



HAL
open science

Synthèse et études d'agents antibactériens constitués d'un photosensibilisateur vectorisé par un peptide antimicrobien

Charly Gourlot

► **To cite this version:**

Charly Gourlot. Synthèse et études d'agents antibactériens constitués d'un photosensibilisateur vectorisé par un peptide antimicrobien. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAF004 . tel-04502841

HAL Id: tel-04502841

<https://theses.hal.science/tel-04502841>

Submitted on 13 Mar 2024

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 :

Charly GOURLOT

soutenue le : 11 mars 2022

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

Discipline/ Spécialité : Chimie et Biologie

**Synthèse et études d'agents
antibactériens constitués d'un
photosensibilisateur vectorisé par un
peptide antimicrobien**

THÈSE dirigée par :

Mme HEITZ Valérie

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme FROCHOT Céline

M. RICHTER Sébastien

Directrice de recherche, Université de Lorraine

Maître de Conférences, Université de Montpellier

AUTRE MEMBRE DU JURY :

M. SPECHT Alexandre

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITÉ :

M. BECHINGER Burkhard

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Céline Frochot, le Dr. Sébastien Richeter et le Dr. Alexandre Specht de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Valérie Heitz qui m'a permis de travailler sur ce sujet de thèse. Tes conseils, ton expertise et ta disponibilité ont été d'une grande aide au cours de ces trois années. Grâce à toi, j'ai eu l'occasion de découvrir plusieurs domaines et de collaborer avec de nombreuses personnes, ça a été très enrichissant ! Ce sujet m'a vraiment intéressé et j'ai pris plaisir à contribuer à son avancée. Un très grand merci pour tout.

Merci également au Pr. Burkhard Bechinger pour cette collaboration qui m'a permis de réaliser un grand nombre d'expériences différentes. Merci à Chris pour ta patience, ton calme à toute épreuve et ta disponibilité. Un grand merci à Elise pour avoir formé un chimiste à la bactério. On en a passé du temps à mettre nos conditions de manips au point et à étaler des géloses au râteau. On est plus efficace que l'Easyspiral maintenant, si je ne trouve pas de boulot après, j'ouvre une crêperie !

Un grand merci au Pr. Vincent Sol pour m'avoir si bien accueilli à deux reprises dans son laboratoire à Limoges. Merci Tan de m'avoir formé à la culture cellulaire et d'avoir été disponible tout au long de mes séjours alors que tu prenais les rênes de l'IUT. Merci également Charlotte de m'avoir épaulé dans mes journées marathon, tu as été d'une grande aide !

Merci à nos collaborateurs, le Dr. Barbara Ventura pour les mesures photophysiques et le Dr. Christophe Gourlaouen pour les études théoriques. Je tiens aussi à remercier Maurice, Bruno et Lionel du service commun de RMN, Stéphanie du service de masse et Martine et Noémie du service de spectroscopie optique. Je suis également reconnaissant envers le ministère de la Recherche et de l'Enseignement pour le financement de cette thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire, anciens ou actuels : Steph, Angélique, HP, Gene, Ryan, Seb, Alex, Sonia, Dylan, Johnny, Etienne, Amy, et tous ceux que j'ai oubliés. Merci à Angélique de m'avoir formé pendant mes stages de master avec autant de pédagogie et de bienveillance. Steph, tes expressions légendaires et tes coups de gueule vont me manquer, on ira grimper à l'occasion (...). HP, bon courage pour la suite et pour ton HDR. Merci Seb pour tes conseils et surtout pour tes photomontages dignes des plus grands artistes. Ryan, c'était sympa de partager le labo avec toi sur du Kerry James, du MJ ou sur la mythique danse de la pluie. Johnny, garde ta bonne humeur et bon vent au Japon, j'espère que tu pourras y aller !

Merci à ceux avec qui j'ai passé ces trois dernières années au LeBel. Vincent, on se connaît depuis la L3 maintenant, ça commence à faire un moment. Tu as toujours répondu présent lorsque je loupais (malencontreusement) quelques cours, merci ! Ta bonne humeur et tes « blagues » ont rythmé la vie du 8^{ème} étage et ont participé à la bonne ambiance tout au long de la thèse.

Matthieu, merci de nous avoir privatisé la salle café du 6^{ème} pour nos parties endiablées de Uno ou les concours internationaux de mots fléchés. Le Uno c'est un peu démodé, va falloir grandir maintenant. Bonne chance pour le post-doc, je ne doute pas de ta future réussite !

Soso, merci pour tes gâteaux pas trop mauvais et ta dévotion sans faille pour éponger les bières qu'Orelsan nous balançait dessus. Garde ta motivation, ta franchise mais surtout ta gentillesse et ton humour, et bon courage pour la suite de ta thèse. Mais surtout, Santèèè !

Alex, le papa de la bande, la sagesse et l'expérience incarnées, rien que ça. Merci pour les bons moments au labo mais surtout au bar, une petite bière et on y va parce que ce soir on n'a pas trop le temps. Ou deux. Ou trois. Ou plus.

Merci à mes anciens collègues étudiants du Columbus Café devenus amis, Freddy et Fanny ! Finis les muffins et les fameux mokaccino lait de soja saveur noisette mais-pas-trop-sucré, c'était bien cool de bosser ensemble ! On est tous passé aux choses sérieuses maintenant, mais ça me fait plaisir qu'on ait gardé ce lien.

Un merci particulier à Déborah, Clément, Claire, Vincent, Fayçal et Margot pour toutes les soirées et les week-ends passés ensemble. Ces années à Strasbourg n'auraient certainement pas été pareilles sans ce noyau dur, un énorme merci à tout le monde ! On aura encore plein de bons moments à partager dans le futur, ici ou ailleurs !

Enfin, merci à ma famille, j'ai beaucoup de chance d'être aussi bien entouré. Merci à tous les membres qui la composent et qui font sa richesse et sa diversité. Merci Nelson, on a grandi ensemble comme des frères et je te considère comme tel, on a partagé un sacré paquet de choses depuis toutes ces années. Merci à ma sœur Agathe, un exemple de détermination et d'optimisme à toute épreuve qui forcent l'admiration. Merci à mes parents de m'avoir encouragé à faire ce que je souhaitais et de toujours avoir été là pour moi. Merci de m'avoir inculqué la valeur du travail et l'humilité, qui ont forgé l'homme que je suis aujourd'hui.

Sommaire

Sommaire	5
Liste des abréviations	10
Chapitre I : Introduction	13
1 La résistance bactérienne	13
1.1 Historique	13
1.2 Situation actuelle et conséquences de la résistance antibactérienne	14
1.3 Dissémination de la résistance antibactérienne	15
1.4 Structure et métabolisme des bactéries	18
1.4.1 Bactéries à Gram positif	19
1.4.2 Bactéries à Gram négatif	20
1.4.3 Métabolisme des bactéries	21
1.5 Modes d'action des antibiotiques	22
1.6 Mécanismes de résistance des bactéries	23
1.7 Formation de biofilms bactériens	25
1.8 Stratégies pour lutter contre le développement de la résistance bactérienne	27
1.8.1 Stratégie de politique publique	27
1.8.2 Recherche et développement de nouveaux traitements antibiotiques	27
1.8.3 Développement d'autres composés antibactériens	28
2 La thérapie photodynamique antibactérienne	30
2.1 Historique et principe	30
2.2 Avantages de l'aPDT	32
2.3 Limitations de l'aPDT	33
2.4 Paramètres de l'irradiation pour l'aPDT	33
2.5 Le photosensibilisateur idéal pour l'aPDT	36
2.6 Les photosensibilisateurs non porphyriniques utilisés en aPDT	37
2.7 Les photosensibilisateurs porphyriniques utilisés en aPDT	39
2.7.1 Caractéristiques et propriétés des dérivés porphyriniques	39
2.7.2 Exemples de PS porphyriniques développés	39
3 L'association d'un photosensibilisateur et d'un peptide antimicrobien	45
3.1 Propriétés des peptides antimicrobiens	45
3.2 Structures des peptides antimicrobiens	46

3.3	Interactions des peptides antimicrobiens avec les membranes bactériennes.....	47
3.4	Modes d'action des peptides antimicrobiens.....	48
3.5	Limitations à l'usage des peptides antimicrobiens.....	50
3.6	Nouveaux AMP développés pour l'application antibactérienne.....	51
3.7	Association d'un photosensibilisateur avec un peptide antimicrobien pour l'aPDT.....	51
3.7.1	Avantages de l'association PS-AMP.....	51
3.7.2	Exemples d'agents antibactériens PS-AMP.....	52
4	Projet de thèse.....	59

Chapitre II : Synthèse et caractérisations de conjugués porphyrine-peptide pour la thérapie photodynamique antibactérienne **61**

1	Molécules précédemment développées au laboratoire.....	62
2	Conception des conjugués.....	63
2.1	Conjugué PS₁-PGLa	64
2.1.1	Choix du photosensibilisateur.....	64
2.1.2	Choix du peptide antimicrobien.....	66
2.2	Conjugué PS₂-PGLa	66
2.3	Conjugué PS₂-Gly-D-Ctl	67
3	Stratégie de synthèse.....	69
4	Synthèse du conjugué antibactérien PS₁-PGLa.....	70
4.1	Synthèse du photosensibilisateur PS₁	70
4.1.1	Synthèse de la porphyrine 9	70
4.1.2	Synthèse de l'espaceur 10	72
4.1.3	Synthèse du groupe 2-iodo-5-nitro-thiophène 12	73
4.1.4	Synthèse de la porphyrine PS₁	73
4.2	Synthèse du peptide PGLa	77
4.3	Synthèse du conjugué PS₁-PGLa	81
5	Synthèse du conjugué antibactérien PS₂-PGLa.....	85
5.1	Synthèse du composé bromo-BTD.....	85
5.2	Synthèse du photosensibilisateur PS₂	85
5.3	Synthèse de PS₂-PGLa	87
6	Propriétés photophysiques des photosensibilisateurs et des conjugués pour l'aPDT.....	90

6.1	Etudes par spectroscopie d'absorption UV-visible	90
6.1.1	Effet de la fonctionnalisation des porphyrines de zinc(II) sur leurs propriétés d'absorption	90
6.1.2	Absorption des photosensibilisateurs PS₁ et PS₂ et des conjugués PS₁-PGLa et PS₂-PGLa	92
6.2	Rendements quantiques et durées de vie de fluorescence	94
6.3	Rendements quantiques de production d'oxygène singulet	96
6.4	Dichroïsme circulaire électronique	98
6.4.1	Analyse du peptide PGLa	99
6.4.2	Analyse des conjugués PS₁-PGLa et PS₂-PGLa	100
7	Etudes théoriques par calculs TD-DFT	104
7.1	Etude théorique du photosensibilisateur PS₁	105
7.2	Etude théorique du photosensibilisateur PS₂	109
7.3	Limitations des calculs théoriques par TD-DFT	112
8	Etudes par RMN à l'état solide de PS₁-PGLa en présence de bicouches lipidiques orientées	112
9	Synthèse et caractérisation du conjugué antibactérien PS₂-Gly-D-Ctl	116
9.1	Synthèse des peptides D-Ctl et Gly-D-Ctl	116
9.2	Synthèse du conjugué PS₂-Gly-D-Ctl	116
9.3	Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible	119
9.4	Propriétés photophysiques de PS₂-Gly-D-Ctl	120
10	Conclusion	121
 Chapitre III : Etudes biologiques des conjugués porphyrine-peptide		125
1	Optimisation du protocole d'irradiation	125
2	Protocole utilisé pour les tests antibactériens et les tests de toxicité sur les cellules eucaryotes	126
3	Etudes de l'activité et de la photoactivité de PS₁-PGLa et de ses composants PS₁ et PGLa	127
3.1	Activité antibactérienne des composés sur <i>S. aureus</i> , une bactérie à Gram positif	128
3.1.1	Activité antibactérienne en l'absence de lumière	128
3.1.2	Photoinactivation bactérienne à la suite d'une irradiation dans le proche IR	131
3.1.3	Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche	133
3.1.4	Conclusion	134
3.2	Activité antibactérienne des composés sur <i>E. coli</i> , une bactérie à Gram négatif	135
3.2.1	Activité antibactérienne en l'absence de lumière	135

3.2.2	Photoinactivation bactérienne à la suite d'une irradiation dans le proche IR.....	136
3.2.3	Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche.....	140
3.2.4	Conclusion.....	142
3.3	Etudes de la toxicité et de la phototoxicité des composés sur des cellules eucaryotes, les kératinocytes (NHEK)	143
3.3.1	Caractéristiques des kératinocytes	143
3.3.2	Détermination de la viabilité cellulaire.....	144
3.3.3	Cytotoxicité en l'absence de lumière.....	144
3.3.4	Phototoxicité à la suite d'une irradiation à 720 nm.....	145
3.3.5	Phototoxicité en lumière blanche.....	146
3.3.6	Conclusion.....	147
4	Etudes de l'activité et de la photoactivité de PS₂-PGLa et de ses composants PS₂ et PGLa	148
4.1	Activité antibactérienne des composés sur les bactéries <i>S. aureus</i>	148
4.1.1	Activité en l'absence de lumière et photoactivité à 710 nm	148
4.1.2	Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche.....	150
4.2	Activité antibactérienne des composés sur les bactéries <i>E. coli</i>	151
4.2.1	Activité en l'absence de lumière et photoactivité à 710 nm	151
4.2.2	Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche.....	153
4.2.3	Effet du temps d'incubation avant irradiation à 710 nm.....	154
4.3	Etudes de la toxicité et de la phototoxicité des composés sur les cellules kératinocytes (NHEK)	156
4.3.1	Cytotoxicité dans le noir et phototoxicité à 710 nm.....	156
4.3.2	Phototoxicité en lumière blanche.....	157
5	Etudes de l'activité et de la photoactivité du conjugué PS₂-Gly-D-Ctl et de ses composants PS₂ et Gly-D-Ctl	158
5.1	Activité antibactérienne des composés sur les bactéries <i>E. coli</i>	158
5.1.1	Activité dans le noir et à la suite d'une irradiation à 710 nm	158
5.1.2	Effet du temps d'incubation avant irradiation à 710 nm.....	159
6	Affinité des conjugués pour les parois de <i>E. coli</i>.....	162
6.1	Evaluation par spectroscopie UV-visible.....	162
6.2	Evaluation par microscopie confocale	164
7	Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	165
8	Conclusion	166

Chapitre IV : Synthèse de nouveaux photosensibilisateurs cationiques et de photosensibilisateurs métallés pour l'aPDT.....171

1 Photosensibilisateurs fonctionnalisés par des unités imidazolium 171

1.1	Synthèse et caractérisations des photosensibilisateurs bis-imidazolium PZn-imi et PH₂-imi	172
1.1.1	Obtention du synthon 2-iodo-1-méthylimidazole 18	172
1.1.2	Synthèse des PS PH₂-imi et PZn-imi	173
1.1.2.1	Caractérisation de PH₂-imi	174
1.1.2.2	Caractérisation de PZn-imi	177
1.2	Spectres d'absorption UV-visible et propriétés photophysiques de PH₂-imi et PZn-imi	178
1.2.1	Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible.....	178
1.2.2	Propriétés d'émission des composés PH₂-imi et PZn-imi	179
1.2.3	Rendements quantiques de production d'oxygène singulet.....	180
1.2.4	Etudes théoriques par calculs TD-DFT.....	180
1.2.4.1	Porphyrine PH₂-imi	181
1.2.4.2	Porphyrine PZn-imi	182
1.2.4.3	Orbitales frontières et transitions électroniques.....	183
1.3	Etudes biologiques des PS cationiques.....	184
1.3.1	Activité antibactérienne des PS PH₂-imi et PZn-imi sur <i>S. aureus</i>	184
1.3.2	Activité antibactérienne des PS PH₂-imi et PZn-imi sur <i>E. coli</i>	185
1.3.3	Affinité des PS PH₂-imi et PZn-imi vis-à-vis des bactéries <i>E. coli</i>	186
1.3.4	Evaluation de l'activité bactériostatique des PS PH₂-imi et PZn-imi	187

2 Photosensibilisateurs métallés au palladium(II)..... 187

2.1	Méallation au Pd(II) de la porphyrine base libre 5	188
2.2	Méallation au Pd(II) de la porphyrine base libre bis-éthynyle protégés 23	189
2.3	Déprotection des groupes protecteurs TIPS de la porphyrine 23	191
2.3.1	Déprotection statistique des alcynes protégés.....	191
2.3.2	Déprotection totale des alcynes protégés.....	192
2.4	Méallation des porphyrines fonctionnalisées.....	193

3 Conclusion..... 194

Conclusion générale et perspectives	197
Annexes	201
Partie expérimentale	211
Publication et Communications	249
Références	251

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADPA : Acide Anthracene-9,10-dipropionique
AMP : Antimicrobial Peptide
aPDT : antibacterial Photodynamic Therapy
ARN : Acide Ribonucléique
BMR : Bactérie multi-résistante
Boc : *tert*-Butoxycarbonyle
BTD : 2,1,3-Benzothiadiazole
C : Concentration molaire
CIS : Croisement intersystème
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
COSY : Correlation Spectroscopy
CPP : Cell-penetrating peptide
Ctl : Cateslytine
DCE : Dichroïsme Circulaire Electronique
DCM : Dichlorométhane
DDQ : 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone
DEL : Diode électroluminescente
DIPEA : N,N-diisopropyléthylamine
DLS : Dynamic Light scattering
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPBF : 1,3-Diphénylisobenzofurane
DPP : Dicotépyrrolopyrrole
OD : Optical Density
EDT : Ethane-1,2-dithiol
EDTA : Ethylènediaminetétraacétique
Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyle
HBTU : *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetraméthyluronium hexafluorophosphate
HFIP : Hexafluoroisopropanol
HGT : Horizontal Gene Transfer
HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
HR ESI-MS : High Resolution Electrospray-Ionization Mass Spectroscopy
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
IR : Infrarouge
LPS : Lipopolysaccharides
LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital
Mmt : 4-Méthoxytrityle
MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NBS : N-bromosuccinimide
NIR : Near-infrared
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PACT : Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy
Pbf : Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS : Phosphate Buffer Saline
PDI : Photodynamic Inactivation
PDT : Photodynamic Therapy
POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
POPG : 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoglycerol
PS : Photosensibilisateur
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Reactive Oxygen Species
RX : Rayons X
t.a. : Température ambiante
TBAF : Tetra-*n*-butylammonium fluoride
tBu : *tert*-butyl
TBTU : *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate
TD-DFT : Time-Dependent Density Functional Theory
TFA : Trifluoroacetic acid
THF : Tetrahydrofuran
TIPS : Triisopropylsilyl
TIS : Triisopropylsilane
TOCSY : Total Correlation Spectroscopy
Trt : Triphénylméthyle
UV-vis : Ultraviolet – visible

Chapitre I : Introduction

1 La résistance bactérienne

1.1 Historique

L'utilisation d'antibiotiques, décrits comme des composés chimiques générés par des micro-organismes pour inhiber ou détruire des microbes selon Selman Waksman, a permis une avancée majeure dans le traitement des infections bactériennes depuis leurs découvertes. Plus généralement, on peut considérer un antibiotique comme une substance dont l'action inhibe ou tue des microbes par interactions avec des cibles biologiques sans considérer la source dont il provient, qu'elle soit naturelle ou synthétique.¹

En 1928, Alexander Fleming découvrit involontairement la pénicilline au travers d'une contamination d'une culture de staphylocoques par le champignon *Penicillium notatum*. Les zones situées à proximité de ce dernier étaient exemptes de bactéries car il sécrétait de la pénicilline, responsable de la lyse des staphylocoques. Cette découverte majeure permis par la suite le développement de nombreux composés antibiotiques pendant une période prolifique couramment appelée « l'âge d'or des antibiotiques » où une vingtaine de classes différentes furent découvertes (Figure 1).²

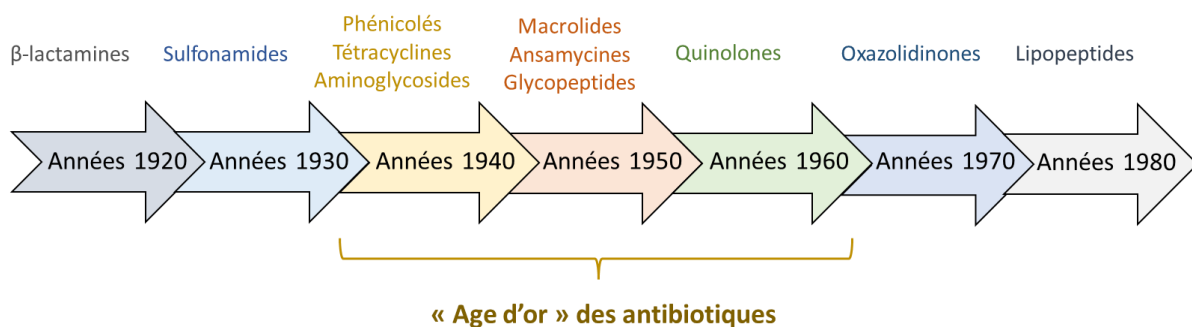


Figure 1. Découvertes chronologiques des classes d'antibiotiques (liste non exhaustive).³

Cependant, de 1980 à nos jours, seulement deux nouvelles classes d'antibiotiques ont été mises sur le marché. L'une des principales raisons est de nature financière. La procédure pour une

commercialisation de nouveaux antibiotiques est longue, coûteuse et risquée et ces derniers s'avèrent peu rentables car ils impliquent des traitements courts par rapport à la médication d'autres pathologies telles que les maladies chroniques.^{4,5} D'une manière générale, la recherche souffre d'un manque d'innovation dans ce domaine car elle se contente de développer des analogues aux antibiotiques déjà existants afin de limiter les risques de pertes financières.³

Néanmoins, depuis plusieurs dizaines d'années, l'émergence de bactéries résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques a progressivement conduit à redynamiser la recherche. En effet, sans nouvelles molécules capables d'éliminer ces bactéries résistantes, la situation risque de s'aggraver dans les années à venir car l'utilisation des antibiotiques de dernier recours va devenir de plus en plus courante et un nombre croissant de pathogènes deviendront intraitables.⁶

A titre d'exemple, dès 1940, des bactéries résistantes à la pénicilline (**Figure 2**) avaient déjà été isolées alors que le médicament n'était pas encore officiellement sur le marché, conduisant l'industrie à modifier chimiquement ce composé pour éviter son hydrolyse par les pénicillinases.⁷

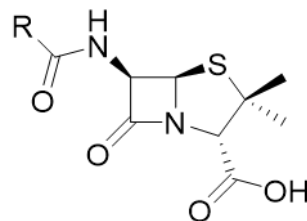


Figure 2. Structure de la pénicilline.

1.2 Situation actuelle et conséquences de la résistance antibactérienne

On définit les bactéries multirésistantes (BMR) comme non sensibles à au moins un agent dans trois classes ou plus d'antibiotiques, et les plus résistantes d'entre elles sont appelées pan-résistantes car insensibles à toutes les catégories d'antibiotiques.⁸ L'OMS a classé le problème des BMR dans le top 10 des plus grandes menaces pour la santé publique, traduisant le niveau de préoccupation croissant vis-à-vis de ce problème. En 2015, on estimait que les BMR étaient responsables d'environ 700 000 infections en Europe dont plus de 33 000 mortelles chaque année (**Figure 3**).⁹ La France, fortement touchée avec 125 000 infections annuelles, a lancé un programme prioritaire de recherche de 40 millions d'euros en 2018 consacré à la lutte contre la résistance antibactérienne.¹⁰

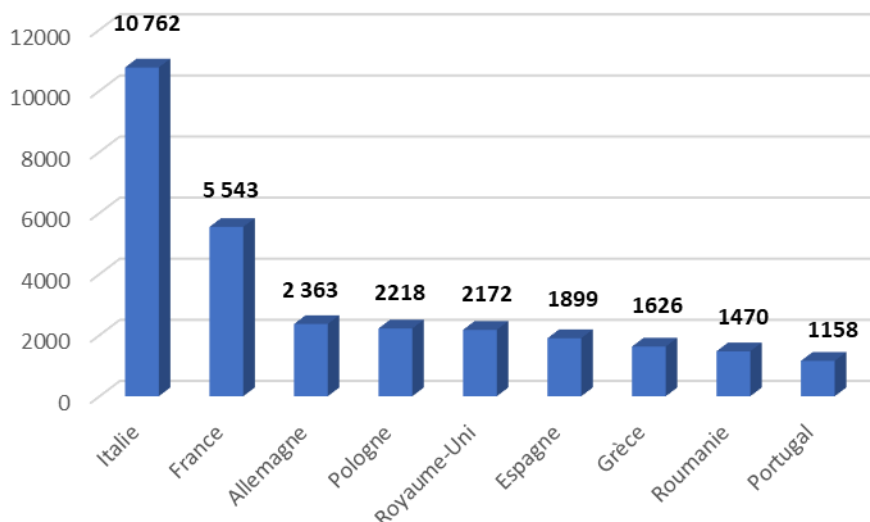


Figure 3. Nombre de morts dû aux infections bactériennes en Europe en 2015. Image adaptée de la publication.⁹

Les bactéries multirésistantes affectent fortement le domaine hospitalier. Elles conduisent à une augmentation de la durée d'hospitalisation et des coûts de traitement, et à une augmentation du taux de mortalité de certaines maladies ou infections. Une étude a montré une hausse de 80 à 150 % de la mortalité dans les trente jours suivant l'infection par des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération ou par des *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) résistants à la méticilline (MRSA).¹¹ De plus, sans médicaments efficaces, certaines chirurgies ou transplantations peuvent conduire à une augmentation du taux de mortalité post-opératoire.^{12,13} A l'heure actuelle, les infections nosocomiales engendrées par des MRSA ou des entérobactéries porteuses de l'enzyme New Delhi métallo-bêta-lactamase représentent une réelle menace pour la santé publique.¹⁴

1.3 Dissémination de la résistance antibactérienne

Le développement de résistances au sein des populations de bactéries n'est pas récent : c'est un phénomène naturel de l'évolution qui se produit en l'absence de l'homme car ces microorganismes doivent se protéger des antibactériens naturels.^{15,16} Des études récentes ont montré que certaines bactéries présentes dans les sols n'ayant jamais été exposées à des antibiotiques synthétisés par l'Homme constituent un réservoir important de gènes résistants.^{17,18} Néanmoins, la résistance

antibactérienne a fortement augmenté au cours de ce demi-siècle.¹⁹ En effet, l'utilisation massive des antibiotiques directement liée aux activités humaines a imposé une très forte pression de sélection sur les populations bactériennes et conduit à une importante augmentation des bactéries multirésistantes.²⁰ La dissémination des BMR est facilitée par de nombreux facteurs (**Figure 4**).

