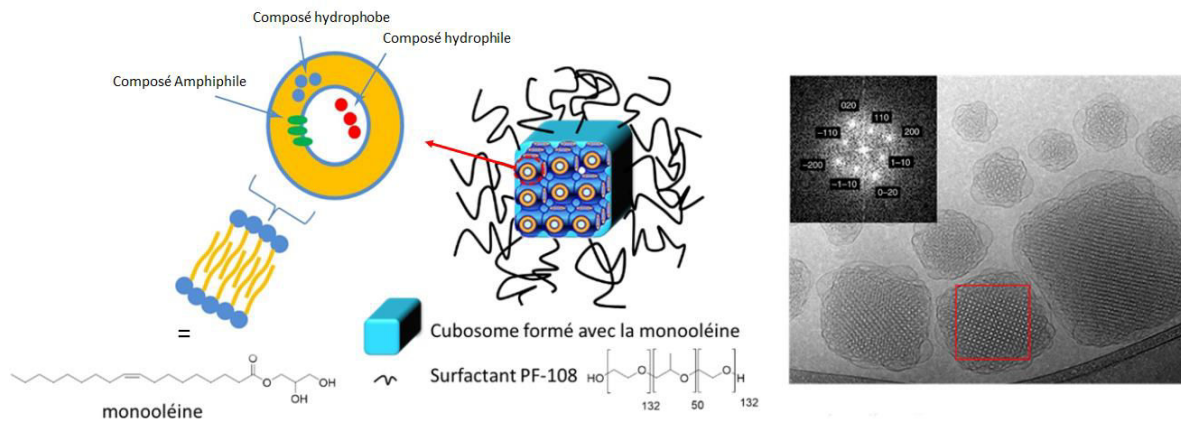


Figure 117. A gauche : schéma représentant un cubosome, l'incorporation des composés et la structure de la monooléine et du surfactant PF-108. A droite : image cryo-TEM d'une dispersion de cubosomes. Image issue du journal.¹⁹⁹

V.1.1. Cubosomes incorporant le composé YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA

Note : Les concentrations en vésicules ou cubosomes utilisées pour les études biologiques sont données en fonction de la dilution de la solution mère. Par exemple, une concentration C100 signifie que la solution mère a été diluée 100 fois.

Nous avons dans un premier temps voulu voir si un PS anionique et amphiphile pouvait être incorporé dans les cubosomes. Ainsi, les premiers essais d'incorporation ont été effectués

avec un PS disponible au laboratoire **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA**, le composé diamagnétique analogue à **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** présenté en III.2 (Figure 118).

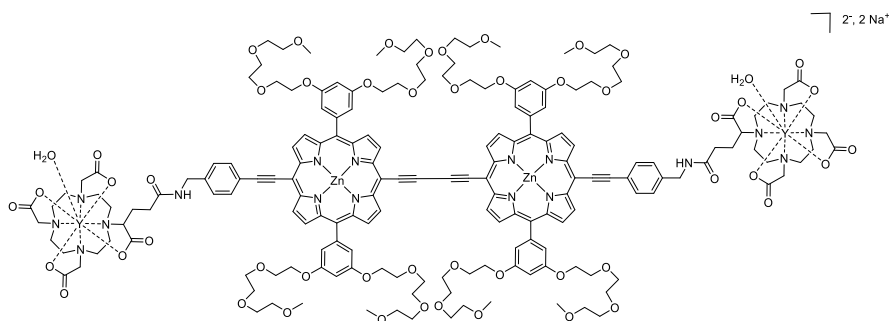


Figure 118. Structure du PS **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA**.

Brièvement, les cubosomes sont obtenus en réalisant une dispersion de **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA** dans la monooléine puis le surfactant (PF-108) est ajouté avant sonication du mélange. Afin d'obtenir des cubosomes, il est important d'avoir un ratio précis entre l'eau, la monooléine et le surfactant PF-108. L'obtention de cubosomes a été confirmée par des analyses SAXS (Small-Angle X-ray Scattering). La concentration en PS dans la solution obtenue de cubosomes incorporant ce PS est de $53 \mu\text{M}$ et a été déterminée par spectroscopie UV-visible (Figure 119).

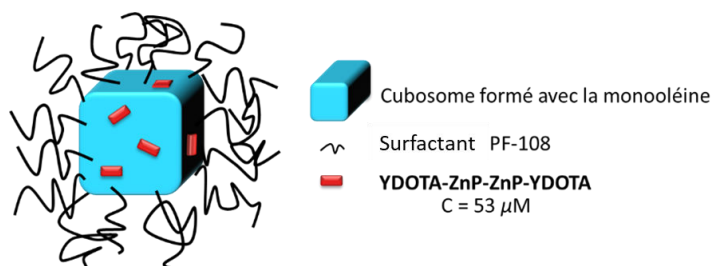


Figure 119. Schéma des cubosomes incorporant le PS **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA** et sa concentration.

Les tests de cytotoxicité dans le noir ont été effectués sur des cellules HeLa incubées pendant 24 h avant évaluation de leur viabilité. La quantité de cubosomes incubés varie de C10000 à C100 correspondant à des concentrations en PS allant de $0,0053$ à $0,53 \mu\text{M}$ (Figure 120).

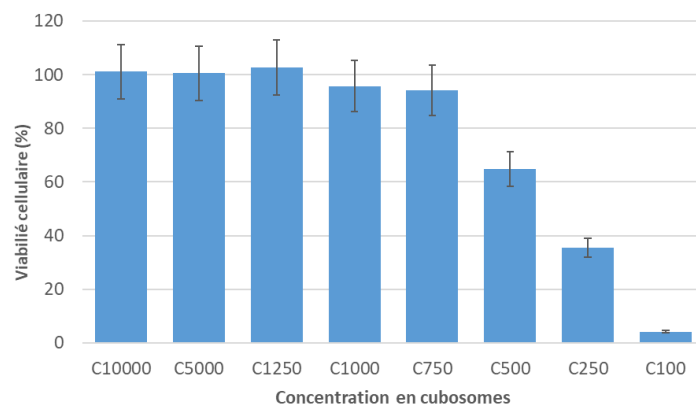


Figure 120. Cytotoxicité induite sur des cellules HeLa en fonction de la concentration d'incubation en cubosomes après 24 h d'incubation.

L'IC₅₀ se situe entre C500 et C250 correspondant à une concentration en PS entre 0,11 μM et 0,21 μM . La cytotoxicité semble être induite par les cubosomes, car **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**, le composé analogue à **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA** n'est pas cytotoxique lorsqu'il est incubé seul à ces concentrations (Figure 81). Cette étude nous montre que la phototoxicité peut être évaluée pour une concentration inférieure à C500.

Les tests de phototoxicités par excitation monophotonique ont ensuite été réalisés. Les cellules ont été incubées à C750 (0,07 μM en PS) pendant 1 h, 3 h, 6 h et 24 h avant d'être irradiées avec des DELs à 740 nm et 23 mW/cm^2 pour une durée de 30 min. La viabilité cellulaire a été déterminée 24 h après irradiation par un test au MTT (Figure 121).

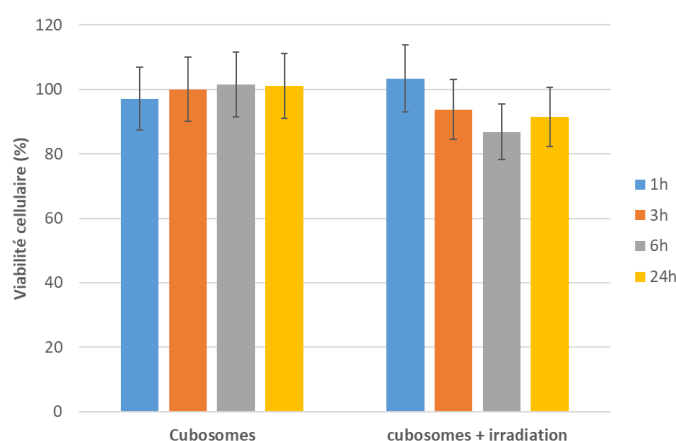


Figure 121. Phototoxicité induite par irradiation monophotonique de cellules HeLa incubées à C750 avec les cubosomes incorporant **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA**. L'irradiation a été réalisée à 740 nm et 23 mW/cm^2 pendant 30 min. Test de viabilité au MTT réalisé 24 h après irradiation.

Aucune phototoxicité n'est détectée après 30 min d'irradiation, lorsque les cellules ont été incubées durant 1 h. Suite à 3 h, 6 h ou 24 h la phototoxicité après 30 min d'irradiation est très faible et n'est pas statistiquement différente. Nous avons donc décidé d'augmenter la concentration en cubosomes (C500 et C250 correspondant respectivement à 0,11 μM et 0,21 μM en PS) et de diminuer le temps d'incubation à 3 h (Figure 122). En effet, à ces concentrations les cubosomes sont toxiques pour les cellules seulement après 24 h d'incubation. La diminution du temps d'incubation devrait diminuer leur toxicité et permet d'augmenter la concentration d'incubation.

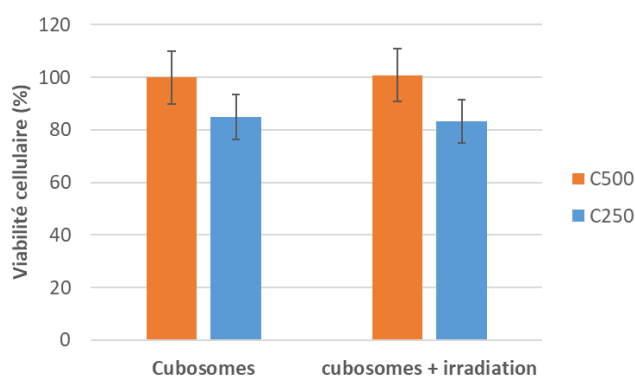


Figure 122. Phototoxicité induite par irradiation monophotonique à 740 nm et 23 mW/cm² pendant 30 min. Test de viabilité au MTT 24 h après irradiation.

On note une cytotoxicité après 3 h d'incubation des cubosomes à une concentration de C250. Néanmoins comme précédemment, aucune phototoxicité n'est détectée, mais les cubosomes induisent une toxicité pour une concentration de C250. La quantité de PS par cubosomes semble être trop faible (0,11 μM pour C500) pour pouvoir obtenir une phototoxicité. Il est possible que la faible quantité de PS incorporée dans un cubosome, soit due à la nature amphiphile du PS ou à la présence des complexes d'yttrium très hydrophiles. Nous nous sommes alors tournés vers un autre PS plus hydrophobe.

V.1.2. Cubosomes incorporant TIPS-ZnP-ZnP-TIPS

Notre choix c'est porté vers le composé **TIPS-ZnP-ZnP-TIPS**, car ce PS a déjà été décrit au laboratoire et possède des propriétés photophysiques et photochimiques intéressantes pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique (Figure 124).²⁰⁴ Ce composé possède un coefficient d'absorption molaire très élevé de 158 000 M⁻¹cm⁻¹ à 734 nm dans le DMSO et une

section efficace d'absorption molaire élevée de 3375 GM à 910 nm dans le DMSO. Ces propriétés d'absorption ainsi que le bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet de 0,38 dans le DMSO font de ce composé un PS intéressant pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique (Figure 123). De plus l'absence des deux complexes rend ce composé plus hydrophobe que le PS **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA** ce qui devrait favoriser son incorporation dans les cubosomes et donc augmenter la concentration en PS par cubosome.

	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M.cm}^{-1}$)	ϕ_{fl}	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$ (σ_2 / GM)	ϕ_{Δ}
TIPS-ZnP-ZnP-TIPS	734 (158000)	0,21	910 (3375)	0,38

Figure 123. Principales propriétés photophysiques du PS **TIPS-ZnP-ZnP-TIPS** dans le DMSO.

J'ai réalisé la synthèse du PS **TIPS-ZnP-ZnP-TIPS** en utilisant les conditions décrites au laboratoire.²⁰⁴ Deux équivalents du composé **TIPS-ZnP-H** réagissent en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI et de la benzoquinone pour accélérer l'oxydation. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice afin d'obtenir un solide brun avec un rendement de 83% (Figure 124).

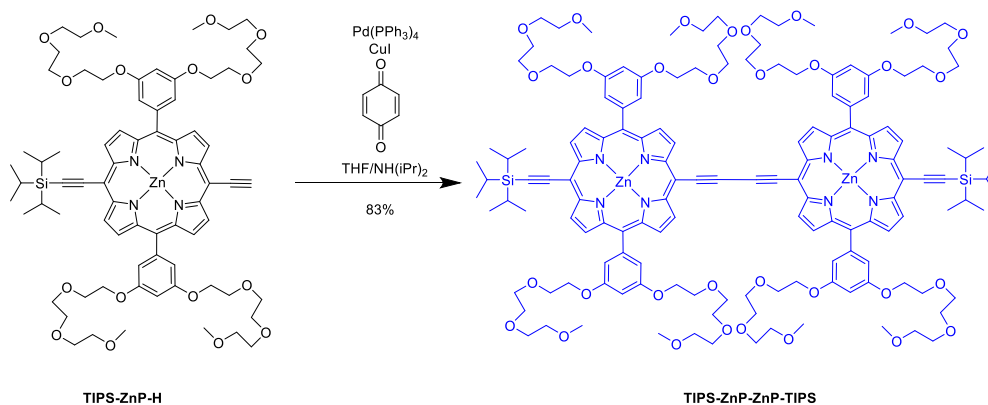


Figure 124. Schéma de synthèse du PS **TIPS-ZnP-ZnP-TIPS**

Les essais d'incorporation du PS **TIPS-ZnP-ZnP-TIPS** dans des cubosomes ont été réalisés par l'équipe de Claudia Caltagirone. Néanmoins, lors de la synthèse des cubosomes une grande partie du composé a précipité sans être incorporé dans les cubosomes résultant en une concentration trop faible en PS pour pouvoir espérer une utilisation en PDT (Figure 125). Nous

avons donc décidé de changer de stratégie en fixant par liaison covalente le PS aux surfactants stabilisant les cubosomes.

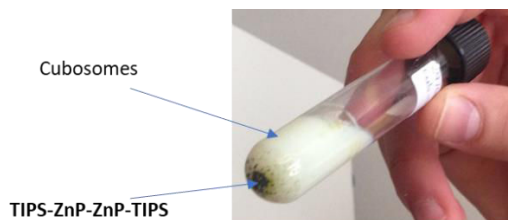


Figure 125. Photographie prise montrant l'obtention des cubosomes qui n'incorporent pas le PS TIPS-ZnP-ZnP-TIPS.

V.2. Photosensibilisateur lié par liaison covalente aux surfactants des cubosomes

V.2.1. Synthèse du photosensibilisateur et des cubosomes

Le PS choisi pour être greffé sur le surfactant est le **DPP-ZnP** à cause de ses bonnes propriétés pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique décrite dans les chapitres I.2.4.c) et II. La réaction avec le surfactant se fait par une réaction d'addition-élimination entre le surfactant activé et une amine. Nous avons donc décidé de synthétiser le composé **DPP-ZnP-NH₂** décrit préalablement au laboratoire (Figure 126).¹²¹

Un premier couplage de Sonogashira entre **TIPS-ZnP-H** et **DPP-Br** donne le composé **DPP-ZnP** avec un rendement de 53 % après purification par colonne de silice et colonne d'exclusion stérique. La protection de la fonction amine de 4-iodo-benzylamine est réalisée en une étape avec Boc₂O. L'amine protégée par un groupement Boc est obtenue avec un rendement de 76 % après purification sur colonne de silice. La déprotection de la fonction alcyne de **DPP-ZnP** suivi d'un second couplage de Sonogashira avec l'amine protégée permet d'obtenir **DPP-ZnP-NHBoc** après purification par colonne de silice avec un rendement de 81 %. Enfin la déprotection de la fonction amine suivie de la remétallation de la porphyrine avec de l'acétate de zinc donne **DPP-ZnP-NH₂** avec un rendement de 97 % après lavage.

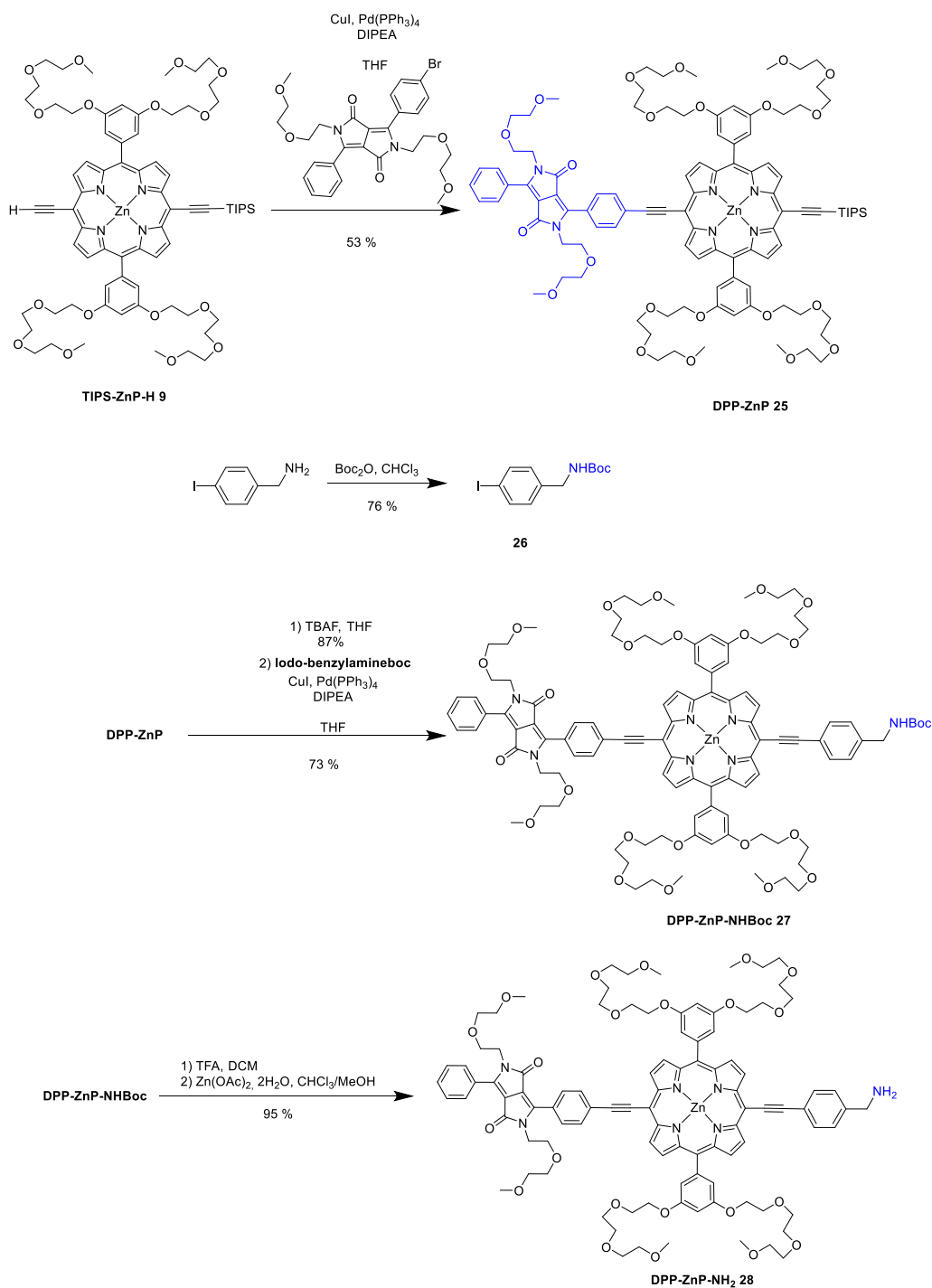


Figure 126. Schéma de synthèse de **DPP-ZnP-NH₂**.

Le PS **DPP-ZnP-NH₂** a été envoyé à l'équipe de Claudia Caltagirone pour réaliser la synthèse du cubosome **F108-(DPP-ZnP-NH₂)₂**. Deux étapes sont nécessaires, la première consiste à activer les deux alcools terminaux du surfactant PF-108 avec le carbonyldiimidazole. La seconde étape est la réaction d'addition-élimination entre le surfactant activé et **DPP-ZnP-NH₂** pour former le surfactant **PF108-(DPP-ZnP-NH₂)₂** (Figure 127).

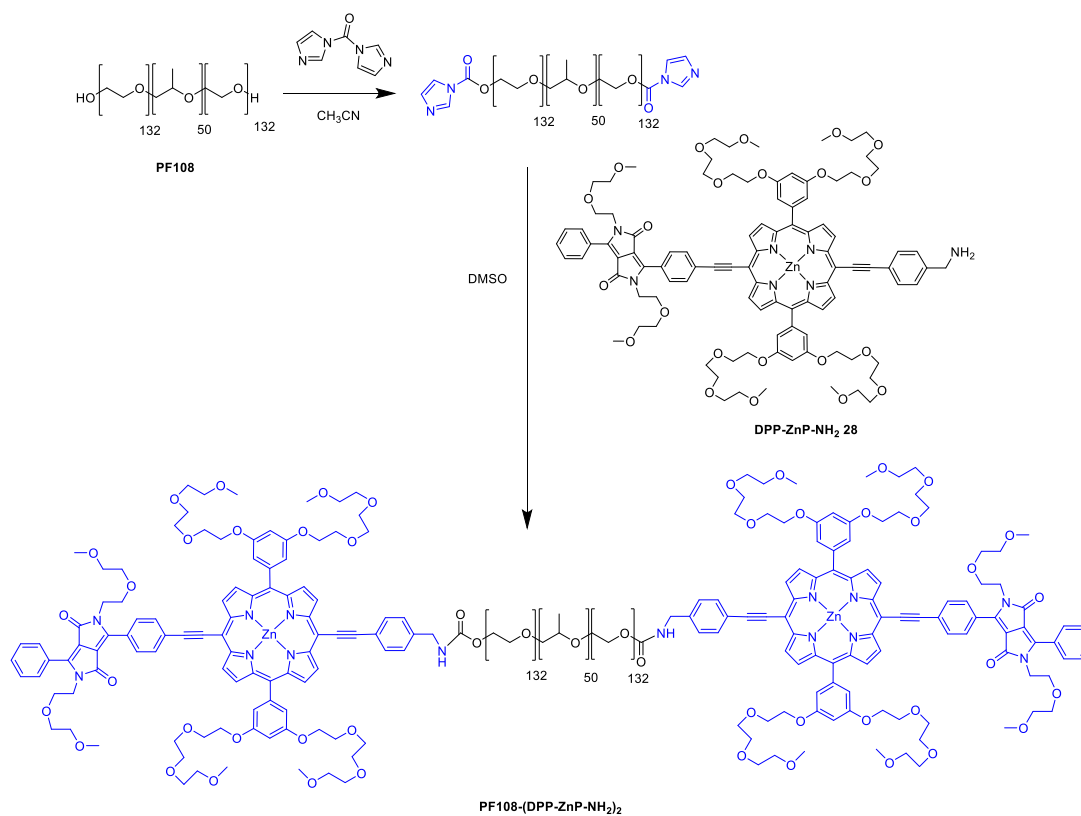


Figure 127. Schéma de synthèse de **PF108-(DPP-ZnP-NH₂)₂**.