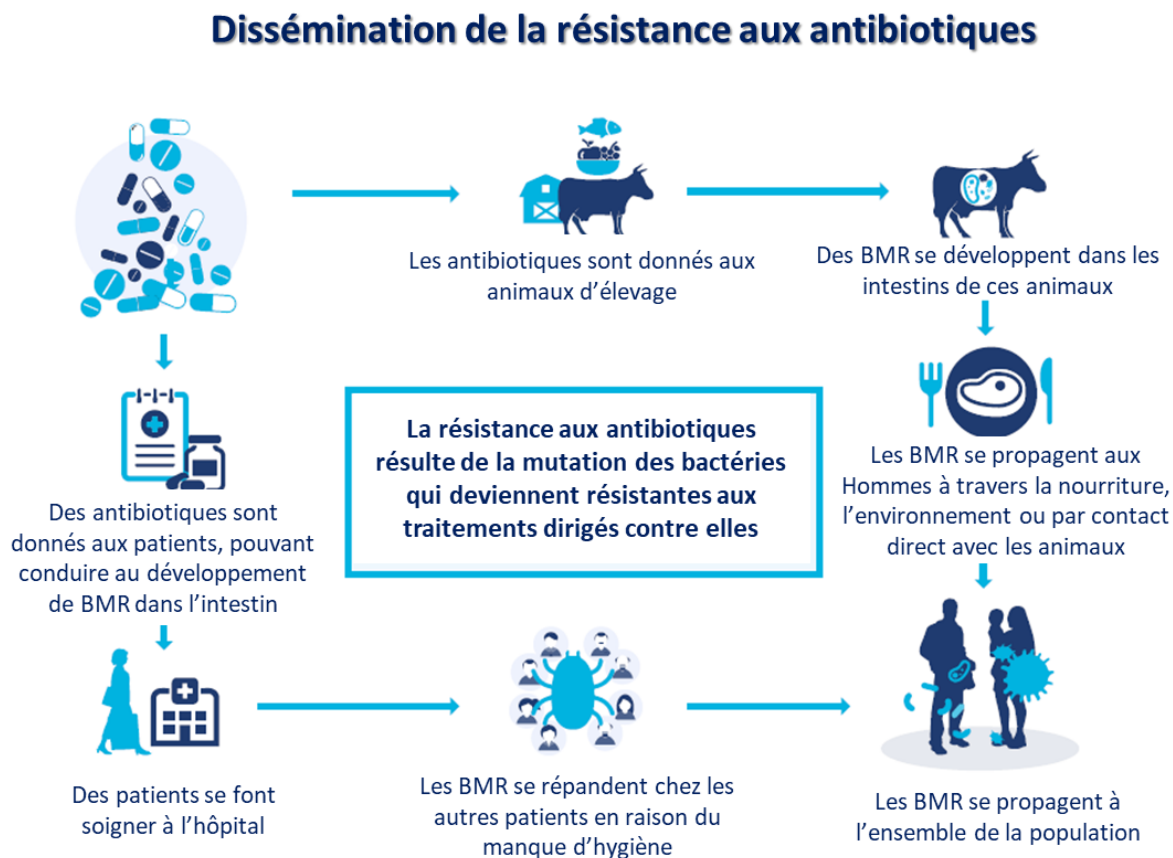


Figure 4. Schéma de l'OMS illustrant la dissémination de la résistance aux antibiotiques.²¹

L'utilisation des antibiotiques, encore trop peu régulée dans certains secteurs hospitaliers, est surtout problématique dans les secteurs agricoles et les secteurs de l'élevage intensif où l'usage de ces médicaments est jusqu'à quatre fois plus élevé que dans le domaine médical. De nombreux antibiotiques normalement réservés aux traitements médicaux pour l'Homme sont donnés aux animaux sous des noms différents et certains sont utilisés comme facteur de croissance pour produire à bas coûts, permettant la transmission des BMR par la consommation de viande contaminée.²²⁻²⁴ Il est néanmoins interdit de les utiliser en tant que facteurs de croissance en Europe depuis 2006.²⁵ L'environnement constitue également un réservoir de gènes résistants où les

bactéries se développent et se partagent les résistances dans les écosystèmes, tout en les transmettant aux pathogènes humains.²⁶ Leur dissémination se fait via les eaux usées, les insectes et les oiseaux, permettant leur transmission et leur propagation à grande échelle.²⁷⁻²⁹ De plus, la mobilité humaine et matérielle, la densité élevée de population et les mauvaises gouvernances sont autant de facteurs aggravants la situation et conduisant à l'augmentation des BMR à l'échelle planétaire.^{30,31}

Si certaines résistances sont innées car intrinsèques à la bactérie en raison d'une structure ou d'une fonctionnalité caractéristique, d'autres sont en revanche acquises via des mutations ou des transferts de gène. La dissémination des résistances entre différentes bactéries peut se faire de façon endogène (transmission verticale) ou exogène (transmission horizontale) (**Figure 5**).³²

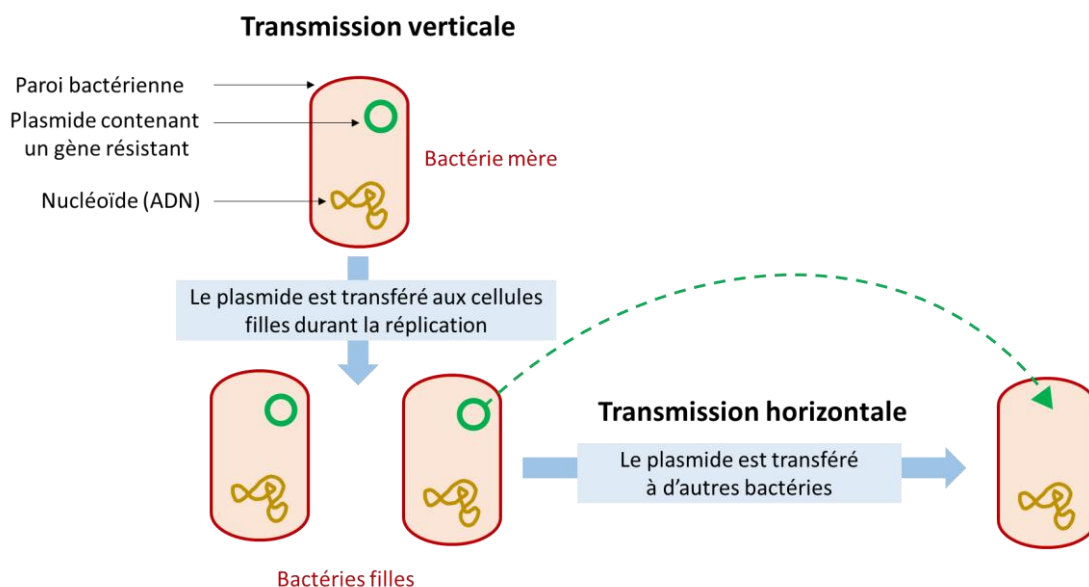


Figure 5. Schéma de la transmission d'un gène résistant entre bactéries. Image adaptée de la publication.³³

Le transfert horizontal de gènes (HTG) est à l'origine de la grande dissémination des résistances, et peut permettre la transmission de gènes résistants de la part des bactéries non pathogènes à des bactéries pathogènes par incorporation du matériel génétique dans leur génome.³⁴

Ces microorganismes possèdent donc de grandes capacités d'acquisition et de transmission de résistances car leur taux de croissance est très rapide, leur population est importante et le HTG est fréquent entre bactéries, qu'elles soient de la même espèce ou d'une espèce différente.¹⁴

1.4 Structure et métabolisme des bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont la taille varie de 1 à 20 μm .³⁵ Ce sont des cellules procaryotes qui ne comportent donc pas de noyaux : l'information génétique est portée par les chromosomes qui constituent une simple molécule d'ADN en double hélice enroulée dans une structure sans membrane, connue sous le nom de nucléoïde (**Figure 6**).³⁶ Elles possèdent des ribosomes où sont synthétisées les protéines, des plasmides participant au code génétique et sont entourées d'une membrane cytoplasmique, également appelée membrane cellulaire. Cette membrane est constituée d'une bicouche de phospholipides chargés négativement et d'acides gras en différentes proportions mais elle est dépourvue de stérols contrairement aux cellules eucaryotes. Cette barrière est sélectivement perméable et régule les échanges entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme.

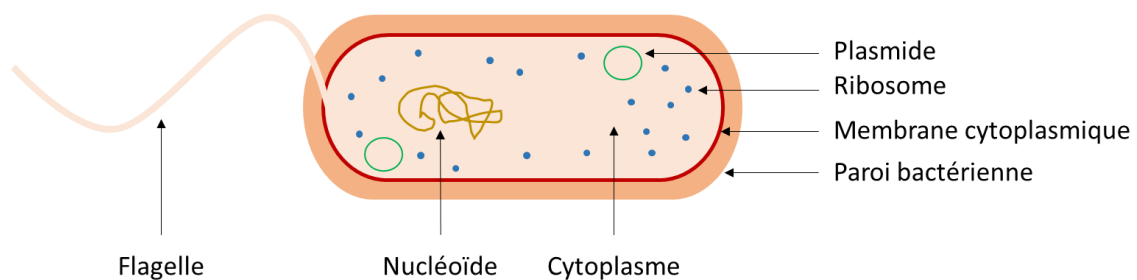


Figure 6. Schéma de la composition d'une bactérie.

Les bactéries possèdent également une paroi externe rigide qui leur assure une protection contre leur environnement et leur permet de résister aux dégâts mécaniques et aux pressions osmotiques.³⁷ Selon la composition de cette paroi cellulaire, les bactéries sont usuellement classées en deux groupes distincts : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Bien qu'elle soit différente pour les deux types de bactéries, la paroi est toujours composée de peptidoglycane qui constitue un réseau tridimensionnel de chaînes de disaccharides (*N*-acétyl-glucosamine et acide *N*-actéyl-muramique) reliées entre elles par des liaisons pentapeptidiques (**Figure 7**).

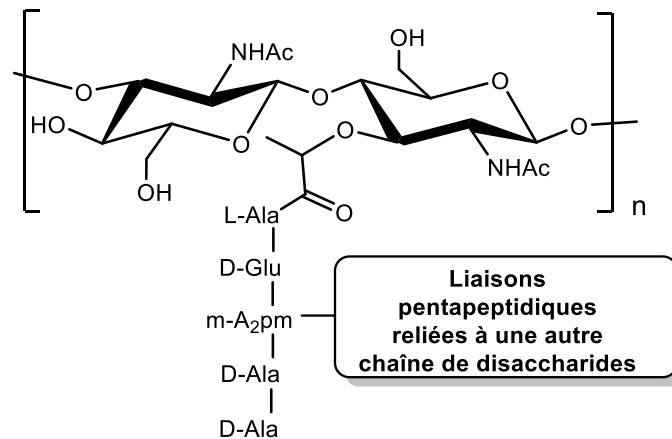


Figure 7. Structure générale du peptidoglycane de *E. coli*.³⁸

1.4.1 Bactéries à Gram positif

La paroi des bactéries à Gram positif est constituée d'une épaisse couche poreuse de peptidoglycane de 15 à 80 nm comportant des acides téichoïques et lipotéichoïques chargés négativement dû aux groupes phosphates (**Figure 8** et **Figure 9**).³⁹ Les acides lipotéichoïques ont une extrémité composée de chaînes lipidiques intégrée dans la membrane cytoplasmique et stabilisent la paroi de peptidoglycane.

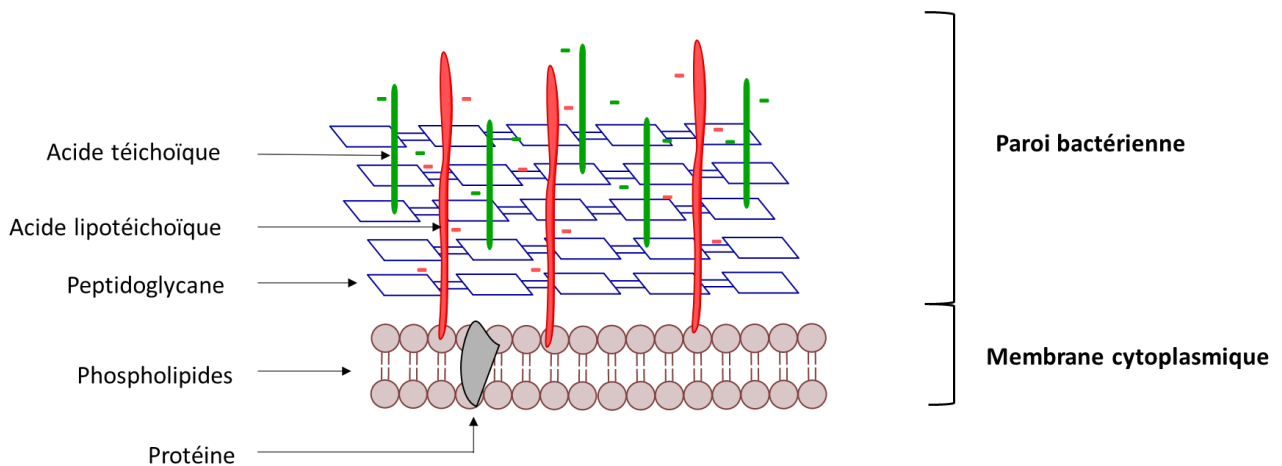


Figure 8. Schéma de la membrane des bactéries à Gram positif.

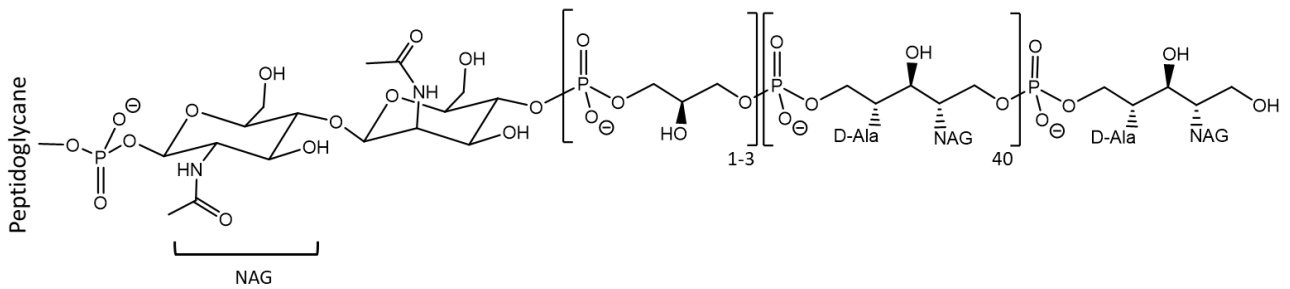


Figure 9. Structure de l'acide téichoïque composant la paroi bactérienne de *S. aureus*.⁴⁰

1.4.2 Bactéries à Gram négatif

En plus d'une fine couche de peptidoglycane d'environ 7-8 nm sans présence d'acides téichoïques, la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée d'une membrane externe supplémentaire peu perméable de 10 à 15 nm. Cette dernière est composée d'éléments hétérogènes tels que des phospholipides, des lipopolysaccharides (LPS), des protéines et des lipoprotéines anioniques (**Figure 10**).³⁹

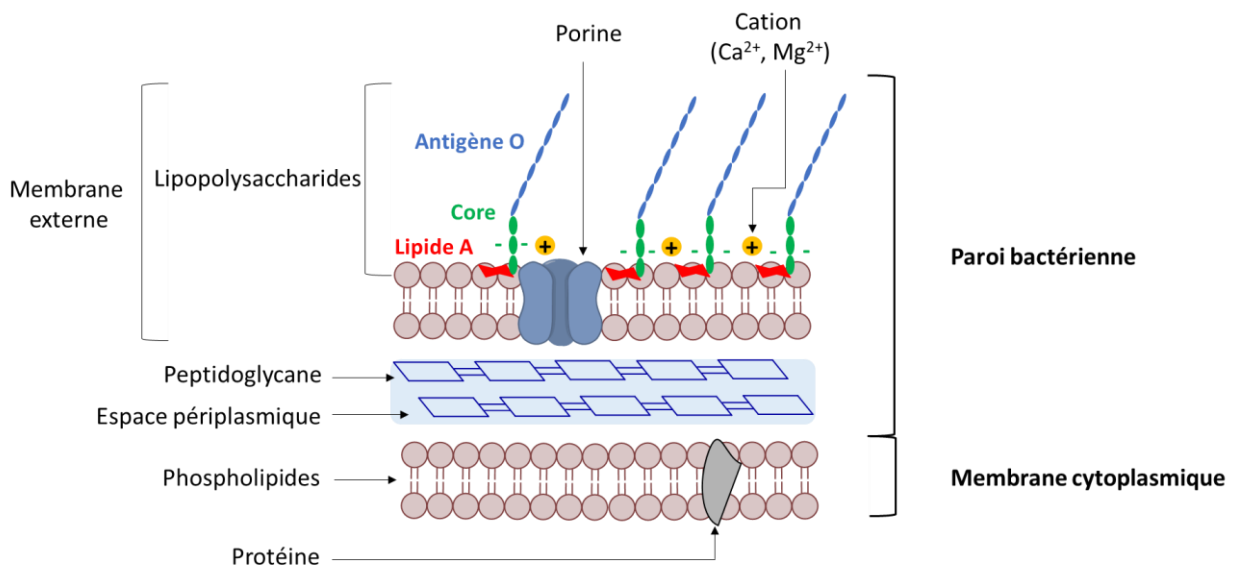


Figure 10. Schéma de la membrane des bactéries à Gram négatif.

Les LPS sont des polymères amphiphiles constitués d'une partie lipidique (lipide A) intégrée dans la membrane externe reliée à une chaîne de carbohydrates (antigène O) par un « core » (**Figure 11**). Ils sont fortement chargés négativement et stabilisés par des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} .⁴¹ Cette membrane externe étant moins perméable qu'une simple couche de peptidoglycane, les bactéries

à Gram négatif sont en général beaucoup plus difficiles à éradiquer car les antibiotiques ont du mal à accéder à la membrane cytoplasmique ou à pénétrer dans la bactérie.⁴² De fait, l'augmentation des ces bactéries résistantes aux antibiotiques est particulièrement préoccupante.

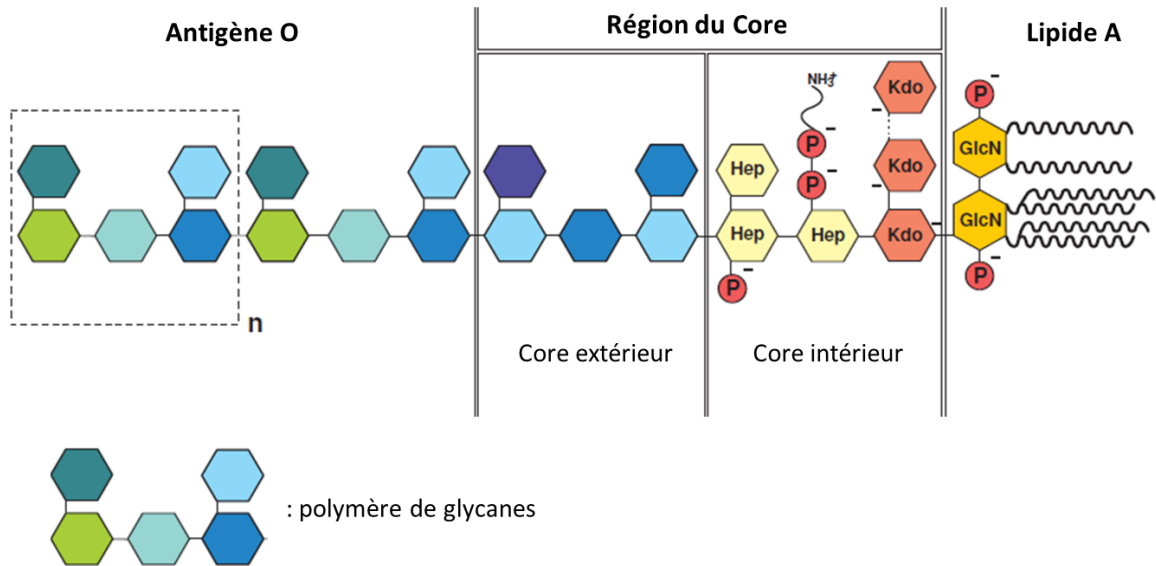


Figure 11. Structure générale des LPS. Hep : D-glycéro-D-manno-heptose, Kdo : acide 2-céto-3 deoxyocutolosonique, GlcN : glucosamine, P : phosphate. Image adaptée de la publication.⁴³

1.4.3 Métabolisme des bactéries

Les bactéries se caractérisent également par leur mode de croissance qui leur permet une colonisation rapide et efficace d'un environnement. La multiplication bactérienne se fait par scissiparité : deux bactéries filles identiques à la cellule mère sont obtenues. Le temps de génération, correspondant à l'intervalle durant lequel la population bactérienne double, est habituellement de 20 à 40 min *in vitro* dans des conditions optimales de culture. Il est généralement plus lent *in vivo*, de l'ordre de plusieurs heures, car les bactéries ont moins de nutriments à leur disposition. La courbe de croissance bactérienne en milieu non renouvelé comprend 4 phases principales (**Figure 12**) : ⁴⁴

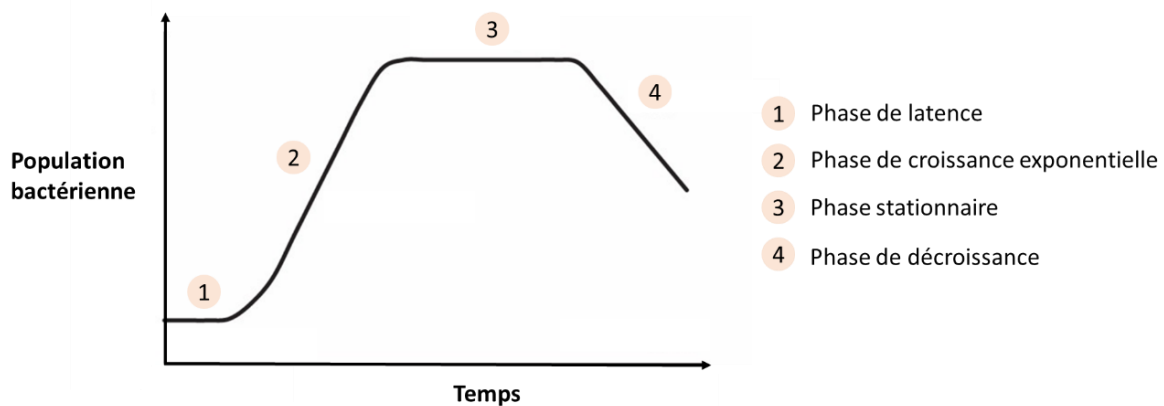


Figure 12. Croissance bactérienne en fonction du temps.

- **La phase de latence** : durant cette période, les bactéries ne se divisent pas ou très peu, mais leur activité métabolique est intense afin de produire des enzymes adaptées au milieu de culture.
- **La phase de croissance exponentielle** : le temps de génération y est minimal et constant, la population bactérienne augmente très rapidement.
- **La phase stationnaire** : le manque d'espace pour se diviser et la raréfaction des nutriments entraîne la stabilisation de la population bactérienne, le nombre de bactéries qui meurent s'équilibre avec le nombre de nouvelles cellules. Les bactéries en état de déprivation synthétisent des protéines de manque qui les rendent plus résistantes aux dommages externes.
- **La phase de décroissance** : l'absence de nutriments entraîne la mort progressive des bactéries.

1.5 Modes d'action des antibiotiques

Il existe de nombreux modes d'action des antibiotiques, qu'ils soient spécifiques ou plus généraux, bactériostatiques ou bactériophages. Certains antibiotiques bloquent la synthèse du peptidoglycane composant la paroi cellulaire ou inhibent la synthèse de protéines, la synthèse d'ADN ou la transcription d'ARN. D'autres altèrent la structure de la membrane cellulaire ou inhibent le métabolisme de l'acide folique, composé essentiel à la survie des bactéries.^{45,46} Les

modes d'action des classes d'antibiotiques présentées Figure 1 sont explicités ci-dessous, en accord avec le code couleur précédemment attribué à leur découverte (**Tableau 1**).

Tableau 1. Mécanismes d'action de certaines classes d'antibiotiques. ^{1,14}

Classe d'antibiotique	Exemples	Mode d'action
Bêta-lactamines	<i>Pénicilline, céphalosporines</i>	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par perturbation de la synthèse du peptidoglycane
Sulfonamides	<i>Sulfaméthoxazole</i>	Inhibition du métabolisme de l'acide folique
Tétracyclines	<i>Minocycline</i>	Traduction : l'antibiotique se lie à une sous-unité ribosomique et inhibe la synthèse de protéines
Aminoglycosides (ou Aminosides)	<i>Gentamicine</i>	Traduction : l'antibiotique se lie à une sous-unité ribosomique et inhibe la synthèse de protéines
Phénicolés	<i>Chloramphénicol</i>	Traduction : l'antibiotique se lie à une sous-unité ribosomique et inhibe la synthèse de protéines
Macrolides	<i>Erythromycine</i>	Traduction : l'antibiotique se lie à une sous-unité ribosomique et inhibe la synthèse de protéines
Ansamycines	<i>Rifampicine</i>	Transcription : l'antibiotique se lie à l'ARN polymérase et inhibe l'initiation de la transcription de l'ARN
Glycopeptides	<i>Vancomycine</i>	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par perturbation de la synthèse du peptidoglycane
Quinolones (et fluoroquinolones)	<i>Ciprofloxacine</i>	Réplication de l'ADN : se lie à l'ADN gyrase et inhibe son action, inhibant ainsi la synthèse de l'ADN
Oxazolidinones	<i>Linézolide</i>	Traduction : l'antibiotique se lie à une sous-unité ribosomique et inhibe la synthèse de protéines
Lipopeptides	<i>Daptomycine</i>	Altération de la structure de la membrane cytoplasmique

1.6 Mécanismes de résistance des bactéries

En réponse aux mécanismes d'action des antibiotiques, les bactéries ont développé un arsenal de résistances pour diminuer leur sensibilité face à ces médicaments (**Figure 13**).

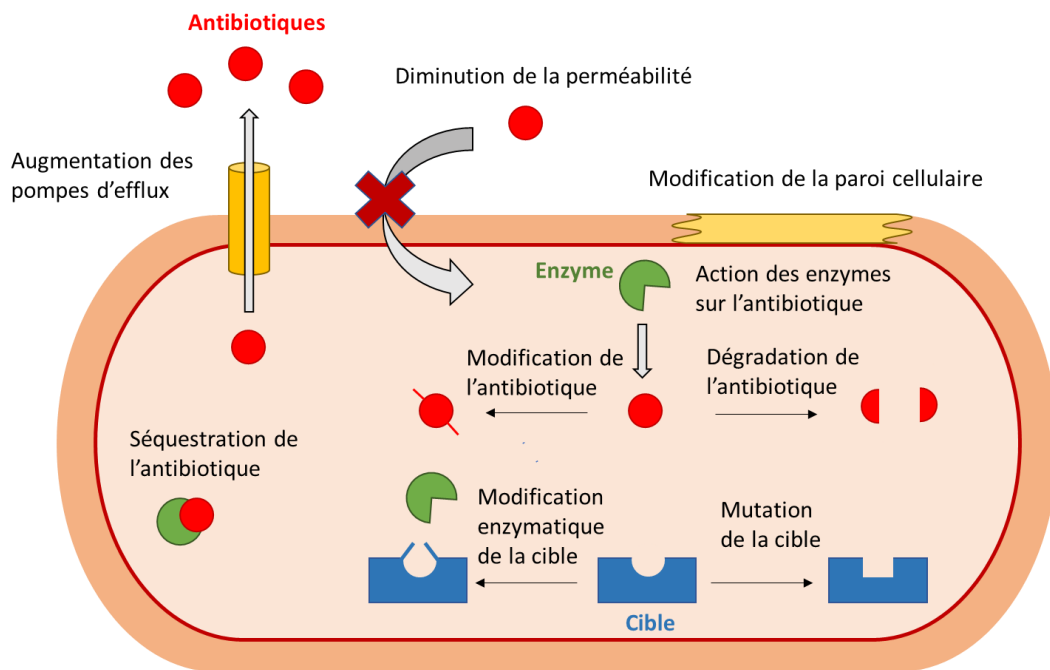


Figure 13. Mécanismes de résistance des bactéries contre les antibiotiques.

Modification des bactéries

Certaines résistances proviennent d'une modification structurale de la bactérie.

L'augmentation du nombre de pompes d'efflux et la réduction du nombre de porines ou leur remplacement par des canaux plus sélectifs réduisent la perméabilité de la membrane. Ces changements diminuent la concentration intracellulaire de l'antibiotique qui perd alors en efficacité.^{47,48} Les antibiotiques se lient fortement et spécifiquement à une cible, la mutation de cette dernière constitue également un moyen de défense en diminuant son affinité pour le médicament. Certaines enzymes sont aussi capables de modifier légèrement la cible afin d'altérer son affinité pour un antibiotique. La méthylation des ribosomes par une enzyme méthyltransférase permet par exemple aux bactéries de résister à la plupart des aminoglycosides.⁴⁹

De plus, les bactéries peuvent diminuer la densité de charge anionique exprimée sur leur paroi. Ainsi, les bactéries à Gram négatif peuvent procéder par addition de phosphoéthanolamines sur les LPS tandis que les bactéries à Gram positif peuvent induire une diminution de charges négatives par alanylation des acides téichoïques, contribuant au manque de reconnaissance et d'affinité électrostatique de certains antibiotiques cationiques comme les polymyxines.^{50,51}

Action directe sur les antibiotiques

D'autres mécanismes de résistances agissent directement sur les antibiotiques.

Ces derniers peuvent être inactivés par l'action d'enzymes spécifiques selon deux mécanismes : par hydrolyse de certaines fonctions chimiques comme c'est le cas pour les β -lactamases ou par modifications par transfert de groupements chimiques.²⁰ Les acétyltransférases augmentent la gêne stérique sur l'antibiotique tandis que les phosphotransférases modifient la charge de ce dernier afin d'empêcher la liaison avec sa cible.⁵²

En outre, certaines protéines s'associent avec l'antibiotique et l'empêchent d'agir, exerçant une forme de séquestration.⁵³

De nombreuses bactéries ont acquis plusieurs mécanismes de résistance qui leur permettent de résister à différentes classes d'antibiotiques.⁵⁴

1.7 Formation de biofilms bactériens

Les bactéries en suspension dites planctoniques peuvent former des biofilms qui constituent un assemblage de cellules liées entre elles par une matrice extracellulaire composée d'eau, de polysaccharides, de protéines, et d'acides nucléiques (**Figure 14**).¹³ Dans un premier temps, les bactéries adhèrent à une surface puis se multiplient et forment des micro-colonies. Elles synthétisent ensuite des exopolysaccharides pour constituer la matrice polymérique lors de la phase de maturation jusqu'à la formation d'un biofilm. Les bactéries peuvent ensuite se détacher et se disperser afin de coloniser de nouvelles surfaces pour créer d'autres biofilms.⁵⁵

Les biofilms bactériens sont responsables d'environ 80 % des infections bactériennes chez l'Homme.⁵⁶ Ces structures sont plus dures à éradiquer car elles possèdent des propriétés qui leur permettent d'être près de 1000 fois plus tolérantes envers les antibiotiques que les bactéries en phase planctonique.^{57,58} Par sa viscosité et l'expression de nombreuses protéines, la matrice agit comme barrière et ralentit ou empêche la pénétration des agents bactéricides.⁵⁹ Les charges électrostatiques présentes en surface peuvent également piéger les molécules actives en dehors du biofilm. Certaines zones situées en profondeur ne sont donc pas atteintes par les antibiotiques, tandis que d'autres en comportent une trop faible concentration qui ne permet pas d'éliminer les bactéries.⁶⁰

De plus, en raison des gradients de nutriments et d'oxygène qui existent à travers le biofilm, les bactéries sont présentes dans différents états physiologiques. Ainsi, celles situées en profondeur dont le métabolisme est ralenti sont moins sensibles aux antibiotiques, notamment ceux dont l'action est d'inhiber la synthèse de la paroi bactérienne.⁶¹ Certaines bactéries sont sous forme dormante et sont ainsi insensibles aux agents antibactériens.⁶² Le transfert horizontal de gènes est également beaucoup plus fréquent au sein de ces structures car facilité par la proximité spatiale des bactéries, permettant aux BMR de perdurer dans les biofilms. A l'inverse, dans un environnement non structuré, la compétition entre toutes les bactéries, résistantes ou non, diminue la population des BMR lors de l'arrêt de pression de sélection exercée par les antibiotiques. Une étude récente a montré que certaines bactéries résistantes étaient toujours présentes dans le biofilm plus de 45 jours après l'arrêt du traitement antibiotique alors que ces dernières avaient totalement disparu à l'état planctonique.⁶³

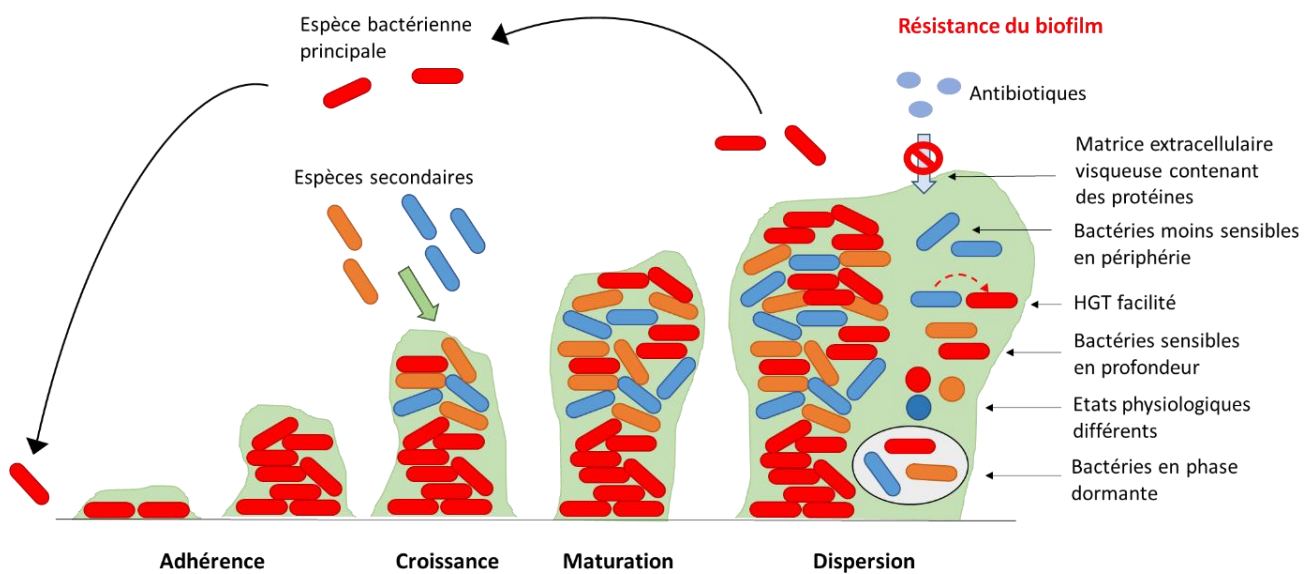


Figure 14. Formation, structuration et résistance des biofilms.⁵⁶

1.8 Stratégies pour lutter contre le développement de la résistance bactérienne

1.8.1 Stratégie de politique publique

Afin d'enrayer cette hausse constante des BMR, plusieurs stratégies sont envisagées.

Une meilleure utilisation des antibiotiques est primordiale. Un médicament « niche » à spectre d'action réduit devrait être appliqué quand il se peut car il induit des résistances sur un nombre limité de pathogènes par rapport à ceux de spectre d'action plus large, également plus toxiques pour le microbiote humain.¹⁴

Les diagnostics pour déterminer les causes d'une infection devraient également être plus rapides et moins coûteux : cela permettrait d'ajuster au mieux les traitements et donc éviter l'utilisation d'antibiotiques non adaptés ou non nécessaires pour traiter certaines infections.⁶⁴ L'investissement dans le développement des diagnostics est souvent trop faible : aux Etats-Unis, seulement 2% des dépenses de la santé y sont consacrées.⁶⁵

La stratégie du « cycling », qui consiste à utiliser des antibiotiques par cycles pour limiter le développement de résistances contre certains médicaments peut être situationnelle et utilisée en complément, mais elle est soumise à débats concernant son efficacité.^{66,67}

Enfin, des programmes d'éducation et de sensibilisation commencent à être mis en place à travers le monde afin d'éveiller les consciences et casser les schémas de surconsommation ainsi que les mauvaises utilisations de ces médicaments.⁶⁸

1.8.2 Recherche et développement de nouveaux traitements antibiotiques

Parmi les antibiotiques disponibles, il peut être intéressant d'en modifier certains afin de changer leurs mécanismes d'action et de pouvoir éliminer les BMR. Le succès de ces modifications est incertain car ces changements sont susceptibles de réduire l'efficacité du médicament et d'augmenter sa toxicité.¹ La métallation d'antibiotiques déjà sur le marché constitue une stratégie intéressante : de nombreux complexes tels que les quinolones métallées, les aminoglycosides métallés, les sulfonamides métallés et les β -lactamines métallés sont à l'étude.¹³

La resensibilisation des BMR via des molécules inhibant la résistance aux antibiotiques (« Antibiotics

Resistance Breakers, ARB ») est également une approche intéressante. Ces composés sont co-administrés avec des antibiotiques et en augmentent l'efficacité en combattant les mécanismes de résistance dirigés contre eux.³² A titre d'exemple, des médicaments tels que l'Augmentin® sont composés d'amoxicilline et d'un sensibilisant, l'acide clavulanique. Ce dernier permet l'inhibition des enzymes modificatrices telles que les hydrolases et transférases agissant sur l'antibiotique.⁶⁹ Cette approche vise à développer des traitements combinés : si plusieurs antibiotiques avec différents modes d'action sont utilisés simultanément, le risque de développer des résistances diminue.²⁵ Néanmoins, des données pharmacologiques précises doivent être recueillies et analysées pour chaque combinaison.

La découverte de nouveaux antibiotiques est également importante. Une technique récente, le criblage virtuel à haut débit mêlant le criblage à la modélisation 3D permet un gain de temps pour l'analyse virtuelle de nombreuses molécules. La modélisation de l'intérieure de la cellule permet d'obtenir des données précises et fiables concernant l'affinité d'un antibiotique potentiel avec des récepteurs bactériens.^{70,71}

Une autre approche, la stratégie « antivirulente », consiste à ne pas tuer les bactéries mais à les empêcher d'être virulentes : elles ne sont plus en mesure d'établir une infection sévère mais ne sont pas soumises à une pression de sélection car leur survie n'est pas menacée. Des inhibiteurs de systèmes contrôlant l'expression des gènes de la virulence de *S. aureus* ou des perturbateurs de la synthèse d'heptoses qui constituent les LPS des bactéries à Gram négatif entraînent une diminution de la virulence de ces microorganismes.^{72,73}

1.8.3 Développement d'autres composés antibactériens

En plus de la modification et de l'utilisation différente des antibiotiques actuels, de nouveaux composés antibactériens sont développés. La liste suivante, non exhaustive, expose les nouvelles alternatives en cours :

- **Les anticorps** : ils peuvent se lier à la bactérie et l'inactiver, ou inactiver leurs facteurs de virulence. Très étudiés, ils sont facilement synthétisables.⁷⁴

- **Les oligonucléotides anti-sens (ASO)** : ce sont des fragments d'ARN pouvant modifier l'ARN messager des bactéries pour inhiber l'expression de certains gènes comme ceux codant les enzymes qui transportent les protéines ou ceux responsables de la virulence de la bactérie.⁷⁵
- **Les probiotiques** : ils peuvent être utilisés en combinaison d'autres traitements. Une fois les bactéries ciblées éliminées par d'autres agents, ils permettent de rééquilibrer l'environnement bactérien par des colonies saines tout en empêchant les pathogènes de s'implanter.⁷⁶
- **Les bactériophages** : ce sont des virus non toxiques pour les cellules humaines composés de protéines qui encapsulent le génome d'ADN ou ARN et qui infectent les bactéries. Ils peuvent être utilisés à faibles doses car ils se répliquent une fois dans l'hôte. Ils sont spécifiques à certaines souches bactériennes, inoffensifs pour les autres, prolifèrent là où l'infection a lieu jusqu'à éliminer toutes les bactéries et sont finalement excrétés.
Cependant, les bactéries peuvent développer des résistances aux phages en détruisant leur matériel génétique.⁷⁷
- **Les nanoparticules** : il en existe une très grande diversité, avec des mécanismes antibactériens variés comme la perturbation et la perméabilisation des membranes, l'induction de ROS ou encore le blocage de la chaîne respiratoire par accumulation/dissolution.⁷⁸ Elles peuvent également être utilisées pour augmenter l'activité de certains antibiotiques comme les nanoparticules d'or conjuguées avec de l'ampicilline, ou être utilisées en tant qu'hydrogel pour délivrer des petites molécules.^{79,80} Certaines nanoparticules fonctionnalisées possèdent des propriétés antibactériennes, telles que les nanoparticules d'argent.⁸¹ Leur efficacité dépend de leur taille, de leur distribution, de leur morphologie et de la fonctionnalisation de leur surface.⁸²⁻⁸⁴
- **Les complexes métalliques** : chargés positivement pour l'application antibactérienne, ils présentent des structures diverses en fonction de la géométrie de coordination, et peuvent être chiraux, la chiralité étant un paramètre important pour la reconnaissance et les interactions avec les récepteurs biologiques.³⁵ Leurs mécanismes d'action sont variés et peuvent induire une modification de structure et de fonctionnement des biomolécules, perturber la membrane plasmique et occasionner des dégâts à l'ADN. De nombreux

complexes ont été étudiés et présentent de bonnes activités antimicrobiennes tels que ceux d'argent, de ruthénium, de cuivre, de fer, de gallium et d'iridium.⁸⁵⁻⁹⁰

- **Les peptides antimicrobiens (AMP)** : leurs descriptions et actions seront détaillées dans la suite de ce travail.
- **La thérapie photodynamique antibactérienne (aPDT)** : elle est au cœur de de projet et est décrite dans la section 2.

2 La thérapie photodynamique antibactérienne

2.1 Historique et principe

Bien que la PDT soit un traitement utilisé contre certains cancers depuis plus de 30 ans, son développement en tant que traitement antibactérien a été plus tardif et s'est fait conjointement à l'essor des BMR.⁹¹ Cette technique pour détruire des microorganismes est néanmoins connue depuis plus de 120 ans : sa découverte remonte au début du XXe siècle par Oscar Raab lorsqu'il observa la toxicité de l'acridine sur la paramécie *Paramecium caudatum* en présence de lumière. Il remarqua que l'efficacité était dépendante de la dose lumineuse incidente sur le milieu car ses résultats variaient selon l'ensoleillement.⁹² En 1904, Von Tappeiner énonça que la toxicité n'était pas liée à la chaleur mais à la contribution de l'oxygène et nomma ce phénomène « réaction photodynamique ».⁹³

La thérapie photodynamique repose sur une combinaison de trois éléments : une source lumineuse adaptée, un photosensibilisateur (PS) et du dioxygène (**Figure 15**). Á la suite de l'absorption d'un photon, le PS atteint l'état excité S_1 soit directement, soit par désactivation d'états excités d'énergie supérieure S_n .⁹⁴ Cet état excité S_1 a un temps de demi-vie court, de l'ordre de quelques nanosecondes. Le PS perd ensuite son énergie par émission de fluorescence ou par désactivation non radiative. Il peut également atteindre l'état triplet T_1 de plus faible énergie par croisement intersystème. La durée de vie à l'état triplet est relativement longue, de l'ordre de la microseconde, permettant à la molécule de pouvoir interagir avec des substrats biologiques proches ou des molécules de dioxygène. Le PS retourne de l'état triplet T_1 à l'état fondamental par émission de

phosphorescence, par désactivation non radiative ou par génération d'espèces réactives oxygénées (ROS).

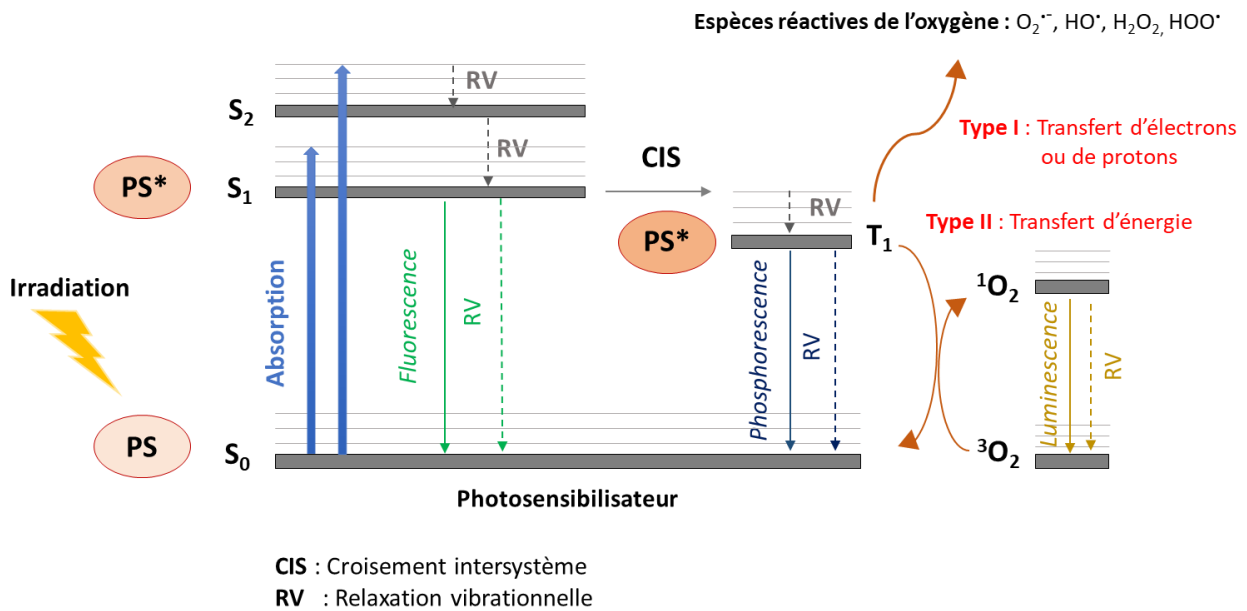


Figure 15. Diagramme simplifié de Jablonski et mécanismes schématisés de production de ROS.

La production de ROS se fait via deux mécanismes à partir de l'état triplet du PS. Le mécanisme de type I correspond à un transfert d'électrons ou de protons sur des substrats biologiques (S) pour former des radicaux libres qui engendrent ensuite, après réaction avec le dioxygène, des ROS tels que l'eau oxygénée H_2O_2 , l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} (Figure 16).^{95,96}

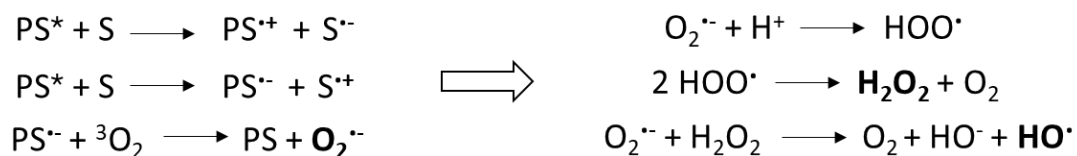


Figure 16. Mécanisme de type I conduisant à la formation de ROS par réactions photochimiques.

Le mécanisme de type II correspond à un transfert d'énergie de l'état excité triplet du PS à une molécule de dioxygène, conduisant à la formation du dioxygène à l'état excité singulet (Figure 17). Ce mécanisme est considéré comme prépondérant dans les milieux oxygénés.



Figure 17. Réaction photochimique du mécanisme de type II pour la formation d'oxygène singulet.

Cette espèce créée, appelée oxygène singulet (${}^1\text{O}_2$), est une molécule hautement réactive de faible temps de vie d'environ 3 μs en milieu aqueux physiologique et disposant de fait d'un rayon d'action limité estimé à 150 nm dans une cellule.^{97,98} L'oxygène singulet conduit à la mort des cellules ou micro-organismes proches en réagissant par cycloadditions sur des biomolécules qui les composent pour former des endoperoxydes, des hydroperoxydes et des dioxétanes.⁹⁹

On définit le rendement quantique de production d'oxygène singulet, propriété essentielle pour un PS, comme étant la quantité d'oxygène singulet formée par rapport au nombre de photons absorbés (**Figure 18**).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\text{Quantité d'oxygène singulet formé}}{\text{Quantité de photons absorbés}}$$

Figure 18. Equation du rendement quantique de formation d'oxygène singulet.

2.2 Avantages de l'aPDT

L'application de la thérapie photodynamique dans le domaine antibactérien est dénommée de différentes façons dans la littérature : la thérapie photodynamique antibactérienne (aPDT), l'inactivation photodynamique (PDI), la chimiothérapie photodynamique antibactérienne (PACT). On utilisera aPDT dans la suite de ce manuscrit car il semble que ce soit le terme le plus répandu actuellement.

L'aPDT possède deux avantages majeurs par rapport aux traitements antibiotiques : elle est efficace sur les BMR et elle n'induit pas de nouvelles résistances.¹⁰⁰ C'est une technique à l'action rapide et sélective par l'usage de la lumière qui cible la zone à traiter. Elle agit de manière non spécifique sur diverses cibles telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques.⁹⁶ Les dégâts oxydatifs des ROS sur la membrane bactérienne conduisent à la fuite des composants intracellulaire et sont à l'origine de la mort cellulaire.¹⁰¹ L'action sur les acides nucléiques n'intervient qu'en fin du processus lorsque les membranes ont été détruites au préalable.^{102,103}

L'aPDT peut être efficace contre tous types de bactéries et ne nécessite pas forcément l'internalisation du PS pour tuer les bactéries, ce qui constitue un atout supplémentaire pour éviter le développement de résistances. Elle peut être utilisée lorsque l'infection est localisée sur la peau ou dans un tissu mou à la suite d'une chirurgie, permettant ainsi de préserver l'usage des antibiotiques pour des infections plus généralisées. Afin d'augmenter la sélectivité du traitement, il a été montré qu'une courte période d'incubation avant l'irradiation favorise l'interaction électrostatique du PS avec les bactéries car la pénétration dans les tissus sains s'effectue par diffusion lente en plusieurs heures.¹⁰⁴ Une courte irradiation de la zone bactérienne permet un contrôle spatial et temporel, limitant ainsi les photodégâts sur les tissus hôtes.¹⁰⁵

De plus, l'aPDT est efficace sur les facteurs de virulence tels que les toxines, les α -hémolysines et les lipopolysaccharides en les dégradant via des oxydations chimiques.¹⁰⁶ L'aPDT peut aussi être utilisée pour combattre les biofilms bactériens, même si ces derniers sont plus tolérants à ce traitement que les bactéries en phase planctonique.¹⁰⁷ En effet, la matrice peu perméable peut limiter la pénétration du PS tandis que les couches profondes sont moins pourvues en oxygène.^{108,109}

L'aPDT apparaît donc comme une alternative prometteuse aux antibiotiques car elle présente de nombreux avantages : son spectre d'action est large et elle permet d'éliminer les bactéries via une action multiple, simultanée et non spécifique. Elle fait intervenir des PS de différentes natures accessibles par synthèse et peut donc constituer une alternative sérieuse aux antibiotiques conventionnels. A ce jour, il n'est pas connu de moyen de défense spécifique dirigé contre l'oxygène singulet, contrairement aux autres ROS. Plusieurs études ont montré que l'aPDT n'entraînait pas de développement de résistances de la part des bactéries. Après 10 cycles de traitements sur *E. coli* par une porphyrine tricationique ou 20 traitements quotidiens sur *S. aureus* par un dérivé tétracationique de phtalocyanine, les bactéries étaient toujours aussi sensibles à l'action des PS irradiés.^{110,111}

2.3 Limitations de l'aPDT

Bien que les traitements aPDT présentent de nombreux avantages, certaines contraintes tendent à freiner leurs utilisations. L'aPDT est appliquée principalement pour des infections localisées en surface, et beaucoup de PS rencontrent des problèmes de solubilité et de sélectivité. Certaines

bactéries possèdent des pompes d'efflux pour excréter les PS qui s'internalisent, mais ces dernières ne semblent efficaces que contre les dérivés de phénotiazinium.¹¹²

Par ailleurs, il y a actuellement un manque d'harmonisation des procédés *in vitro* concernant la puissance et le type d'irradiation pour pouvoir comparer et classer les activités des différents PS développés.

2.4 Paramètres de l'irradiation pour l'aPDT

La source lumineuse est un paramètre important pour l'efficacité de l'aPDT. Il en existe principalement quatre : les lasers, les DEL, les lampes halogènes et les lampes à incandescence.¹¹³

Les lasers permettent une émission à une seule longueur d'onde précise, alors que les DEL présentent un pic d'émission plus large mais ont l'avantage d'être moins onéreuses. Les lampes halogènes peuvent quant à elles être équipées de filtres pour adapter la longueur d'onde d'irradiation mais émettent généralement plus de chaleur. Des études sont réalisées afin d'améliorer les sources lumineuses : la fibre optique permet par exemple de délivrer une lumière de façon homogène à des zones plus difficiles d'accès.