La synthèse des cubosomes a été réalisée en utilisant environ 35 % de **PF108-(DPP-ZnP-NH₂)₂** et 65 % du surfactant non substitué PF-108. Cela donne une solution de cubosomes contenant le PS à une concentration $C_0 = 140 \mu\text{M}$ (Figure 128).

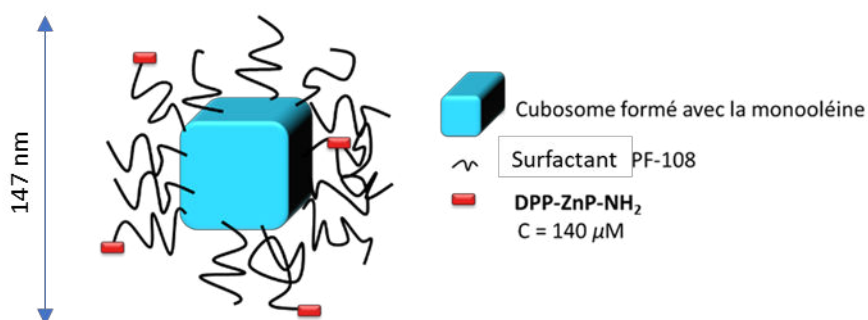


Figure 128. Schéma des cubosomes avec le surfactant relié au PS **DPP-ZnP-NH₂**. La concentration du PS est également indiquée.

L'obtention de cubosomes a notamment été confirmée par des études réalisées en Italie, la Cryo-TEM (Figure 129) et les analyses DLS (Dynamic light scattering) montrent une taille moyenne de 147 nm.

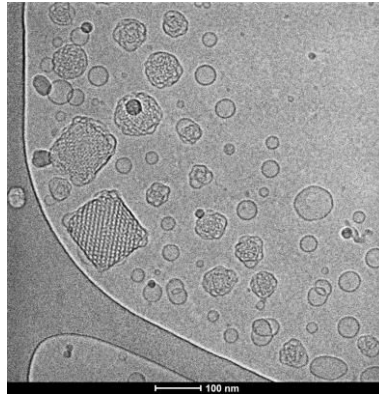


Figure 129. Image cryo-TEM de la formulation des cubosomes stabilisés par 35 % de **PF108-(DPP-ZnP-NH₂)₂** et ~ 65 % du surfactant **PF-108**.

V.2.1. Études cellulaires

V.2.1.a) Localisation cellulaire

Le PS **DPP-ZnP-NH₂**, greffé sur les surfactants des cubosomes, est fluorescent et nous a permis de réaliser des études de localisation cellulaire. Elle a été déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre II.6.1. Les cellules ont été incubées avec des cubosomes à une concentration de C500 pendant 4 h. Une heure avant la prise des images le Hoescht, le mitotracker ou le lysotracker ont été ajoutés (Figure 130).

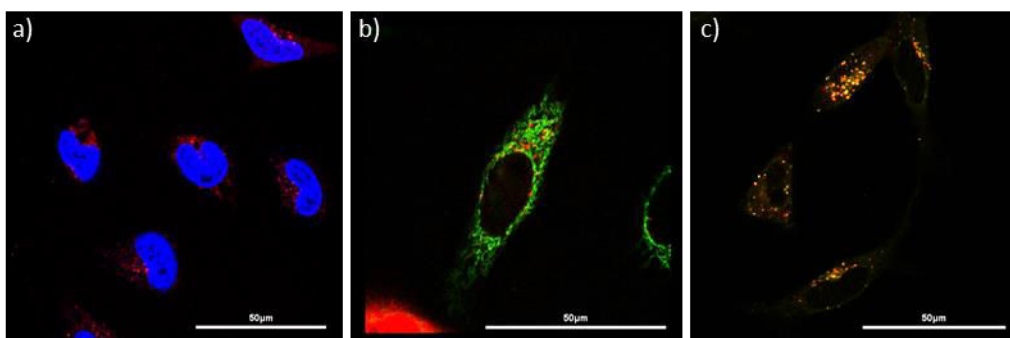


Figure 130. Images confocales de cellules HeLa après 4 h d'incubation avec les cubosomes (C500). Cubosome en rouge, a) Hoescht (bleu), b) mitotracker (vert) et c) lysotracker (jaune).

On remarque une colocalisation entre la fluorescence du lysotracker et celle des cubosomes indiquant une localisation dans les lysosomes. Cette localisation a déjà été observée par

d'autres groupes pour ce type de surfactant.²⁰⁵ De manière plus surprenante, on observe aussi une colocalisation entre la fluorescence du mitotracker et celle des cubosomes suggérant une localisation dans les mitochondries. Des études de localisation avec le surfactant PF85, possédant une structure analogue au surfactant PF108, relié à un fluorophore (la tétraméthylrhodamine) ont montré sa localisation dans les mitochondries.²⁰⁶

V.2.1.b) Cytotoxicité

Les études de cytotoxicité ont été réalisées sur des cellules HeLa après 4 h d'incubation à des concentrations en cubosomes variant de C5000 à C50 correspondant à des concentrations en PS variant entre 0,028 μM et 2,8 μM . La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test au MTT (Figure 131).

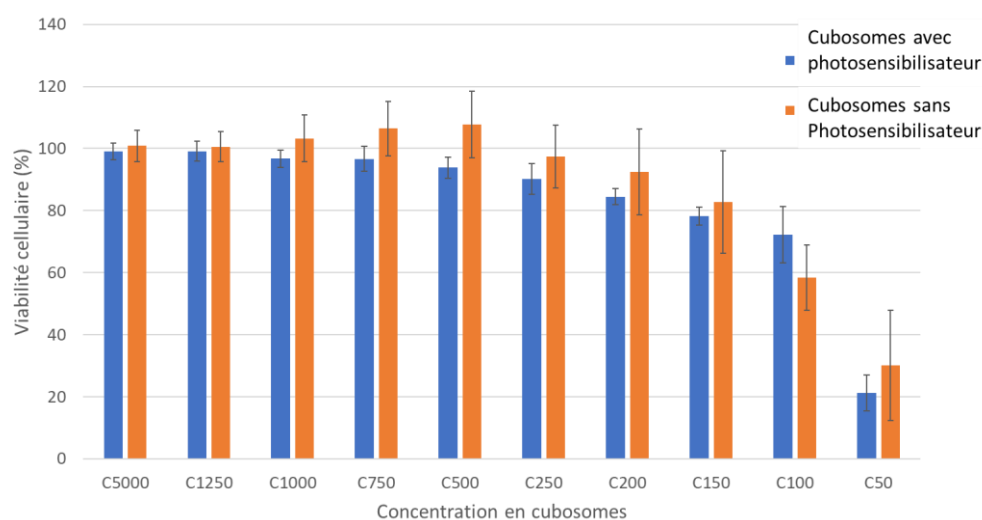


Figure 131. Cytotoxicité induite par les cubosomes avec ou sans PS après 4 h d'incubation.

On ne remarque pas de différence de toxicité entre les cubosomes portant le PS ou non suggérant que la toxicité provient essentiellement des cubosomes. L' IC_{50} se trouve entre C100 et C50 correspondant à une concentration en PS comprise entre 1,4 μM et 2,8 μM .

V.2.1.c) Phototoxicité par excitation monophotonique

Les études de phototoxicité par excitation monophotonique avec les cubosomes greffés avec **DPP-ZnP-NH₂** ont été réalisées à C500 correspondant à une concentration en PS de 0,3 μM (contre 0,11 μM pour les cubosomes incorporant **YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA**). Les cellules HeLa

ont été incubées pendant 4 h à C500 puis irradiées à 660 nm et 36 mW/cm² pendant 1 h. La viabilité cellulaire a été estimée 24 h après irradiation par un test au MTT (Figure 132).

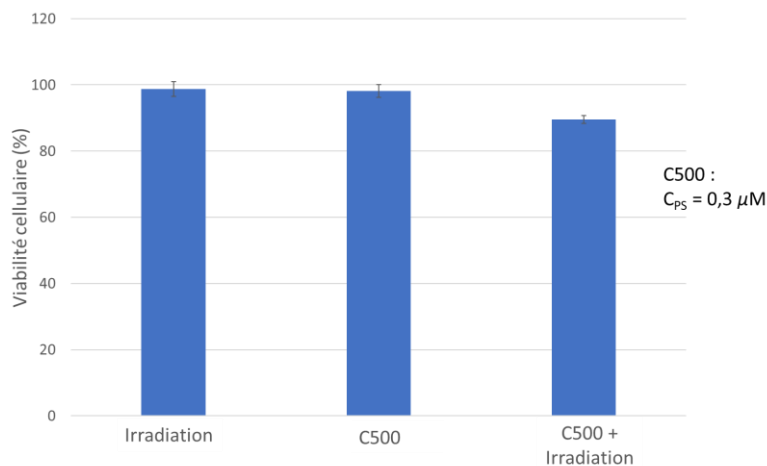


Figure 132. Phototoxicité induite par une excitation à une puissance de 36 mW/cm² à 660 nm pendant 1 h après 4 h d'incubation à une concentration de C500. Test de viabilité au MTT 24 h après irradiation.

À une concentration de C500, correspondant à une concentration en PS de 0,3 μM, on observe une phototoxicité faible de 10 % pour une grande dose lumineuse de 130 J/cm².

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour une si faible phototoxicité :

- La concentration en PS est toujours trop faible.
- Le PS n'est plus capable d'émettre de l'oxygène singulet efficacement lorsqu'il est incorporé dans la structure lipophile.
- L'oxygène singulet est produit, mais réagit avec les composants du cubosome au lieu des composants cellulaires.

V.3. Photosensibilisateur lié au surfactant des vésicules

Afin d'augmenter la concentration en PS par nanoparticule le nombre de surfactants a été augmenté par rapport à la monooléine, mais en gardant le même ratio entre **PF108-(NH-ZnP-DPP)₂** et le surfactant non substitué PF-108. Cette augmentation ne conduit pas à des cubosomes lors de la synthèse, mais à des vésicules possédant une taille moyenne de 146,1 nm. Ce résultat a été confirmé par des analyses SAXS qui montre l'absence de structure

cristalline. La concentration en PS est près de 4 fois plus importante dans les vésicules que dans les cubosomes ($C_0 = 533 \mu\text{M}$ contre $140 \mu\text{M}$ pour les cubosomes) (Figure 133).

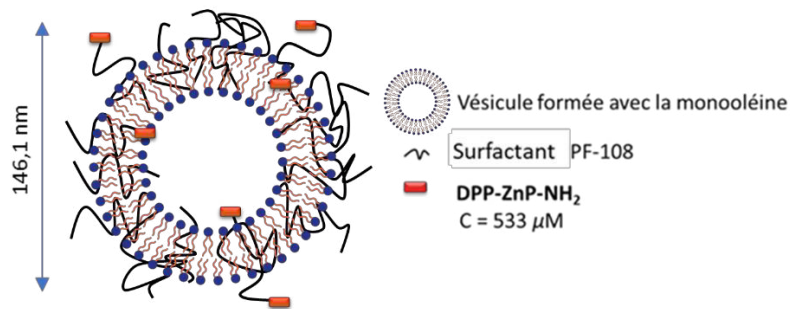


Figure 133. Schéma des vésicules avec le surfactant relié au PS **DPP-ZnP-NH₂** et sa concentration dans les vésicules.

V.3.1. Localisation cellulaire

Les cellules ont été incubées avec les vésicules à une concentration de C_{500} pendant 4 h. 1 h avant la prise des images le Hoescht, le mitotracker et le lysotracker ont été ajoutés au milieu de culture (Figure 134).

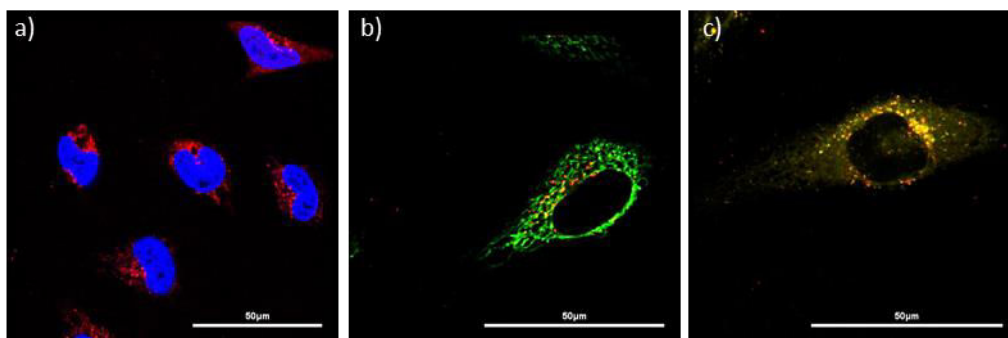


Figure 134. Images confocales de cellules HeLa après 4h d'incubation avec les vésicules (C_{500}). Vésicule en rouge, a) Hoescht (bleu), b) mitotracker (vert) et c) lysotracker (jaune).

Comme pour les cubosomes, les vésicules se localisent dans les lysosomes et les mitochondries.

V.3.2. Cytotoxicité

Les études de cytotoxicité ont été réalisées sur des cellules HeLa après 4 h d'incubation à des concentrations en vésicules variant de C_{5000} à C_{50} correspondant à des concentrations en PS

variant entre 0,11 μM et 10,7 μM . La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test au MTT (Figure 135).

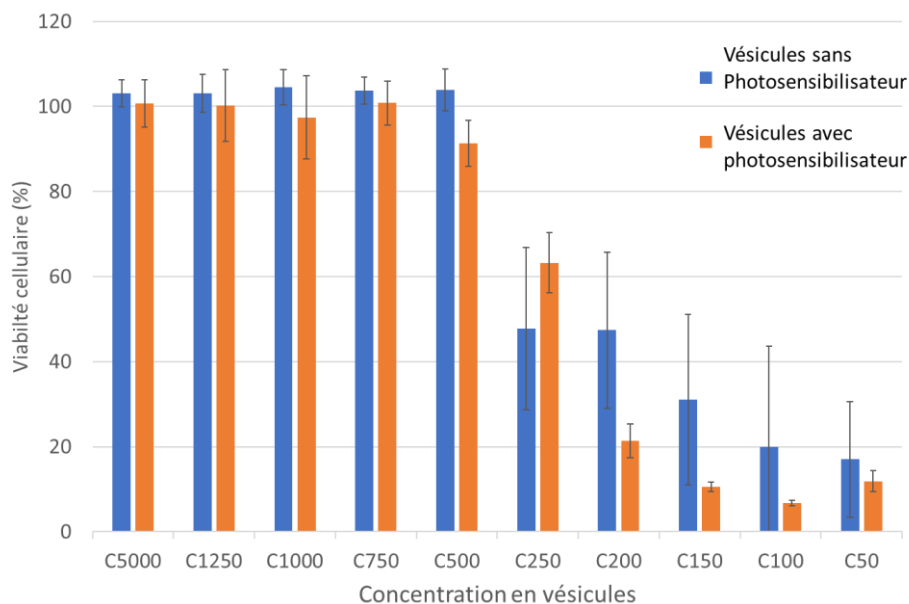


Figure 135. Cytotoxicité induite par les vésicules avec ou sans PS (**DPP-ZnP-NH₂**) sur des cellules HeLa après 4 h d'incubation. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test au MTT.

Comme pour les cubosomes, on ne note pas de différence de cytotoxicité entre les vésicules portant le PS ou non. Néanmoins, on trouve une valeur d' IC_{50} vers C250 alors qu'elle était plus élevée pour les cubosomes (entre C₁₀₀ et C₅₀). On peut faire l'hypothèse que la toxicité des vésicules provient majoritairement du surfactant.

V.3.3. Phototoxicité par excitation monophotonique

Les études de phototoxicité par excitation monophotonique ont été réalisées à C500 correspondant à une concentration en PS de 1,1 μM (contre 0,3 μM pour les cubosomes). Les cellules HeLa ont été incubées pendant 4 h à C500 puis irradiées avec une puissance de 25 et 36 mW/cm^2 pendant 30 min à 660 nm. La viabilité cellulaire a été estimée 24 h après irradiation avec un test au MTT (Figure 136).

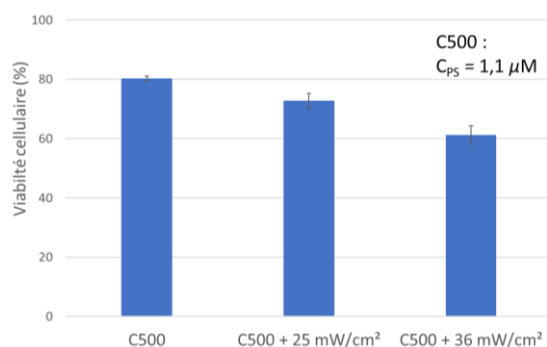


Figure 136. Phototoxicité induite sur des cellules HeLa incubés avec les vésicules greffées avec le PS **DPP-ZnP-NH₂** à une puissance de 25 ou 36 mW/cm² à 660 nm pendant 30 min. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test au MTT 24 h après irradiation.

À une concentration de C500, les vésicules induisent une toxicité de 20 %. Cette toxicité, légèrement plus élevée par rapport à la courbe de cytotoxicité (Figure 135) peut être expliquée par l'évaluation de la viabilité cellulaire 24 h après incubation au lieu de 4 h. Ainsi, même si le milieu de culture est remplacé après irradiation pour enlever les vésicules, les vésicules incorporées dans les cellules entraînent de la toxicité. La phototoxicité induite par les vésicules greffées avec **DPP-ZnP-NH₂** est d'environ 10 % pour une dose lumineuse de 45 J/cm² et d'environ 25 % pour une dose lumineuse de 65 J/cm².

V.4. Cubosomes et vésicules pour la PDT et la chimiothérapie

Il peut être intéressant de coupler la toxicité d'un agent chimiothérapeutique à la phototoxicité d'un PS, car la PDT n'induit pas de résistance et peut détruire les cellules résistantes. L'association d'un PS et d'un agent chimiothérapeutique peut conduire à une synergie.¹⁹⁵ Le Docetaxel est un composé antinéoplasique qui va perturber le réseau microtubulaire ce qui va empêcher la division cellulaire provoquant la mort de celle-ci (Figure 137).²⁰⁷

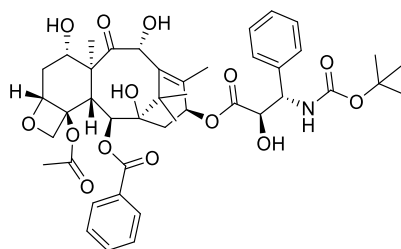


Figure 137. Structure du Docetaxel.

Le groupe de Claudia Caltagirone et Sergio Murgia a montré qu'en incorporant le Docetaxel dans les cubosomes sa cytotoxicité est accrue.¹⁹⁸ Les synthèses des cubosomes et des vésicules ont été réalisées avec le surfactant portant le PS **F108-(NH-ZnP-DPP)₂** et le Docetaxel a été incorporé lors de la synthèse des nanoparticules. La taille des cubosomes et vésicules, déterminée par analyse DLS, est de 149,5 nm et 126,6 nm respectivement.

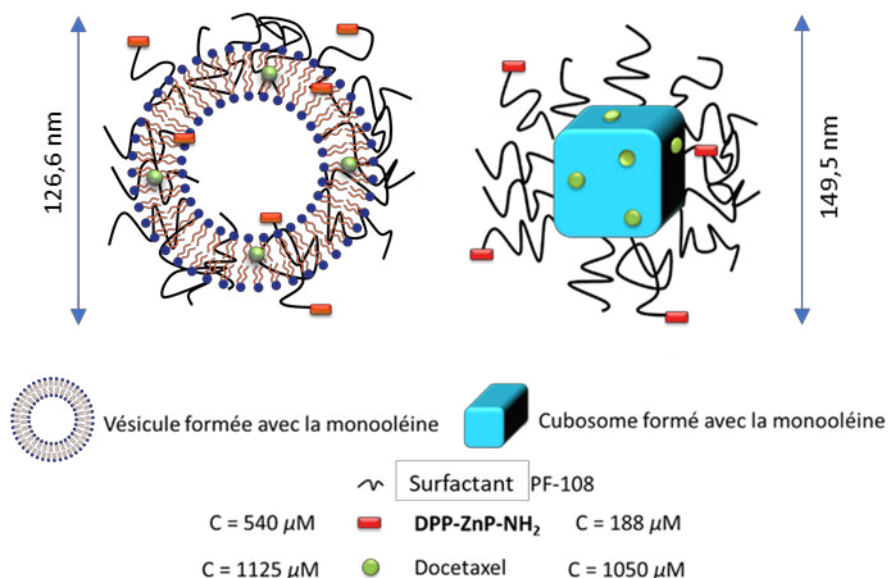


Figure 138. Schéma des vésicules et cubosomes avec le surfactant relié au PS **DPP-ZnP-NH₂** et incorporant le Docetaxel ainsi que leurs concentrations.