Qu'importe la nature de la source, il est primordial de connaître son intensité d'émission pour pouvoir calculer la dose totale de lumière appliquée à la zone à traiter. La fluence énergétique est utilisée pour décrire la quantité d'énergie délivrée par unité d'aire. Elle est exprimée en $J.cm^{-2}$ et correspond à la dose totale de lumière appliquées lors d'un traitement par PDT. Elle est calculée selon le temps d'irradiation et la puissance lumineuse par unité d'aire, l'irradiance, exprimée en $W.cm^{-2}$. La fluence utilisée lors d'un traitement est très variable dans la littérature, avec des valeurs allant de un à plusieurs centaines de joules par centimètre carré et des temps d'irradiation variant de quelques dizaines de secondes à plusieurs heures.¹¹⁴

Pour une application clinique, il est préférable d'irradier dans le proche IR entre 700 et 900 nm, domaine de longueurs d'onde correspondant à la fenêtre thérapeutique optique (**Figure 19**). Cela permet de limiter les photodommages aux tissus sains car les chromophores endogènes (tels que l'hémoglobine et la mélanine), les lipides et l'eau y ont une absorption minimale.¹¹⁵

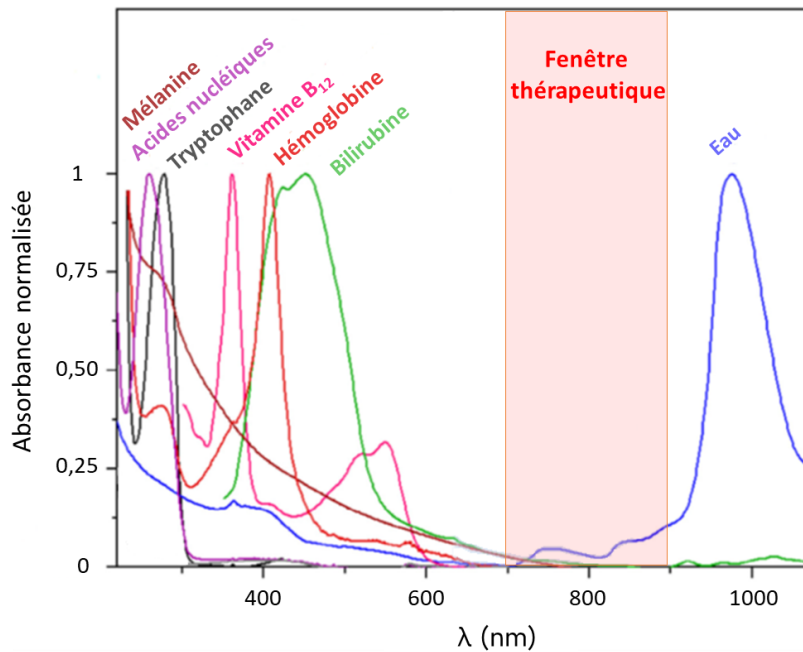


Figure 19. Absorbance normalisée des chromophores endogènes et localisation de la fenêtre thérapeutique optique. Image adaptée du journal.¹¹⁵

Une irradiation dans le proche IR permet également une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus car cette dernière croît avec l'augmentation de la longueur d'onde dans le domaine du visible (**Figure 20**).^{116,117} La profondeur de pénétration dépend fortement de la nature des tissus dont les propriétés optiques d'absorption, de réflexion et de diffusion sont très variables.¹¹⁸ De plus, les traitements par lumière rouge peuvent induire une meilleure guérison et une réparation des tissus avoisinants la zone d'irradiation par photostimulation (ou « low lever laser therapy »).¹¹⁹

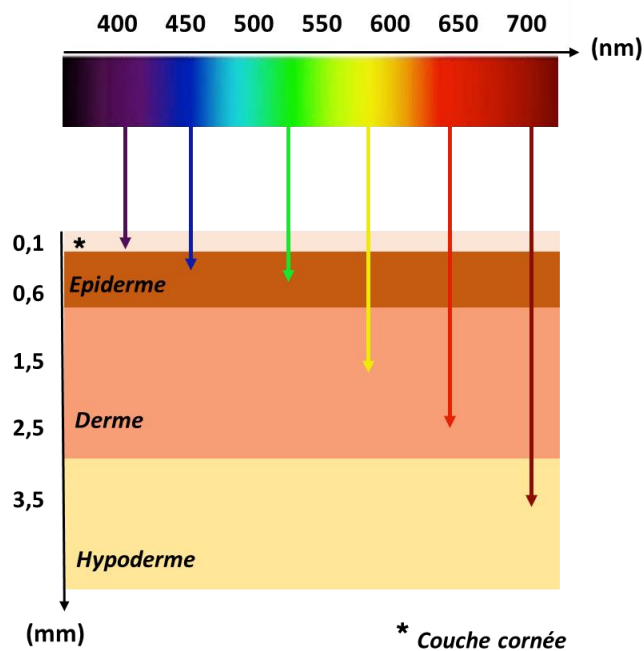


Figure 20. Profondeur de pénétration de la lumière dans la peau en fonction de la longueur d'onde.¹¹⁹

2.5 Le photosensibilisateur idéal pour l'aPDT

Le PS doit posséder certaines propriétés afin de pouvoir être utilisé en aPDT. L'un des enjeux majeurs est de pouvoir éradiquer les bactéries à Gram négatif car la présence de la membrane externe protège la bactérie de l'oxygène singulet extracellulaire généré lors de l'aPDT. De nombreux PS neutres et anioniques sont inefficaces sur ces bactéries. Les bactéries à Gram négatif ne sont pas sensibles aux PS traditionnels tels que les acridines, les xanthènes et les dérivés porphyriniques comme le Photofrin®. D'une manière générale, les PS neutres peuvent présenter une bonne photoactivité vis-à-vis des bactéries à Gram positif mais ne sont pas efficaces pour éradiquer les bactéries à Gram négatif à moins d'être co-administrées avec des adjuvants perturbateurs de membranes tels que l'EDTA, CaCl₂, ou la polymyxine B.^{120,121} Ainsi, à la différence de nombreux PS anticancéreux pas ou peu chargés, les PS antibactériens sont souvent cationiques avec un fort caractère amphiphile.¹²² Ils peuvent perturber et déstabiliser la membrane externe des bactéries à Gram négatif en entrant en compétition avec les cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺. Les distorsions induites par la gêne stérique occasionnée rendent ainsi la paroi plus perméable. Les PS peuvent

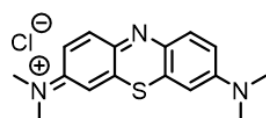
ensuite entrer en contact avec la membrane cytoplasmique pour un effet optimal de l'aPDT. Récemment, Maisch *et al.* ont défini le PS idéal pour une application antibactérienne. Ce PS devrait :

91

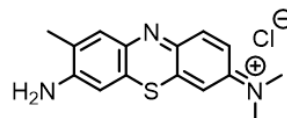
- Être amphiphile et chargé positivement pour favoriser les interactions électrostatiques avec les parois anioniques des bactéries.
- Avoir un haut rendement de production de ROS, en privilégiant la formation d'oxygène singulet.
- Pouvoir être irradié dans la fenêtre thérapeutique optique et à des concentrations d'action suffisamment faibles pour éliminer les bactéries sans induire de dégâts sur les cellules eucaryotes.
- Être photostable durant l'irradiation et rapidement éliminable pour minimiser les effets secondaires sur les tissus sains.
- Ne pas présenter de toxicité ou d'activité mutagène dans le noir sur les cellules eucaryotes et sur les microorganismes afin de ne pas induire de résistances.
- De faible poids moléculaire pour faciliter la pénétration dans les biofilms.

2.6 Les photosensibilisateurs non porphyriniques utilisés en aPDT

Bien que beaucoup de PS soient des dérivés porphyriniques, il existe de nombreuses classes de molécules utilisées pour l'aPDT. La plus courante concerne les dérivés de phénothiazines, dont le plus connu et le plus ancien est le bleu de méthylène développé par Caro dans les années 1870 (**Figure 21**). Ce composé tricyclique π -donneur ne présente qu'une charge positive, et possède un rendement quantique d'oxygène singulet d'environ 0,5 dans l'éthanol pour une absorption comprise entre 600 et 650 nm.¹²³ Il a été le premier PS autorisé cliniquement et constitue une référence standard pour les tests *in vitro* car il est peu cher et facilement disponible.^{124,125} Cependant, il peut être excrété de la bactérie par les pompes d'efflux, diminuant sa concentration et donc son efficacité.¹¹² Depuis leurs découvertes, le bleu de méthylène et son analogue le bleu de toluidine ont été développés et fonctionnalisés au cours du temps afin d'optimiser leur activité antibactérienne.



Bleu de méthylène



Bleu de toluidine

Figure 21. Exemples de dérivés de phénothiazines : le bleu de méthylène et le bleu de toluidine.

D'autres types de PS sont utilisés pour l'aPDT et les structures de ceux les plus couramment étudiés sont répertoriées **Figure 22**.^{91,94} Leurs longueurs d'onde d'excitation ainsi que leurs rendements de production d'oxygène singlet varient fortement en fonction de leur fonctionnalisation.

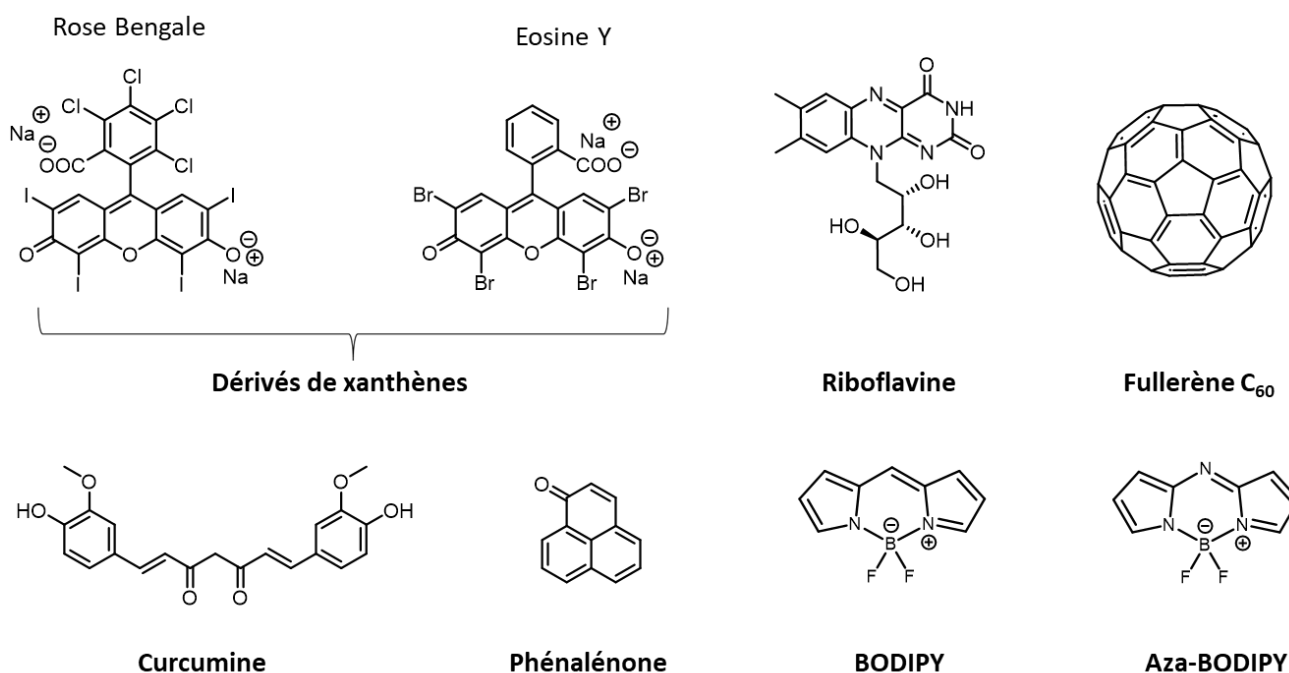


Figure 22. Structure des principaux PS non porphyriniques étudiés en aPDT.

Si certains composés tels que les dérivés de la curcumine et les dérivés de la riboflavine présentent de bonnes biocompatibilités, le caractère poly-aromatique des fullerènes et des xanthènes peut induire une cytotoxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes.^{126,127} De plus, le principal inconvénient de la plupart de ces PS pour l'aPDT est leur manque de solubilité en milieu aqueux. De nombreuses études visant à augmenter leur solubilité dans l'eau par introduction de charges positives ou par encapsulation dans des nanoparticules sont décrites dans la littérature.^{55,128-131}

2.7 Les photosensibilisateurs porphyriniques utilisés en aPDT

2.7.1 Caractéristiques et propriétés des dérivés porphyriniques

Les porphyrines et leurs dérivés chlorines et bactériochlorines sont des composés présents chez les plantes (chlorophylle) et les mammifères (hémoglobine, vitamine B12) et sont par le fait très bien tolérés par ces organismes.¹³² Du fait de leur grande stabilité, de leur facilité de fonctionnalisation et de leur coefficient d'extinction molaire élevé, les porphyrines constituent des candidats de choix pour en faire des PS. Le macrocycle aromatique permet une délocalisation des électrons π et induit une forte absorption dans le domaine du visible. De plus, les porphyrines à l'état excité triplet génèrent de l'oxygène singulet en présence de dioxygène avec un rendement quantique habituellement compris entre 0.5 et 0.9 dans différents solvants.¹³³

Le PS porphyrinique le plus ancien est le Photophrin[®] utilisé en oncologie, mais présente l'inconvénient d'une forte sensibilisation de la peau après traitement qui peut durer plusieurs semaines.¹²²

2.7.2 Exemples de PS porphyriniques développés

Dans les années 1990, les équipes de Nitzan et Jori ont commencé à s'intéresser aux porphyrines fonctionnalisées par des unités pyridinium pour les utiliser en aPDT vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. La porphyrine cationique étudiée au cours de ces travaux et souvent utilisée comme composé de référence pour les études *in vitro* est la tétrakis(4-N-méthylpyridyl)porphyrine, notée TMPyP (**Figure 23**).

Lors des différents tests antibactériens, les porphyrines neutres et anioniques n'ont présenté aucune photoactivité. En revanche, à une concentration de 8,5 μM , la porphyrine cationique TMPyP a conduit à une diminution de plus de 3 log de la viabilité des bactéries *E. coli* après 30 min d'irradiation avec des lampes à incandescence (6 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, 10,8 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).¹³⁴

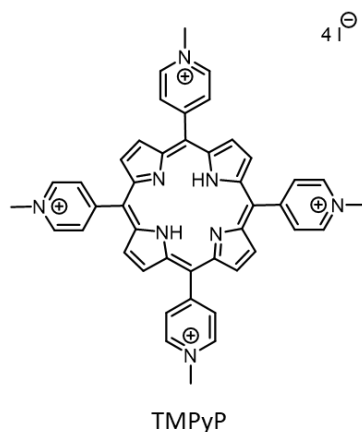


Figure 23. Structure de la porphyrine tétrakis(4-N-méthylpyridyl)porphyrine (TMPyP).

En 2005, Maisch *et al.* ont synthétisé deux porphyrines dicationiques et observé que l'activité du PS était indépendante du temps d'incubation dans le noir en présence des bactéries.¹³⁵ La porphyrine **XF73** dont les deux substituants ammonium sont portés par une chaîne située en position *para* du phényl s'est montrée plus active que son analogue **XF70** dont les chaînes sont en position *méto* (**Figure 24**). Elle a permis à une concentration de 1 μM de réduire la survie de *E. coli* de plus de 7 log après 15 min d'irradiation avec une lampe UV-vis 380-480 nm ($15,2 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; $13,7 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Cependant, elle s'est également avérée phototoxique sur les cellules eucaryotes dans les mêmes conditions.

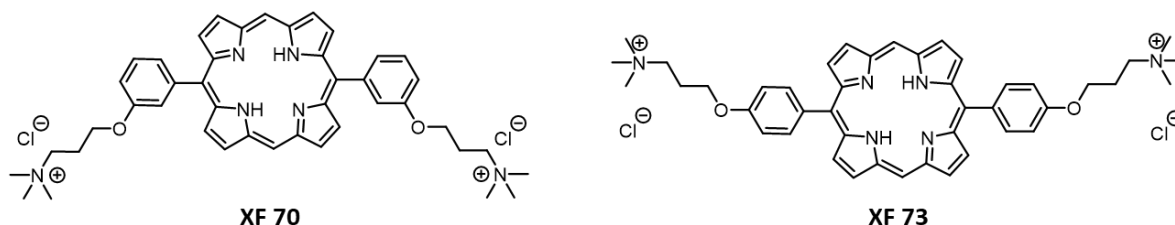


Figure 24. Structures des porphyrines dicationiques **XF70** et **XF73** développées par Maisch *et al.*¹³⁵

Le caractère amphiphile du PS est important car il est en partie responsable de l'affinité pour les bactéries. Parmi les porphyrines dicationiques, Orlandi *et al.* ont montré que la lipophilie pouvait avoir un effet sur l'activité du PS vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (**Figure 25**).¹³⁶ En effet, le composé fonctionnalisé par des substituants benzylpyridinium en position *meso* a été capable de réduire la population initiale de *E. coli* de plus de 6 log à 5 μM après irradiation avec une lampe halogène ($\lambda_{\text{irr}} = 380\text{-}780 \text{ nm}$, $216 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) alors que le composé comportant des unités

méthylpyridinium, moins lipophile, n'a pas atteint cette valeur et ce même à des concentrations supérieures à 10 μM . Le temps d'incubation des composés en présence des bactéries dans le noir avant irradiation a également été étudié par ce groupe. Pour ces PS, aucune différence de photoactivité n'a été observée sur *E. coli* après 30, 60 ou 90 min d'incubation.

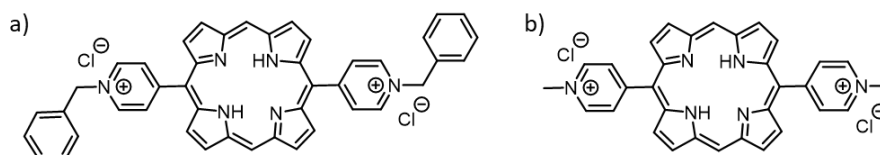


Figure 25. Structures des porphyrines dicationiques a) N-benzylpyridinium et b) N-méthylpyridinium, décrites par Orlandi *et al.*¹³⁶

Almeida *et al.* ont également étudié l'importance du caractère amphiphile des PS pour l'aPDT ainsi que l'impact de la distribution des charges au sein de la molécule. Une série de porphyrines substituées en position *meso* par des groupes méthylpyridinium et pentafluorobenzyle ont été testées (**Figure 26**).¹³⁷

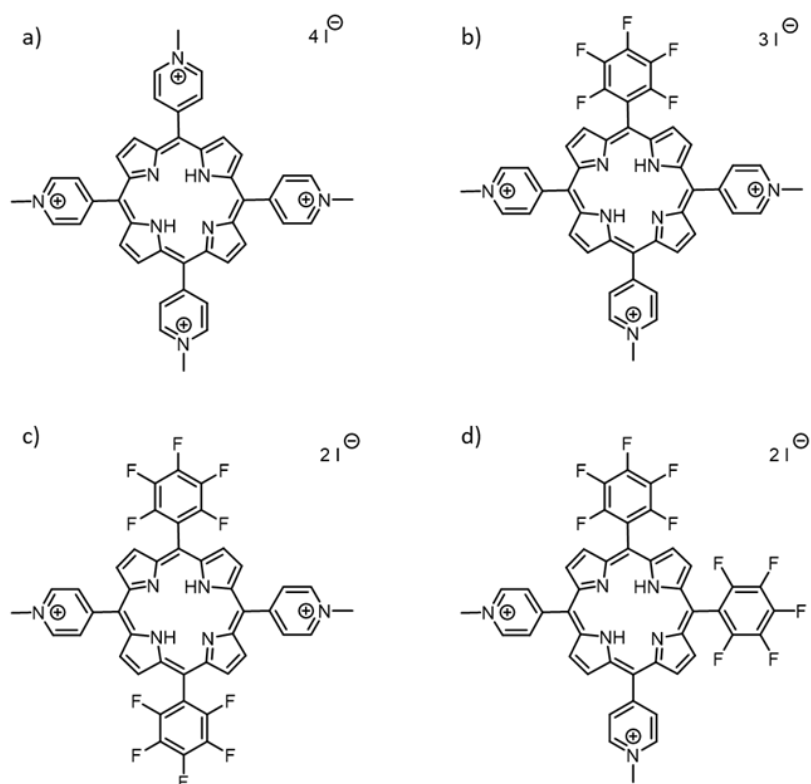


Figure 26. Structures des porphyrines a) tétracationiques, b) tricationiques, et dicationiques c) dont les groupes pyridinium sont en trans et d) dont les groupes pyridinium sont en cis, publiées par Faustino *et al.*¹³⁷

La porphyrine ne possédant qu'un seul groupe pyridinium s'agrège fortement dans l'eau et ne présente aucune activité sur les bactéries dans les conditions testées. Les porphyrines dicationiques tendent à s'agréger légèrement en milieu aqueux à des concentrations supérieures à 4 μM tandis que les porphyrines tri- et tétracationiques sont parfaitement solubles et ne présentent aucun signe d'agrégation.

L'activité antibactérienne sur *E. coli* des différents PS a été évaluée à 5 μM après 15 min d'incubation dans le noir avec les bactéries puis irradiation par une lumière blanche (380-700 nm, 4 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les temps d'irradiation nécessaires des différents PS afin d'induire une éradication totale de *E. coli*, soit une réduction de 8 log de la viabilité bactérienne, sont présentés **Tableau 2**.

Tableau 2. Temps nécessaire pour réduire la viabilité de *E. coli* de 8 log des différents PS à 5 μM par irradiation en lumière blanche (4 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).¹³⁷

	4a (tétracationique)	4b (tricationique)	4c (trans-dicationique)	4d (cis-dicationique)
Temps d'irradiation	180 min	90 min	270 min (seulement 6 log)	270 min

Le PS le plus hydrophile, la porphyrine TMPyP tétracationique (**Figure 26a**), possède une photoactivité plus faible que son analogue tricationique moins hydrophile (**Figure 26b**). Les porphyrines dicationiques sont moins efficaces et des différences d'activités sont observées entre les deux composés. En effet, la distribution des charges semble jouer un rôle important car la porphyrine dont les substituants cationiques sont adjacents (**Figure 26d**) est plus photoactive que celle dont les substituants cationiques sont opposés (**Figure 26c**). Selon les différentes études publiées par cette équipe, les PS les plus efficaces seraient fonctionnalisés par des groupes cationiques adjacents et combinés à des substituants lipophiles.^{137,138}

Néanmoins, le nombre idéal de charges positives pour les PS porphyriniques n'est pas clairement établi. Si le groupe d'Almeida préconise une charge totale de +3 à +4, Orlandi *et al.* ainsi que Maish *et al.* semblent moins catégoriques, des porphyrines dicationiques ayant démontré de fortes propriétés photobactéricides après irradiation.¹³⁶

Une autre approche développée par le groupe de Matsumoto a évalué l'importance de l'équilibre lipophilie/hydrophilie pour l'aPDT. Des porphyrines tricationiques phosphorées et fonctionnalisées par deux ligands axiaux N-alkylpyridinium ont été étudiées (**Figure 27a**).¹³⁹ L'activité photobactéricide des différents PS a été testée pour des longueurs de chaînes allant de 1 à 8 atomes de carbone. Les composés fonctionnalisés par des substituants N-heptylpyridinium de longueur de chaîne intermédiaire ont présenté les plus fortes activités photobactéricides sur *E. coli*. Ils ont permis à 0,4 μM de réduire de 50 % la viabilité bactérienne après irradiation pendant 24 min par une lampe fluorescente ($\lambda_{\text{irr}} = 400\text{-}723 \text{ nm}$, $10,5 \text{ W.cm}^{-2}$). A titre de comparaison, pour obtenir le même résultat, il a fallu 2 μM et 27 min d'irradiation pour le composé N-éthylpyridinium et 0,5 μM et 63 min d'irradiation pour le composé N-octylpyridinium.

Une seconde étude du même groupe a permis de comparer les activités de différents analogues de porphyrines fonctionnalisées par des groupes pyridinium décorés de chaînes de longueurs variables en position *méto* (**Figure 27b**).¹⁴⁰ Le composé avec les chaînes éthyles a montré la meilleure photoactivité car 0,25 μM de cette porphyrine a permis d'éradiquer la moitié de la population initiale de *E. coli* en 32 min dans les mêmes conditions que lors de la précédente étude.

La photoactivité des différents composés dépend donc grandement de leurs structures et du positionnement et de la nature des substituants mais il paraît difficile de prédire la longueur de chaîne optimale. En effet, le composé de la première étude est le plus actif pour un nombre d'atomes de carbone $n = 7$ alors que celui de la seconde l'est pour $n = 2$.

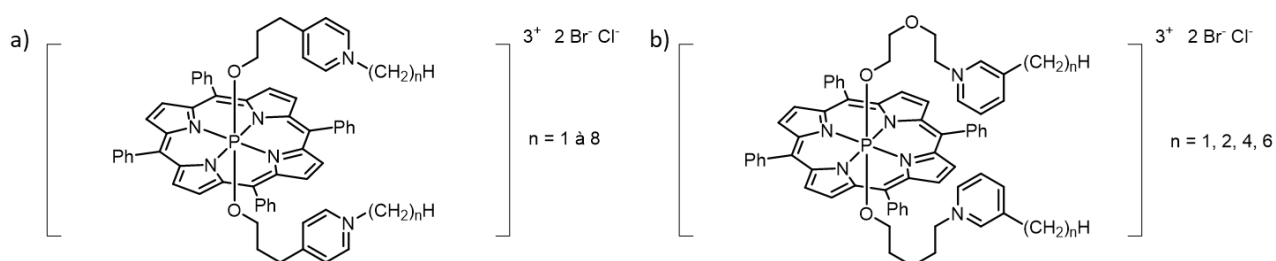


Figure 27. Structures des porphyrines de phosphore (V) tricationiques alkylpyridinium fonctionnalisées par des chaînes de longueurs variables décrites par Matsumoto *et al.*^{139,140}

Récemment, Pereira *et al.* ont obtenu des résultats prometteurs aux concentrations nanomolaires avec des porphyrines fonctionnalisées en position *meso* non pas par des groupes pyridinium mais par des groupes imidazolium (**Figure 28**).¹⁴¹ En effet, une très forte photoactivité a été observée à

seulement 10 nM : après une irradiation de faible intensité à 415 nm (2 J.cm^{-2}), la porphyrine tétracationique **IP 4** a réduit de plus de 4 log la population initiale de bactéries *E. coli*, alors qu'aucune activité de la porphyrine de référence TMPyP n'a été observée dans les mêmes conditions. A une concentration de 1 μM , les porphyrines tétracationiques **IP 4** et dicationiques **IP 2** ont totalement éradiqué la population de *E. coli* après irradiation, soit une réduction de plus de 7 log de la viabilité bactérienne. Le temps d'incubation pour ces PS représente un paramètre très important contrairement aux résultats observés dans la majorité des autres études. Une durée inférieure à 45 min diminue grandement la photoactivité contre les bactéries, alors que des changements drastiques d'efficacité sont observés après 1 h d'incubation.

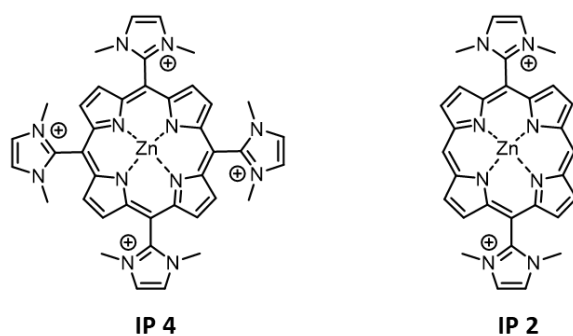


Figure 28. Structures des porphyrines imidazolium de zinc(II) a) tétracationique **IP 4** et b) dicationique **IP 2**, publiées par Pereira *et al.*¹⁴¹

Par ailleurs, de nombreux dérivés de polymères de porphyrines, conjuguées avec des nanofibres telle que la cellulose¹⁴² ou incorporées dans des hydrogels¹⁴³ sont également décrits en tant que PS pour l'aPDT dans la littérature.

3 L'association d'un photosensibilisateur et d'un peptide antimicrobien

3.1 Propriétés des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont des protéines linéaires ou cycliques principalement cationiques et produits par des organismes vivants. Ils sont de petites tailles et généralement composés de 10 à 50 acides aminés.¹⁴⁴ Ils font partie du système immunitaire inné des eucaryotes pour lutter contre les infections et possèdent un large spectre d'activité contre une multitude de pathogènes tels que les bactéries, les virus et les champignons.¹⁴⁵ Plus de 4500 AMP naturels et synthétiques sont à ce jour répertoriés et de nombreuses études sont menées pour raccourcir certains peptides afin qu'ils soient moins coûteux tout en conservant leurs propriétés antibactériennes.^{146,147}

Les AMP possèdent une proportion équilibrée d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes qui garantit leur caractère amphiphile.¹⁴⁸ Un peptide trop hydrophobe ou possédant trop de charges positives peut diminuer son activité antibactérienne et/ou augmenter son activité hémolytique ainsi que sa toxicité sur les cellules eucaryotes.^{149,150} La sélectivité et le mode d'action de l'AMP sont liés à son caractère amphiphile, sa flexibilité, sa capacité à faire des liaisons hydrogène et à la charge totale exprimée à pH physiologique.

Si de nombreux AMP sont en cours d'évaluation clinique et pré-clinique, très peu sont approuvés et commercialisés. La colistine, peptide cyclique appartenant à la famille des polymyxines, est l'exemple le plus connu d'antibiotique commercial basé sur un peptide cationique (**Figure 29**).

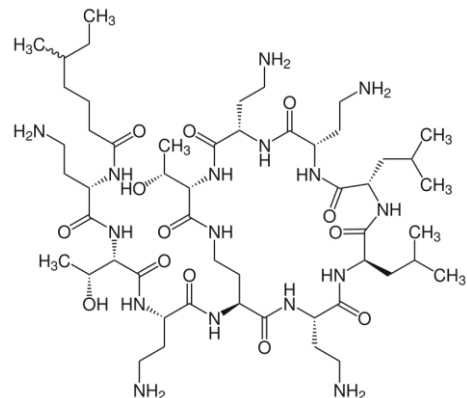


Figure 29. Structure de la colistine.

Il a également été montré que certains AMP co-administrés avec des antibiotiques peuvent avoir un effet bénéfique. Le PGLa administré à des concentrations sub-léthales avec du chloramphénicol permet par exemple de restaurer l'activité du médicament contre des BMR et ralentit le développement des résistances.¹⁵¹ D'autres AMP comme la magainine 2 peuvent également avoir un effet synergique lorsqu'ils sont combinés avec des antibiotiques tels que les bêta-lactamines.¹⁵² De plus, certains AMP possèdent des propriétés curatives. A titre d'exemple, un développement clinique est en cours pour évaluer l'effet réparateur de l'AMP LL-37 concernant la guérison d'ulcères veineux de la jambe.¹⁵³

3.2 Structures des peptides antimicrobiens

La structure secondaire des peptides est primordiale : les AMP se structurent en hélice- α , en feuillets- β ou peuvent ne pas adopter de conformation définie (« extended coil ») (**Figure 30**).¹⁴⁵

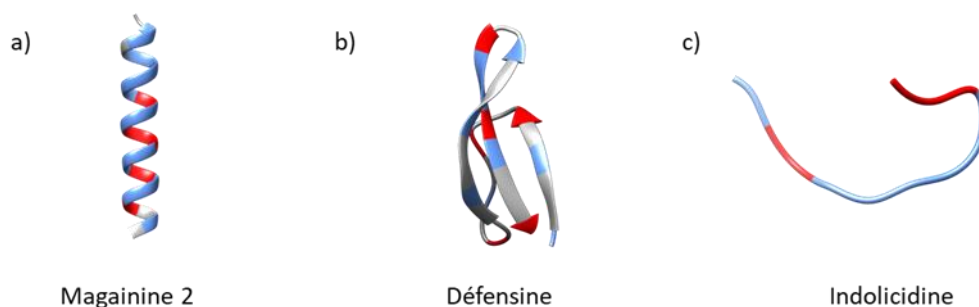


Figure 30. Différentes structures secondaires des AMP a) magainine 2 en hélice- α ; b) défensine 5 en feuillet- β ; c) indolicidine non structurée. Les résidus cationiques apparaissent en rouge, les résidus hydrophobes en bleu. Les structures ont été modélisées avec le logiciel CHIMERA. Image reproduite du journal.¹⁵⁴

La taille de l'AMP joue un rôle important : si la séquence d'acides aminés est trop courte, cela diminue la capacité du peptide à former une structure secondaire ordonnée.¹⁴⁹ Les AMP non structurés sont majoritairement composés de résidus prolines qui empêchent l'établissement d'une structure secondaire organisée.¹⁵⁵

Les peptides hélicoïdaux présentent une face polaire hydrophile et une face apolaire hydrophobe. La plupart de ces AMP ne sont généralement pas structurés en hélice en solution aqueuse et n'adoptent une conformation hélicoïdale qu'à proximité des parois anioniques bactériennes par le

biais des interactions électrostatiques.¹⁵⁶

A l'inverse, les peptides en feuillets- β sont structurés en solution aqueuse et ne changent pas de conformation en présence de lipides. En général, ces AMP comportent des résidus cystéines formant des ponts disulfures responsables de la stabilité et de la rigidité des feuillets tout en leur conférant une plus grande résistance aux protéases.¹⁵⁴

3.3 Interactions des peptides antimicrobiens avec les membranes bactériennes

Les charges positives des AMP discriminent les bactéries anioniques par rapport aux membranes neutres des cellules eucaryotes. Cette forte affinité est à l'origine de la sélectivité des AMP pour ces microorganismes. En effet, en plus de la paroi bactérienne fortement chargée négativement, la membrane cytoplasmique des bactéries diffère grandement de celle observée pour les cellules eucaryotes. La principale différence concerne les feuillets externes des membranes bactériennes composés de phospholipides anioniques alors que ceux des cellules eucaryotes sont majoritairement composés de phospholipides zwitterioniques et de dérivés de stérols.¹⁵⁶ La présence de cholestérol et de ses dérivés permet également de réduire l'action des AMP sur les cellules eucaryotes en stabilisant la membrane, diminuant ainsi sa perméabilité (**Figure 31** et **Figure 32**).¹⁵⁷

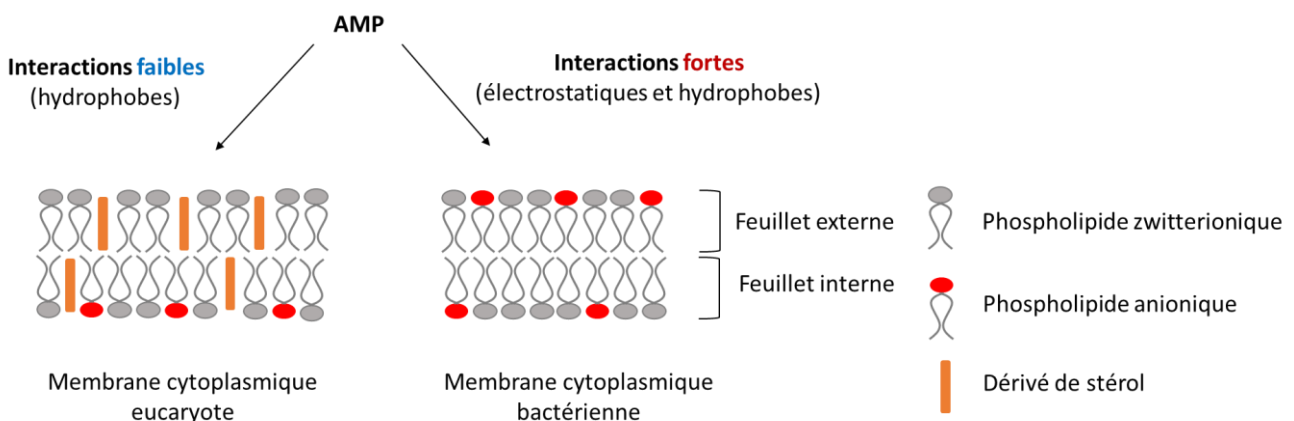


Figure 31. Affinités de l'AMP pour les membranes plasmiques des bactéries et des cellules eucaryotes. Image adaptée de Straus *et al.*¹⁵⁶

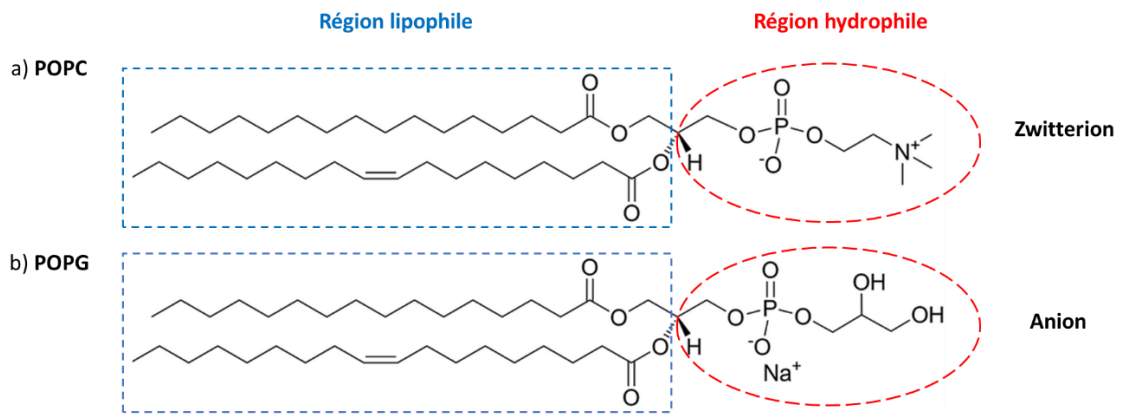


Figure 32. Exemple d'un phospholipide a) zwitterionique, le POPC, et b) anionique, le POPG.

3.4 Modes d'action des peptides antimicrobiens

Les AMP agissent selon différents mécanismes sur les bactéries. Ils peuvent agir de façon indirecte sur les pathogènes en contribuant à la défense de l'organisme infecté par stimulation du système immunitaire et contrôle de l'inflammation.^{158,159}

Cependant, la plupart des AMP agissent directement sur les pathogènes afin de les éliminer.¹⁶⁰ Pour les bactéries à Gram positif, les AMP traversent l'épaisse paroi bactérienne perméable et agissent directement sur la membrane cytoplasmique. Concernant les bactéries à Gram négatif, les peptides interagissent avec les groupes phosphates des LPS. Le remplacement momentané des petits cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} par des AMP plus volumineux créent des brèches temporaires permettant aux peptides de traverser cette membrane externe et d'accéder à la membrane cytoplasmique.^{161,162} Lorsque les AMP ont traversé les parois des bactéries à Gram positif ou négatif, ils agissent sur leur membrane plasmique. Une fois au contact de cette membrane, plusieurs modes d'actions sont observés selon la nature et la conformation du peptide :^{154,163,164}

- Certains AMP ciblent les composants intracellulaires des bactéries en pénétrant dans la cellule par translocation sans dégrader la membrane cytoplasmique.
- D'autres agissent directement sur la membrane cytoplasmique des bactéries en la dégradant.

La dégradation de la membrane peut être induite par la formation de pores transmembranaires entraînant une dépolarisation et un dysfonctionnement de cette dernière. L'inhibition de la

respiration, la mauvaise régulation osmotique ou une importante déformation membranaire aboutissant à la rupture complète de la membrane conduisent à la lyse de la bactérie. Dans certains cas, certains AMP agissent également sur les composants internes des bactéries en pénétrant dans le cytoplasme par le biais des pores formés. La formation de pores est décrite selon deux modèles : le modèle de pores en douve de tonneaux (« barrel-stave model ») et le modèle de pores toroïdaux (« Wormhole pore ») (**Figure 33**).

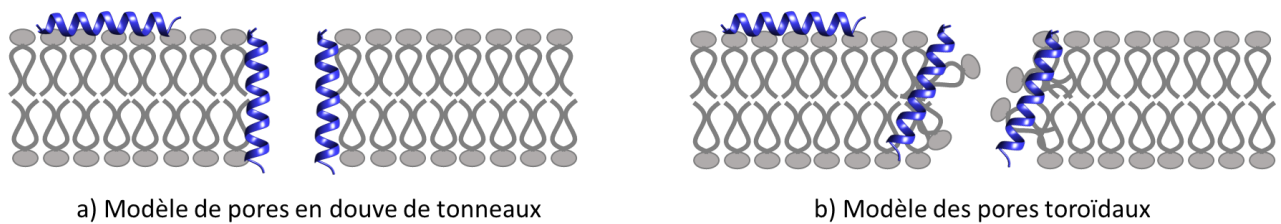


Figure 33. Modèles de formation de pores membranaires par action des AMP.¹⁶⁵

Dans ces deux modèles, les peptides sont dans un premier temps orientés parallèlement à la membrane cytoplasmique puis s'insèrent perpendiculairement dans la bicouche.

Dans le modèle des pores en douve de tonneaux, il y a des interactions latérales hydrophobes peptide-peptide. La face hydrophobe interagit également avec les lipides apolaires de la membrane tandis que la face polaire forme la structure tubulaire, à l'origine du pore transmembranaire (**Figure 33a**). L'organisation et la structuration des régions hydrophiles et hydrophobes des lipides composant la membrane sont maintenues.

Pour le modèle des pores toroïdaux, il n'y a pas d'interactions latérales entre les peptides (**Figure 33b**). Les AMP perturbent la membrane en induisant une courbure de la bicouche. Les pores sont formés par les peptides et les têtes polaires des lipides : l'organisation hydrophile/hydrophobe de la membrane est perturbée.

Un troisième modèle de dégradation de la membrane sans formation de pores est également établi : le modèle de déstabilisation en tapis (« carpet-like model ») (**Figure 34**).

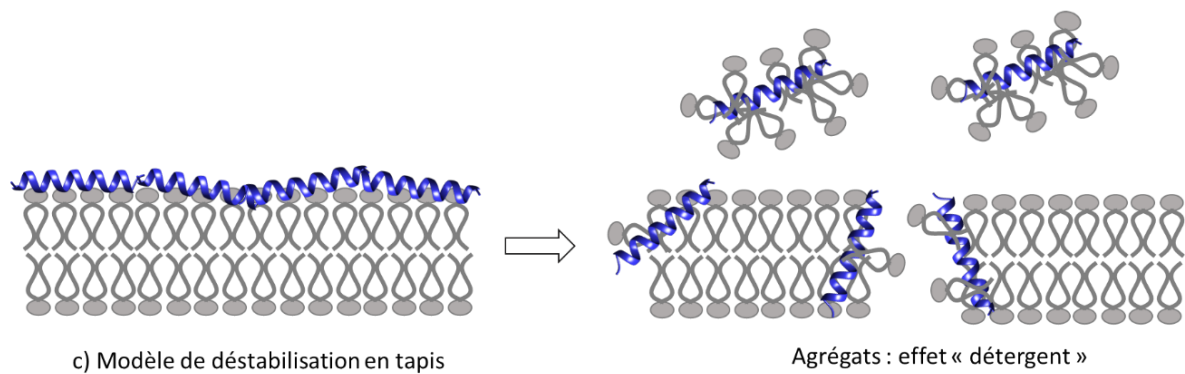


Figure 34. Modèle de déstabilisation en tapis de la membrane bactérienne par l'action des AMP.¹⁶⁵

Les AMP sont adsorbés parallèlement aux lipides à la surface de la membrane et s'accumulent afin de former un tapis peptidique. Lorsqu'une concentration critique est atteinte, les interactions défavorables perturbent l'intégrité membranaire qui finit par se désintégrer en formant des structures micellaires. Ce mécanisme ne fait pas intervenir d'interactions peptide-peptide et ces derniers n'ont pas besoin de s'insérer dans la partie hydrophobe de la membrane pour former des canaux.

Il est actuellement admis que les AMP agissent différemment sur les membranes bactériennes selon le ratio peptide/lipide lié à leurs concentrations dans le milieu, et selon la nature des lipides membranaires et l'épaisseur de la bicouche lipidique.¹⁶² En effet, un même peptide peut avoir différents modes d'action selon la composition de la membrane. L'auréine 2.2 peut par exemple induire des pores toroïdaux ou agir comme un détergent selon la nature de la membrane sur laquelle elle agit.¹⁶⁶

3.5 Limitations à l'usage des peptides antimicrobiens

Les AMP possèdent certains défauts qui limitent leurs applications antibactériennes. L'une des principales limitations à leur usage provient de leur faible stabilité métabolique *in vivo*. Ils peuvent en effet être rapidement hydrolysés et dégradés par des enzymes protéolytiques, les protéases, et peuvent se lier aux protéines anioniques de l'hôte.¹⁶⁷

Les mutations des bactéries induisant une modification structurelle peuvent également réduire l'activité des AMP : une baisse de charges surfaciques anioniques diminue les interactions

électrostatiques avec les peptides. Une augmentation de pompes d'efflux permet quant à elle d'excréter les peptides pénétrant dans le cytoplasme, réduisant leur concentration intracellulaire.^{168,169}

La formation de biofilms diminue également l'efficacité des AMP en les piégeant dans la matrice extracellulaire, les empêchant d'atteindre leurs cibles.¹⁷⁰

De plus, la faible corrélation entre les résultats *in vitro* et *in vivo* résultant de la grande sensibilité des AMP à leur environnement constitue un frein pour leur développement clinique.¹⁴⁴

3.6 Nouveaux AMP développés pour l'application antibactérienne

Pour pallier ces problèmes, il est possible de modifier les AMP afin de les rendre plus résistants et donc plus efficaces. Certaines modifications chimiques permettent aux peptides d'être plus stables vis-à-vis des protéases, notamment par cyclisation, par N-acétylation ou par C-amidation des azotes et carbones terminaux.^{171,172} Une autre modification chimique consiste à utiliser des acides aminés D en remplacement de leurs énantiomères naturels L, conduisant à une meilleure résistance aux protéases stéréospécifiques.^{173,174}

Il est également possible d'incorporer les AMP dans des nanoparticules de silice mésoporeuse ou des nanoparticule d'or ou d'argent pour leur assurer une meilleure stabilité.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷

L'intégration des AMP dans des nanogels est aussi une méthode utilisée pour augmenter leur stabilité *in vivo* et prévenir d'éventuels phénomènes d'agrégation. L'encapsulation du peptide LL-37 dans des nanogels d'acide hyaluronique permet ainsi d'augmenter l'activité antibactérienne de l'AMP tout en lui conférant une plus grande résistance aux protéases et en diminuant sa toxicité sur les cellules de l'hôte.¹⁷⁸

3.7 Association d'un photosensibilisateur avec un peptide antimicrobien pour l'aPDT

3.7.1 Avantages de l'association PS-AMP

L'aPDT, bien que prometteuse pour éliminer les BMR induites par les traitements antibiotiques, souffre généralement du manque de sélectivité et de solubilité des PS utilisés.

L'association d'un PS et d'un AMP est ainsi utilisée pour pallier ces limitations, le peptide permettant (**Figure 35**) :

- D'augmenter la solubilité du PS en milieu aqueux à pH physiologique.
- D'augmenter la sélectivité du traitement car le peptide favorise l'interaction du conjugué avec les membranes bactériennes.

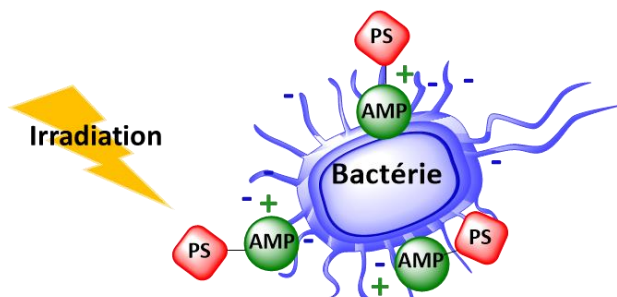


Figure 35. Schéma de l'action du conjugué PS-AMP pour l'aPDT (échelle non respectée).

3.7.2 Exemples d'agents antibactériens PS-AMP

Il existe dans la littérature un nombre limité de conjugués porphyriniques liés de façon covalente à des AMP.

Le groupe de Wilson a décrit en 2010 une *meso*-tétraphénylporphyrine neutre liée à un peptide pénétrant (CPP) dérivé du Tat, composé de 6 résidus arginine (**Figure 36**).¹⁷⁹ Ce conjugué s'est montré photoactif à 0,5 μM sur *S. aureus* et *E. coli* après irradiation par une lumière bleue pendant 30 s (7 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) en réduisant de plus de 4 log la population bactérienne initiale. Le composé s'est également avéré actif dans le noir et particulièrement sur *S. aureus* à 1 μM avec une réduction de plus de 3 log de la survie bactérienne. Cela peut être dû à la présence des nombreuses arginines qui confèrent au peptide sa capacité à pénétrer dans les cellules. Des études évaluant la toxicité sur les cellules eucaryotes n'ont cependant pas été effectuées par les auteurs.

Une variation du temps d'incubation de 30 min à 5 h a par ailleurs montré une différence négligeable de la photoactivité du conjugué, contrairement à l'augmentation de la concentration qui permet un accroissement de l'efficacité du composé après irradiation, mais également en l'absence de lumière.

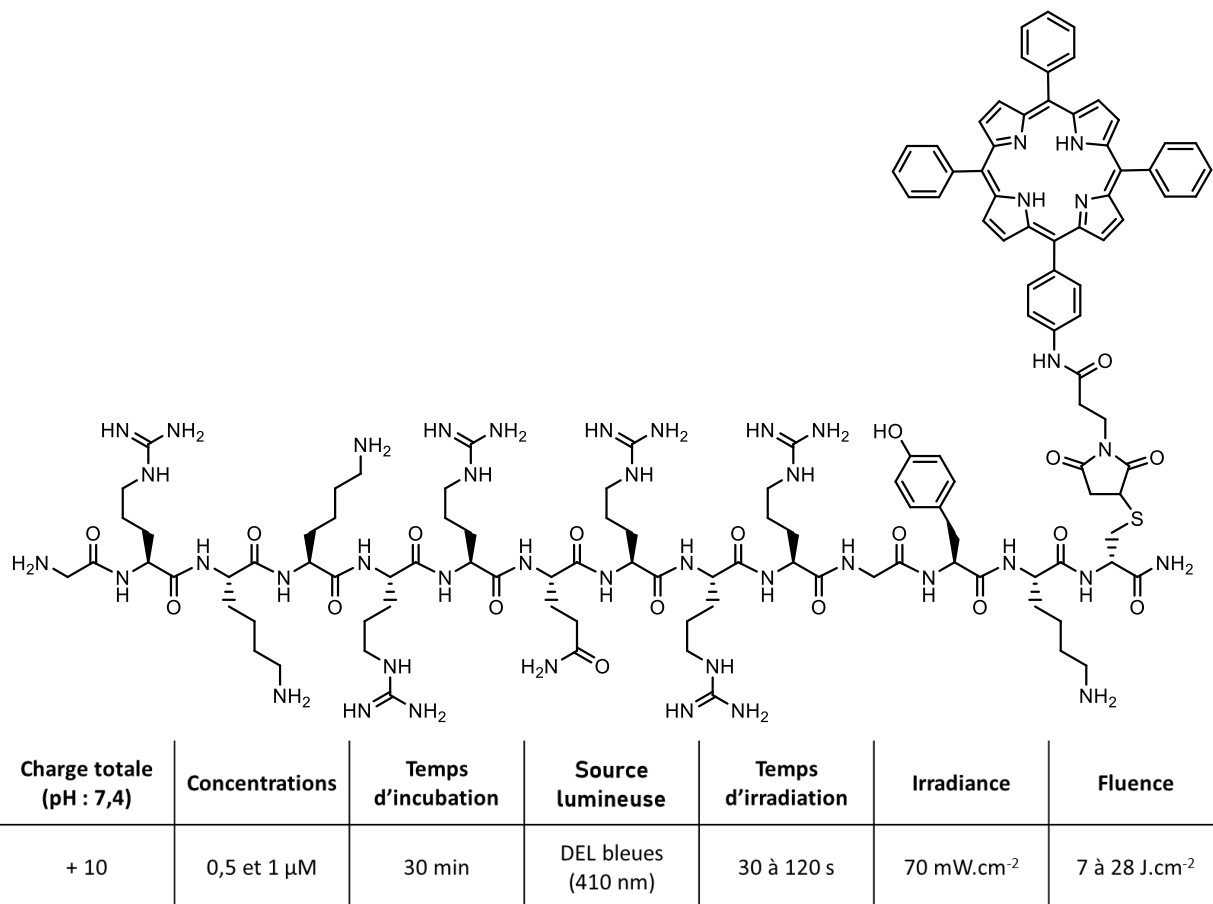
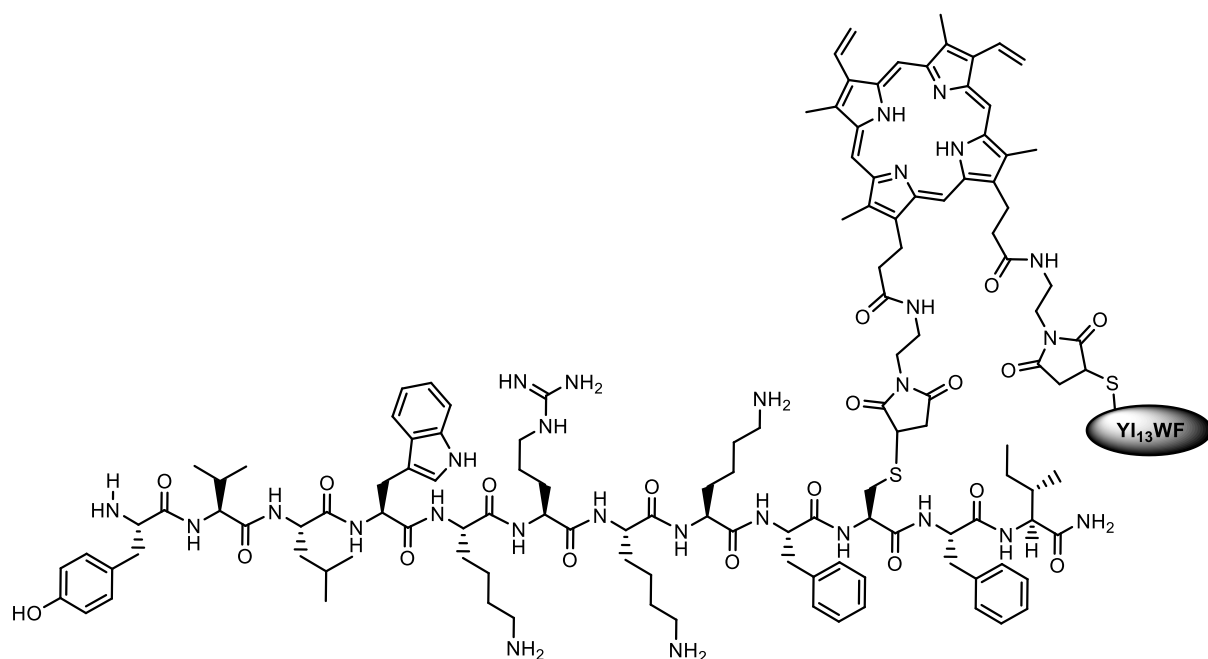


Figure 36. Structure de la tétraphénylporphyrine liée au dérivé de Tat décrite par Wilson *et al* et tableau récapitulatif des conditions des tests antibactériens.¹⁷⁹

Une approche intéressante développée par Xing *et al.* en 2012 a consisté à lier une protoporphyrine IX neutre à deux AMP identiques YI₁₃WF et à comparer l'activité avec l'analogue conjugué à un seul peptide (**Figure 37**).¹⁸⁰ La protoporphyrine bis-conjuguée s'est montrée plus photoactive que la mono-conjuguée sur différentes souches de *E. coli* à 1 μ M. Après 10 min d'irradiation en lumière blanche par fibre optique (30 J.cm⁻²), le composé comportant deux peptides a induit une réduction de la survie bactérienne de 4 log alors que le conjugué avec un seul peptide n'a induit qu'une réduction de 2 log. Dans les mêmes conditions, les conjugués ne se sont pas avérés toxiques ni phototoxiques sur des lymphocytes T, traduisant ainsi une sélectivité *in vitro* de ces molécules pour les bactéries par rapport à certaines cellules eucaryotes.