V.4.1. Cytotoxicité induite par le Docétaxel

Les études de cytotoxicité ont été réalisées sur des cellules HeLa après 4 h d'incubation à des concentrations en cubosomes ou vésicules variant de C5000 à C50. Pour les cubosomes cela correspond à une concentration en **DPP-ZnP-NH₂** allant de 0,04 μM à 3,8 μM et en Docetaxel allant de 0,21 μM à 21 μM (Figure 139). Pour les vésicules cela correspond à une concentration

en PS allant de 0,11 μM à 11 μM et en Docetaxel allant de 0,23 μM à 23 μM . La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test au MTT (Figure 140).

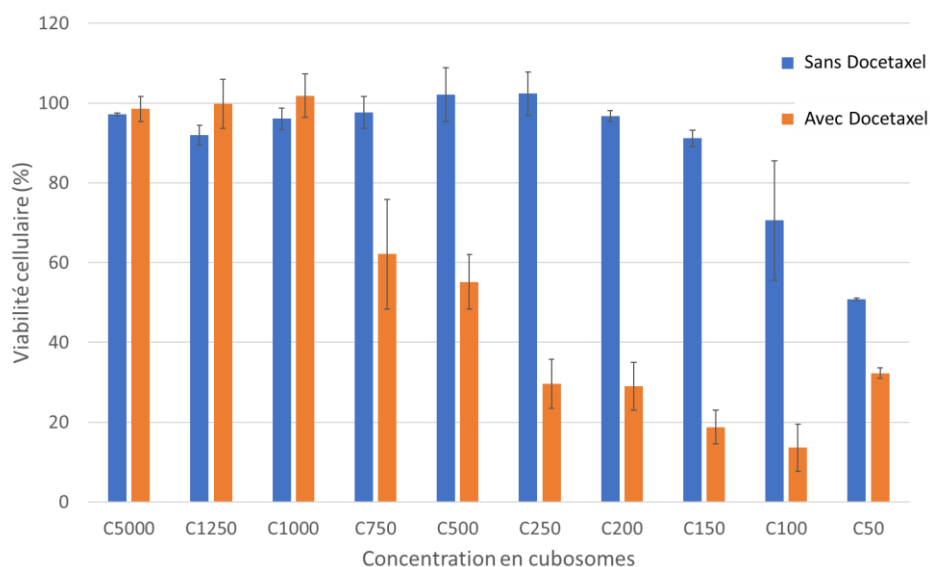


Figure 139. Cytotoxicité induite sur des cellules HeLa par les cubosomes greffés avec **DPP-ZnP-NH₂** avec ou sans Docetaxel après 4 h d'incubation.

Les cubosomes greffés avec **DPP-ZnP-NH₂** et incorporant le Docetaxel deviennent toxiques pour une concentration de C₇₅₀ et l'IC₅₀ est estimé entre C750 et C500. En revanche, Les cubosomes n'incorporant pas le Docetaxel ne sont pas toxiques à ces concentrations indiquant une toxicité provenant du Docetaxel. Cela est cohérent avec des résultats obtenus par le groupe de Claudia Caltagirone pour des cubosomes incorporant le Docetaxel.¹⁹⁸ Ils ont obtenus environ 30 % de toxicité pour une concentration en Docetaxel de 0,8 μM après 4 h d'incubation dans des cellules HeLa. Ici, les cubosomes induisent environ 40 % de mort cellulaire pour une concentration en Docetaxel de 1,4 μM .

Les vésicules greffées avec **DPP-ZnP-NH₂** et incorporant le Docetaxel, induisent comme les cubosomes, une toxicité à partir de C750. Cela correspond à une concentration en Docetaxel de 1,5 μM .

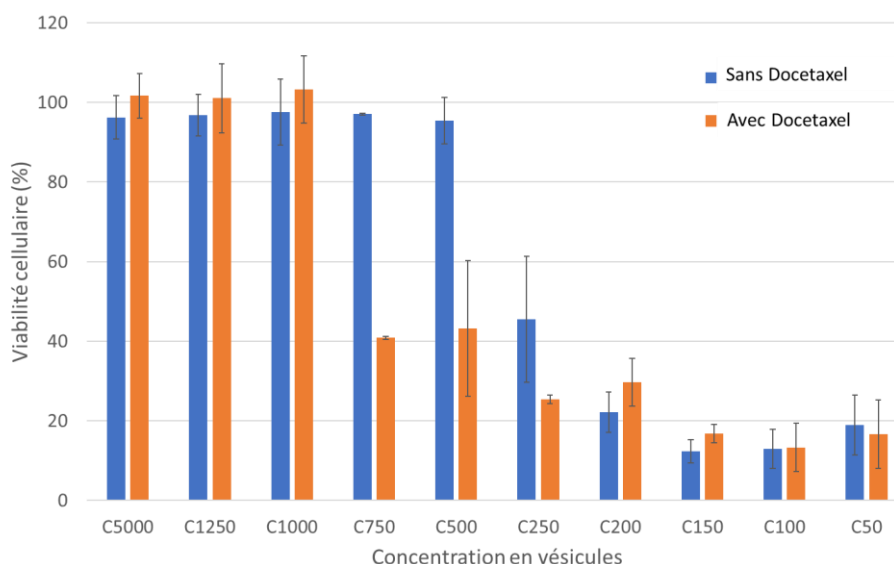


Figure 140. Cytotoxicité induite sur des cellule HeLa par les vésicules greffées avec **DPP-ZnP-NH₂** avec ou sans Docetaxel après 4 h d'incubation.

V.4.2. Phototoxicité par excitation monophotonique du PS

Les études de phototoxicité par excitation monophotonique ont été réalisées sur des cellules HeLa après incubation avec une solution de cubosomes ou de vésicules greffées avec **DPP-ZnP-NH₂** et incorporant ou non le Docetaxel. Les cellules ont été incubées à C750 pendant 4 h à C750 puis irradiées à 36 mW/cm² pendant 1 h à 660 nm. Cela correspond à une concentration en PS de 0,25 μM et en Docetaxel de 1,4 μM pour les cubosomes. Pour les vésicules cela correspond à une concentration en PS de 0,72 μM et en Docetaxel de 1,5 μM. La viabilité cellulaire a été estimée 24 h après irradiation avec un test au MTT (Figure 141).

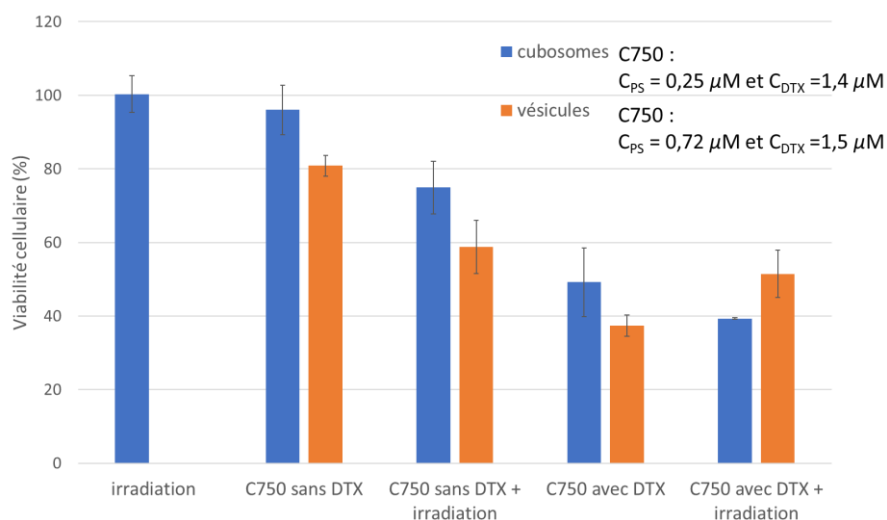


Figure 141. Phototoxicité des cubosomes et des vésicules greffées avec **DPP-ZnP-NH₂** incorporant ou non du Docetaxel (DTX), incubés pendant 4 h, induite par une irradiation à 660 nm pendant 1 h à 36 mW/cm². La viabilité cellulaire est estimée 24 h après irradiation.

Les cubosomes sans Docetaxel n'induisent pas de toxicité alors que les vésicules sans Docetaxel induisent 20 % de toxicité. Cette différence peut, comme précédemment, être expliquée par l'évaluation de la viabilité réalisée 24 h après l'incubation et non 4 h. L'irradiation des cubosomes ou vésicules à une dose lumineuse élevée de 130 J/cm² conduit à une phototoxicité d'environ 20 % pour les cubosomes et les vésicules alors que les vésicules contiennent 3 fois plus de PSs que les cubosomes. La toxicité induite par les cubosomes ou vésicules incorporant le Docetaxel est d'environ 50 % et 40 % respectivement. Ces valeurs sont cohérentes avec les courbes de cytotoxicité (Figure 139, Figure 140). Néanmoins, l'irradiation des cubosomes ou vésicules incorporant le Docetaxel n'augmente pas leur toxicité. Il n'y a donc pas d'effet additif ou synergétique. Une explication peut être donnée par la toxicité déjà trop élevée, de l'ordre de 70 %, induite par le Docetaxel ou à une phototoxicité trop faible pour pouvoir observer un effet. Un moyen pour améliorer cela serait de diminuer la quantité de Docetaxel incorporée dans les vésicules et cubosomes pour diminuer leurs toxicités.

V.5. Conclusion

Les études de cytotoxicité et de phototoxicité par excitation monophotonique de cubosomes et de vésicules ont été réalisées (Figure 142).

PS	Nature de la nanoparticule	Type de liaison	Docetaxel	IC ₅₀ (μM)	Phototoxicité
Aucun	Cubosomes	/	Sans	C100 < IC ₅₀ < C50 après 4 h d'incubation	/
	Vésicules	/	Sans	C250 après 4 h d'incubation	/
YDOTA-ZnP-ZnP-YDOTA	Cubosomes	Encapsulation	Sans	C500 < IC ₅₀ < C250 après 24 h d'incubation	Aucune à 41 J/cm ² (740 nm) et C500 ou C250
TIPS-ZnP-ZnP-TIPS	Cubosomes	Encapsulation	Sans	/	/
DPP-ZnP-NH₂	Cubosomes	Greffé par liaison covalente	Sans	C100 < IC ₅₀ < C50 après 4 h	~ 20 % à 130 J/cm ² (660 nm) et C750
			Avec	C500 < IC ₅₀ < C250 après 4 h	Aucune
	Vésicules	Greffé par liaison covalente	Sans	C250 après 4 h d'incubation	~ 20 % à 130 J/cm ² (660 nm) et C750
			Avec	C500 < IC ₅₀ < C250 après 4 h	Aucune

Figure 142. Tableau récapitulatif des essais de cytotoxicité et de PDT par excitation monophotonique pour les cubosomes et vésicules décrits dans ce chapitre.

Une légère phototoxicité de 10 à 20 % est obtenue pour une forte irradiation de 130 J/cm², mais à des concentrations en PSs très faibles d'environ 0,25 μM pour les cubosomes. Les essais de PDT par excitation biphotonique n'ont pas été réalisés, car la phototoxicité par excitation monophotonique est trop faible. Afin d'augmenter la phototoxicité, il est nécessaire d'augmenter la concentration en PS par cubosome en augmentant par exemple le ratio de surfactant portant un PS par rapport au surfactant natif. Un autre moyen serait d'essayer un grand nombre de PSs pour trouver celui qui s'incorpore le mieux dans les cubosomes.

Malgré tout, à ma connaissance, c'est le premier exemple de cubosomes portant ou incorporant des PSs pour la PDT. Cette première preuve de concept permet d'envisager les cubosomes comme type de formulation pour transporter les PSs dans les tumeurs.

Conclusion générale et perspectives

J'ai effectué dans le cadre de ma thèse la synthèse, les études physicochimiques et cellulaires de différentes molécules. Ces molécules sont potentiellement des PSs pour la PDT par absorption mono- et bi-photonique dans le proche infrarouge ou des PSs associés à des agents de contraste pour la théranostique.

Lors de cette thèse, la synthèse multiétapes du composé théranostique **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** a été réalisée. Ce composé bifonctionnel associe un PS, capable d'être excité par un processus d'excitation mono- ou bi-photonique, pour la PDT à deux complexes de Gd(III) pour l'IRM. Le haut coefficient d'extinction molaire dans le DMSO et l'eau, d'environ 50000 M.cm⁻¹ à 670 nm et le bon rendement de formation d'oxygène de 0,58 permettent à ce composé d'être un PS intéressant pour la PDT avec une irradiation proche de la fenêtre thérapeutique. De plus, la section efficace d'absorption biphotonique de 670 GM à 920 nm dans le DMSO rend également possible la PDT par excitation biphotonique. L'évaluation des propriétés de **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** en tant qu'agent de contraste pour l'IRM a été réalisée en mesurant sa relaxivité en fonction du champ magnétique. La valeur de relaxivité obtenue à 20 MHz et 37 °C est de 14,4 mM⁻¹.s⁻¹ par complexe de Gd(III). Cette remarquable valeur peut être expliquée par la taille et la relative rigidité du composé. Enfin, **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** contient deux complexes de Gd(III) ce qui porte sa relaxivité par molécule à 31 mM⁻¹.s⁻¹. Ce résultat est important, il valide la conception de la molécule pour associer deux fonctions, l'imagerie et la thérapie au sein d'une même molécule avec la possibilité d'effectuer l'imagerie à des concentrations plus faibles par rapport aux agents de contraste commerciaux. Les études de toxicité en absence de lumière réalisées sur des cellules HeLa ont permis de déterminer un IC₅₀ de 12 μM et une toxicité très faible à 2 μM, concentration utilisée pour les essais de PDT. Les études de phototoxicité par excitation monophotonique ont montré le potentiel de ce composé pour la PDT. Il reste cependant à réaliser les essais de PDT par excitation biphotonique.

Les études cellulaires de deux autres composés théranostiques, **P(GdDTTA)₄** et **GdDOTA-ZnP-GdDOTA**, associant la PDT et l'IRM synthétisés au laboratoire ont aussi été réalisées. Leurs cytotoxicités pour des cellules HeLa ont été évaluées à 50 μM pour **P(GdDTTA)₄** et à 10 μM

pour **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**. La phototoxicité pour ces deux composés a été démontrée pour une irradiation monophotonique à 636 nm pour **P(GdDTTA)₄** et à 740 nm, longueur d'onde située dans la fenêtre thérapeutique pour **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA**. Des études de PDT par excitation biphotonique ont aussi été réalisées pour **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** avec une irradiation à 910 nm. Les résultats ont montré une phototoxicité à partir d'une puissance d'irradiation de 30 mW et 100 % de mort cellulaire a été observée pour une puissance de 138 mW. Les analyses par ICP-AES du gadolinium ont permis de montrer l'internalisation de ces deux composés dans des proportions plus importantes que les agents de contraste commerciaux, qui peut s'expliquer par la partie centrale hydrophobe de ces composés. Ces résultats ont conduit à une publication pour **P(GdDTTA)₄** et le manuscrit pour **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** est en cours de finalisation.

La deuxième partie de ces travaux de thèse présente la synthèse multiétape et les études cellulaires de deux PSs vectorisés pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique. Le PS a été relié à l'acide folique ou la biotine dont les récepteurs sont surexprimés dans les cellules cancéreuses. Les très bons coefficients d'absorption molaire d'environ 60000 M.cm⁻¹ à 670 nm combinés aux excellents rendements quantiques de formation d'oxygène singulet de 0,70 dans le DMSO font de ces deux composés de très bons candidats pour la PDT par excitation monophotonique avec une excitation proche de la fenêtre thérapeutique optique. De plus les sections efficaces d'absorption biphotonique pour **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** permettent d'envisager ces composés pour la PDT par excitation biphotonique. Les études de cytotoxicité ont permis de déterminer des IC₅₀ de 11 μM et 7 μM pour **DPP-ZnP-FA** et **DPP-ZnP-Biotine** respectivement dans des cellules HeLa. Les essais de PDT par excitation monophotonique ont prouvé l'efficacité de ces composés avec des LD₅₀ de 66 J/cm² et 25 J/cm² à des concentrations d'incubation faibles de 1 μM pour **DPP-ZnP-Biotine** et **DPP-ZnP-FA** respectivement. Les études de phototoxicité par excitation biphotonique ont aussi démontré la possibilité d'utiliser **DPP-ZnP-FA** pour la PDT par excitation biphotonique. Enfin, les essais d'internalisation en présence ou non d'acide folique ont montré que **DPP-ZnP-FA** s'internalise en plus grande quantité via le récepteur de l'acide folique montrant l'intérêt de la vectorisation de ce PS.

La troisième partie de ma thèse présente la synthèse de PSs et les études cellulaires de cubosomes et vésicules incorporant de façon covalente ou non ces PSs pour la PDT par excitation mono- et bi-photonique. Ces études, réalisées avec des cellules HeLa, ont permis

de déterminer la cytotoxicité de ces nanoparticules. Les études de phototoxicités ont été effectuées, et malgré les différentes conditions testées, les résultats restent modestes et dans le meilleur des cas on observe 20 % de phototoxicité. L'incorporation de Docetaxel dans ces nanoparticules afin de réaliser un double traitement, par chimiothérapie et PDT, a aussi été explorée. On observe une augmentation de la toxicité induite par le Docetaxel, mais il n'a pas été possible de mettre en évidence une synergie entre la PDT et le Docetaxel.

Pour la suite de ce travail, il serait intéressant à partir des résultats obtenus durant ma thèse d'envisager la synthèse d'un composé théranostique vectorisé pour la PDT et l'IRM. En effet, une augmentation de la sélectivité améliorerait le traitement et l'imagerie.

Des études sur le petit animal pourraient aussi être intéressantes afin de suivre les agents théranostiques par IRM et de pouvoir déterminer leurs efficacité, absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité. Une fois ces études réalisées, la phototoxicité par excitation mono- et bi-photonique devra être évaluée. Pour les nouveaux PSs vectorisés synthétisés, ces études animales permettraient de déterminer si le vecteur permet réellement d'augmenter la sélectivité vis-à-vis des tumeurs.

Des études supplémentaires doivent être réalisées sur les cubosomes pour expliquer le manque de phototoxicité. Malgré tout, l'approche cubosome reste intéressante pour augmenter la solubilité des PS et améliorer leur biodistribution.

Enfin, plusieurs collaborations ont été initiées récemment. Le groupe du Pr. B. Wilson (Université de Toronto, Canada) est en train d'étudier le PS **DPP-ZnP** pour la PDT par excitation biphotonique pour le traitement des mélanomes. D'autre part la synthèse d'un nouveau composé théranostique combinant la PDT et l'imagerie par émission de positron par un complexe de Cu⁶⁴ devrait être réalisée en collaboration avec le groupe du Pr. R. Tripiier (Université de Brest).

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des propriétés photophysiques

	Solvants	$\lambda_{abs} / \text{nm}$	$\lambda_{abs} / \text{nm}$	λ_{em} / nm	φ_f	φ_{Δ}	$\lambda_{abs} / \text{nm}$
		($\epsilon / \text{M.cm}^{-1}$)	($\epsilon / \text{M.cm}^{-1}$)				(σ_2 / GM)
		Soret	Q				Maximum
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	H ₂ O	453 (153 000)	670 (52 000)	666, 742	$4,7 \times 10^{-3}$	0,58	-
	DMSO	456 (179 000)	668 (53 000)		0,13	-	920 (670)
DPP-ZnP-FA	H ₂ O / 1 % DMSO	-	-	744	$6,0 \times 10^{-3}$	-	-
	DMSO	457 (241 000)	668 (62 000)	682, 748sh	0,14	0,69	930 (800)
DPP-ZnP-Biotine	H ₂ O / 1 % DMSO	-	-	778	$3,1 \times 10^{-3}$	-	-
	DCM	455 (204 000)	666 (68 000)	682, 748sh	0,14	0,70	-
	DMSO	456 (209 000)	670 (61 000)	686, 754sh	0,14	0,58	930 (400)
DPP-ZnP	H ₂ O / 1 % DMSO	-	663 (-)	684, 750sh	$4,2 \times 10^{-3}$	-	-
	DCM	445 (224 000)	648 (62 000)	658, 724	0,15	0,58	1950
	DMSO	-	662 (70 000)	672, 734	0,15	0,54	272

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des études cellulaires

	Localisation cellulaire	Cytotoxicité IC ₅₀ / μM	Phototoxicité 1P LD ₅₀ / J/cm ²	Phototoxicité 2P LP ₅₀ ^a / mW
P(GdDTTA)₄	Lysosomes	50	29 (6 μM)	-
DPP-ZnP-(GdDOTA)₂	Lysosomes	12	45 (2 μM)	-
GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA	Lysosomes	10	60 (1 μM)	~ 77 (2 μM)
DPP-ZnP-FA	-	11	25 (1 μM)	~ 12 (1 μM)
DPP-ZnP-Biotine	-	7	66 (1 μM)	-

^aLP₅₀ = puissance lumineuse induisant 50 % de mort cellulaire

Annexe 3 : Mesure de la section efficace d'absorption biphotonique

Dans le cadre de cette thèse, la section efficace d'absorption biphotonique a été déterminée par la méthode TPEF (Two photon excitation fluorescence). La détermination directe de la section efficace d'absorption biphotonique est compliquée, car elle dépend d'un grand nombre de facteurs comme la puissance du laser, la fréquence, la longueur d'onde d'excitation ou encore l'efficacité du détecteur. Pour s'affranchir de tous ces paramètres, on utilise un composé de référence dont la section efficace d'absorption biphotonique et le rendement de fluorescence sont connus. Plusieurs références ont été déterminées par Drobizhev, Rebane *et al* qui ont publié en 2008 les sections efficaces d'absorption biphotonique de plusieurs fluorophores commerciaux permettant d'avoir des références

allant de 550 à 1600 nm.^{48,49} Le composé de référence que nous avons utilisé est la rhodamine B dont le spectre d'excitation biphotonique est donné Figure 143.

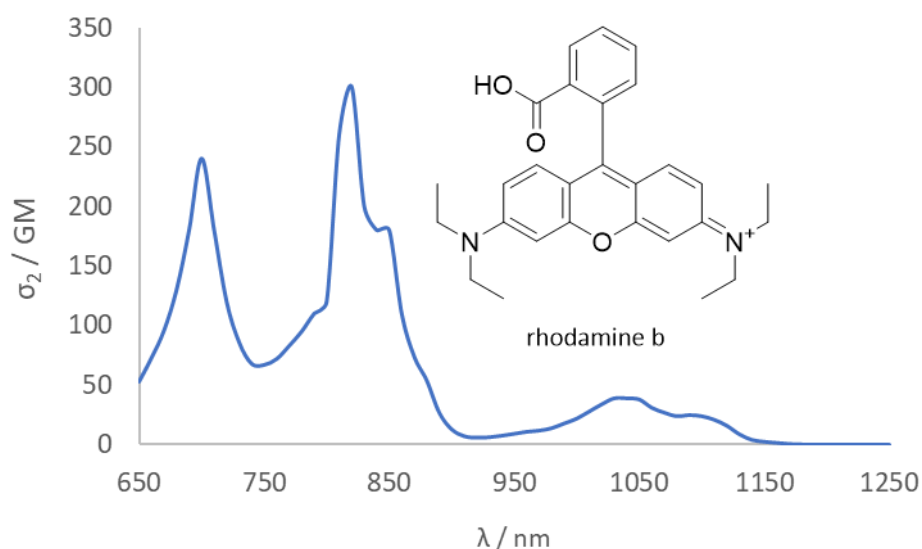


Figure 143. Spectre d'excitation biphotonique de la rhodamine B dans le méthanol.

Pour chaque longueur d'onde, la section efficace d'absorption biphotonique peut être déterminée en mesurant la fluorescence émise par le composé étudié et la référence dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'équation suivante :

$$\sigma_{2éch} = \frac{\Phi_{réf} \cdot C_{réf} \cdot \eta_{réf} \cdot I_{éch}}{\Phi_{éch} \cdot C_{éch} \cdot \eta_{éch} \cdot I_{réf}} \times \sigma_{2réf}$$

$\Phi_{réf}$ et $\Phi_{éch}$ correspondent au rendement quantique de fluorescence de la référence et de l'échantillon respectivement. $C_{réf}$ et $C_{éch}$ sont les concentrations des deux produits, $\eta_{réf}$ et $\eta_{éch}$ correspondent aux indices de réfractions des solvants, $I_{éch}$ et $I_{réf}$ correspondent aux intensités de fluorescence émises.

Dans le cadre de cette thèse, les mesures ont été réalisées entre 800 et 1000 nm pour des puissances comprises entre 50 et 250 mW. La dépendance quadratique de l'intensité de fluorescence par rapport à la puissance du laser a été réalisée pour chaque longueur d'onde afin de s'assurer que le processus d'absorption est uniquement biphotonique et qu'il n'y a pas de contribution d'une absorption mono- ou tri-photonique.

Annexe 4 : Montage d'irradiation monophotonique

Les tests de phototoxicité par irradiation monophotonique ont nécessité le développement de montage d'irradiation permettant d'irradier sélectivement certains puits d'une plaque 96 puits (Figure 144). Pour cela nous nous sommes tournés sur des DELs car ils sont une bonne alternative aux lasers grâce à leur grande durée de vie et faible coût.

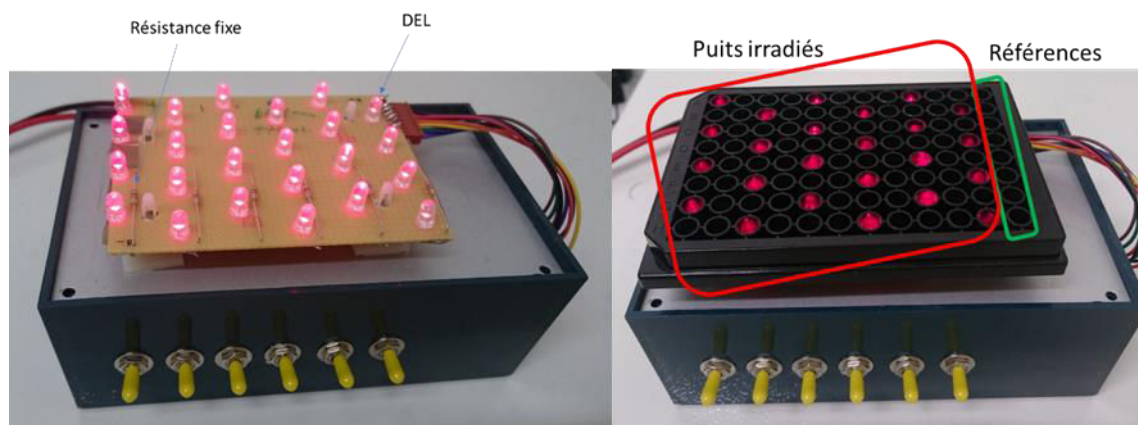


Figure 144. Montage d'irradiation monophotonique composé de DELs ayant une longueur d'onde d'émission de 636 nm.

Ce montage est composé de 6 circuits en parallèle alimentés par un générateur de tension et comportant chacun une résistance et 4 DELs ayant une émission maximale à 636 nm. Ces DELS possédant une tolérance de fabrication importante nous avons notés une puissance lumineuse variable et il a été nécessaire de mesuré la puissance de chaque LED individuellement avec un Wattmètre. Cela a permis d'accéder à plusieurs puissances d'irradiation sur une seule plaque. Ce montage a été utilisé pour étudier la phototoxicité de **P(GdDTTA)₄**.

La cytotoxicité plus élevée des autres composés nous a contraint à réaliser la phototoxicité à des concentrations plus faibles nécessitant une augmentation de la puissance. Les DELs utilisées dans le montage précédent étant déjà utilisées à leur tension maximale nous sommes passés à des DELs hautes puissances. En fonction des molécules étudiées, deux montages ont été réalisés. Le premier avec des DELs ayant une émission maximale à 660 nm et le second à 740 nm (Figure 145).

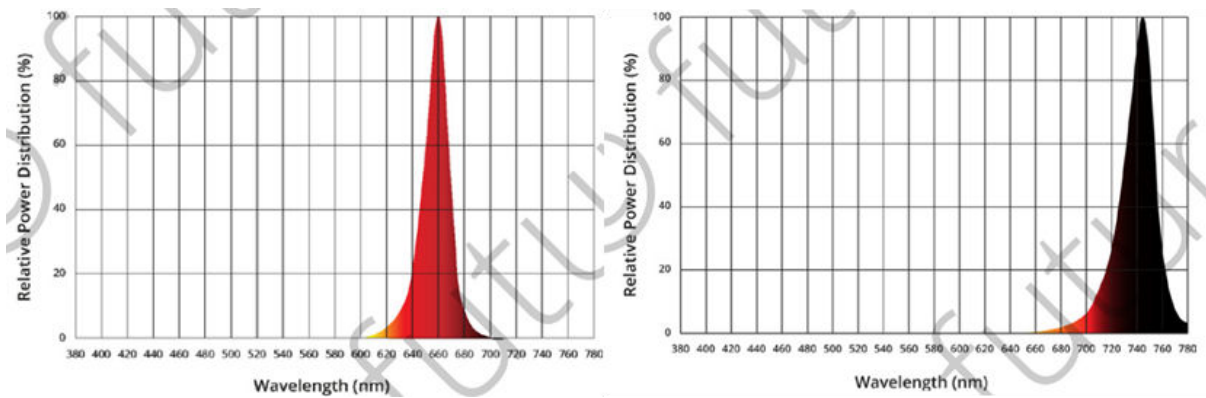


Figure 145. Spectres d'émission des DELs possédant un maximum d'émission à 660 et 740 nm, utilisées pour les études de phototoxicité monophotonique.

Les deux montages sont constitués d'un générateur de tension continu et de deux circuits montés en parallèle comportant chacun 5 DELs. Le premier possède une résistance fixe et le second une résistance variable. La résistance variable permet de calibrer les DELs pour avoir exactement les mêmes puissances lumineuses pour toutes les DELs ou encore d'obtenir deux puissances d'irradiations sur une même plaque 96 puits. La puissance lumineuse est mesurée pour chaque DELs avant chaque expérience avec un powermètre (Thorlabs PM100D). Enfin les DELs sont collées à l'aide de pâte thermique à un dissipateur de chaleur pour éviter de tuer les cellules par augmentation de la température (Figure 146).

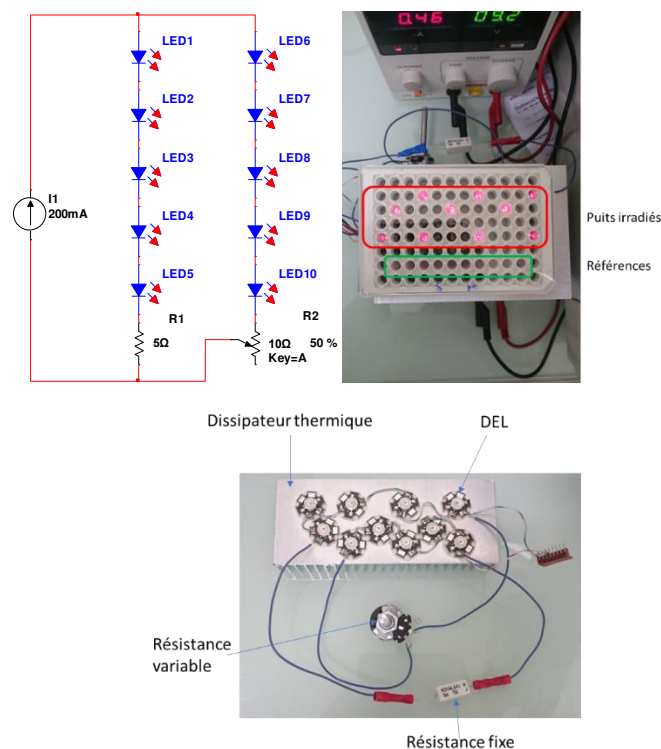


Figure 146. Schéma du circuit électrique (en haut à gauche), photo de cellules HeLa en train d'être irradiée (en haut à droite) et photo du montage d'irradiation (en bas).

Partie expérimentale

General information

All chemicals were of the best commercially available grade and used without further purification. Tetrahydrofuran was distilled over Na/benzophenone under argon before use. Precoated plates (PLC Silica gel 60 F254, 2 mm) were used for preparative thin-layer chromatography. Column chromatographies were carried out on silica (Fluka 60, 70-230 mesh) or on alumina. Size-exclusion chromatographies were carried out using Bio-Beads S-X1, 200-400 mesh (Bio-Rad). Flash chromatographies were carried out on silica using the Spot Ultimate apparatus from Armen Technologies. Prep-HPLC and analytical HPLC were performed using a Knauer system with C18 column. Dialysis devices [1000 molecular weight cutoff (MWCO)] were manufactured by Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, CA). NMR spectra were recorded using Bruker AVANCE 300, 400 or 500 spectrometers. Chemical shifts are quoted as parts per million (ppm) relative to the residual peak of solvent and coupling constants (J) are quoted in Hertz (Hz). Where assignments of ^1H NMR spectra are given, they have been unambiguously established via COSY, HSQC, HMBC and ROESY experiments. In the assignments, the chemical shift (in ppm) is given first, followed, in brackets, by the multiplicity of the signal (s : singlet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, br s : broad signal), the number of protons implied, the value of the coupling constants (J) in Hertz if applicable, and finally the assignment. UV-vis spectra were recorded on a UVIKON XL spectrophotometer. Mass spectra were obtained by using a Bruker MicroTOF spectrometer (ES-MS). ICP-AES was performed by emission spectrometry with a Vista AX CCD Simultaneous ICP-AES Varian spectrophotometer. ICP-MS was performed with an Agilent 7500ce spectrometer.

Spectroscopy and photophysics

Fluorescence quantum yield

The fluorescence quantum yields have been determined with reference to the previously studied compound **DPP-ZnP-DPP** in DCM ($\varphi_f = 0.16$).⁸⁰ Fluorescence lifetimes have been measured with an IBH Time Correlated Single Photon Counting apparatus with excitation both at 590 nm and 620 nm for **DPP-ZnP-(GdDOTA)₂** and **DPP-ZnP-FA** and at 510 nm for **DPP-ZnP-Biotine**. The analysis of the luminescence decay profiles against time was accomplished with the DAS6 Decay Analysis Software provided by the manufacturer. Estimated errors are 20% on quantum yields.

Singlet oxygen production quantum yields in DCM

Singlet oxygen production quantum yields in DCM have been measured with reference to Rose Bengal bis(triethyl-ammonium) salt ($\varphi_\Delta = 0.48$ in DCM) by comparing the intensity of singlet oxygen phosphorescence spectra measured with a FLS920 spectrofluorimeter (Edinburgh) equipped with a Hamamatsu R5509-72 supercooled photomultiplier tube at 193 K and a TM300 emission monochromator with a grating blazed at 1000 nm. Excitation at 442 nm has been performed with a Kimmon Koha Co., Ltd. HeCd laser (the power has been reduced to ca. 7 mW to avoid annihilation effects). Estimated errors are 20% on quantum yields.

Singlet oxygen production quantum yield in DMSO

Singlet oxygen production quantum yield in DMSO has been measured with a comparative method using DPBF as a singlet oxygen trap, which is oxidized by singlet oxygen and its degradation can be monitored by the decrease of its absorbance at 417 nm.²⁰⁸ ZnPc has been used as a standard ($\varphi_\Delta = 0.67$).²⁰⁹ Solutions of the standard or of the compound containing DPBF 5.2×10^{-5} M, prepared in the dark, have been irradiated at 672 nm by using an irradiation set-up composed by a 150 W Xenon lamp (LOT) and a Omni- λ 150 monochromator (Zolix), under continuous stirring. The light intensity was 12 mW/cm²). Estimated errors are 20% on quantum yields.

Two-photon excitation spectra

The two-photon excitation spectra was obtained by upconverted fluorescence measurements using a Ti:sapphire femtosecond laser Insight DS with pulse width <120 fs and a repetition rate of 80 MHz (Spectra-Physics). The excitation beam was collimated over the cell length (10 mm) and the fluorescence, collected at 90° of the excitation beam, was focused into an optical fibber connected to a spectrometer. The incident beam intensity was adjusted to ensure an intensity-squared dependence of the fluorescence over the whole spectral range investigated. Calibration of the spectra was performed by comparison with the published rhodamine B TPA (two-photon absorption) spectrum.⁴⁹ Estimated errors are 20% two-photon cross section.

Relaxometric Measurements for DPP-ZnP-(GdDOTA)₂

Proton nuclear magnetic relaxation dispersion (NMRD) profiles (1.02 mM, pH 7.3 in H₂O/1 % DMSO) were recorded on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01–10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20–80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. Higher field relaxivities were measured on a Bruker AVANCE NMR spectrometer at 300, 400, and 600 MHz. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a platinum resistance temperature probe. The longitudinal relaxation rates (1/T₁) were determined in H₂O/1 % DMSO. The relaxivity was also measured in the presence of 37 mg.L⁻¹ bovine serum albumin (BSA) for **DPP-ZnP-Gd(DOTA)₂** (0.57 mM in H₂O, pH 6.95).

Cell experiments

All cell experiments, except two-photon PDT and cell pellets T₁-Weighted Phantom MRI, were performed at least in triplicates and three independent experiments. The error bars are standard deviations.

Cell culture and MTT test

HeLa cells were cultured in DMEM complete culture medium containing phenol red at 37°C with 5% CO₂. They were seeded and maintained in 25 mL Falcon culture flasks or multi wells

(96 wells) LabTek (Lab-Tek® II) culture flasks for cytotoxicity experiments. The determination of the cell viability was performed by using the MTT colorimetric method. MTT toxicity tests were performed in hexaplicate with extemporaneous solutions of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (50 μ L of a MTT (5 mg/mL DMEM) solution by well). After an incubation period of 45 minutes, the media was removed and replaced by 150 μ L of DMSO. The absorbance was measured in 96 well plates with a Safas Xenius spectrofluorimeter at 550 nm after complete dissolution of the solid.

Confocal imaging

Confocal images were acquired on a confocal Leica SPE microscope with four different laser excitation sources at 405, 488, 561 or 635 nm. Colocalisation studies were performed with a simultaneous incubation of the compound and organelle trackers (Hoescht, Myotracker green or lysotracker blue).

One-photon phototoxicity for DPP-ZnP-(GdDOTA)₂, GDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA, DPP-ZnP-NHBoc, DPP-ZnP-FA, DPP-ZnP-Biotin

HeLa cells were cultured one day in Corning® 96 well special optics plates and incubated for 24 h with the studied compound (1 or 2 μ M). The plates were irradiated using a homemade apparatus (see annex) for 15 or 30 or 60 min. The media was then replaced with fresh DMEM and the viability was assessed 24 h after by MTT test.

One-photon phototoxicity for Cubosomes or vesicles

HeLa cells were cultured one day in Corning® 96 well special optics plates and incubated for 4 h with the compound. The plates were irradiated using a homemade apparatus (see annex) for 15, 30 or 60 min. The media was then replaced with fresh media and the viability was assessed 4 or 24 h after irradiation by MTT test.

Two-photon phototoxicity for GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA and DPP-ZnP-FA

HeLa cells were plated at 25% confluence in μ -Dish 35 mm, low grid-500 ibidi grids. After growth for 24h the media was replaced by fresh media containing **Gd-ZnP-ZnP-Gd** (2 μ M) or **DPP-ZnP-FA** (1 μ M). The two-photon irradiation was performed 24h later at a cell confluence

of ~80%. Two-photon microscopy studies were performed on a Leica SP5 inverted microscope with a HCX PL APO CS 40x oil Leica objective. A Coherent Chameleon Ultra 2 laser was used for irradiation with 150 fs pulses with a repetition rate of 80 MHz set at 910 nm or 920 nm depending the PS used. A region of 260x260 μm (zoom set to 1,5) was irradiated. The laser power was measured at the back pupil of the objective. The cell focus was done by DIC microscopy ($\lambda_{\text{ex}} = 513 \text{ nm}$) to be at the bottom of the cells. The cells were irradiated as a series of 10 slices, each 1 μm apart, with 30 scans per slide (300 scans in total). After irradiation the cells were left 3h30 in an incubator. Hoescht (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Sytox orange (5 μM) were added and the cells left in the incubator for another 30 min before imaging. Confocal images were obtained with a Leica TSP SPE microscope using two channels, one for Hoescht (ex. 405 nm) and one for SYTOX orange (ex. 561 nm). A control experiment was performed for each light power using the same conditions but without incubation of the PS.

Accumulation assay for DPP-ZnP-NHBoc, DPP-ZnP-FA, DPP-ZnP-Biotin

HeLa cells were seeded in a 250 mL culture flask in a complete DMEM medium, as described previously in the Cell Culture section. Samples of these cultures were incubated with **DPP-ZnP-NHBoc, DPP-ZnP-FA, DPP-ZnP-Biotin** at 1 μM for 24 h in presence or in absence of folic acid (4 mM) or biotin (1 mM). These cell cultures were then washed three times with phosphate-buffered saline (15 mL). Cells were suspended using trypsin (1 mL), and 9 mL of DMEM was added. The cells were counted using a Malassez cell. The culture medium was removed by gentle centrifugation at 60 g. The cell pellet was then lyophilized and redissolved in DMSO (1 mL). The fluorescence emission was measured and the intensity of each sample was normalized to cell concentration.

Cell Preparation for T1-Weighted Phantom MRI Images for P(GdTTA)₄

HeLa cells were seeded in a 250 mL culture flask in a complete DMEM medium, as described previously in the Cell Culture section. Samples of these cultures were incubated with **P(GdDTTA)₄** (0, 2.5, 6, and 10 μM) or Na₂GdDTPA (10 μM) for 24 h. These cell cultures were then washed three times with phosphate-buffered saline (15 mL). Cells were suspended using trypsin (1 mL), and 9 mL of DMEM was added. The cells were counted using a Malassez cell. The culture medium was removed by gentle centrifugation at 60 g. The pellets were

suspended in a 1.5 mL Eppendorf tube filled with DMEM and centrifuged again at 60 g to afford pellets in the bottom of the Eppendorf tubes, which were imaged.

Cell pellets T1-Weighted Phantom MRI Images for P(GdTTA)₄

The MRI experiments were performed on a 7 T Biospec 70/30 USR NMR spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) at 20 °C. They were carried out using a circular polarized transmit/receive 1H volume coil with an inner diameter of 72 mm. T1 measurements were performed with a RARE-VTR sequence and 20 TRs (46.82, 191.77, 344.95, 507.34, 680.14, 864.75, 1062.91, 1276.78, 1509.06, 1763.22, 2043.81, 2356.98, 2711.3, 3119.24, 3599.98, 4185.27, 4933.59, 5972.38, 7682.62, and 13500 ms); TE = 6 ms; FA = 90/180.0°; three 0.5 mm slices; pixel size 300 × 300 μm²; scan time 1 h 37 min. All quantitative T1 maps were calculated assuming exponential regrowth, using ImageJ (ImageJ, version 1.50e; NIH).

Cell Preparation for ICP Measurements for GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA

HeLa cells were seeded in a 250 mL culture flask in a complete DMEM medium, as described previously in the Cell Culture section. Samples of these cultures were incubated with **GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA** (1 or 2 μM) or Na₂GdDTPA (2 or 4 μM) for 24 h. These cell cultures were then washed three times with phosphate-buffered saline (15 mL). Cells were suspended using trypsin (1 mL), and 9 mL of DMEM was added. The cells were counted using a Malassez cell. The culture medium was removed by gentle centrifugation at 60 g.

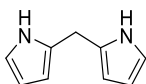
ICP Measurements for P(GdTTA)₄ and GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA

The gadolinium content in aqueous samples was determined by ICP-AES after mineralization in an Anton Paar microwave oven: multiwave ECO 3000 in a nitric acid solution (HNO₃ for trace analysis ≥69.0%, TraceSELECT, from Fluka). The gadolinium content in the cell was determined by ICP-MS from the known number of cells contained in an Eppendorf tube. The cell pellet samples were transferred to a 10 mL container with a 60% nitric acid solution and digested for 24 h at room temperature, followed if necessary by heating at 50 °C for 24 h.