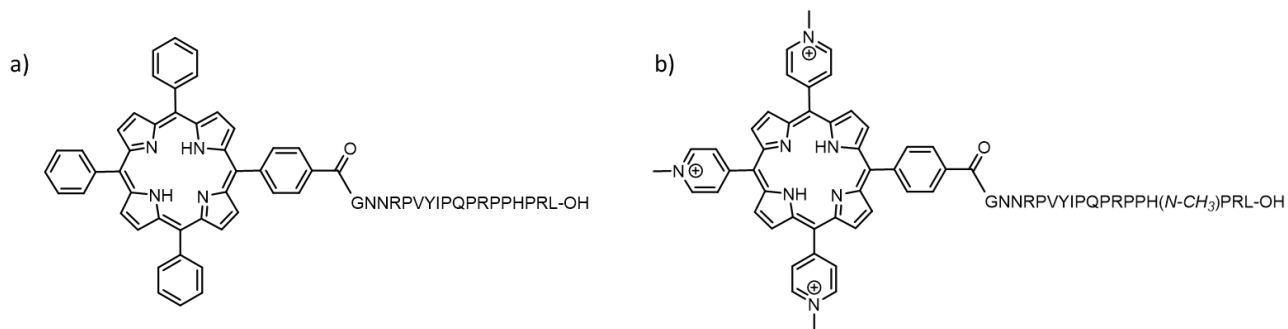


Charge totale (pH : 7,4)	Concentrations	Temps d'incubation	Source lumineuse	Temps d'irradiation	Irradiance	Fluence
+ 10 (5 x 2)	0,25 à 1 μ M	20 min	Fibre optique (400-900 nm)	2 à 10 min	50 mW.cm ⁻²	6 à 30 J.cm ⁻²

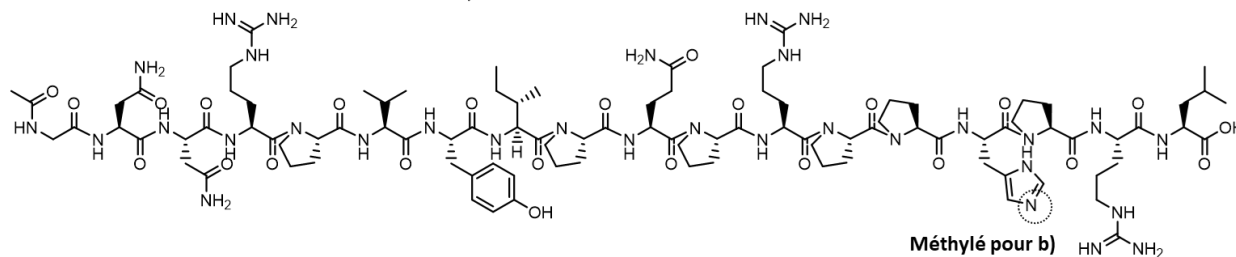
Figure 37. Structure de la protoporphyrine IX liée à deux peptides YI13WFb publiée par Xing *et al* et tableau récapitulatif des conditions des tests antibactériens.¹⁸⁰

Afin d'étudier l'effet de la structure des conjugués porphyrine-peptide sur leur activité antibactérienne, Reddi *et al.* ont synthétisé plusieurs conjugués liant des porphyrines neutres et tricationiques avec différents AMP, l'apidaécine 1b, la buforine II et la magainine 2.

Lors d'une première série d'études en 2013, l'apidaécine 1b, un peptide pénétrant dans les bactéries (CPP), a été conjugué à une porphyrine neutre et une porphyrine cationique (**Figure 38**).¹⁸¹



Apidaécine :



Charge totale (pH : 7,4)	Concentrations	Temps d'incubation	Source lumineuse	Temps d'irradiation	Irradiance	Fluence
a) +3 b) +7	1,5, 5, 10 et 15 μ M	60 min	Lampe UV-bleue (390-460 nm)	15 min	15,2 mW.cm ⁻²	13,5 J.cm ⁻²

Figure 38. Structures de l'apidaécine 1b liée à a) la porphyrine neutre, b) la porphyrine tricationique, développées par Reddi *et al.* et tableau récapitulatif des conditions des tests antibactériens.¹⁸¹

Une différence de photoactivité a été observée entre les deux conjugués à une concentration de 5 μ M. Après irradiation en lumière bleue pendant 15 min (13,5 J.cm⁻²), le conjugué composé de la porphyrine neutre (**Figure 38a**) a induit une réduction de plus de 3 log de la survie des bactéries *E. coli* alors que celui constitué d'une porphyrine cationique (**Figure 38b**) a induit une réduction de plus de 4 log. Cette différence d'activité s'est néanmoins inversée lorsque des lavages au PBS ont été réalisés afin de retirer du milieu les conjugués non liés aux bactéries. Le composé comportant une porphyrine cationique, plus hydrophile, est donc plus faiblement lié aux bactéries que son analogue comportant une porphyrine neutre, ces différences d'affinités ayant été également observées par cytométrie en flux. Différents temps d'incubation dans le noir (de 15 à 120 min) entre les PS et les bactéries ont également été testés et n'ont pas eu d'effet sur l'activité des molécules.

Des études plus récentes publiées en 2014 par les mêmes équipes ont comparé les activités observées pour des porphyrines liées à des peptides différents, la magainine 2 (non CPP) et la buforine II (CPP) (**Figure 39**).¹⁸²

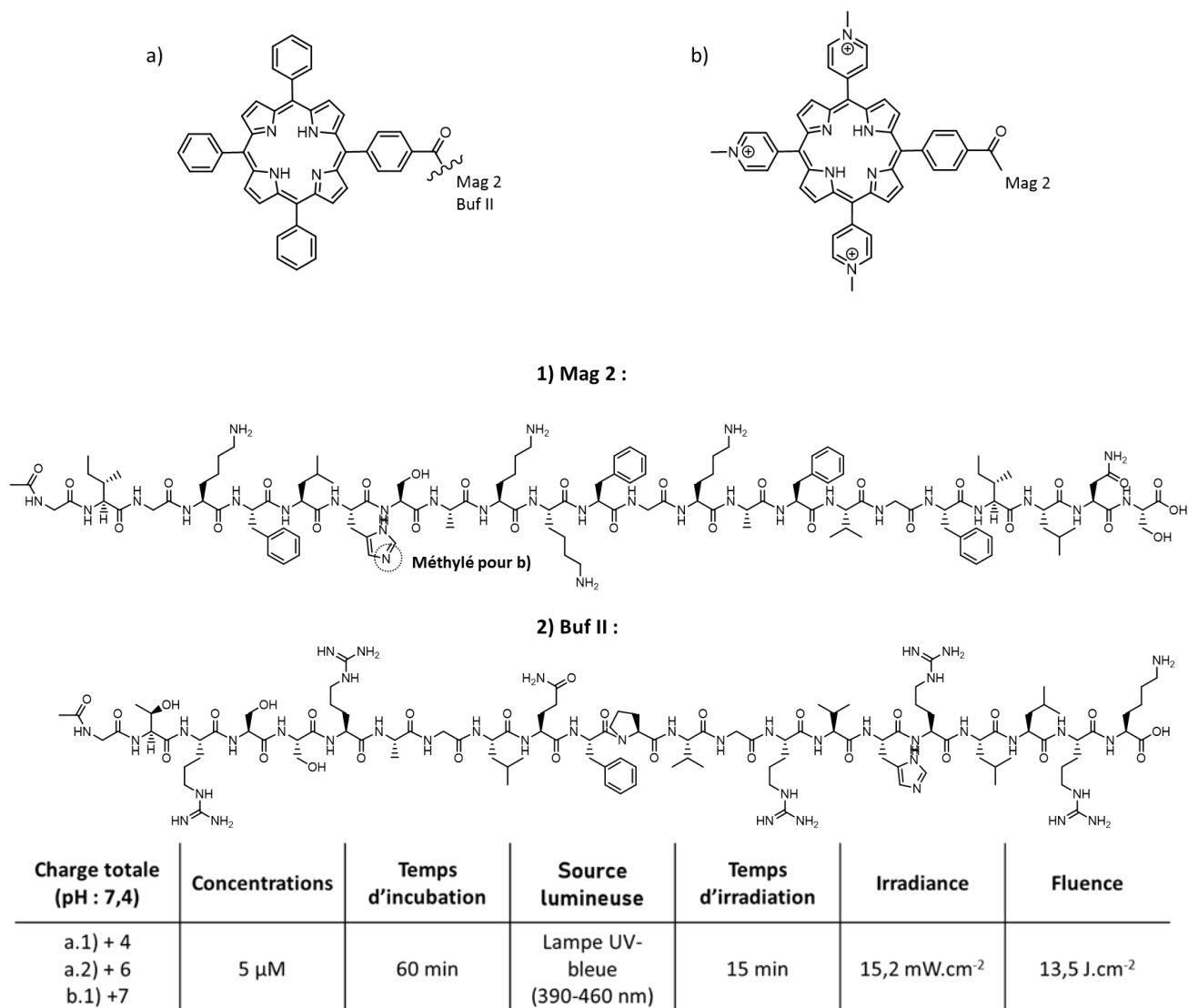


Figure 39. Structures de la porphyrine neutre liée à a.1) la magainine 2 (Mag 2), a.2) la buforine II (Buf II) et de la porphyrine tricationique liée à b.1) la magainine 2, développées par Reddi *et al.* Les conditions des tests antibactériens sont explicitées dans le tableau.¹⁸²

Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment à une concentration de 5 μ M et une irradiation par lampe UV-bleue pendant 15 min.¹⁸² Les résultats diffèrent selon la nature du peptide et de la porphyrine : une réduction de la viabilité de *E. coli* d'environ 3 log a été

obtenue pour la porphyrine neutre liée à la magainine 2 (**Figure 39a.1**), de 7 log pour cette même porphyrine liée à la buforine II (**Figure 39a.2**) et 7 log également pour la porphyrine tricationique liée à la magainine 2 (**Figure 39b.1**). La condition porphyrine cationique-buforine II ne semble pas avoir été testée.

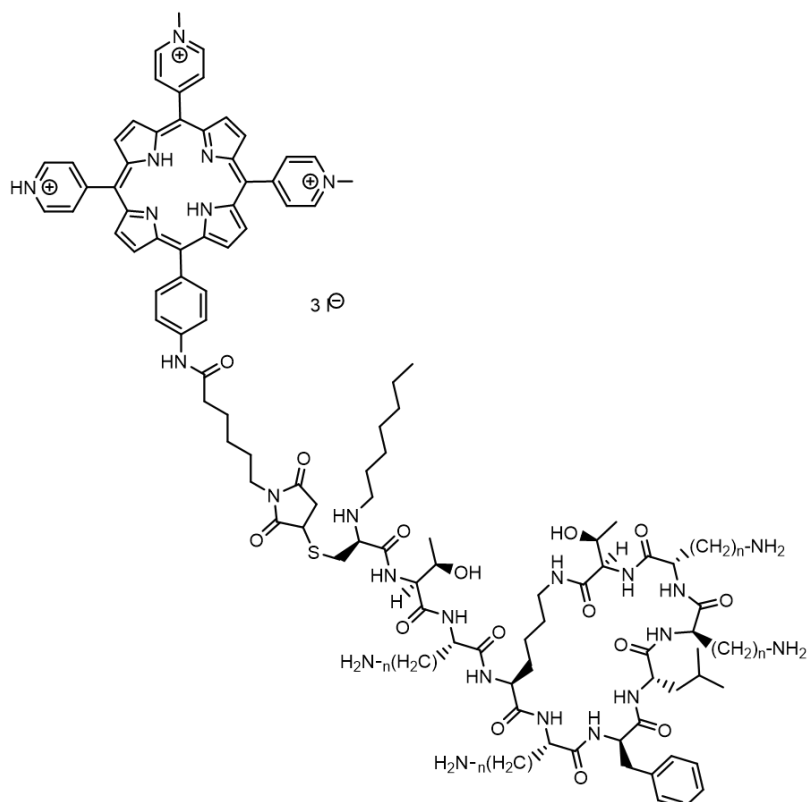
De manière intéressante, l'activité des porphyrines neutres liées aux AMP est inchangée si des lavages au PBS sont effectués après incubation en présence des bactéries, alors que la porphyrine cationique liée à la buforine II voit son activité chuter drastiquement de plus de 4 log. De la même façon que pour la précédente étude, les conjugués comportant une porphyrine neutre semblent liés plus fortement aux bactéries que leur analogue présentant une porphyrine cationique en raison d'un caractère amphiphile plus prononcé.

La nature du peptide influe également sur l'activité antibactérienne des conjugués après irradiation mais il est difficile de le corrélérer au caractère pénétrant ou non de l'AMP. Ainsi, l'apidaécine 1b (CPP) et la magainine 2 (non CPP) conjuguées aux porphyrines neutres possèdent des photoactivités similaires en réduisant de 3 log la survie de *E. coli*, tandis que le conjugué composé de la buforine II (CPP) présente une meilleure activité photobactéricide en impliquant une baisse de plus de 7 log de la viabilité bactérienne.

Un inconvénient majeur de toutes les molécules décrites par Reddi est leur phototoxicité sur les cellules eucaryotes telles que les fibroblastes et ce même à des concentrations nanomolaires alors que les photosensibilisateurs et peptides seuls ne présentent pas de toxicité.

En outre, une étude menée par Malik *et al.* dans laquelle la polymyxine B, un peptide cyclique aux propriétés antibactériennes, a été utilisée en tant qu'adjuvant pour désorganiser la membrane externe de *E. coli* a été publiée en 1995.¹²⁰ En présence de cet antibiotique, les porphyrines neutres étudiées, habituellement inefficaces sur les bactéries à Gram négatif, ont montré une photoactivité non négligeable après irradiation.

A la suite de cette étude, le groupe de Sol a développé en 2017 un conjugué PS-AMP composé d'un analogue de la polymyxine B lié de façon covalente à une porphyrine tricationique (**Figure 40**, $n = 2$ avec n représentant le nombre de carbones des chaînes portant les amines primaires).¹⁸³



Charge totale (pH : 7,4)	Concentrations	Temps d'incubation	Source lumineuse	Temps d'irradiation	Irradiance	Fluence
+ 7	10 μ M	30 min	DEL blanches	24 à 120 min	4,8 mW.cm ⁻²	7 à 35 J.cm ⁻²

Figure 40. Structure de la porphyrine tricationique liée à la polymyxine B (n= 2) ou un analogue de la polymyxine B (n = 4) décrites par Sol *et al.* et tableau récapitulatif des conditions des tests antibactériens.^{183,184}

Le conjugué s'est montré bien plus photoactif que la porphyrine cationique seule sur les souches *S. aureus* et *E. coli*. En effet, après irradiation avec des DEL émettant une lumière blanche, le composé porphyrine-peptide incubé à 10 μ M a conduit à une réduction de plus de 3 log de la survie de *E. coli* au bout de 10 min (3 J.cm⁻²) et plus de 5 log après 25 min (7 J.cm⁻²). La porphyrine seule n'a eu quant à elle aucun effet dans ces mêmes conditions. Des études par cytométrie en flux ont montré que le conjugué présente également une forte affinité pour les parois bactériennes. Néanmoins, il s'est avéré actif en l'absence de lumière car il a induit à 5 μ M une réduction de plus de 4 log de la viabilité de *E. Coli* après 20 h d'incubation sans irradiation.

Pour pallier cela, une deuxième étude du même groupe parue en 2018 a consisté à modifier la

polymyxine B afin de la rendre moins active en l'absence de lumière et de limiter ainsi le développement d'éventuelles résistances (**Figure 40**, n = 4).¹⁸⁴ En effet, le développement de résistance a déjà été observé pour des bactéries contre la polymyxine, notamment chez une souche de *Acinetobacter baumannii* devenue insensible à la colistine.¹⁸⁵ Les résidus d'acide diamino-butyrique (dab) ont été remplacés par des résidus lysine dont la chaîne carbonée est plus longue ; la charge totale de la molécule a été conservée. Le conjugué s'est avéré plus de cinq fois moins actif que son analogue avec la polymyxine non modifiée en l'absence de lumière tout en conservant une photoactivité très similaire après irradiation par lumière blanche sur les bactéries à Gram positif et négatif.

Malgré une forte phototoxicité du conjugué sur les fibroblastes aux concentrations nanomolaires, des études par microscopie confocale ont montré que pour un milieu constitué de bactéries et de cellules eucaryotes, une sélectivité du conjugué pour les bactéries était obtenue. Ce résultat montre qu'un temps d'exposition réduit suivi d'un temps d'irradiation court peut permettre d'accroître la sélectivité du traitement en limitant l'interaction du conjugué avec les cellules eucaryotes.

4 Projet de thèse

L'association d'un PS permettant une action photobactéricide rapide à un AMP ciblant les membranes bactériennes constitue une approche antibactérienne intéressante et peu développée. L'objectif de ce travail a été de concevoir et de synthétiser de nouveaux agents photoactivables vectorisés pour la thérapie photodynamique antibactérienne. Notre choix s'est porté sur l'association de différentes porphyrines fonctionnalisées à des peptides antimicrobiens cationiques pour un équilibre entre le caractère lipophile et hydrophile des constituants. D'autre part, les PS choisis possèdent un système aromatique π -étendu pour absorber dans le proche IR afin de pouvoir être excités dans la fenêtre thérapeutique optique. L'utilisation d'une lumière rouge offre la possibilité de traiter des infections plus en profondeur sans induire de photodommages aux chromophores endogènes avoisinant la zone à traiter.

Les peptides ont été sélectionnés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de biophysique des membranes du Pr. Burkhard Bechinger, spécialiste des interactions des AMP avec les

membranes lipidiques, et l'équipe de biomatériaux et bioingénierie du Dr. Philippe Laval de l'unité de recherche INSERM 1121 de Strasbourg. Les AMP choisis ont été étudiés précédemment et ont montré de bonnes affinités pour les parois bactériennes.^{186,187}

Les travaux réalisés au cours de ma thèse sont présentés dans la suite de ce manuscrit.

Le chapitre 2 expose la synthèse, la caractérisation ainsi que les propriétés des différents PS, AMP et des conjugués PS-AMP.

Le chapitre 3 décrit l'activité et la photoactivité antibactérienne des composés après irradiation vis-à-vis de deux types de bactéries (*S. aureus* et *E. coli*) ainsi que leurs toxicités et phototoxicités vis-à-vis des cellules eucaryotes.

La synthèse, la caractérisation et l'évaluation biologique de photosensibilisateurs cationiques non liés à des AMP ainsi que la synthèse de porphyrines métallées au palladium(II) font l'objet du chapitre 4.

Chapitre II : Synthèse et caractérisations de conjugués porphyrine-peptide pour la thérapie photodynamique antibactérienne

Ce chapitre de thèse décrit la synthèse et la caractérisation de conjugués porphyrine-peptide pour l'aPDT. Ils sont constitués d'une porphyrine neutre liée à un peptide antibactérien cationique (**Figure 41**).

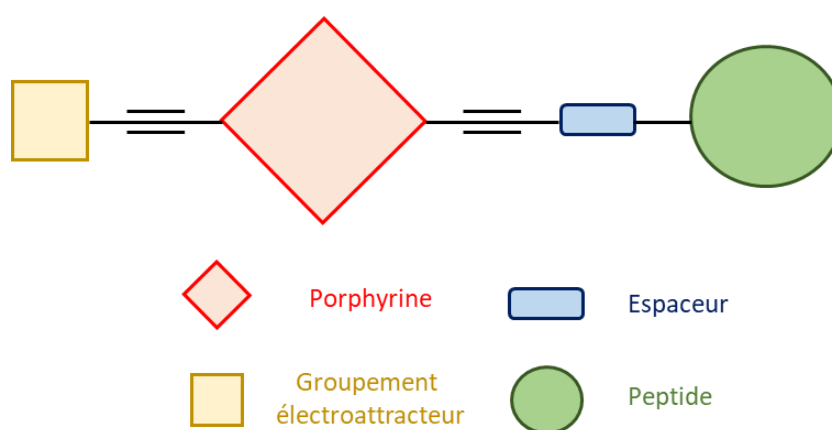


Figure 41. Schéma des constituants des molécules ciblées.

Le photosensibilisateur est composé d'une porphyrine dont deux positions *meso* sont fonctionnalisées par des alcynes respectivement liés à un espaceur et à un groupement électroattracteur. Le système conjugué π -donneur π -accepteur permet au PS d'être excité dans la fenêtre thérapeutique optique (700-900 nm) par déplacement de la longueur d'onde d'absorption vers le rouge par effet « Push-Pull ». ^{188,189}

Le peptide antimicrobien cationique permet de cibler les membranes anioniques des bactéries et de favoriser la solubilité du PS en milieu aqueux.

1 Molécules précédemment développées au laboratoire

Plusieurs photosensibilisateurs constitués d'une porphyrine de zinc(II) bis-éthynyle fonctionnalisée par des groupes dicétopyrrolopyrrole (DPP) ont été développés au laboratoire. La synthèse du précurseur porphyrinique **ZnP** (**Figure 42a**) a été mise au point par Julie Schmitt au cours sa thèse. Dans le cadre de son projet, ce précurseur a pu être obtenu à l'échelle du gramme et déprotégé afin de le fonctionnaliser avec différentes unités pour être utilisé en PDT en tant que photosensibilisateur.

La longueur d'onde maximale d'absorption de ces PS augmente en fonction de la délocalisation des électrons, permettant une excitation dans le proche IR (**Figure 42**).

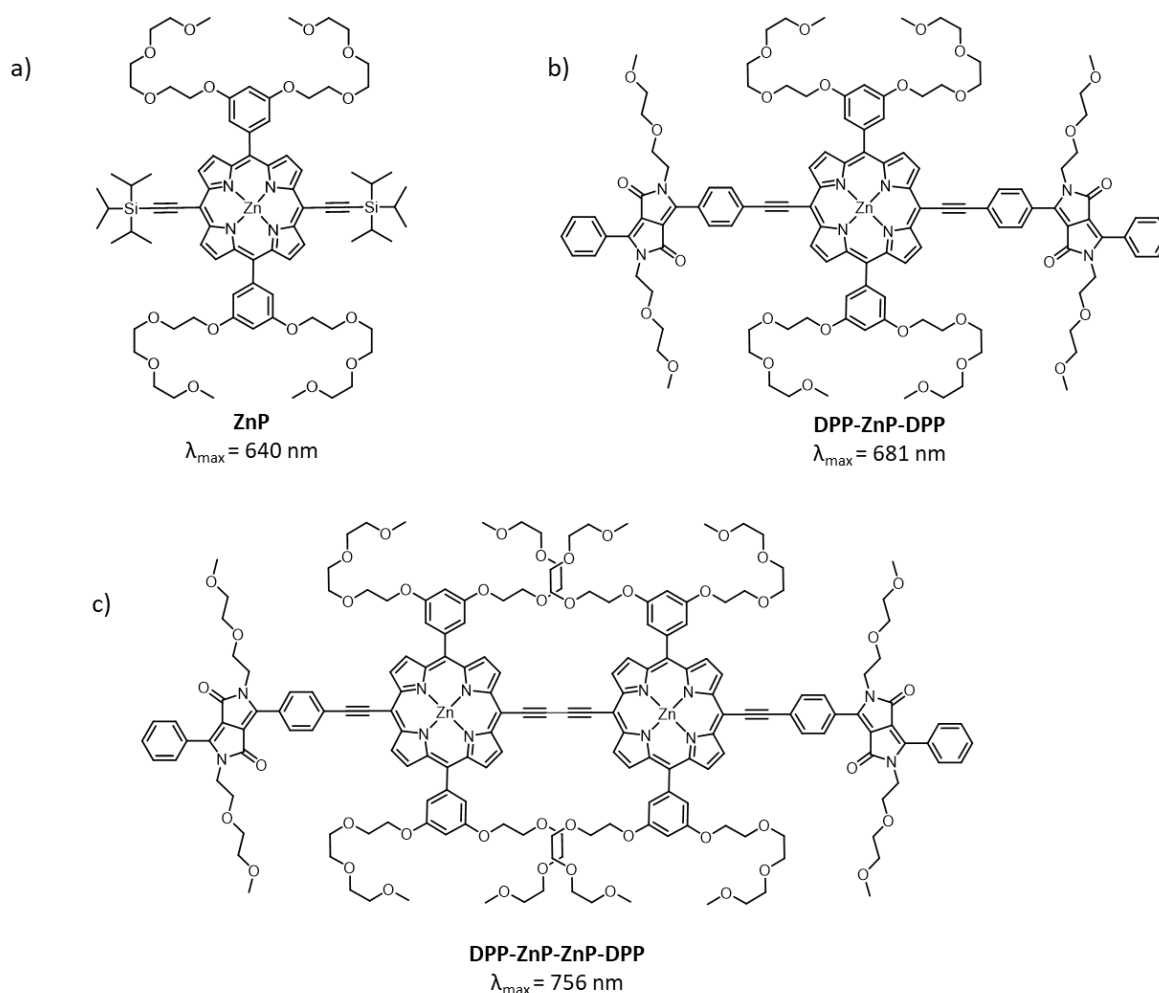


Figure 42. Structures des PS **ZnP**, **DPP-ZnP-DPP** et **DPP-ZnP-ZnP-DPP** développés au laboratoire et leurs longueurs d'onde maximales d'absorption dans le DMSO.^{190,191}

Afin d’obtenir des traitements sélectifs, des agents moléculaires vectorisés pour la PDT anticancéreuse ont été développés. Une porphyrine liée à un groupe DPP et vectorisée par l’acide folique a montré une forte photoactivité anticancéreuse à une faible concentration de 1 μM après irradiation à 660 nm (**Figure 43**).¹⁹² Le PS vectorisé s’est montré près de quatre fois plus photoactif sur les cellules cancéreuses HeLa que la porphyrine analogue sans vecteur après 15 min d’irradiation (32 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), démontrant ainsi l’importance d’une forte affinité pour les cellules à traiter. La délocalisation étendue des électrons π permet au composé d’être irradié dans le proche IR, mais également par excitation biphotonique à 920 nm en raison de sa forte section efficace d’absorption à deux photons ($\sigma = 800 \text{ GM}$ à 930 nm).