Synthesis

Chapitre 2

Dipyrromethane 1



Chemical Formula: C₉H₁₀N₂

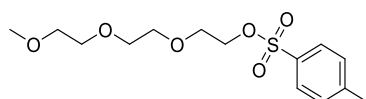
Exact Mass: 146.08

Molecular Weight: 146.19

A solution of pyrrole (25 mL, 0.361 mol) and aqueous formaldehyde (5.4 mL, 0.072 mol) was degassed by three vacuum argon cycles. The solution was cooled to 0°C and HCl (37%, 125 µL) was added dropwise. The resulting solution was stirred at room temperature for 1 h. The reaction was quenched with the addition of NaOH (16 mL, 0.1 M). CH₂Cl₂ (30 mL) was added and the organic phase was washed with H₂O (2 x 25 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated. The resulting liquid was purified by Kugelrohr distillation under vacuum (180 °C) and recrystallized from EtOH/H₂O (10 : 1) to give a pale brown solid (2.131 g, 20%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): δ(ppm) = 4.00 (s, 2H, CH₂), 6.04 (m, 2H, Har), 6.15 (m, 2H, Har), 6.70 (m, 2H, Har), 7.90, (br, 2H, NH).

Compound 2¹⁶⁰



Chemical Formula: C₁₄H₂₂O₆S

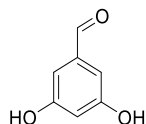
Exact Mass: 318.11

Molecular Weight: 318.38

Triethylene glycol monomethyl ether (7 mL, 43.9 mmol) was added dropwise to a solution of p-toluenesulfonyl chloride (9.81 g, 51.5 mmol) dissolved in pyridine (56 mL) and cooled to -10 °C. The reaction mixture was stirred at -10°C under argon for 4h30 and cold water (85 mL) was added. The product was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 60 mL) and the organic layer washed with HCl (100 mL, 6 M), acidic water (2 x 50 mL, pH = 1) and brine. The organic phase was dried with Na₂SO₄ and evaporated to give a pale yellow viscous oil in 97 % yield (13.49 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): δ(ppm) = 2.41 (s, 3H, Ar-CH₃), 3.33 (s, 3H, O-CH₃), 3.49 (m, 2H, O-CH₂), 3.56 (m, 6H, O-CH₂), 3.66 (m, 2H, O-CH₂), 4.13 (m, 2H, O-CH₂), 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Har), 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Har).

Aldehyde 3¹⁶¹



Chemical Formula: C₇H₆O₃

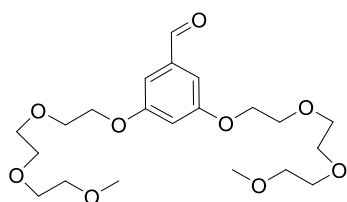
Exact Mass: 138.03

Molecular Weight: 138.12

Jone's Reagent (40 mL, 0.90 M) was added dropwise to 3,5-dihydroxybenzaldehyde (5 g, 0.0358 mol) dissolved in acetone (220 mL) and cooled to 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for 15 min and poured in diethyl ether (1.9 L). The organic layer was washed with a saturated NaHCO₃ solution (5 x 400 mL), brine (2 x 400 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvents were evaporated to give a pale brown solid in 56 % yield (2.79 g).

¹H NMR (300 MHz, CD₆O, 298 K): δ(ppm) = 6.65 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, Har), 6.88 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, Har), 8.78 (br s, 2H, Halcool), 9.85 (s, 1H, Hald).

Aldehyde 4¹⁶⁰



Chemical Formula: C₂₁H₃₄O₉

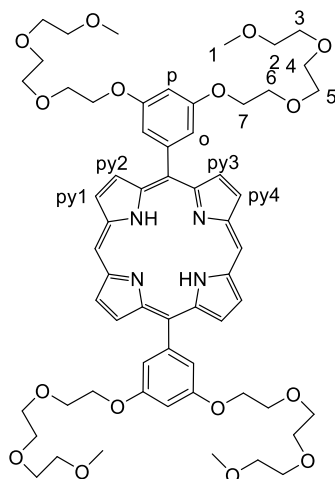
Exact Mass: 430.22

Molecular Weight: 430.49

A solution of **2** (13.49 g, 42.4 mmol) dissolved in dry DMF (70 mL) was added to a solution of dihydroxybenzaldehyde **3** (2.54 g, 18.4 mmol) and K₂CO₃ (7.55 g, 54.7 mmol) dissolved in dry DMF (70 mL). The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h. After cooling, water (80 mL) was added and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 70 mL). The combined organic layers were then washed with water (100 mL), brine (100 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvents were evaporated and the resulting oil was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH, 0 to 3 %) to give a pale yellow oil in 83 % yield (6.61 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta(\text{ppm}) = 3.37$ (s, 3H, O- CH_3), 3.54 (m, 4H, O- CH_2), 3.67 (m, 8H, O- CH_2), 3.73 (m, 4H, O- CH_2), 3.86 (m, 4H, O- CH_2), 4.16 (m, 4H, O- CH_2), 6.75 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, Har), 7.02 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, Har), 9.88 (s, 1H, Hal).

Porphyrin 5⁷⁹



Chemical Formula: $\text{C}_{60}\text{H}_{78}\text{N}_4\text{O}_{16}$

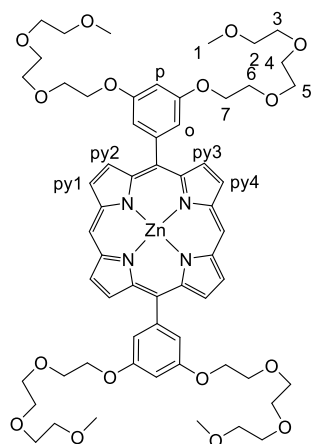
Exact Mass: 1110.54

Molecular Weight: 1111.30

Dipyrromethane **1** (0.991 g, 6.8 mmol) and **4** (2.915 g, 6.8 mol) were dissolved in CH_2Cl_2 (1350 mL). The solution was degassed by three vacuum/argon cycles, TFA (335 μL , 4.3 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for 3 h 30. DDQ (2.045 g, 9.0 mmol) was added and the solution was stirred for another 30 min at room temperature. The reaction was quenched with NEt_3 (6.5 mL) and poured on a silica gel pad (CH_2Cl_2 / MeOH, 1.5 %) to remove the oligomers and the solvents were evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH, 1 to 2.5 %) to give a purple solid in 35% yield (1.324 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta(\text{ppm}) = -3.14$, (br, 2H, NH), 3.33 (s, 12H, H1), 3.50 (m, 8H, H2), 3.64 (m, 8H, H3), 3.71 (m, 8H, H4), 3.79 (m, 8H, H5), 3.95 (m, 8H, H6), 4.33 (m, 8H, H7), 7.00 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, p), 7.48 (d, $J = 2.2$ Hz, 4H, o), 9.18 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H, py2), 9.39 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H, py1), 10.30 (s, 2H, Hmeso).

Porphyrin 6⁷⁹



Chemical Formula: C₆₀H₇₆N₄O₁₆Zn

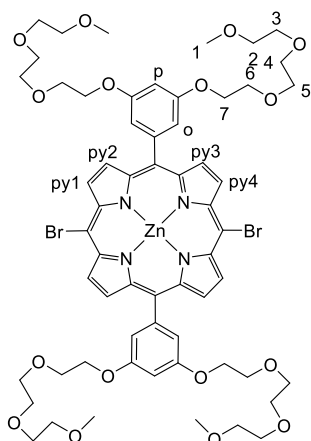
Exact Mass: 1172.45

Molecular Weight: 1174.66

To a solution of compound **5** (1.30 g, 1.2 mmol) in CHCl₃ (130 mL) was added a solution of Zn(OAc)₂·2 H₂O (1.28 g, 5.9 mmol) in MeOH (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 5h and the solvents were evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 1 to 2.5%) to give a fuchsia solid in 93 % yield (1.27 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): δ(ppm) = 2.76 (s, 12H, H1), 2.91 (m, 8H, H2), 3.11 (m, 8H, H3), 3.40 (m, 8H, H4), 3.54 (m, 8H, H5), 3.76 (m, 8H, H6), 4.20 (m, 8H, H7), 6.86 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H, p), 7.46 (d, *J* = 2.2 Hz, 4H, o), 9.17 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H, py2), 9.36 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H, py1), 10.23 (s, 2H, Hmeso).

Porphyrin 7



Chemical Formula: C₆₀H₇₄Br₂N₄O₁₆Zn

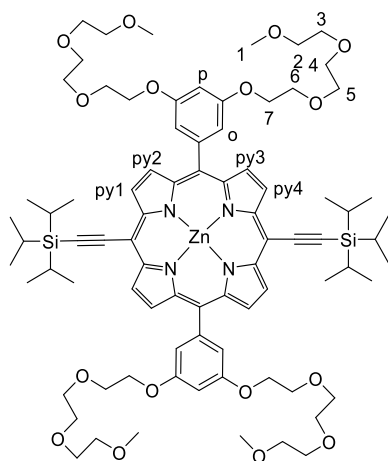
Exact Mass: 1328.28

Molecular Weight: 1332.45

To a solution of **6** (403 mg, 0.34 mmol) in CHCl_3 (27 mL) and pyridine (182 μL) cooled to -10°C was added drop by drop a solution of NBS (120 mg, 0.67 mmol) in CHCl_3 (13 mL) and pyridine (100 μL). The solution was stirred at -10°C for 20 min and the reaction quenched with acetone. The solvents were evaporated and the residue purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 1 to 2%) to give a violet solid in 98 % yield (447 mg).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta(\text{ppm}) = 2.66$ (s, 12H, H1), 2.83 (m, 8H, H2), 3.02 (m, 8H, H3), 3.30 (m, 8H, H4), 3.50 (m, 8H, H5), 3.71 (m, 8H, H6), 4.15 (m, 8H, H7), 6.78 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, p), 7.34 (d, $J = 2.2$ Hz, 4H, o), 8.95 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H, py2), 9.65 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H, py1).

TIPS-ZnP-TIPS **8**



Chemical Formula: $\text{C}_{82}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{Si}_2\text{Zn}$

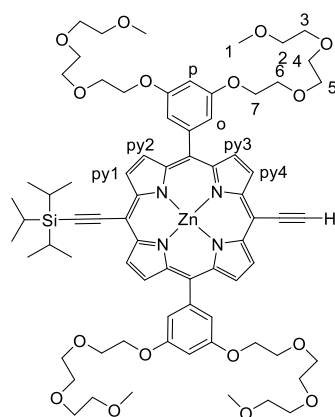
Exact Mass: 1532.72

Molecular Weight: 1535.39

To a solution of **7** (1.03 g, 0.78 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (60 mg, 194 μmol) and CuI (34.8 mg, 194 μmol) in THF (56 mL) and NEt_3 (11 mL) degassed by three vacuum/argon cycles was added triisopropylsilyl-acetylene (523 μL , 2.33 mmol). The solution was stirred at 40°C for 2 h 30 and the solvents were evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 1 to 1.5 %) to give a green solid in 90 % yield (1.07 g).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K): $\delta(\text{ppm}) = 1.45$ (m, 42 H, TIPS), 2.68 (s, 12H, H1), 2.84 (m, 8H, H2), 3.08 (m, 8H, H3), 3.44 (m, 8H, H4), 3.61 (m, 8H, H5), 3.83 (m, 8H, H6), 4.27 (m, 8H, H7), 6.87 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, p), 7.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 4H, o), 8.97 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H, py2), 9.70 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H, py1).

TIPS-ZnP-H **9**⁸⁰

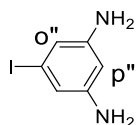


Chemical Formula: C₇₃H₉₆N₄O₁₆SiZn
Exact Mass: 1376.59
Molecular Weight: 1379.05

To a solution of **8** (787 mg, 0.51 mmol) in THF (135 mL) was added a solution of TBAF·2H₂O (40 mg, 0.13 mmol) in THF (1 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 min and the reaction was quenched with CaCl₂ (553 mg, 5 mmol). The solvents were evaporated and the residue purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 1 to 2%) to give a green solid in 42% yield (305 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): δ(ppm) = 1.44 (m, 21 H, Tips), 2.69 (s, 12H, H1), 2.85 (m, 8H, H2), 3.06 (m, 8H, H3), 3.38 (m, 8H, H4), 3.54 (m, 8H, H5), 3.76 (m, 8H, H6), 4.14 (s, 1H, alkyne), 4.20 (m, 8H, H7), 6.80 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H, p), 7.38 (d, *J* = 2.2 Hz, 4H, o), 8.95 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 8.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 9.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4), 9.71 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4).

Iodo-phenylenediamine **10**¹⁶⁴



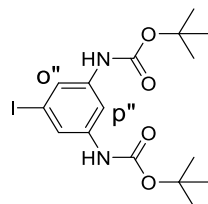
Chemical Formula: C₆H₇I N₂
Exact Mass: 233.97
Molecular Weight: 234.04

1-iodo-3,5-dinitrobenzene (600 mg, 2.04 mmol) was dissolved in EtOH (10 mL). SnCl₂·2 H₂O (2.75 g, 12.19 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 70 °C for 5 h. The reaction mixture was poured in cold water and a saturated solution of NaHCO₃ was added until pH 8. The product was extracted with EtOAc and washed with a saturated solution of NaHCO₃ followed by brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated.

The product was purified by standard alumina chromatography (DCM). Compound **10** was obtained as a pale brown solid in 65 % yield (312 mg).

$^1\text{H NMR}$ (300, CDCl_3 , 299 K): δ (ppm) = 3.55 (br, 4H, amine), 5.94 (t, $J = 2\text{Hz}$, 1H, p''), 6.47 (d, $J = 2\text{Hz}$, 2H, o'').

Protected Iodo-phenylenediamine **11**



Chemical Formula: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{IN}_2\text{O}_4$

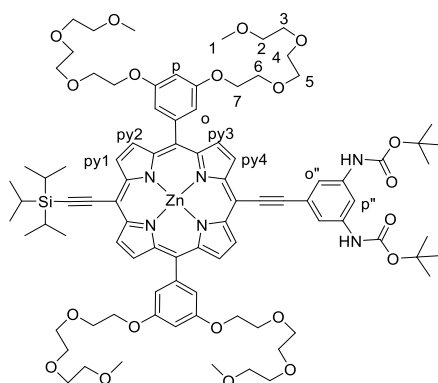
Exact Mass: 434.07

Molecular Weight: 434.27

To a solution of 1-iodo-3,5-diaminobenzene **10** (312 mg, 1.33 mmol) in dry THF (10 mL). Boc_2O (597 mg, 2.74 mmol) was added followed by NEt_3 (720 μL , 5.34 mmol). The resulting mixture was stirred at 65 °C for 44 h and was monitored by TLC on silica. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica chromatography (DCM). Compound **11** was obtained as a pale brown solid in 40% yield (230 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 1.50 (s, 18H, Boc), 6.40 (br, 2H, amide), 7.41 (t, $J = 1.8\text{ Hz}$, 1H, p''), 7.44 (d, $J = 1.8\text{ Hz}$, 2H, o'').

Compound **12**



Chemical Formula: $\text{C}_{89}\text{H}_{118}\text{N}_6\text{O}_{20}\text{SiZn}$

Exact Mass: 1682.75

Molecular Weight: 1685.41

TIPS-ZnP-H 9 (189 mg, 0.14 mmol), **11** (71.42 mg, 0.16 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (15.84 mg, 0.01 mmol) and CuI (2.61 mg, 0.01 mmol) were dried under vacuum at 40 °C for 30 min. The system was flushed with argon and a solution of dry THF (10 mL) and $(i\text{Pr})_2\text{NH}$ (2 mL) degassed by

vacuum for 1h at 35°C. The system was flushed with argon and a solution of dry THF (5.5 mL) and (iPr)₂NH (1.1 mL) degassed by four freeze vacuum argon cycles was transferred via cannula. The resulting solution was stirred at room temperature for 18 h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography on silica gel (DCM / pyridine 1% / MeOH 0 to 2%) followed by size exclusion chromatography (Bio-Beads S-X1, DCM / pyridine 1%). Compound **13** was obtained as brown-green solid in 50% yield (81 mg).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/pyridine, 295 K): δ(ppm) = 1.52 (s, 18H, Boc), 3.26 (s, 12H, H1), 3.30 (s, 3H, H25) 3.36 (s, 3H, H20), 3.41-3.46 (m, 10H, H24, H2), 3.48-3.50 (m, 2H, H19), 3.51-3.53 (m, 2H, H23), 3.57-3.59 (m, 10H, H18, H3), 3.64-3.66 (m, 8H, H4), 3.73-3.76 (m, 10H, H22, H5), 3.80-3.82 (m, 2H, H17), 3.89-3.91 (m, 8H, H6), 3.96-3.98 (m, 2H, H21), 4.03-4.05 (m, 2H, H16), 4.27-4.29 (m, 8H, H7), 6.91 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, o), 7.33 (d, *J* = 1.9 Hz, 4H, p), 7.49 (m, 3H, mpx, ppx), 7.74 (m, 3H, o'', p''), 7.76 (br, 2H, NH), 7.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, opx), 8.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, o'), 8.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, m'), 8.86 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 8.91 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 9.62 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4), 9.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4).

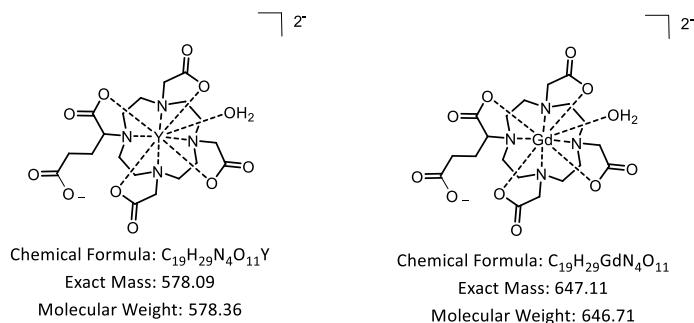
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/pyridine, 295 K): δ(ppm) = 28.41, 42.04, 42.40, 58.98, 59.06, 59.15, 67.78, 68.89, 69.06, 69.85, 70.47, 70.56, 70.66, 70.87, 71.84, 71.88, 80.44, 92.86, 95.93, 96.39, 96.70, 99.95, 100.96, 101.40, 109.81, 110.06, 114.74, 115.75, 122.36, 123.71, 125.17, 127.31, 127.37, 128.01, 128.82, 129.35, 129.68, 130.43, 130.93, 131.22, 131.66, 132.43, 132.66, 135.73, 135.92, 139.91, 144.50, 148.38, 149.72, 149.79, 149.83, 152.03, 152.08, 152.96, 157.83, 162.97, 163.08.

ES-MS: *m/z* (%) 1031.91 (100) [M+2Na⁺]/2 (calcd 1031.90 for [C₁₀₈H₁₂₈N₈O₂₆ZnNa₂]).

128.02, 128.84, 129.37, 129.69, 130.43, 130.87, 131.24, 131.67, 132.37, 132.66, 135.74, 135.94, 144.51, 147.83, 148.39, 149.80, 149.82, 152.04, 152.13, 157.84, 162.99, 163.10.

HR ES-MS: m/z (%) 1841,689 (100) [M+Na⁺] (calcd 1841.709 for [C₉₈H₁₁₂N₈Na₁O₂₂Zn₁]).

Complex 15 and 16



DOTAGA anhydride (35 mg, 74 μmol) was dissolved in H₂O (2 mL) and stirred for 2 h at room temperature. A slight excess of an aqueous solution of MCl₃ (1.33 mL, 78,9 μmol) was added and the pH of the solution was adjusted to 6.5. The solution was then stirred at 50°C overnight. The pH was checked (pH = 6.3) and the solvents were removed under reduced pressure to give a solid.

[YDOTAGA]²⁻ :

HR ES-MS : m/z (%) 561.0881 (100) [M-H₂O+H]⁻ (calcd 561.0869 for [C₁₉H₂₈YN₄O₁₀]⁻, 100%)

[GdDOTAGA]²⁻ :

HR ES-MS : m/z (%) 630.1293 (100) [M-H₂O+H]⁻ (calcd 630.1056 for [C₁₉H₂₈GdN₄O₁₀]⁻, 100%)

= 8.3 Hz, 2H, o'), 8.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, m'), 8.89 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py2 or py3), 8.90 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py2 or py3), 9.60 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py1 or py4), 9.72 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py1 or py4), 10.37 (br, 2H, amide).

HR ES-MS: m/z (%) 1452.4280 (100) [M^2]/2 (calcd 1452.4361 for [$C_{136}H_{164}N_{16}O_{40}Y_2Zn$]).

DPP-ZnP-(GdDOTAGA)₂ :

Yield: 56 %

UV-Vis (DMSO): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 456 (5.25), 517sh, 589sh, 617sh, 668 nm (4.72).

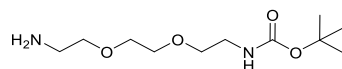
(H₂O): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 455 (5.25), 540sh, 670 nm (4.72).

HR ES-MS: m/z (%) 1521,4408 (100) [M^2]/2 (calcd 1521.4543 for [$C_{136}H_{164}N_{16}O_{40}Gd_2Zn$]).

ICP-AES: Gd = 1.1 (± 0.1) mmol/kg, Zn = 0.58 (± 0.04) mmol/kg

Chapitre 4

Compound 18¹⁴¹

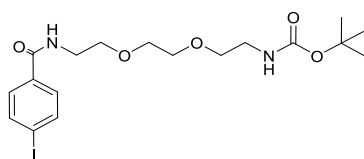


Chemical Formula: $C_{11}H_{24}N_2O_4$
Exact Mass: 248.17
Molecular Weight: 248.32

To a solution of 2,2'-(ethylenedioxy)-bis(ethylamine) (7.40 mg, 49.93 μ mol) dissolved in anhydrous $CHCl_3$ (50 mL), cooled to 0°C and under argon was added dropwise di-*tert*-butyldicarbonate (Boc_2O) (1.07g, 4.90 μ mol) in anhydrous $CHCl_3$ (25 mL). The solution was stirred at room temperature and under Argon for 24 h. The solvent was evaporated under vacuum and the resulting oil was taken up in CH_2Cl_2 (50 mL). The organic layer was successively washed with saturated aqueous NaCl (2 x 25 mL), water (25 mL) and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent were evaporated under reduced pressure to give pale oil (1.17 g, 96%).

¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm) = 1.44 (s, 9H, H_tbu), 2.88 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.32 (td, $J = 5.0, 5.5$ Hz, 2H), 3.50-3.56 (m, 4H), 3.62 (m, 4H), 5,13 (Br, 1H, NH).

Compound 19

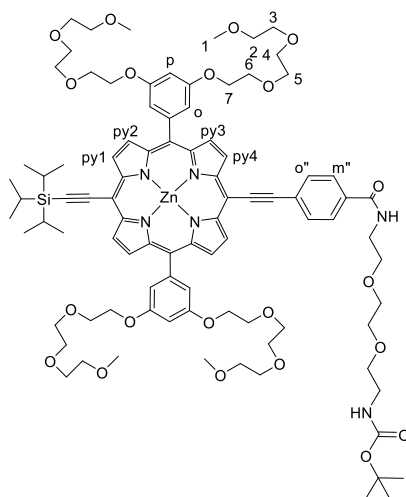


Chemical Formula: $C_{18}H_{27}IN_2O_5$
Exact Mass: 478.10
Molecular Weight: 478.33

To a solution of 4-iodobenzoic acid (154 mg, 0.62 mmol) dissolved in anhydrous DMF (3 mL) were added TBTU (214 mg, 0.66 mmol) followed by DIPEA (230 μ L, 1.35 mmol). A solution of **18** (157 mg, 0.63 mmol) dissolved in anhydrous DMF (1.5 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 h. The solvents were removed under vacuum and the residue dissolved in CH_2Cl_2 (40 mL). The organic phase was washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (40 mL), HCl 2M (40 mL) and H_2O (25 mL). Finally the product was purified by flash chromatography on silica gel (DCM / MeOH 0 to 5%) to give a pale yellow oil (247 mg, 83 %).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 333 K): 1.45 (s, 9H, Boc), 3.29 (td, $J = 5.8, 5.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.55 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.62-3.70 (m, 8H, CH_2), 7.54 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, aromatic), 7.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, aromatic).

Compound 20



Chemical Formula: $C_{91}H_{122}N_6O_{21}SiZn$
Exact Mass: 1726.77
Molecular Weight: 1729.46

TIPS-ZnP-H 9 (100 mg, 72.51 μ mol), $Pd(PPh_3)_4$ (8.8 mg, 7.62 μ mol), CuI (1.38 mg, 7.25 μ mol) and the compound **19** (35 mg, 73.17 μ mol) were dried under vacuum for 1 h at 40 $^\circ$ C. The system was flushed with argon and a solution of dry THF (5 mL) and $(iPr)_2NH$ (1 mL) degassed by four freeze vacuum argon cycles was transferred via cannula. The resulting solution was stirred at room temperature overnight. The solvents were evaporated under reduced pressure and the product was purified by chromatography on silica gel (DCM/MeOH 1.5 to 3.5%) followed by

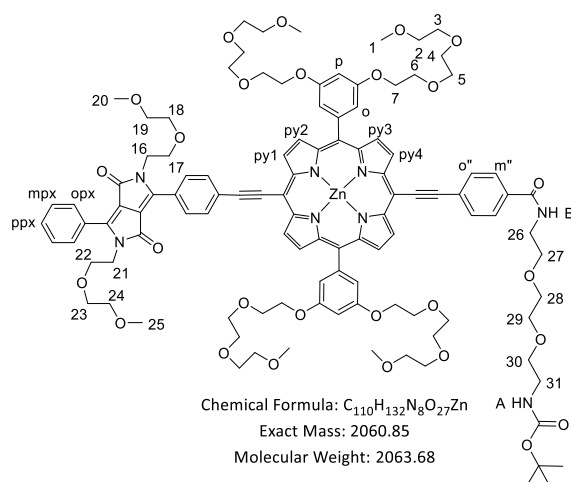
size exclusion chromatography (Bio-Beads S-X1) with DCM/pyridine 1%. The compound **20** was obtained as a green solid in 82 % yield (102 mg).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridine}$, 297 K) : δ (ppm) = 1.38 (m, 30H, TIPS, Boc), 3.26 (s, 12H, H1), 3.31 (m, 2H, CH_2), 3.41-3.48 (m, 8H, CH_2), 3.51-3.60 (m, 10H, CH_2), 3.60-3.67 (m, 12H, CH_2), 3.67-3.76 (m, 12H, CH_2), 3.89 (m, 8H, CH_2), 4.26 (m, 8H, CH_2), 6.89 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H, p), 7.31 (d, $J = 2.2$ Hz, 4H, o), 7.99 (m, 4H, o'', m''), 8.89 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H, pyr), 8.91 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H, pyr), 9.62 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H, pyr), 9.64 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H, pyr).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridine}$) : $\delta = 11.91, 19.12, 28.44, 39.89, 40.32, 58.99, 67.75, 69.83, 70.19, 70.27, 70.55, 70.65, 70.86, 71.88, 79.35, 97.68, 100.86, 101.37, 110.05, 114.73, 122.19, 123.68, 127.43, 130.52, 130.94, 131.47, 132.53, 135.91, 144.46, 149.66, 149.73, 149.89, 151.93, 152.42, 157.80$.

ESI-MS : m/z (%) 1726.77 (100) $[\text{M}]^+$ (calcd 1726.77 for $[\text{C}_{91}\text{H}_{122}\text{N}_6\text{O}_{21}\text{SiZn}]^+$).

Compound 21



TBAF, $3\text{H}_2\text{O}$ (16 mg, 50.71 μmol) was dissolved in anhydrous THF (1 mL) and added to a solution of **20** (97 mg, 56.09 μmol) dissolved in anhydrous THF (30 mL). The resulting solution was stirred at room temperature and under argon for 30 min. CaCl_2 (140 mg, 1.26 mmol) was added to quench the reaction. Finally the solvent were evaporated and CaCl_2 was removed by silica column (DCM / MeOH 5%). Due to its instability, the deprotected compound obtained as a green solid was rapidly used for the next reaction. The deprotected compound (87 mg, 55.30 μmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (9 mg, 7.79 μmol), CuI (4 mg, 21 μmol) and DPP-Br (37.4 mg, 65.45 μmol) were dried under vacuum for 45 min at 40°C . The system was flushed with argon and a

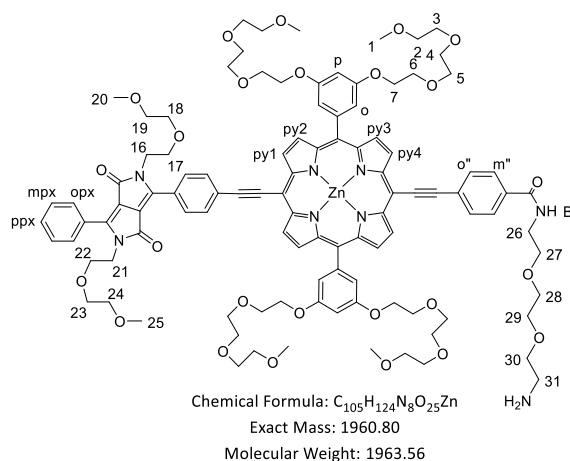
solution of dry THF (5 mL) and (iPr)₂NH (1 mL) degassed by four freeze vacuum argon cycles was transferred via cannula. The resulting solution was stirred at room temperature for one night. The solvents were evaporated under reduced pressure and the product was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH 2.5 to 4%). **21** was obtained as brown-green solid in 52% yield (59 mg).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/pyridine, 295 K): δ(ppm) = 1.42 (s, 9H, Boc), 3.29 (s, 12H, 1), 3.33 (s, 3H, H25), 3.34 (m, 2H, H31), 3.39 (s, 3H, H20), 3.43-3.50 (m, 10H, H2, H24), 3.50-3.53 (m, 2H, H19), 3.53-3.64 (m, 14H, H3, H18, H23, H30), 3.64-3.70 (m, 12H, H4, H28, H29), 3.70-3.74 (m, 4H, H26, H27), 3.74-3.79 (m, 10H, H5, H20), 3.83 (m, 2H, H21), 3.92 (m, 8H, H6), 4.06 (m, 2H, H16), 4.31 (m, 8H, H7), 5.13 (br, 1H, HA), 6.93 (t, *J* = 1.9 Hz, 2H, p), 7.10 (br, 1H, HB), 7.36 (d, *J* = 1.9 Hz, o), 7.51 (m, 3H, mpx, ppx), 7.99 (m, 4H, o'', m''), 8.04 (m, 2H, opx), 8.12 (d, *J* = 8.2 Hz, o'), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, p'), 8.93 (d, *J* = 4.4 Hz, py2 or py3), 8.94 (d, *J* = 4.4 Hz, py2 or py3), 9.66 (d, *J* = 4.4 Hz, py1 or py4), 9.67 (d, *J* = 4.4 Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/pyridine) δ(ppm) = 28.45, 29.70, 39.90, 40.33, 42.03, 42.40, 59.00, 59.06, 59.16, 67.77, 68.88, 69.04, 69.84, 70.19, 70.28, 70.46, 70.55, 70.66, 70.87, 71.83, 71.88, 79.36, 95.54, 95.86, 96.09, 96.53, 100.42, 100.91, 109.79, 110.06, 114.74, 122.53, 127.20, 127.42, 127.98, 128.82, 129.34, 129.67, 130.58, 130.61, 131.23, 131.49, 131.68, 132.65, 132.69, 133.75, 135.91, 144.38, 148.33, 149.25, 149.86, 151.99, 152.06, 156.02, 157.84, 162.96, 163.06, 166.93.

ES-MS : m/z (%) 1053.41 (100) [M+2Na]²⁺/2 (calcd 1053.41 for [C₁₁₀H₁₃₂N₈O₂₇ZnNa₂]²⁺/2).

Compound 22



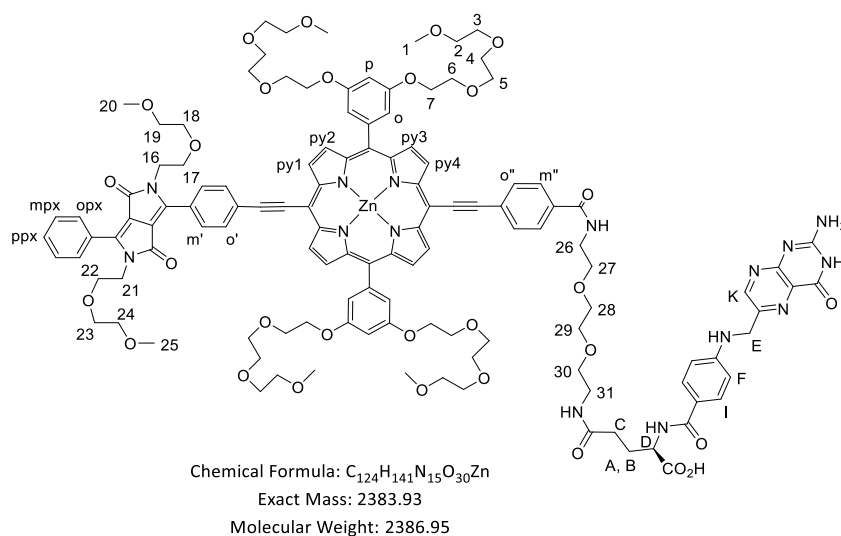
To a solution of **21** (47 mg, 22.77 μmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) cooled to 0°C was added dropwise TFA (0.5 mL, 6.53 mmol). The solution was stirred for 4h at room temperature and washed with H_2O (15 mL) followed by a saturated solution of Na_2CO_3 (15 mL). The solvents were dried with anhydrous Na_2SO_4 and evaporated under reduced vacuum. To the resulting solid dissolved in CHCl_3 (10 mL) was added dropwise a solution of $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (15.70 mg, 71.53 μmol) dissolved in MeOH (0.5 mL). The solution was stirred at 45°C for one night and the solvents were evaporated under reduced pressure. The solid was redissolved in CH_2Cl_2 (20 mL) and washed with a saturated solution of NaCl (20 mL) followed by H_2O (20 mL). The organic phase was dried with anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was evaporated under reduced pressure. **22** was obtained as a brown-green solid in 97% yield (43.2 mg).

^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridine}$, 295 K): $\delta(\text{ppm}) = 3.27$ (s, 12H, H1), 3.30 (s, 3H, H25), 3.36 (s, 3H, H20), 3.41-3.47 (m, 12H, H2, H24, H31), 3.47-3.54 (m, 6H, H19, H23, H30), 3.57-3.62 (m, 12H, H3, H18, H29), 3.62-3.68 (m, 10H, H4, H28), 3.67-3.71 (m, 4H, H26, H27), 3.71-3.77 (m, 10H, H5, H22), 3.81 (m, 2H, H17), 3.90 (m, 8H, H6), 3.97 (m, 2H, H21), 4.04 (m, 2H, H16), 4.28 (m, 8H, H7), 6.92 (t, $J = 1.9$ Hz, 2H, p), 7.34 (d, $J = 1.9$ Hz, o), 7.48 (m, 3H, mpx, ppx), 7.97 (m, 4H, o'', m''), 8.04 (m, 2H, opx), 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, o'), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, m'), 8.91 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py2 or py3), 8.93 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py2 or py3), 9.64 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py1 or py4), 9.66 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, py1 or py4).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridine}$) δ 14.1, 22.7, 29.3, 29.7, 31.9, 39.9, 41.5, 42.0, 42.4, 59.0, 59.0, 59.1, 67.8, 68.9, 69.0, 69.8, 70.1, 70.3, 70.4, 70.5, 70.6, 70.8, 71.9, 72.9, 95.6, 95.8, 96.1, 96.5, 100.4, 100.9, 109.8, 110.0, 114.7, 122.5, 127.2, 127.4, 127.5, 128.0, 128.8, 129.3, 129.7, 130.6, 131.2, 131.4, 131.7, 132.7, 133.9, 144.3, 148.3, 149.9, 152.0, 152.1, 157.8, 162.9, 163.0, 167.0.

ES-MS : m/z (%) 992.38 (100) $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}/2$ (calcd 992.40 for $[\text{C}_{105}\text{H}_{125}\text{N}_8\text{O}_{25}\text{ZnNa}]^{2+}/2$).

DPP-ZnP-FA 23¹⁸²



To a solution of folic acid (5.40 mg, 12.22 μmol) in DMSO (2 mL) and DMF (2 mL) cooled to 0°C was added N-methylmorpholine (3 μL , 27.23 μmol) and TBTU (3.81 mg, 11.86 μmol). The solution was stirred at 0°C for 1h. **22** (24 mg, 12.22 μmol) in DMF (2 mL) was added and the solution was stirred 20 h at room temperature. The reaction was put in Et₂O and the precipitated solid washed with Et₂O, H₂O and CH₃CN. Finally the solid was purified by a C18 prep HPLC column (0,1 M Ammonia acetate (pH=7.2) / CH₃CN 95/5 for 5 min then a linear gradient until 30/70 in 25 min followed by 30/70 for 30 min) and the salts removed with water to give a brown-green solid in 35% yield (yield was estimated using the neutral form)(10.3 mg).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (log ϵ) = 457 (5.38), 522sh, 592sh, 617sh, 668 nm (4.79).

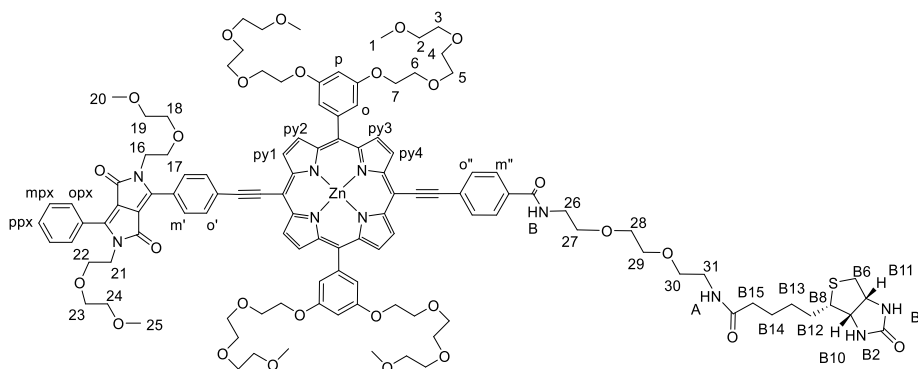
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 350 K): δ (ppm) = 1.94 (m, 1H, A), 2.03 (m, 1H, B), 2.17-2.31 (m, 2H, C), 3.21 (s, 12H, H1), 3.23 (s, 3H, H25), 3.27 (s, 3H, H20), 3.35-3.72 (m, 56H, O-CH₂) 3.85-3.92 (m, 8H, H6), 3.94 (m, 2H, H21), 4.02 (m, 2H, H16), 4.33-4.43 (m, 9H, H7, D), 4.48 (m, 2H, E), 6.68 (d, J = 8.3 Hz, 2H, F), 7.05 (t, J = 2.2Hz, 2H, p), 7.37 (d, J = 2.2 Hz, 4H, o), 7.61 (m, 4H, mpx, ppx), 7.68 (d, J = 8.3 Hz, 2H, l), 7.96 (m, 2H, opx), 8.09-8.20 (m, 4H, o", m"), 8.22 (d, J = 8.2 Hz, 2H, o'), 8.28 (d, J = 8.2 Hz, 2H, m'), 8.63 (s, 1H, K), 8.93 (d, J = 4.7 Hz, 2H, py2 or py3), 8.94 (d, J = 4.7 Hz, 2H, py2 or py3), 9.73 (d, J = 4.7 Hz, 2H, py1 or py4), 9.74 (d, J = 4.7 Hz, 2H, py1 or py4).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO, 298 K) δ (ppm) = 27.5, 28.7, 29.5, 31.2, 39.0, 41.8, 42.0, 46.3, 58.5, 58.6, 58.6, 68.1, 68.3, 68.5, 69.4, 69.4, 69.5, 70.0, 70.1, 70.3, 70.5, 71.6, 71.7, 71.7, 95.1, 95.2,

96.1, 96.4, 96.6, 100.2, 100.5, 101.2, 109.3, 109.7, 111.6, 111.7, 114.7, 123.0, 126.2, 126.3, 128.1, 128.2, 128.3, 129.2, 129.5, 130.1, 131.4, 131.8, 132.1, 133.3, 134.5, 144.1, 148.0, 149.2, 149.7, 149.8, 151.2, 151.8, 151.8, 158.2, 162.3, 166.1, 166.7.

HR ES-MS : m/z (%) 2384.9311 (100) $[M+H]^+$ (calcd 2384.9333 for $[C_{124}H_{142}N_{15}O_{30}Zn]^+$).

DPP-ZnP-Biotine 24



Chemical Formula: $C_{115}H_{138}N_{10}O_{27}SZn$

Exact Mass: 2186,87

Molecular Weight: 2189,85

D-Biotin (3.7 mg, 15 μ mol) and TBTU (4.3 mg, 13 μ mol) were dissolved in DMF (2 mL) and the solution was stirred at room temperature for 15 min. A solution of **22** (20 mg, 10.19 μ mol) in DMF (3 mL) was added dropwise and the solution was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 0 to 8%) followed by a C18 prep HPLC column (H_2O/CH_3CN , 50/50 to 30/70 in 30 min followed by 30/70 for 30 min at a flow rate of 2 mL/min) to give a brown-green solid in 82% yield (18 mg).

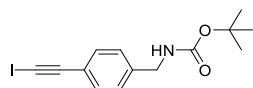
UV-Vis (DCM): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 455 (5.31), 520sh, 592sh, 620sh, 666 nm (4.76).

(DMSO): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 456 (5.32), 520sh, 596sh, 620 sh, 670 nm (4.79).

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, 298 K): δ (ppm) = 1.18-1.35 (m, 2H, B12 or B13 or B14), 1.36-1.64 (m, 4H, B12 or B13 or B14), 2.07 (m, 2H, B15), 2.53 (m, 1H, B6), 2.75 (m, 1H, B6), 3.03 (m, 1H B8), 3.17 (s, 12H, H1), 3.19 (s, 3H, H25), 3.23 (s, 3H, H20), 3.26-3.66 (m, 56H, O-CH₂), 3.84 (m, 8H, H6), 3.91 (m, 2H, H21), 3.99 (m, 2H, H16), 4.06 (m, 1H, B10), 4.22 (m, 1H, B11), 4.33 (m, 8H, H7), 6.30 (s, 1H, B4), 6.37 (s, 1H, B2), 7.04 (t, J = 1.9 Hz, 2H, p), 7.35 (d, J = 1.9 Hz, 4H, o), 7.60 (m, 3H, mpx, ppx), 7.83 (m, 1H, HA), 7.96 (m, 2H, opx), 8.10 (d, J = 8.2 Hz, 2H, o',), 8.21 (m, 4H, o'', m''), 8.29 (d, J = 8.2 Hz, 2H, m'), 8.75 (m, 1H, HB), 8.91 (d, J = 4.4 Hz, 2H, py2

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K) δ(ppm) = 1.44 (s, 21H, TIPS), 2.86 (s, 12H, H1), 3.03 (m, 8H, H2), 3.24 (m, 8H, H3), 3.30 (s, 3H, H25), 3.36 (s, 3H, H20), 3.42 (m, 2H, H24), 3.45-3.60 (m, 14H, H4, H18, H19, H23), 3.64-3.76 (m, 10H, H5, H22), 3.82 (m, 2H, H17), 3.84-3.94 (m, 10H, H6, H21) 4.05 (m, 2H, H16), 4.30 (m, 8H, H7), 6,91 (t, *J* = 2.2 Hz, 2H, p), 7.42 (d, *J* = 2.2 Hz, 4H, o), 7.54 (m, 3H, mpx, ppx), 7.97 (m, 2H, opx), 8.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, o'), 8.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, m'), 8.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 8.99 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py2 or py3), 9.69 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4), 9.71 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, py1 or py4).

Compound 26²¹⁰

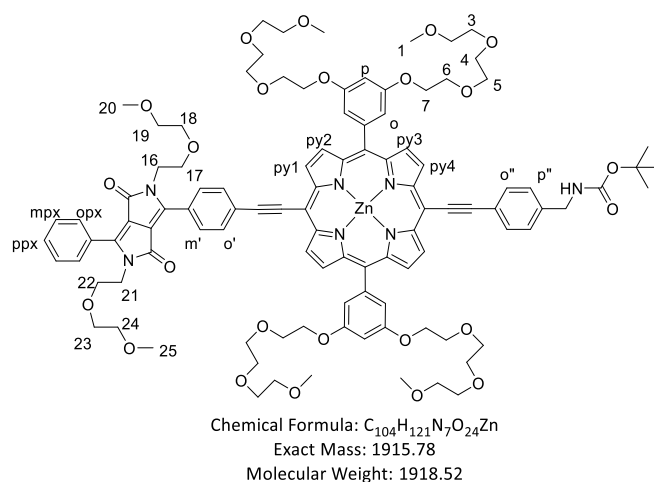


Chemical Formula: C₁₄H₁₆INO₂
 Exact Mass: 357,02
 Molecular Weight: 357,19

To a suspension of 4-iodobenzylamine (300 mg, 1.29 mmol) in CHCl₃ (6 mL) and Net₃ (350 μL) cooled to 0°C was added dropwise a solution of Boc₂O (295 mg, 1.35 mmol) in CHCl₃ (6 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3h. The solvents were evaporated under reduced pressure and the product was purified by column chromatography on silica gel (DCM) to give a white solid in 76 % yield (326 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ(ppm) = 1,46 (s, 9H, HtBu), 4,25 (d, *J*=5,6 Hz, 2H, Ar-CH₂), 4,82 (s br, 1H, N-H), 7,03 (d, *J*=8,3Hz, 2H, Ar-H), 7,65 (d, *J*=8,3Hz, 2H, Ar-H).

DPP-ZnP- NHBoc 27¹²¹



To a solution of **DPP-ZnP 25** (70 mg, 37 μ mol) in THF (10 mL) was added TBAF (14.8 mg, 47 μ mol) dissolved in THF (1 mL). The solution was stirred at room temperature and under argon for 30 min. CaCl₂ (83 mg, 749 μ mol) was added and the solvents removed. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM / MeOH 3%) to give a brown-green solid and was rapidly used for the next reaction. **DPP-ZnP-H, 26** (11.8 mg, 35 μ mol), Pd(PPh₃)₄ (9.3 mg, 8 μ mol) and CuI (1.5 mg, 8 μ mol) were dried under vacuum at 40 °C for 1h and a solution of THF (5 mL) and NH(iPr)₂ (1 mL) degassed by four freeze-thaw cycles was transferred *via* canula. The reaction mixture was stirred one night at room temperature and the solvents were evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM/1% pyridine/MeOH, 0 to 3 %) to give a brown-green solid in 81 % yield (57 mg, 30 μ mol).

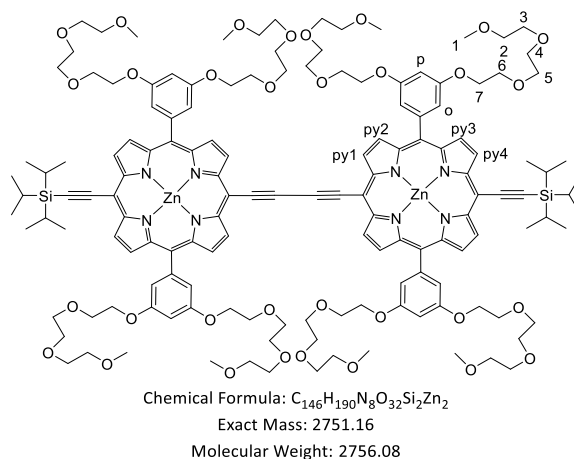
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃ + pyridine-d₅, 298K) : δ (ppm) = 1.50 (s, 9H, H10), 3.30 (s, 12H, H1), 3.33 (s, 3H, H25), 3.39 (s, 3H, H20), 3.44-3.50 (m, 10H, H24, H2), 3.55-3.57 (m, 4H, H23, H19), 3.60-3.63 (m, 10H, H3, H18), 3.66-3.70 (m, 8H, H4), 3.74-3.79 (m, 10H, H22, H5), 3.82-3.85 (m, 2H, H17), 3.92-3.95 (m, 8H, H6), 3.98-4.02 (m, 2H, H21), 4.04-4.08 (m, 2H, H16), 4.29-4.33 (m, 8H, H7), 4.42 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H8), 5.20 (br s, 1H, H9), 6.93 (t, J = 2.1 Hz, 2H, p), 7.36 (d, J = 2.2 Hz, 4H, o), 7.45 (d, J = 8.2 Hz, 2H, o''), 7.51-7.53 (m, 3H, mpx, ppx), 7.96 (d, J = 8.3 Hz, 2H, m''), 7.98-8.01 (m, 2H, opx), 8.13 (d, J = 8.5 Hz, 2H, o'), 8.23 (d, J = 8.4 Hz, 2H, m'), 8.91 (d, J = 4.6 Hz, 2H, py2 or py3), 8.94 (d, J = 4.6 Hz, 2H, py2 or py3), 9.66 (d, J = 4.6 Hz, 2H, py1 or py4), 9.67 (d, J = 4.6 Hz, 2H, py1 or py4).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + pyridine-d₅, 298K) : δ(ppm) = 3.30 (s, 12H, H1), 3.33 (s, 3H, H25), 3.39 (s, 3H, H20), 3.45-3.49 (m, 10H, H2, H24), 3.51-3.53 (m, 2H, H19), 3.54-3.56 (m, 2H, H23), 3.59-3.62 (m, 10H, H18, H3), 3.67-3.69 (m, 8H, H4), 3.76-3.78 (m, 12H, H8, H5, H22), 3.82-3.85 (m, 2H, H17), 3.92-3.94 (m, 8H, H6), 3.99-4.01 (m, 2H, H21), 4.05-4.07 (m, 2H, H16), 4.30-4.32 (m, 8H, H7), 6.93 (br s, 2H, p), 7.36-7.38 (m, 6H, o, m''), 7.50-7.53 (m, 3H, mpx, ppx), 7.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, o'), 7.99-8.00 (m, 2H, opx), 8.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, o'), 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, m'), 8.91 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, py2 or py3), 8.94 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, py2 or py3), 9.66 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, py1 or py4), 9.67 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, py1 or py4).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + pyridine-d₅, 298K) : δ(ppm) = 42.08, 42.44, 46.12, 59.06, 59.13, 59.23, 67.81, 68.93, 69.10, 69.90, 70.51, 70.60, 70.71, 70.92, 71.88, 71.93, 93.14, 96.00, 96.34, 96.71, 100.00, 100.95, 101.56, 109.84, 110.09, 114.78, 122.42, 122.77, 123.47, 127.34, 127.40, 128.03, 128.89, 129.41, 129.73, 130.53, 130.80, 131.29, 131.73, 131.77, 132.51, 132.74, 143.07, 144.52, 148.42, 149.29, 149.48, 149.76, 149.87, 152.00, 152.18, 157.88, 163.02, 163.13.

HR ES-MS : *m/z* (%) 1818.7247 (100) [M+H]⁺ (calcd 1818.7323 for [C₉₉H₁₁₄N₇O₂₂Zn]⁺).

TIPS-ZnP-ZnP-TIPS 29²⁰⁴



To a solution of **TIPS-ZnP-H 9** (60 mg, 43.5 μmol) in THF (10 mL) and NH(iPr)₂ (4 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (5 mg, 4.4 μmol), CuI (6.2 mg, 32.6 μmol) and benzoquinone (9.4 mg, 87 μmol). The solution was stirred at room temperature for 2h and the solvents were removed. The residue was purified by column chromatography on silica gel (DCM / 1% pyridine / MeOH, 1 to 3 %) to give a brown solid in 83 % yield (50 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridine-*d*₅, 298K) : δ(ppm) = 1.41-1.46 (m, 42H, TIPS), 3.29 (s, 24H, H1), 3.46-3.49 (m, 16H, H2), 3.60-3.63 (m, 16H, H3), 3.66-3.70 (m, 16H, H4), 3.75-3.78 (m, 16H, H5), 3.92-3.95 (m, 16H, H6), 4.29-4.33 (m, 16H, H7), 6.93 (t, *J* = 2.2 Hz, 4H, p), 7.37 (d, *J* = 2.2 Hz, 8H, o), 8.91 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H, py3), 9.00 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H, py2), 9.65 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H, py4), 9.84 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H, py1).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298K) : δ(ppm) = 12.11, 19.33, 59.01, 68.03, 70.06, 70.53, 70.78, 71.01, 71.83, 82.40, 88.39, 98.29, 99.55, 101.31, 102.15, 110.08, 114.93, 122.72, 122.76, 130.99, 131.26, 132.79, 133.15, 136.26, 143.44, 144.53, 149.77, 150.27, 152.57, 153.30, 158.05.

HR ES-MS : *m/z* (%) 2278.140 (100) [M+Na]⁺ (calcd 2278.151 for [C₁₄₆H₁₉₀N₈O₃₂Si₂Zn₂Na]⁺)

Publications et Communications

Publications

Alam, M.M., Bolze, F., Daniel, C., Flamigni, L., Gourlaouen, C., Heitz, V., **Jenni, S.**, Schmitt, J., Sour, A., and Ventura, B. (2016).

π -Extended diketopyrrolopyrrole–porphyrin arrays: one- and two-photon photophysical investigations and theoretical studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 21954–21965.

DOI : 10.1021/acs.inorgchem.6b00381

Sour, A., **Jenni, S.**, Ortí-Suárez, A., Schmitt, J., Heitz, V., Bolze, F., Loureiro de Sousa, P., Po, C., Bonnet, C.S., Pallier, A., (2016).

Four Gadolinium(III) Complexes Appended to a Porphyrin: A water-soluble molecular theranostic agent with remarkable relaxivity suited for MRI tracking of the photosensitizer. *Inorg. Chem.*, 4545–4554.

DOI : 10.1039/c6cp01844k

Schmitt, J.; Heitz, V.; **Jenni, S.**; Sour, A.; Bolze, F.; Ventura, B. (2017).

π -extended porphyrin dimers as efficient near-infrared emitters and two-photon absorbers. *Supramol. Chem.*, 769–775.

DOI : 10.1080/10610278.2017.1377837

Bolze, F.; **Jenni, S.**; Sour, A.; Heitz, V. (2017).

Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, 12857-12877.

DOI : 10.1039/C7CC06133A

Communications

Orales

Titre: Synthèse d'un agent bimodal actif en thérapie photodynamique biphotonique et en imagerie par résonance magnétique.

Journées scientifiques de l'UMR, Strasbourg, 29 – 30 octobre 2015

Titre : Two-photon PDT sensitizer combined to MRI contrast agents or to folic acid: towards a molecular theranostic agent.

New chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy, Le Bono, 21 – 24 septembre 2016

Titre : Composés bifonctionnels pour des applications théranostiques

Journée des doctorants, Strasbourg, 2 novembre 2016

Titre : Bifunctional compounds for theranostic applications

Journées scientifiques de l'UMR 7199, Illkirch, 15 décembre 2016

Par affiches

Titre : Two-photon PDT sensitizer combined to MRI contrast agents or to folic acid: towards a molecular theranostic agent.

Forum BioChem, Illkirch, 2 – 3 juin 2016

Titre : Two-photon PDT sensitizer combined to MRI contrast agents or to folic acid: towards a molecular theranostic agent.

MiFoBio 2016, Seignosse, 30 septembre - 6 octobre 2016

Titre : A π -extended porphyrin linked to two gadolinium complexes for theranostic applications

International Photodynamix Association World Congress, Coimbra (Portugal), 8 – 13 juin 2017

Références

- 1 R. R. Allison, H. C. Mota and C. H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 263–277.
- 2 N. Finsen, *Lond. Arnold*, 1901.
- 3 O. Rabb, *Z Biol*, 1900, 524–546.
- 4 R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. Childs and C. H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 27–42.
- 5 H. Von Tappeiner and A. Jodblauer, *Arch Klin Med*, 1904, 427–487.
- 6 A. Jodblauer and H. Von Tappeiner, *Münch Med Wochenschr*, 1904, 1139–1141.
- 7 A. Jesionek and H. Von Tappeiner, *Arch Klin Med*, 1905, 223–227.
- 8 R. R. Allison and C. H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, **7**, 61–75.
- 9 T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle and A. Mittleman, *Cancer Res.*, 1978, **38**, 2628–2635.
- 10 T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, **90**, 889–905.
- 11 J. Moan, *Photochem. Photobiol.*, 1986, **43**, 681–690.
- 12 T. J. Dougherty, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 1996, **14**, 219–221.
- 13 J. J. Schuitmaker, P. Baas, H. L. L. M. van Leengoed, F. W. van der Meulen, W. M. Star and N. van Zandwijk, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1996, **34**, 3–12.
- 14 R. R. Allison, V. S. Bagnato, R. Cuenca, G. H. Downie and C. H. Sibata, *Future Oncol.*, 2006, **2**, 53–71.
- 15 A. Martinez De Pinillos Bayona, P. Mroz, C. Thunshelle and M. R. Hamblin, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2017, **89**, 192–206.
- 16 J. D. Knoll and C. Turro, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **282–283**, 110–126.
- 17 T. K. Horne and M. J. Cronjé, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2017, **89**, 221–242.
- 18 A. E. O'Connor, W. M. Gallagher and A. T. Byrne, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 1053–1074.
- 19 E. Panzarini, V. Inguscio, G. M. Fimia and L. Dini, *PLOS ONE*, 2014, **9**, e105778.
- 20 A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung and K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **42**, 77–88.
- 21 J. Fong, K. Kasimova, Y. Arenas, P. Kaspler, S. Lazic, A. Mandel and L. Lilge, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 2014–2023.
- 22 Y. Li, C.-P. Tan, W. Zhang, L. He, L.-N. Ji and Z.-W. Mao, *Biomaterials*, 2015, **39**, 95–104.
- 23 T. A. Theodossiou, J. S. Hothersall, P. A. De Witte, A. Pantos and P. Agostinis, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 1775–1789.
- 24 T. Li, X. Hou, H. Deng, J. Zhao, N. Huang, J. Zeng, H. Chen and Y. Gu, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 972–981.
- 25 H. Abrahamse and M. R. Hamblin, *Biochem. J.*, 2016, **473**, 347–364.
- 26 A. Wagner, U. W. Denzer, D. Neureiter, T. Kiesslich, A. Puespoeck, E. A. J. Rauws, K. Emmanuel, N. Degenhardt, U. Frick, U. Beuers, A. W. Lohse, F. Berr and G. W. Wolkersdörfer, *Hepatol. Baltim. Md*, 2015, **62**, 1456–1465.
- 27 W. M. Chan, T.-H. Lim, A. Pece, R. Silva and N. Yoshimura, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2010, **248**, 613–626.
- 28 R. Biswas, J. H. Moon and J.-C. Ahn, *Photochem. Photobiol.*, 2014, **90**, 1108–1118.

- 29 A.-R. Azzouzi, S. Lebdai, F. Benzaghoul and C. Stief, *World J. Urol.*, 2015, **33**, 937–944.
- 30 R. Saavedra, L. B. Rocha, J. M. Dąbrowski and L. G. Arnaut, *ChemMedChem*, 2014, **9**, 390–398.
- 31 P. Mroz, Y.-Y. Huang, A. Szokalska, T. Zhiyentayev, S. Janjua, A.-P. Nifli, M. E. Sherwood, C. Ruzié, K. E. Borbas, D. Fan, M. Krayner, T. Balasubramanian, E. Yang, H. L. Kee, C. Kirmaier, J. R. Diers, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey and M. R. Hamblin, *FASEB J.*, 2010, **24**, 3160–3170.
- 32 T. J. Kinsella, E. Baron, V. Colussi, K. Cooper, C. Hoppel, S. Ingalls, M. Kenney, X. Li, N. Oleinick, S. Stevens and S. Remick, *Front. Oncol.*, DOI:10.3389/fonc.2011.00014.
- 33 S. B. Brown, E. A. Brown and I. Walker, *Lancet Oncol.*, 2004, **5**, 497–508.
- 34 A. Juzeniene, Q. Peng and J. Moan, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1234–1245.
- 35 M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi and R. K. Pandey, *Chem Soc Rev*, 2011, **40**, 340–362.
- 36 V. Pansare, S. Hejazi, W. Faenza and R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 812–827.
- 37 W. Kaiser and C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.*, 1961, **7**, 229–231.
- 38 F. Helmchen and W. Denk, *Nat. Methods*, 2005, **2**, 932–940.
- 39 M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.*, 1931, **401**, 273–294.
- 40 P. F. Curley, A. I. Ferguson, J. G. White and W. B. Amos, *Opt. Quantum Electron.*, 1992, **24**, 851–859.
- 41 W. R. Zipfel, R. M. Williams and W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1369–1377.
- 42 H. Ftouni, F. Bolze, N. Peyriéras and J.-F. Nicoud, *Disp. Imaging*, 2014, **1**, 131–148.
- 43 M. Sheik-Bahae, A. A. Said, T. H. Wei, D. J. Hagan and E. W. V. Stryland, *IEEE J. Quantum Electron.*, 1990, **26**, 760–769.
- 44 K. Kamada, K. Matsunaga, A. Yoshino and K. Ohta, *JOSA B*, 2003, **20**, 529–537.
- 45 E. W. Van Stryland, D. J. Hagan, O. V. Przhonska, S. R. Marder, S. Webster and L. A. Padilha, *NLOQO*, 2010, **40**, 95–113.
- 46 D. A. Oulianov, I. V. Tomov, A. S. Dvornikov and P. M. Rentzepis, *Opt. Commun.*, 2001, **191**, 235–243.
- 47 C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams and W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**, 10763–10768.
- 48 M. Drobizhev, Y. Stepanenko, Y. Dzenis, A. Karotki, A. Rebane, P. N. Taylor and H. L. Anderson, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 7223–7236.
- 49 N. S. Makarov, M. Drobizhev and A. Rebane, *Opt. Express*, 2008, **16**, 4029–4047.
- 50 C. N. LaFratta, J. T. Fourkas, T. Baldacchini and R. A. Farrer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 6238–6258.
- 51 S. Kawata and Y. Kawata, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 1777–1788.
- 52 W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, 1990, **248**, 73–76.
- 53 B. Goegan, F. Terzi, F. Bolze, S. Cambridge and A. Specht, *ChemBioChem*, DOI: 10.1002/cbic.201700628
- 54 R. Marchesini, E. Melloni, G. Fava, G. Pezzoni, G. Savi, F. Zunino and F. Docchio, *Lasers Surg. Med.*, 1986, **6**, 323–327.
- 55 A. Karotki, M. Khurana, J. R. Lepock and B. C. Wilson, *Photochem. Photobiol.*, 2006, **82**, 443–452.
- 56 M. Khurana, H. A. Collins, A. Karotki, H. L. Anderson, D. T. Cramb and B. C. Wilson, *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**, 1441–1448.
- 57 M. Atif, P. E. Dyer, T. A. Paget, H. V. Snelling and M. R. Stringer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2007, **4**, 106–111.

- 58 T. J. Beck, M. Burkanas, S. Bagdonas, Z. Krivickiene, W. Beyer, R. Sroka, R. Baumgartner and R. Rotomskis, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2007, **87**, 174–182.
- 59 J. Wang, W. Li, H. B. Yu, N. H. Cheung and J. Y. Chen, *Laser Phys.*, 2014, **24**, 035602.
- 60 P. Zhao, P. Chen, G. Tang, J. Liu, L. Lin, P. Guo, Q. Yu, J. Yao, D. Ma, G. Zhang and W. Chen, *Sci. China Ser. B Chem.*, 2008, **51**, 529–538.
- 61 T. Luo, B. C. Wilson and Q.-B. Lu, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014, **132**, 102–110.
- 62 K. S. Samkoe, A. A. Clancy, A. Karotki, B. C. Wilson and D. T. Cramb, *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**, 034025.
- 63 F. Bolze, S. Jenni, A. Sour and V. Heitz, *Chem. Commun.*, 2017, **53**, 12857–12877.
- 64 W. G. Fisher, W. P. Partridge, C. Dees and E. A. Wachter, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **66**, 141–155.
- 65 J. Liu, Y. W. Zhao, J. Q. Zhao, A. D. Xia, L. J. Jiang, S. Wu, L. Ma, Y. Q. Dong and Y. H. Gu, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2002, **68**, 156–164.
- 66 W. Yang, Q. Zou, Y. Zhou, Y. Zhao, N. Huang, Y. Gu and F. Wu, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2011, **222**, 228–235.
- 67 C. Tang, P. Hu, E. Ma, M. Huang and Q. Zheng, *Dyes Pigments*, 2015, **117**, 7–15.
- 68 Q. Zou, H. Zhao, Y. Zhao, Y. Fang, D. Chen, J. Ren, X. Wang, Y. Wang, Y. Gu and F. Wu, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 7949–7958.
- 69 Q. Zou, Y. Fang, Y. Zhao, H. Zhao, Y. Wang, Y. Gu and F. Wu, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 5288–5294.
- 70 R. Chennoufi, H. Bougherara, N. Gagey-Eilstein, B. Dumat, E. Henry, F. Subra, F. Mahuteau-Betzer, P. Tauc, M.-P. Teulade-Fichou and E. Deprez, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 14881–14884.
- 71 R. Chennoufi, H. Bougherara, N. Gagey-Eilstein, B. Dumat, E. Henry, F. Subra, S. Bury-Moné, F. Mahuteau-Betzer, P. Tauc, M.-P. Teulade-Fichou and E. Deprez, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 21458.
- 72 K. Ogawa and Y. Kobuke, *Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2008, **8**, 269–279.
- 73 K. Ogawa and Y. Kobuke, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2241.
- 74 K. Ogawa and Y. Kobuke, *BioMed Res. Int.*, 2013, **2013**, 1–11.
- 75 M. Morisue, K. Ogawa, K. Kamada, K. Ohta and Y. Kobuke, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2121.
- 76 M. K. Kuimova, H. A. Collins, M. Balaz, E. Dahlstedt, J. A. Levitt, N. Sergent, K. Suhling, M. Drobizhev, N. S. Makarov, A. Rebane, H. L. Anderson and D. Phillips, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 889.
- 77 E. Dahlstedt, H. A. Collins, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Khurana, B. C. Wilson, D. Phillips and H. L. Anderson, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 897.
- 78 H. A. Collins, M. Khurana, E. H. Moriyama, A. Mariampillai, E. Dahlstedt, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Drobizhev, V. X. D. Yang, D. Phillips, A. Rebane, B. C. Wilson and H. L. Anderson, *Nat. Photonics*, 2008, **2**, 420–424.
- 79 M. Balaz, H. A. Collins, E. Dahlstedt and H. L. Anderson, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 874–888.
- 80 J. Schmitt, V. Heitz, A. Sour, F. Bolze, H. Ftouni, J.-F. Nicoud, L. Flamigni and B. Ventura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 169–173.
- 81 S. C. Boca, M. Four, A. Bonne, B. van der Sanden, S. Astilean, P. L. Baldeck and G. Lemerrier, *Chem. Commun.*, 2009, 4590.