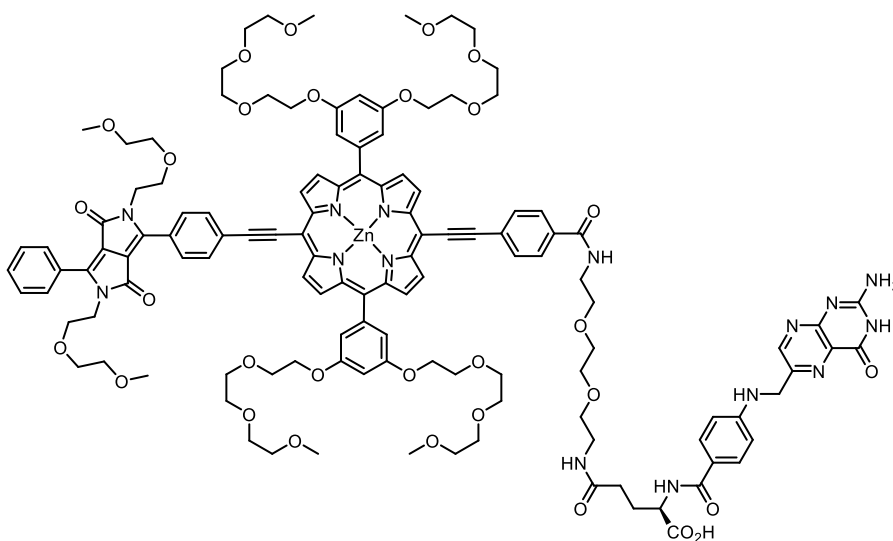


Figure 43. Photosensibilisateur vectorisé **DPP-ZnP-Acide Folique** développé au laboratoire.¹⁹²

2 Conception des conjugués

Les PS précédemment développés au laboratoire nous ont conduit à envisager la synthèse de trois conjugués porphyrine-peptide **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** pour l’aPDT en utilisant la porphyrine **ZnP** comme synthon fonctionnalisable (**Figure 44**).

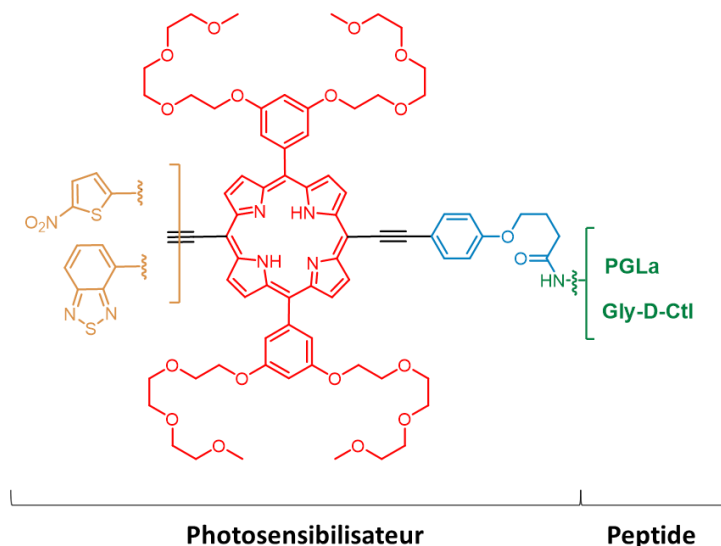


Figure 44. Structure des conjugués PS_1 -PGLa, PS_2 -PGLa et PS_2 -Gly-D-Ctl.

2.1 Conjugué PS_1 -PGLa

Le conjugué PS_1 -PGLa est composé d'une porphyrine *meso*-5,15-bis-éthynyle reliée à l'unité nitrothiophène et au peptide antibactérien PGLa (Figure 45).

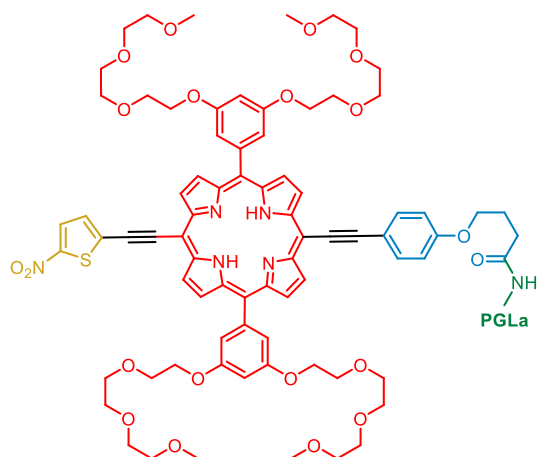



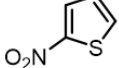
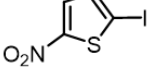
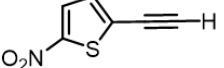
Figure 45. Structure du conjugué PS_1 -PGLa.

2.1.1 Choix du photosensibilisateur

L'unité nitro-thiophène est intéressante pour l'aPDT car elle influe sur les propriétés photophysiques et l'absorption de la porphyrine utilisée en tant que PS. Des exemples de

thiophènes conjugués en position alpha du soufre avec des phényles produisant majoritairement de l'oxygène singulet en présence de dioxygène par transfert d'énergie ont été décrits.¹⁹³ La production d'ions superoxydes O_2^- , formés par transfert d'électron, est négligeable pour ces thiophènes fonctionnalisés.¹⁹³ L'effet d'atome lourd induit par le soufre permet de favoriser le CIS et le transfert d'énergie de l'état triplet du thiophène aux molécules de dioxygène environnantes.¹⁹⁴ L'équipe de Therien a étudié l'effet de la substitution des thiophènes sur leurs longueurs d'ondes d'absorption dans le THF.¹⁹⁵ Le substituant nitro en position alpha du soufre induit un déplacement bathochrome du maximum d'absorption de plus de 80 nm, et l'introduction d'une fonction éthyne sur la seconde position alpha induit le même effet qu'un atome d'iode mésomère donneur, permettant un déplacement vers des longueurs d'ondes plus grandes (**Tableau 3**).

Tableau 3. Effet de la fonctionnalisation d'un thiophène sur la longueur d'onde d'absorption dans le THF.¹⁹⁵

				
$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	230	312	340	340

La conjugaison d'un groupe nitro-thiophène à une porphyrine par l'intermédiaire d'une fonction alcyne en position *meso* pour accroître la délocalisation électronique a également été évaluée par cette même équipe (**Figure 46b**).¹⁹⁵

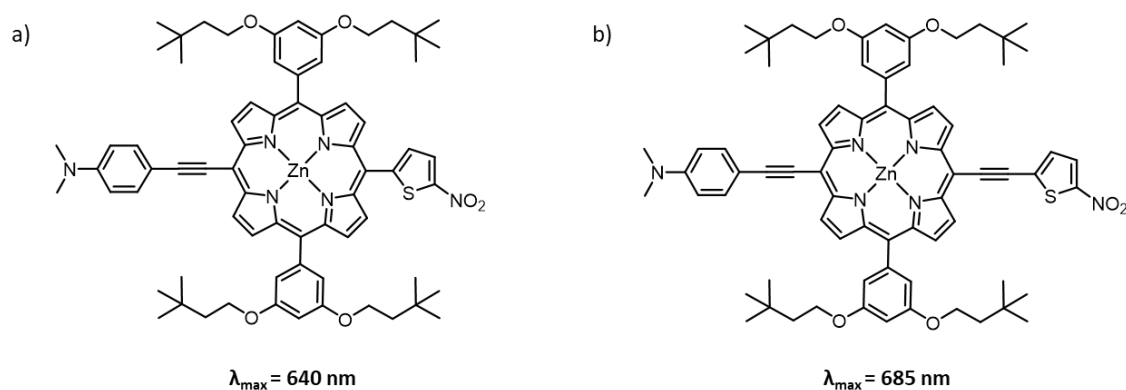


Figure 46. Porphyrines développées par Therien *et al.* et longueurs d'onde d'absorption maximales dans le THF.¹⁹⁵

En comparaison avec la porphyrine directement substituée par un groupe nitro-thiophène (**Figure 46a**), la fonctionnalisation par l'intermédiaire d'une fonction alcyne induit un déplacement bathochrome de la bande Q de plus basse énergie de 45 nm.

2.1.2 Choix du peptide antimicrobien

Notre choix s'est porté sur le peptide **PGLa**, dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Burkhard Bechinger de l'Institut de chimie de Strasbourg. Ce peptide antimicrobien naturel appartient à la famille des magainines et a été isolé de la peau d'une grenouille *Xenopus laevis*.¹⁹⁶ Il est constitué de 21 acides aminés de séquence GMASKAGAIAGKIAKVALKAL dont les 4 résidus lysines sont protonés à pH physiologique (**Figure 47**).

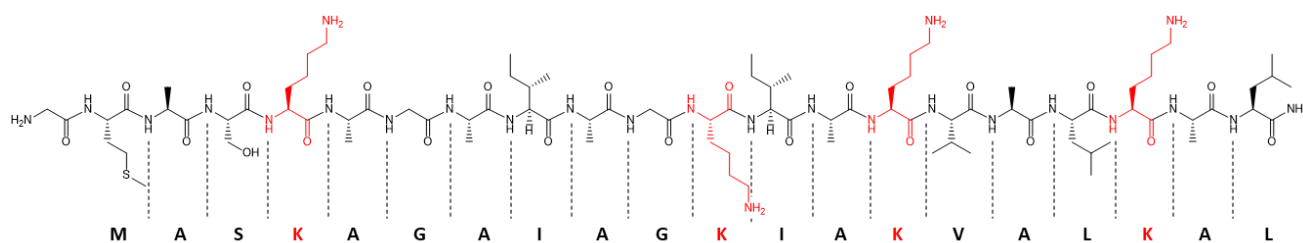


Figure 47. Structure du peptide **PGLa**. Les résidus lysines (K) apparaissent en rouge.

Le **PGLa** possède une bonne affinité pour les bactéries à Gram négatif et positif, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) se situant à 4 μM pour *E. coli* et 8 μM pour *S. aureus*.¹⁸⁶ De plus, sa biocompatibilité et sa sélectivité pour des membranes anioniques vis-à-vis des erythrocytes ont été évaluées. Il s'est avéré très peu toxique car son activité hémolytique sur les hématies a été évaluée à 2 % à une concentration de 16 μM .¹⁸⁶

Le mode d'interaction du **PGLa** avec les bicouches lipidiques a également été étudié par RMN du solide par l'équipe du Pr. Bechinger afin de déterminer l'orientation du peptide par rapport aux membranes anioniques.¹⁹⁷

2.2 Conjugué PS₂-PGLa

Un second photosensibilisateur constitué d'une porphyrine fonctionnalisée par un groupe benzothiadiazole (BTD) et liée au peptide PGLa a été envisagé (**Figure 48**).

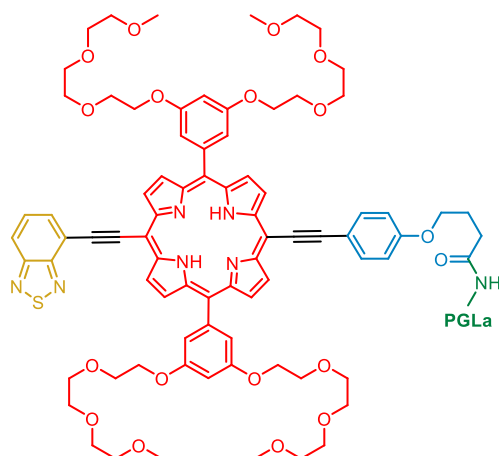


Figure 48. Structure du conjugué **PS₂-PGLa**.

Le BTD possède un système π délocalisé avec un fort pouvoir électroattracteur.¹⁹⁸ Il est également étudié pour des applications photovoltaïques comme PS potentiel pour des cellules organiques dont le développement vise à remplacer les cellules à base de silicium.¹⁹⁹

De plus, une étude de porphyrines liées au BTD par l'intermédiaire d'une fonction alcyne a montré que cette unité favorisait le CIS, propriété importante pour un PS utilisé en aPDT.²⁰⁰

L'AMP utilisé est identique à celui du conjugué **PS₁-PGLa** afin d'évaluer l'effet du BTD sur les propriétés photophysiques du PS et sur les propriétés antibactériennes du composé PS-AMP.

2.3 Conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**

Le troisième conjugué envisagé (**Figure 49**) correspond au **PS₂** lié à un peptide aux propriétés différentes du **PGLa**, la Gly-D-cateslytine de séquence GRSMRLSFRARGYGFR (**Figure 50**).

La cateslytine (Ctl) est un peptide antibactérien naturel notamment étudié par le groupe du Dr. Philippe Lavalley de l'ISERM 1121 de Strasbourg avec lequel nous avons collaboré sur ce projet. Il est constitué de 15 acides aminés dont 5 résidus arginine protonés à pH physiologique et appartient à la famille des CPP. Des études menées par ce groupe ont permis de mettre en lumière des différences notables entre ce peptide composé d'acides aminés en série L par rapport à son analogue non naturel constitué d'acides aminés en série D.¹⁸⁷ Ce dernier a montré d'intéressantes propriétés : il s'avère bien plus résistant à la protéolyse, traduisant une plus grande stabilité en milieu physiologique et donc une meilleure biodisponibilité. En effet, après 24 h d'incubation dans

un milieu de culture en présence de protéases secrétées par *E. coli*, la D-Ctl n'a montré aucun signe de dégradation après analyse par HPLC contrairement à son analogue en série L.

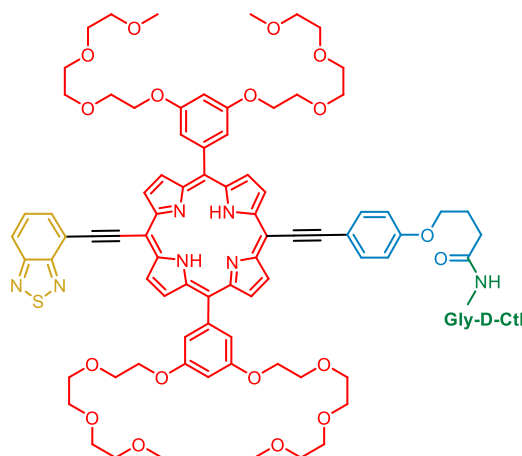


Figure 49. Structure du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**.

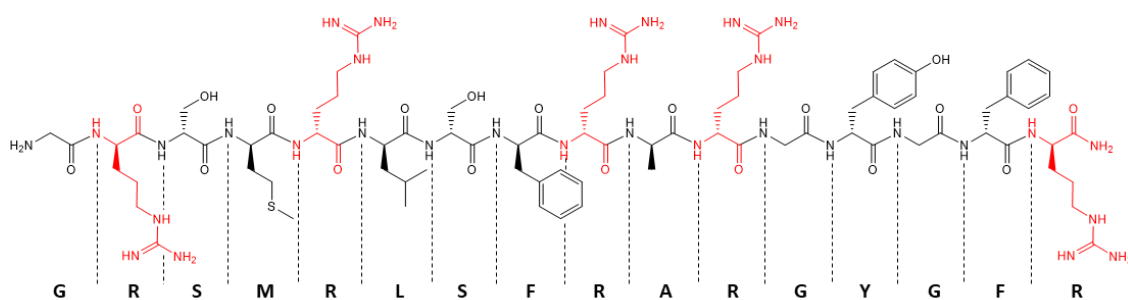


Figure 50. Structure du peptide **Gly-D-Ctl**. Les résidus arginine apparaissent en rouge.

Le peptide D-Ctl n'est pas toxique pour les cellules épithéliales intestinales ni hémolytique à une concentration élevée de 50 μM . Il possède également une forte affinité pour les bactéries *E. coli* et *S. aureus*, sa CMI se situant à 4 μM pour *E. coli* et 12 μM pour *S. aureus*. De plus, l'étude réalisée sur les bactéries *E. coli* a montré que la D-Ctl n'induisait pas de développement de résistances lorsqu'elle est utilisée à des concentrations sub-CMI, contrairement à certains antibiotiques classiques tels que l'ampicilline ou la cefotaxime. Dans le cadre de ce travail, un résidu glycine a été ajouté à la séquence afin de faciliter le couplage avec la porphyrine. Le peptide **Gly-D-Ctl** comporte de fait 16 acides aminés.

3 Stratégie de synthèse

Les conjugués porphyrine-peptide développés dans le cadre de cette thèse sont obtenus par une synthèse convergente et modulable (**Figure 51**).

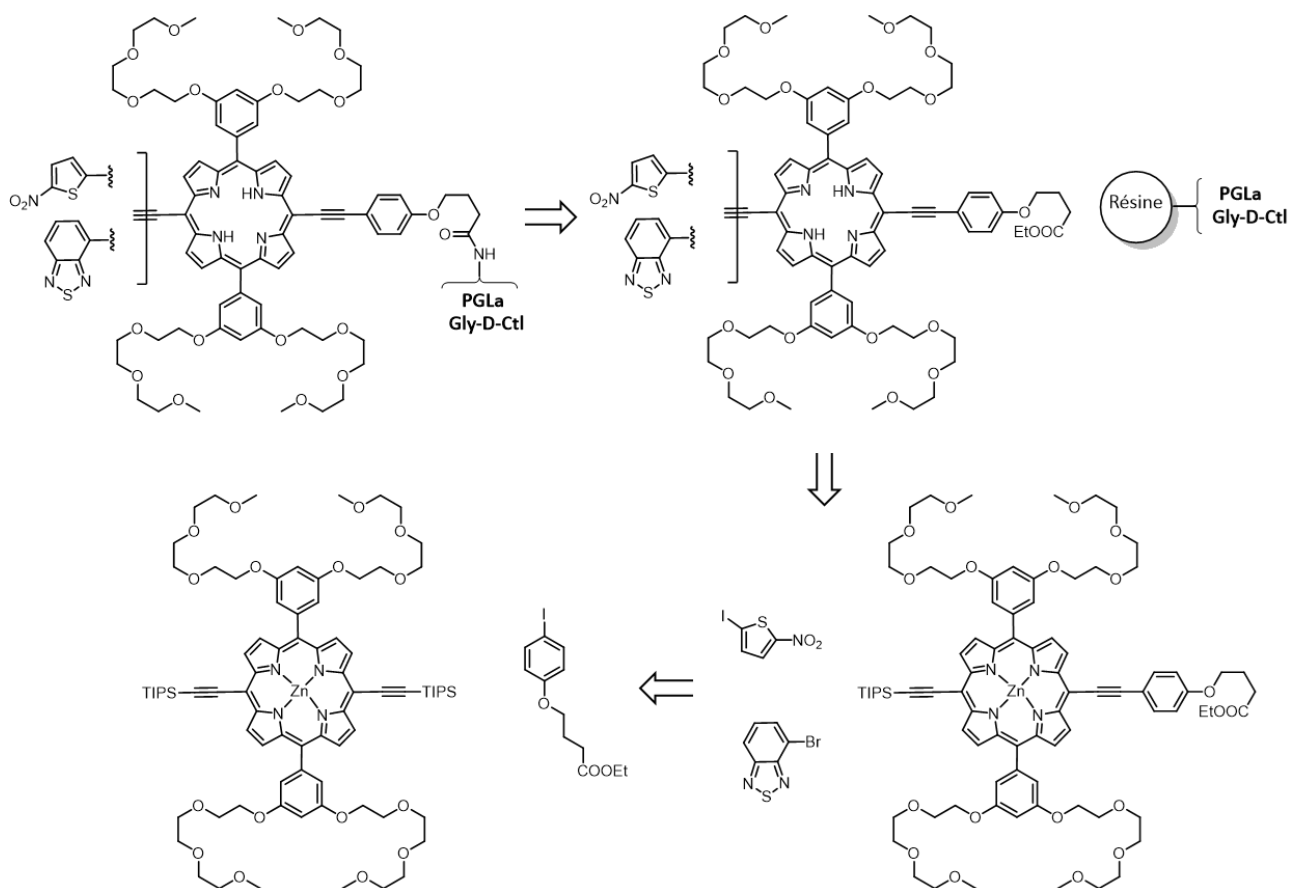


Figure 51. Rétrosynthèse des conjugués PS-AMP.

Ces conjugués se composent de quatre synthons distincts qui peuvent être modifiés selon les propriétés envisagées. Le premier synthon est une porphyrine de zinc(II) liée à deux alcynes protégés qui peuvent être sélectivement déprotégés afin d'obtenir un composé dissymétrique. Le deuxième et le troisième synthons correspondent respectivement à l'espaceur qui permet le couplage peptidique et au groupement électroattracteur aromatique. Enfin, le quatrième synthon correspond au peptide antimicrobien cationique lié de façon covalente au PS.

4 Synthèse du conjugué antibactérien PS₁-PGLa

4.1 Synthèse du photosensibilisateur PS₁

4.1.1 Synthèse de la porphyrine 9

Afin d'obtenir la porphyrine **5** (**Figure 53**), il est nécessaire de synthétiser les précurseurs, le dipyrrométhane **1** et l'aldéhyde **4** représentés sur la **Figure 52**.

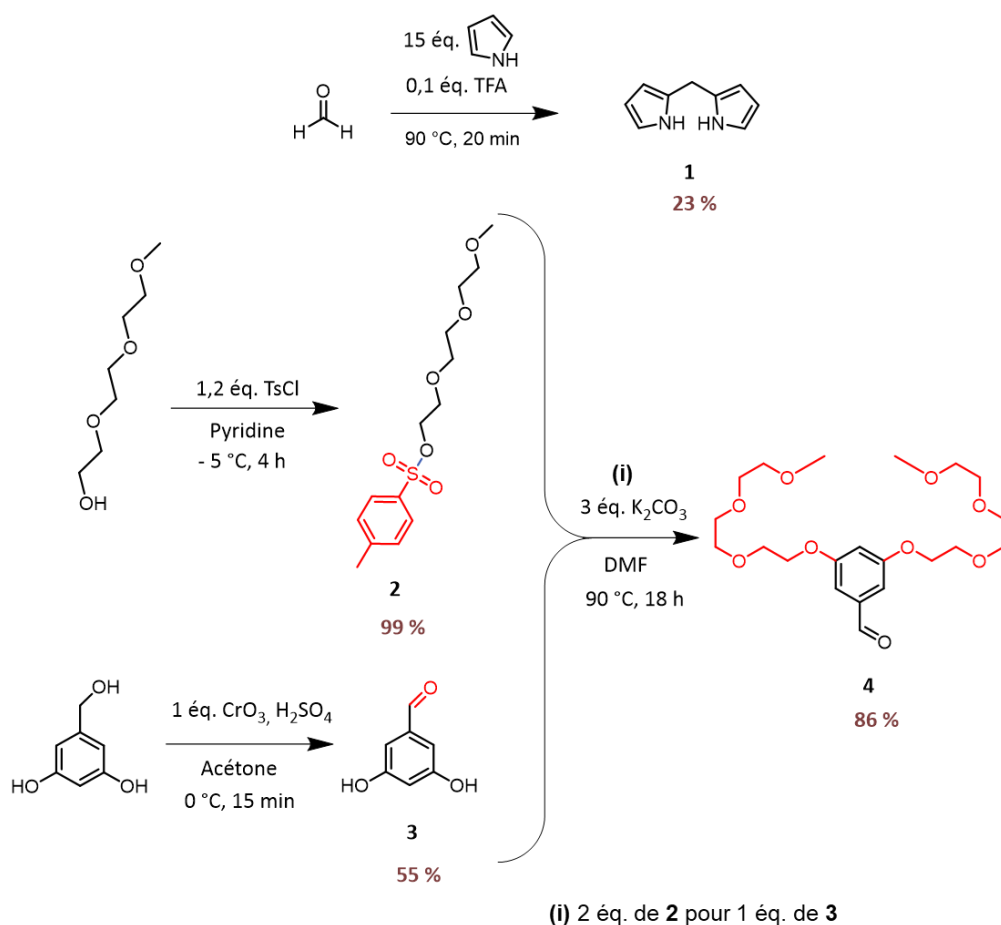


Figure 52. Synthèse du dipyrrométhane **1** et de l'aldéhyde **4**.

Le dipyrrométhane **1** est obtenu par condensation du pyrrole utilisé comme solvant et du paraformaldéhyde à 90 °C en présence de TFA suivie d'une purification par chromatographie sur colonne de silice.²⁰¹ L'aldéhyde **4** est obtenu en trois étapes. Premièrement, l'alcool activé **2** par un groupe tosyloxy est obtenu quantitativement par réaction de l'éther monométhyle de triéthylène

glycol commercial avec 1,2 éq. de chlorure de tosylo (TsCl) dans la pyridine.²⁰² Le 3,5-dihydroxybenzylalcool est oxydé par 1 éq. du réactif de Jones en 15 min à 0 °C au cours de la seconde étape afin de conduire au dihydroxybenzaldéhyde **3** avec un rendement de 55 %.²⁰³

Les composés **2** et **3** réagissent ensuite selon une réaction de Williamson à 90 °C et permettent l'obtention de l'aldéhyde **4** avec un rendement de 86 %.²⁰² Les deux précurseurs **1** et **4** sont obtenus à l'échelle de plusieurs grammes.

La porphyrine A₂B₂ **5** est obtenue par condensation du dipyrrométhane **1** et de l'aldéhyde **4** en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane selon les conditions décrites par Lindsey (**Figure 53**).^{204,205}

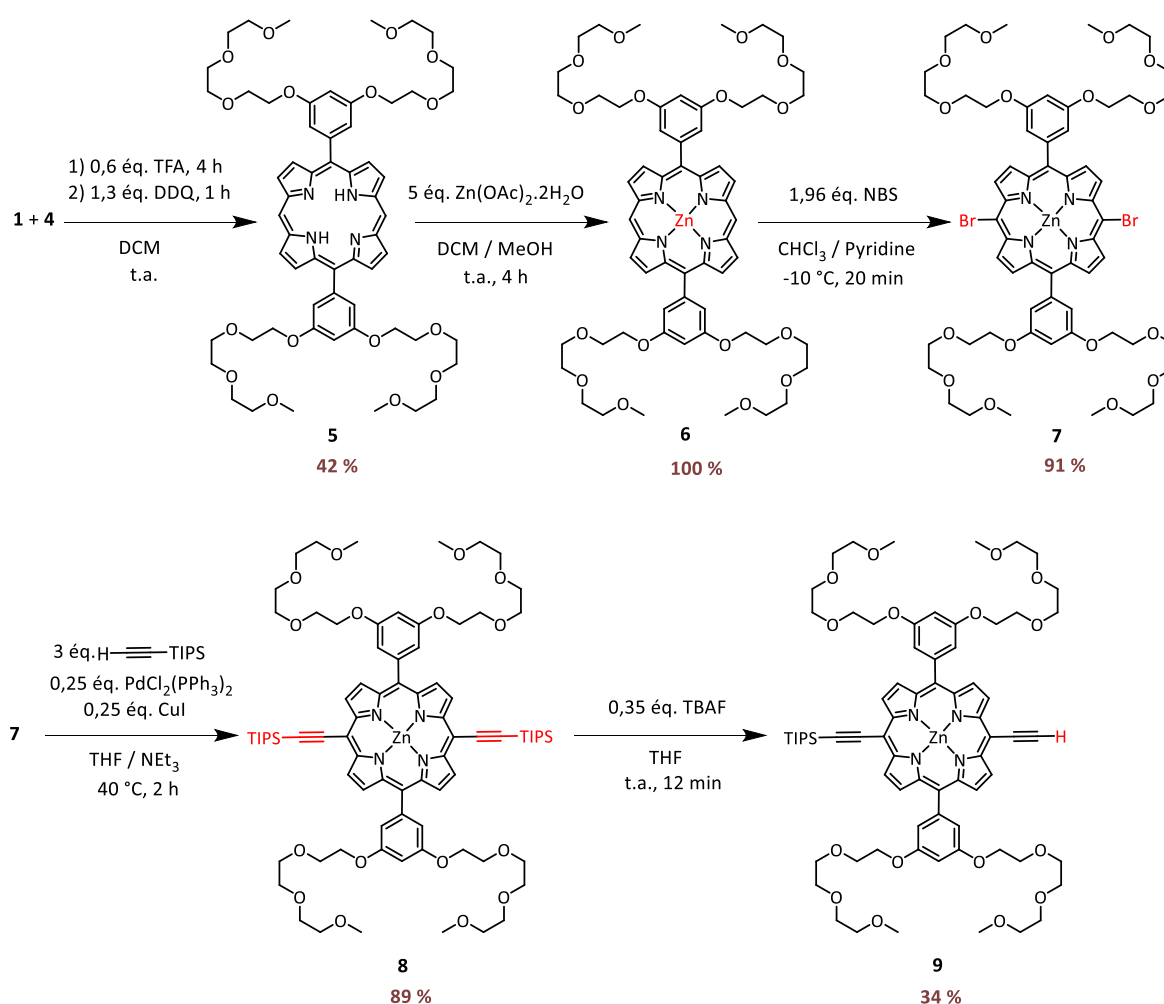


Figure 53. Synthèse de la porphyrine mono-déprotégée **9**.