- 82 K. Qiu, J. Wang, C. Song, L. Wang, H. Zhu, H. Huang, J. Huang, H. Wang, L. Ji and H. Chao, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 18482–18492.
- 83 H. Huang, B. Yu, P. Zhang, J. Huang, Y. Chen, G. Gasser, L. Ji and H. Chao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 14049–14052.
- 84 J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, L. Ji and H. Chao, *Biomaterials*, 2015, **56**, 140–153.
- 85 W. Hu, T. He, R. Jiang, J. Yin, L. Li, X. Lu, H. Zhao, L. Zhang, L. Huang, H. Sun, W. Huang and Q. Fan, *Chem Commun*, 2017, **53**, 1680–1683.
- 86 E. M. Boreham, L. Jones, A. N. Swinburne, M. Blanchard-Desce, V. Hugues, C. Terryn, F. Miomandre, G. Lemerrier and L. S. Natrajan, *Dalton Trans*, 2015, **44**, 16127–16135.
- 87 X. Tian, Y. Zhu, M. Zhang, L. Luo, J. Wu, H. Zhou, L. Guan, G. Battaglia and Y. Tian, *Chem Commun*, 2017, **53**, 3303–3306.
- 88 E. M. Purcell, H. C. Torrey and R. V. Pound, *Phys. Rev.*, 1946, **69**, 37–38.
- 89 F. Bloch, W. W. Hansen and M. Packard, *Phys. Rev.*, 1946, **70**, 474–485.
- 90 R. Damadian, *Science*, 1971, **171**, 1151–1153.
- 91 P. C. Lauterbur, *Nature*, 1973, **242**, 190–191.
- 92 P. Mansfield and P. K. Grannell, *J. Phys. C Solid State Phys.*, 1973, **6**, L422.
- 93 R. Damadian, M. Goldsmith and L. Minkoff, *Physiol. Chem. Phys.*, 1977, **9**, 97–100, 108.
- 94 P. Mansfield and A. Maudsley, *Br J Radiol*, 1977, 188–194.
- 95 T. Ai, J. N. Morelli, X. Hu, D. Hao, F. L. Goerner, B. Ager and V. M. Runge, *Invest. Radiol.*, 2012, **47**, 725–741.
- 96 K. R. Fink and J. R. Fink, *Surg. Neurol. Int.*, 2013, **4**, S209-219.
- 97 R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 901–927.
- 98 M. Bottrill, L. Kwok and N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 557–571.
- 99 S. Aime, M. Botta, M. Fasano and E. Terreno, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, **27**, 19–29.
- 100 J. Kim, Y. Piao and T. Hyeon, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 372–390.
- 101 P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2293–2352.
- 102 P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 512–523.
- 103 E. J. Werner, A. Datta, C. J. Jocher and K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8568–8580.
- 104 M. Rogosnitzky and S. Branch, *Biometals*, 2016, **29**, 365–376.
- 105 M. Port, J.-M. Idée, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou and C. Corot, *BioMetals*, 2008, **21**, 469–490.
- 106 P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček and I. Lukeš, *Dalton Trans.*, 2008, 3027–3047.
- 107 I. Solomon, *Phys. Rev.*, 1955, **99**, 559–565.
- 108 N. Bloembergen, *Phys. Rev.*, 1956, **104**, 1542–1547.
- 109 N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.*, 1957, **27**, 572–573.
- 110 N. Bloembergen and L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.*, 1961, **34**, 842–850.
- 111 J. Costa, É. Tóth, L. Helm and A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 4747–4755.
- 112 J. B. Livramento, L. Helm, A. Sour, C. O’Neil, A. E. Merbach and É. Tóth, *Dalton Trans.*, 2008, 1195–1202.
- 113 L. Moriggi, A. Aebischer, C. Cannizzo, A. Sour, A. Borel, J.-C. G. Bünzli and L. Helm, *Dalton Trans.*, 2009, 2088–2095.
- 114 J. b. Livramento, C. Weidensteiner, M. i. m. Prata, P. r. Allegrini, C. f. g. c. Geraldés, L. Helm, R. Kneuer, A. e. Merbach, A. c. Santos, P. Schmidt and É. Tóth, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2006, **1**, 30–39.

- 115 L. Moriggi, C. Cannizzo, C. Prestinari, F. Berrière and L. Helm, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 8357–8366.
- 116 A. Eggenspiller, C. Michelin, N. Desbois, P. Richard, J.-M. Barbe, F. Denat, C. Licon, C. Gaidon, A. Sayeh, P. Choquet and C. P. Gros, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, **2013**, 6629–6643.
- 117 G. Li, A. Slansky, M. P. Dobhal, L. N. Goswami, A. Graham, Y. Chen, P. Kanter, R. A. Alberico, J. Spornyak, J. Morgan, R. Mazurchuk, A. Oseroff, Z. Grossman and R. K. Pandey, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 32–42.
- 118 L. N. Goswami, W. H. White, J. A. Spornyak, M. Ethirajan, Y. Chen, J. R. Missert, J. Morgan, R. Mazurchuk and R. K. Pandey, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 816–827.
- 119 J. A. Spornyak, W. H. White, M. Ethirajan, N. J. Patel, L. Goswami, Y. Chen, S. Turowski, J. R. Missert, C. Batt, R. Mazurchuk and R. K. Pandey, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 828–835.
- 120 D. Aydın Tekdaş, R. Garifullin, B. Şentürk, Y. Zorlu, U. Gundogdu, E. Atalar, A. B. Tekinay, A. A. Chernonosov, Y. Yerli, F. Dumoulin, M. O. Guler, V. Ahsen and A. G. Gürek, *Photochem. Photobiol.*, 2014, **90**, 1376–1386.
- 121 J. Schmitt, V. Heitz, A. Sour, F. Bolze, P. Kessler, L. Flamigni, B. Ventura, C. S. Bonnet and É. Tóth, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**, 2775–2786.
- 122 P. Ehrlich, *Br. Med. J.*, 1913, **2**, 353–359.
- 123 A. Sudhakar, *J. Cancer Sci. Ther.*, 2009, **1**, 1–4.
- 124 N. Shirasu, S. O. Nam and M. Kuroki, *Anticancer Res.*, 2013, **33**, 2823–2831.
- 125 J. Fang, H. Nakamura and H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, **63**, 136–151.
- 126 K. Greish, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, 2010, **624**, 25–37.
- 127 W. M. Sharman, J. E. van Lier and C. M. Allen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 53–76.
- 128 D. A. James, N. Swamy, N. Paz, R. N. Hanson and R. Ray, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2379–2384.
- 129 E. H. Khan, H. Ali, H. Tian, J. Rousseau, G. Tessier, Shafiullah and J. E. van Lier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1287–1290.
- 130 K. Sato, T. Nagaya, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Theranostics*, 2015, **5**, 698–709.
- 131 M. R. Hamblin and E. L. Newman, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1994, **26**, 45–56.
- 132 G. Garcia, F. Hammerer, F. Poyer, S. Achelle, M.-P. Teulade-Fichou and P. Maillard, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 153–165.
- 133 C. L. Conway, I. Walker, A. Bell, D. J. H. Roberts, S. B. Brown and D. I. Vernon, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**, 290–298.
- 134 P. C. Brooks, R. A. Clark and D. A. Cheresh, *Science*, 1994, **264**, 569–571.
- 135 N. Gonen and Y. G. Assaraf, *Drug Resist. Updat.*, 2012, **15**, 183–210.
- 136 Y. G. Assaraf, C. P. Leamon and J. A. Reddy, *Drug Resist. Updat.*, 2014, **17**, 89–95.
- 137 N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low and C. P. Leamon, *Anal. Biochem.*, 2005, **338**, 284–293.
- 138 C. Muller, *Curr. Pharm. Des.*, 2012, **18**, 1058–1083.
- 139 C. Chen, J. Ke, X. E. Zhou, W. Yi, J. S. Brunzelle, J. Li, E.-L. Yong, H. E. Xu and K. Melcher, *Nature*, 2013, **500**, 486–489.
- 140 C. Müller, *Molecules*, 2013, **18**, 5005–5031.
- 141 R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.-F. Müller and M. Barberi-Heyob, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2799–2808.
- 142 J. Gravier, R. Schneider, C. Frochot, T. Bastogne, F. Schmitt, J. Didelon, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3867–3877.

- 143 A. Stallivieri, L. Colombeau, G. Jetpisbayeva, A. Moussaron, B. Myrzakhmetov, P. Arnoux, S. Acherar, R. Vanderesse and C. Frochot, *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, **25**, 1–10.
- 144 Y.-W. Zheng, S.-F. Chen, B.-Y. Zheng, M.-R. Ke and J.-D. Huang, *Chem. Lett.*, 2014, **43**, 1701–1703.
- 145 M.-R. Ke, S.-L. Yeung, D. K. P. Ng, W.-P. Fong and P.-C. Lo, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 8475–8483.
- 146 A. M. Gazzali, M. Lobry, L. Colombeau, S. Acherar, H. Azaïs, S. Mordon, P. Arnoux, F. Baros, R. Vanderesse and C. Frochot, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, **93**, 419–430.
- 147 J. Zempleni, S. S. K. Wijeratne and Y. I. Hassan, *BioFactors*, 2009, **35**, 36–46.
- 148 A. D. Vadlapudi, R. K. Vadlapatla and A. K. Mitra, *Curr. Drug Targets*, 2012, **13**, 994–1003.
- 149 L. Bildstein, C. Dubernet and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, **63**, 3–23.
- 150 G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice and D. Nowotnik, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1625–1633.
- 151 I. Ojima, E. S. Zuniga, W. T. Berger and J. D. Seitz, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 33–50.
- 152 D. Jung, S. Maiti, J. H. Lee, J. H. Lee and J. S. Kim, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3044–3047.
- 153 S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong and I. Ojima, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 979–987.
- 154 W. X. Ren, J. Han, S. Uhm, Y. J. Jang, C. Kang, J.-H. Kim and J. S. Kim, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 10403–10418.
- 155 M. Gangopadhyay, T. Singh, K. K. Behara, S. Karwa, S. K. Ghosh and N. D. P. Singh, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 1329–1336.
- 156 K. Li, L. Qiu, Q. Liu, G. Lv, X. Zhao, S. Wang and J. Lin, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2017, **174**, 243–250.
- 157 J. R. Starkey, A. K. Rebane, M. A. Drobizhev, F. Meng, A. Gong, A. Elliott, K. McInnerney and C. W. Spangler, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 6564–6573.
- 158 K. Kamada, C. Hara, K. Ogawa, K. Ohta and Y. Kobuke, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 7988.
- 159 B. S. Wang, J. Wang and J.-Y. Chen, *J Mater Chem B*, 2014, **2**, 1594–1602.
- 160 K. Susumu and M. J. Therien, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8550–8552.
- 161 J. M. Lupton, L. R. Hemingway, I. D. W. Samuel and P. L. Burn, *J. Mater. Chem.*, 2000, **10**, 867–871.
- 162 G. P. Arsenault, E. Bullock and S. F. MacDonald, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 4384–4389.
- 163 B. J. Littler, Y. Ciringh and J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2864–2872.
- 164 J. Lux, M. Chan, L. V. Elst, E. Schopf, E. Mahmoud, S. Laurent and A. Almutairi, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 6359–6364.
- 165 A. Barge, G. Cravotto, E. Gianolio and F. Fedeli, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2006, **1**, 184–188.
- 166 S. Liu, J. Pietryka, C. E. Ellars and D. S. Edwards, *Bioconjug. Chem.*, 2002, **13**, 902–913.
- 167 M. M. Alam, F. Bolze, C. Daniel, L. Flamigni, C. Gourlaouen, V. Heitz, S. Jenni, J. Schmitt, A. Sour and B. Ventura, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 21954–21965.
- 168 T.-H. Huang, Y.-J. Chen, S.-S. Lo, W.-N. Yen, C.-L. Mai, M.-C. Kuo and C.-Y. Yeh, *Dalton Trans.*, 2006, **0**, 2207–2213.
- 169 J. J. Piet, P. N. Taylor, B. R. Wegewijs, H. L. Anderson, A. Osuka and J. M. Warman, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 97–104.
- 170 E. S. Nyman and P. H. Hynninen, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2004, **73**, 1–28.

- 171 D. H. Powell, O. M. N. Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer and A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9333–9346.
- 172 Y. Song, H. Zong, E. R. Trivedi, B. J. Vesper, E. A. Waters, A. G. M. Barrett, J. A. Radosevich, B. M. Hoffman and T. J. Meade, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 2267–2275.
- 173 M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt and H. Weinmann, *Invest. Radiol.*, 2005, **40**, 715–724.
- 174 A. Sour, S. Jenni, A. Ortí-Suárez, J. Schmitt, V. Heitz, F. Bolze, P. Loureiro de Sousa, C. Po, C. S. Bonnet, A. Pallier, É. Tóth and B. Ventura, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 4545–4554.
- 175 D. A. James, D. P. Arnold and P. G. Parsons, *Photochem. Photobiol.*, 1994, **59**, 441–447.
- 176 E. Nyarko, T. Hara, D. J. Grab, A. Habib, Y. Kim, O. Nikolskaia, T. Fukuma and M. Tabata, *Chem. Biol. Interact.*, 2004, **148**, 19–25.
- 177 W. Zhang, C. Lu, G. Zhao, J. Zhang, X. Fang, P. Wang, X. Fang, J. Xu and W. Yang, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, 2015, **641**, 578–585.
- 178 G. Zhao, C. Lu, H. Li, Y. Xiao, W. Zhang, X. Fang, P. Wang, X. Fang, J. Xu and W. Yang, *Inorganica Chim. Acta*, 2013, **406**, 146–152.
- 179 H. S. Yoo and T. G. Park, *J. Controlled Release*, 2004, **100**, 247–256.
- 180 A. F. Trindade, R. F. M. Frade, E. M. S. Maçôas, C. Graça, C. A. B. Rodrigues, J. M. G. Martinho and C. A. M. Afonso, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3181–3190.
- 181 D. Li, J. Diao, D. Wang, J. Liu and J. Zhang, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 2010, **14**, 547–555.
- 182 K. Mishra and A. Joy, *Polymer*, 2015, **66**, 110–121.
- 183 R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.-F. Müller and M. Barberi-Heyob, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2799–2808.
- 184 S. Wang, R. J. Lee, C. J. Mathias, M. A. Green and P. S. Low, *Bioconjug. Chem.*, 1996, **7**, 56–62.
- 185 S. Wang, J. Luo, D. A. Lantrip, D. J. Waters, C. J. Mathias, M. A. Green, P. L. Fuchs and P. S. Low, *Bioconjug. Chem.*, 1997, **8**, 673–679.
- 186 C. P. Leamon, R. B. Deprince and R. W. Hendren, *J. Drug Target.*, 1999, **7**, 157–169.
- 187 C. Müller, A. Hohn, P. A. Schubiger and R. Schibli, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2006, **33**, 1007–1016.
- 188 S. D. Boss, T. Betzel, C. Müller, C. R. Fischer, S. Haller, J. Reber, V. Groehn, R. Schibli and S. M. Ametamey, *Bioconjug. Chem.*, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00644.
- 189 S. Wang and P. S. Low, *J. Controlled Release*, 1998, **53**, 39–48.
- 190 E. J. Hong, D. G. Choi and M. S. Shim, *Acta Pharm. Sin. B*, 2016, **6**, 297–307.
- 191 A. Derycke, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 17–30.
- 192 Y.-E. K. Lee and R. Kopelman, in *Biomedical Nanotechnology*, Humana Press, 2011, pp. 151–178.
- 193 G. Hong, S. Diao, A. L. Antaris and H. Dai, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 10816–10906.
- 194 N. F. Gamaleia and I. O. Shton, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2015, **12**, 221–231.
- 195 M. Gary-Bobo, O. Hocine, D. Brevet, M. Maynadier, L. Raehm, S. Richeter, V. Charasson, B. Looock, A. Morère, P. Maillard, M. Garcia and J.-O. Durand, *Int. J. Pharm.*, 2012, **423**, 509–515.
- 196 Z.-D. Qi, D.-W. Li, P. Jiang, F.-L. Jiang, Y.-S. Li, Y. Liu, W.-K. Wong and K.-W. Cheah, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 2455–2458.
- 197 K. Larsson, *J. Phys. Chem.*, 1989, **93**, 7304–7314.
- 198 V. Meli, C. Caltagirone, A. M. Falchi, S. T. Hyde, V. Lippolis, M. Monduzzi, M. Obiols-Rabasa, A. Rosa, J. Schmidt, Y. Talmon and S. Murgia, *Langmuir*, 2015, **31**, 9566–9575.

- 199 D. Demurtas, P. Guichard, I. Martiel, R. Mezzenga, C. Hébert and L. Sagalowicz, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 8915.
- 200 X. Mulet, B. J. Boyd and C. J. Drummond, *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, **393**, 1–20.
- 201 K. Moebus, J. Siepmann and R. Bodmeier, *J. Controlled Release*, 2012, **157**, 206–215.
- 202 S. Aleandri, D. Bandera, R. Mezzenga and E. M. Landau, *Langmuir*, 2015, **31**, 12770–12776.
- 203 C. Caltagirone, A. M. Falchi, S. Lampis, V. Lippolis, V. Meli, M. Monduzzi, L. Prodi, J. Schmidt, M. Sgarzi, Y. Talmon, R. Bizzarri and S. Murgia, *Langmuir*, 2014, **30**, 6228–6236.
- 204 J. Schmitt, V. Heitz, S. Jenni, A. Sour, F. Bolze and B. Ventura, *Supramol. Chem.*, 2017, **29**, 769–775.
- 205 N. Rapoport, A. Marin, Y. Luo, G. D. Prestwich and M. Muniruzzaman, *J. Pharm. Sci.*, 2002, **91**, 157–170.
- 206 D. Y. Alakhova, N. Y. Rapoport, E. V. Batrakova, A. A. Timoshin, S. Li, D. Nicholls, V. Y. Alakhov and A. V. Kabanov, *J. Controlled Release*, 2010, **142**, 89–100.
- 207 P. Zhao and D. Astruc, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 952–972.
- 208 I. Seotsanyana-Mokhosi, N. Kuznetsova and T. Nyokong, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2001, **140**, 215–222.
- 209 A. Ogunsipe, J.-Y. Chen and T. Nyokong, *New J. Chem.*, 2004, **28**, 822–827.
- 210 T. Odani, S. Okada, C. Kabuto, T. Kimura, S. Shimada, H. Matsuda, H. Oikawa, A. Matsumoto and H. Nakanishi, *Cryst. Growth Des.*, 2009, **9**, 3481–3487.

Résumé

L'objectif de cette thèse a été de synthétiser, caractériser et évaluer l'efficacité de photosensibilisateurs (PS) activables par excitation mono- et bi-photonique pour la thérapie photodynamique (PDT). Les PSs sont des dérivés de porphyrines qui ont été associés à différents composés incluant des sondes d'imagerie, des vecteurs, ou des nanoparticules, dans le but d'améliorer l'efficacité du traitement.

Un PS a ainsi été relié à deux complexes de Gd(III) pour former un agent moléculaire théranostique afin de pouvoir suivre l'évolution de la PDT par imagerie par résonance magnétique (IRM). Cet agent théranostique conserve les bonnes propriétés photophysiques du PS et sa relaxivité remarquable permet l'imagerie à des concentrations plus faibles que les agents de contraste commerciaux. L'association d'un PS avec un vecteur, l'acide folique ou la biotine, a permis d'augmenter la sélectivité envers les cellules cancéreuses. L'augmentation de la phototoxicité envers des cellules HeLa pour ces deux PSs par rapport au PS non vectorisé montre le potentiel de ces deux PSs vectorisés pour la PDT par excitation mono et bi-photonique. Enfin, plusieurs PS ont été liés ou incorporés dans des cubosomes pour améliorer leur biodistribution et leurs phototoxicités ont été étudiées. Ces études montrent pour la première fois la possibilité d'utiliser des cubosomes comme formulation pour les PSs.

Mots clefs : Porphyrine, Photosensibilisateur, PDT, Absorption biphotonique, Agent de contraste, IRM, Acide folique, Biotine, Vectorisation, Cubosome.

Résumé en Anglais

The aim of this thesis was to synthesize, characterize and evaluate the efficiency of new photosensitizers (PS) for Photodynamic Therapy (PDT) activated by a one- or two-photon absorption. These PSs are composed of π -extended porphyrins linked to imaging probes, targeting moieties or nanoparticles to improve the treatment efficiency.

A PS was linked to two Gd(III) complexes to form a molecular theranostic agent allowing the monitoring of the PDT outcome by Magnetic Resonance Imaging (MRI). This molecular theranostic agent retains the good photophysical properties of the PS and its high relaxivity allows the imaging at a lower concentration than the commercial contrast agents. In order to increase the selectivity towards cancer cells a PS was linked to folic acid or biotin, two targeting compounds. The increase of the phototoxicity towards HeLa cells of these two targeted PSs compared to a non-targeted PS reveals the potential for one- and two-photon PDT. Finally, several PSs have been linked to cubosomes to increase the biodistribution and their phototoxicity has been investigated. This study shows for the first time that cubosomes can be used as a formulation for PSs.

Keywords: Porphyrin, Photosensitizer, PDT, Two-photon absorption, Contrast agent, MRI, Folic acid, Biotin, Targeting, Cubosome.