Le porphyrinogène intermédiaire est oxydé par de la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) et la porphyrine base libre **5** est obtenue avec un rendement de 42 % après purification par chromatographie sur colonne de silice. Elle est ensuite métallée quantitativement par 5 éq. d'acétate de zinc afin d'obtenir la porphyrine **6**. La caractérisation par RMN ^1H montre la disparition du signal à -3 ppm correspondant aux protons blindés liés aux azotes pyrroliques. Le spectre d'absorption de **6** présenté au paragraphe 6.1.1 (**Figure 77**) montre la présence de seulement deux bandes Q et atteste également de la métallation de la porphyrine. La porphyrine **7** est obtenue par bromation des positions *meso* de **6** en utilisant le N-bromosuccinimide (NBS).²⁰⁶ La réaction a été réalisée avec un léger défaut de 1.96 éq. de NBS ajouté lentement à -10 °C afin d'éviter la bromation des positions β -pyrroliques. Ce produit secondaire a été obtenu précédemment dans le groupe et s'est avéré impossible à séparer du produit d'intérêt malgré de nombreuses tentatives de purification. La porphyrine di-bromée **7** est obtenue avec un rendement de 91 % après purification par chromatographie sur colonne de silice. L'analyse par RMN ^1H confirme l'obtention du produit et montre la disparition du singulet à 10 ppm caractéristique des deux protons *meso* de la porphyrine. Un couplage de Sonogashira permet de fonctionnaliser **7** par deux fonctions alcynes protégées par des groupes triisopropylsilane (TIPS). La réaction est effectuée sous atmosphère inerte avec 3 éq. de (triisopropyl)acétylène en présence de triéthylamine et des catalyseurs $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$ et CuI pour conduire au produit **8** avec un rendement de 89 % après purification par chromatographie sur colonne de silice.²⁰² Enfin, la mono-déprotection statistique des alcynes protégés de **8** avec 0.35 éq. de fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) permet d'obtenir la porphyrine **9** avec 34 % de rendement après purification par deux chromatographies successives sur colonne de silice. Ces conditions de réaction permettent de recycler le produit de départ **8** pour de futures déprotections tout en limitant la formation du produit totalement déprotégé. La porphyrine **8** étant obtenue à l'échelle du gramme, les quantités sont amplement suffisantes pour effectuer plusieurs synthèses en modulant les unités qui lui sont rattachées.

4.1.2 Synthèse de l'espaceur **10**

L'espaceur **10** est synthétisé par une réaction de substitution nucléophile de 1,2 éq. de 4-bromobutyrate d'éthyle par le 4-iodophénol en présence de 2 éq. de carbonate de potassium.²⁰⁷

Après 24 h à 55 °C, le produit est obtenu avec un très bon rendement de 95 % après purification par flash chromatographie sur colonne de silice (**Figure 54**).

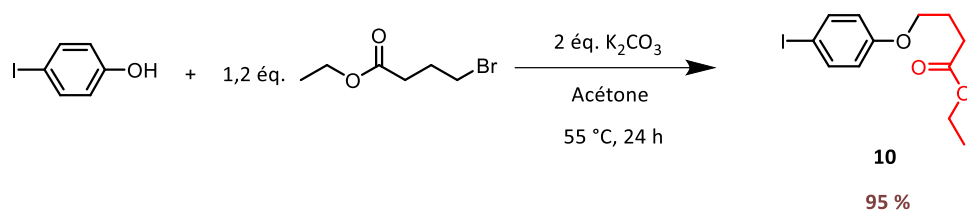


Figure 54. Synthèse de l'espaceur **10**.

4.1.3 Synthèse du groupe 2-iodo-5-nitro-thiophène **12**

Le 2-iodo-5-nitrothiophène **12** est synthétisé par substitution électrophile aromatique du 2-iodothiophène commercial par 2 éq. d'acide nitrique fumant à -5 °C (**Figure 55**).¹⁹⁵ Le composé **12** est obtenu avec 73 % de rendement après recristallisation dans du méthanol.

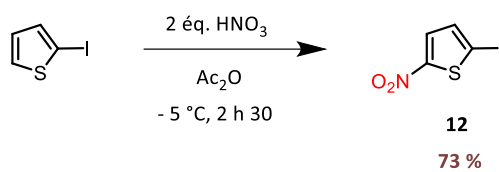


Figure 55. Synthèse du 2-iodo-5-nitro-thiophène **12**.

4.1.4 Synthèse de la porphyrine **PS₁**

Le photosensibilisateur **PS₁** est obtenu à partir de la porphyrine **9** par couplages successifs de l'espaceur **10** et du thiophène **12** (**Figure 56**).

Le composé mono-déprotégé **9** réagit avec 1,1 éq. de **10** par une réaction de couplage de Sonogashira dans le THF à 40 °C pendant 2 h. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, la porphyrine **11** est obtenue avec 70 % de rendement. La fonction alcyne protégée est ensuite déprotégée par une solution de TBAF dans du THF. L'intermédiaire réactionnel formé comportant l'alcyne vrai obtenu après filtration sur silice est directement engagé dans une seconde réaction de Sonogashira avec 1,5 éq. de 2-iodo-5-nitro-thiophène **12**. La porphyrine **13** est isolée après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un excellent rendement de 94 %. Ce composé est ensuite démétallé en présence de TFA dans le DCM et le photosensibilisateur **PS₁**

est obtenu de façon quantitative. Il est préférable de retirer le métal car les réactions de déprotection impliquant le peptide sont effectuées en milieu acide et conduisent à une démétallation du zinc(II). Ce dernier permet néanmoins d'augmenter les rendements lors des précédentes étapes de couplage.

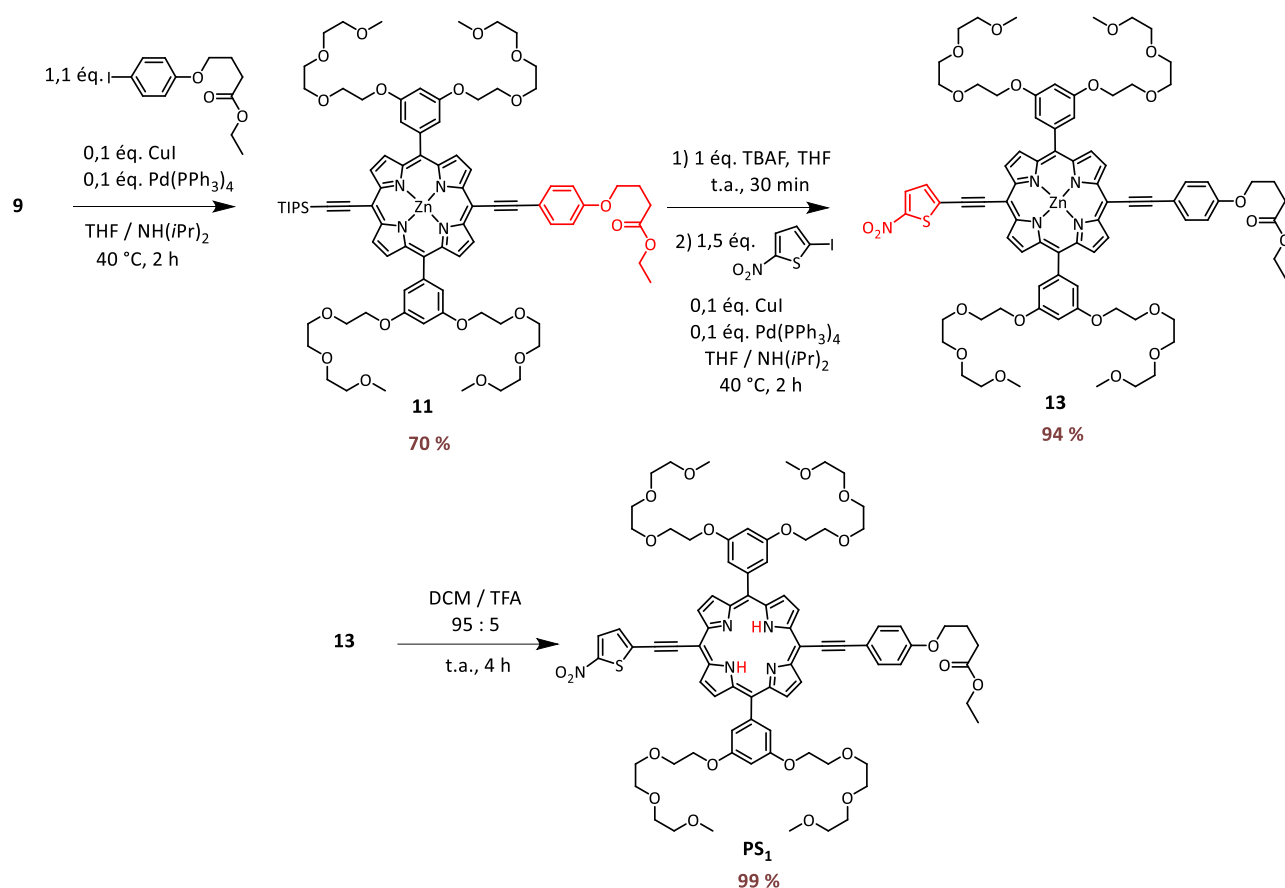


Figure 56. Synthèse du photosensibilisateur **PS₁**.

Le composé **PS₁** a été caractérisé par spectroscopies RMN ¹H (**Figure 57**), COSY (Annexe 1), NOESY (**Figure 58**) et HMBC (**Figure 59**) permettant l'attribution complète des protons. La présence du signal caractéristique des protons des azotes pyrroliques intégrant pour 2 indique que la porphyrine est totalement démétallée. Les quatre doublets situés entre 8,89 et 9,64 ppm correspondent aux signaux des protons β-pyrroliques et sont caractéristiques d'une porphyrine possédant un plan de symétrie.

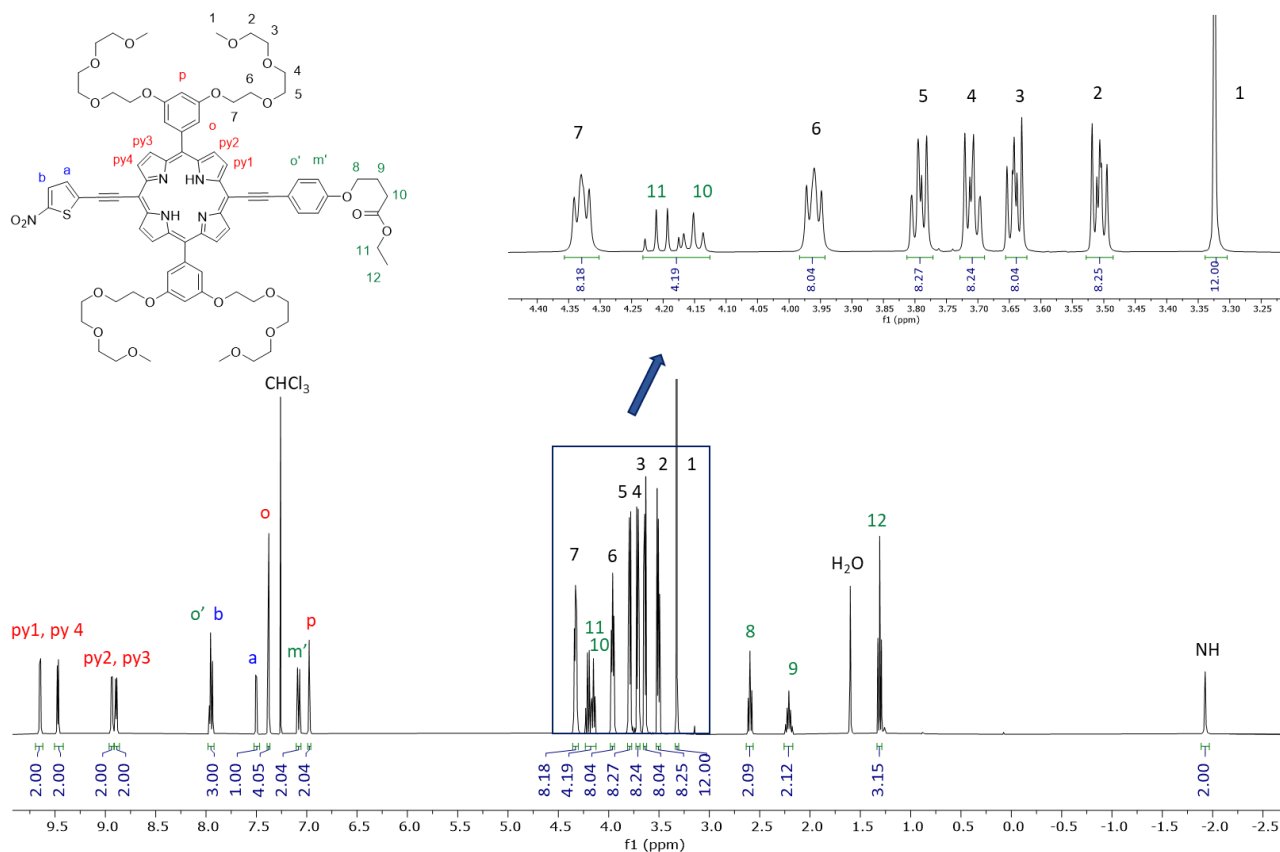
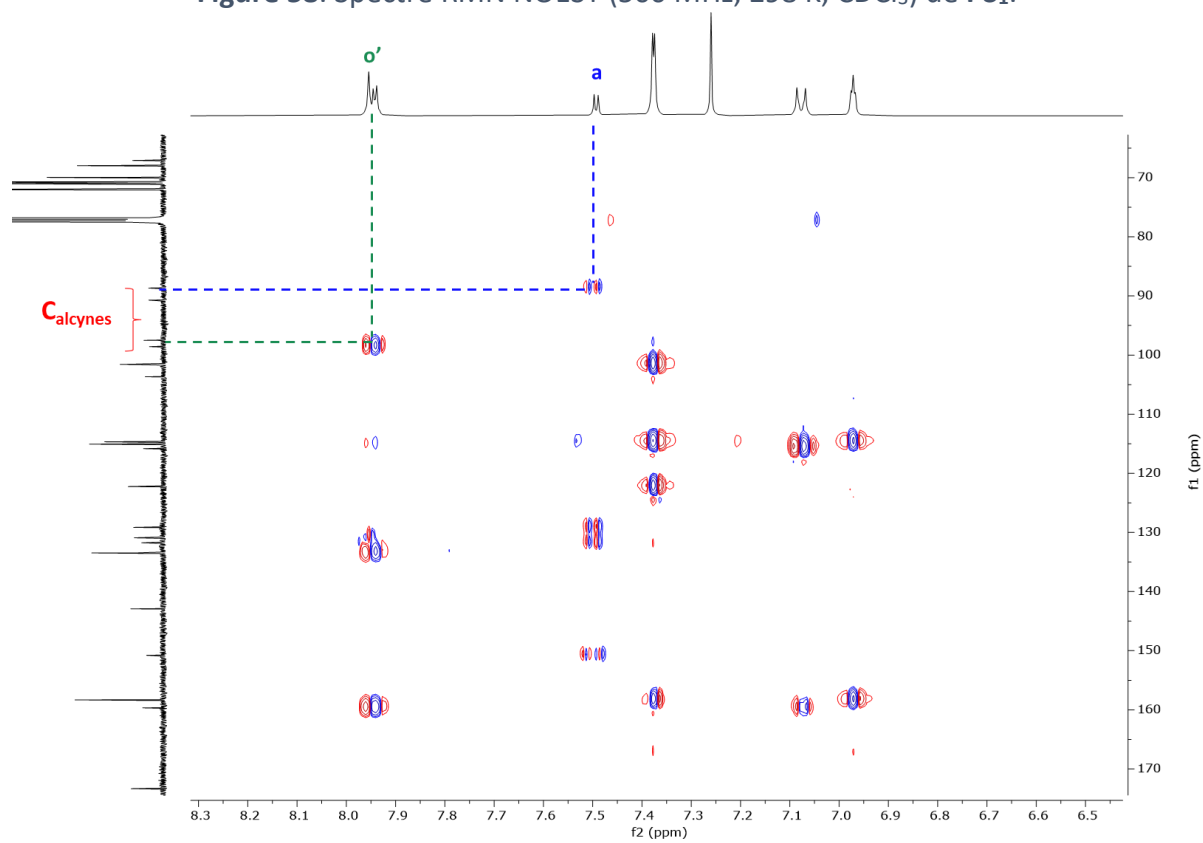
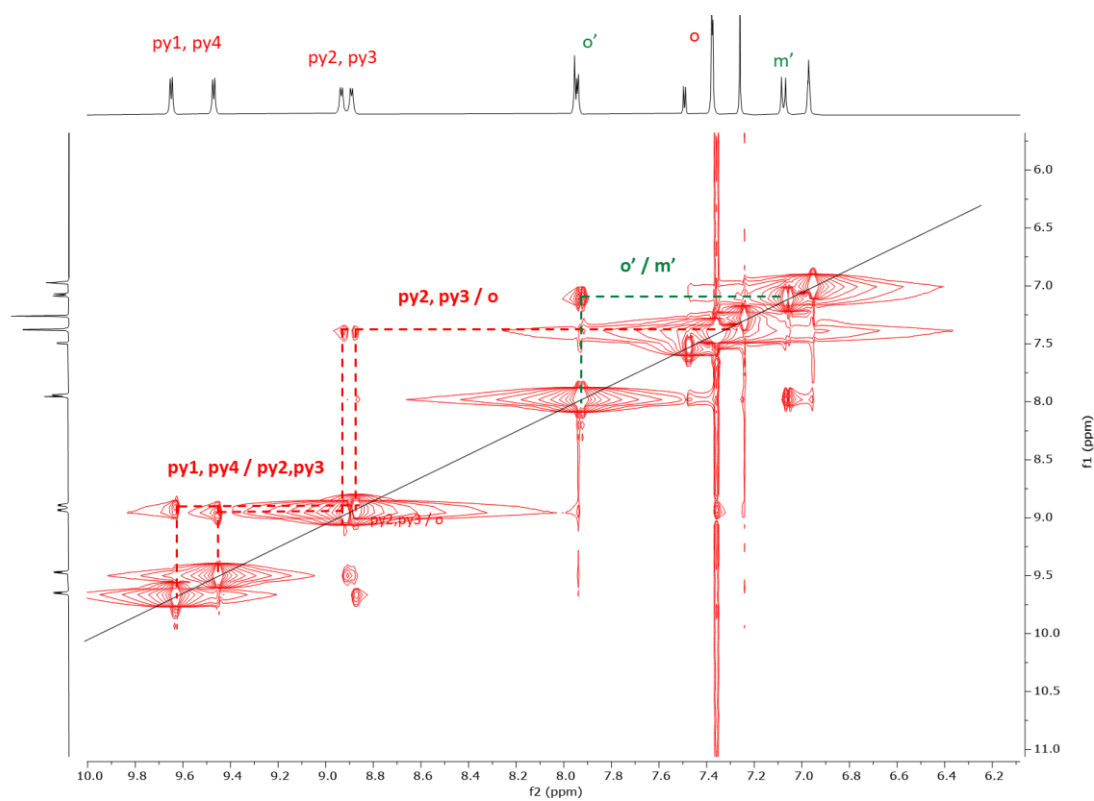


Figure 57. Spectre RMN ^1H (500 MHz, 298 K, CDCl_3) de PS_1 .

Le spectre NOESY montre une corrélation spatiale entre les protons pyrroliques py2 et py3 et les protons o en position ortho du phényle et permet de les différencier des protons py1 et py4 (Figure 58). L'absence de couplage dipolaire des protons py1 et py4 avec les substituants présents en position *meso* ne permet cependant pas de les discriminer ni d'attribuer py2 ou py3. Le spectre HMBC permet l'attribution du proton a du thiophène et du proton o' du phényle par couplage en ^3J avec les carbones des alcynes (Figure 59).



4.2 Synthèse du peptide PGLa

La synthèse du peptide **PGLa** a été réalisée en collaboration avec le Dr. Christopher Aisenbrey de l'équipe de Burkhard Bechinger. Elle a été effectuée de façon automatisée sur résine, une phase solide, selon la méthode de Merrifield par « stratégie Fmoc ». La synthèse peptidique sur support solide permet d'obtenir le peptide désiré par succession de réactions de couplages des acides aminés dont les chaînes latérales peuvent être protégées. Elle s'effectue de l'extrémité C-terminale du peptide, accrochée à la résine, vers l'extrémité N-terminale. Elle est constituée des **étapes a** à c explicitées sur la **Figure 60** :

Etape a) : Le premier acide aminé de la séquence est greffé sur la résine par couplage peptidique après déprotection par de la pipéridine du groupe fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) de la fonction amine du xanthène situé sur la résine.

Etape b) : Cette étape consiste en l'itération d'un cycle permettant l'addition d'acides aminés à la séquence. Tout d'abord, la fonction amine du peptide en croissance est déprotégée par une solution de pipéridine dans le DMF. La solution de déprotection est ensuite éliminée par une étape de lavage avec du DMF.

Une solution contenant un excès de 4 éq. de l'acide aminé à greffer est ajoutée en présence de DIPEA et de l'agent de couplage HBTU, servant respectivement à déprotéger l'acide carboxylique puis à l'activer afin de réaliser le couplage peptidique. Une nouvelle étape de lavage est réalisée pour éliminer les sous-produits formés ainsi que l'excès de réactif.

Etape c) : Lorsque le dernier acide aminé de la séquence est couplé, le groupe Fmoc est déprotégé et le peptide protégé greffé sur résine est obtenu.

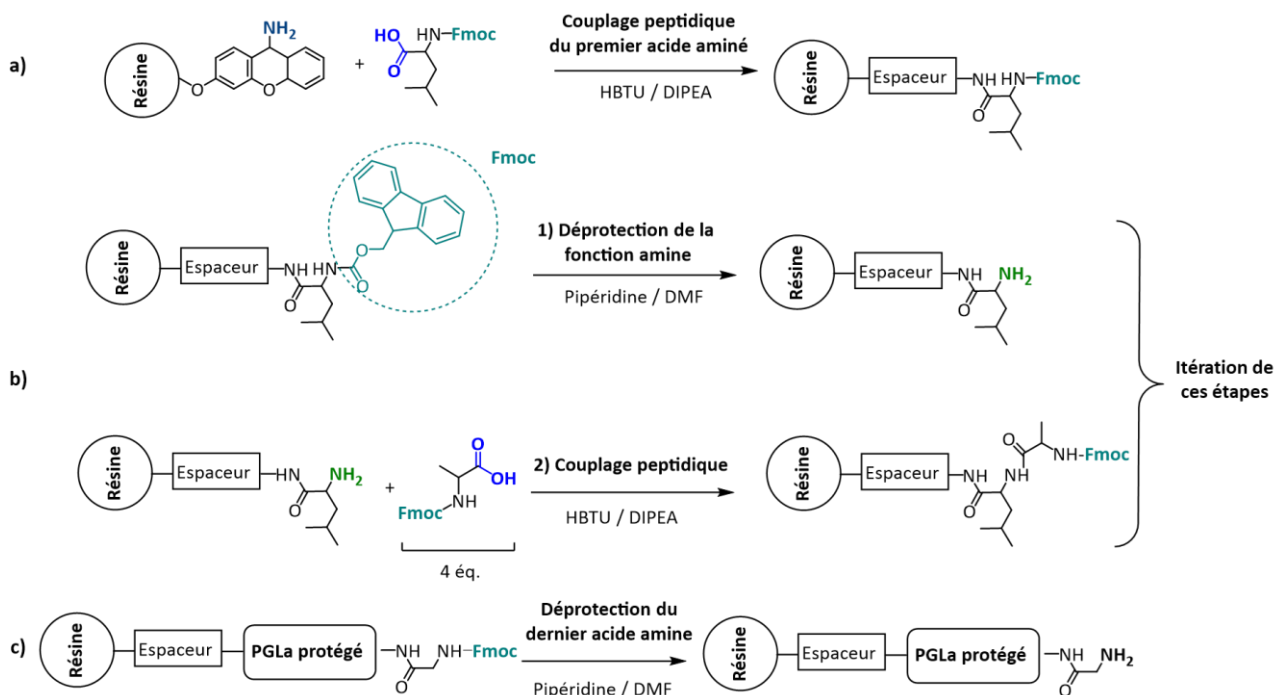


Figure 60. Schéma des principales étapes a à c de la synthèse peptidique en phase solide du PGLa.

Dans le cadre de ce projet, la synthèse du PGLa a été réalisée sur une résine « NovaSyn®TG Sieber Amide » caractérisée par une charge de $0,14 \text{ mmol.g}^{-1}$ (Figure 61). Cette faible charge, correspondant au nombre de sites d'accrochage disponibles, permet de greffer moins de peptide sur la résine afin de faciliter le couplage peptidique final avec la porphyrine. En effet, des tests impliquant une résine standard de charge $0,7 \text{ mmol.g}^{-1}$ n'ont pas permis d'obtenir le conjugué porphyrine-peptide, potentiellement dû à la gêne stérique trop importante sur la résine lors du couplage peptidique.

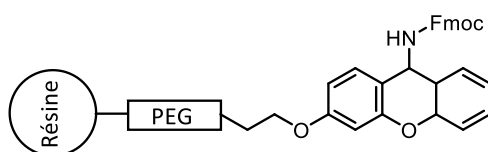


Figure 61. Structure chimique de la résine NovaSyn®TG Sieber Amide.

Par ailleurs, les fonctions amines des résidus lysine sont protégées par des groupes 4-méthoxytrityle (Mmt) et la fonction alcool du résidu sérine est protégée par un groupe triphénylméthyle (Trt) (Figure 62).

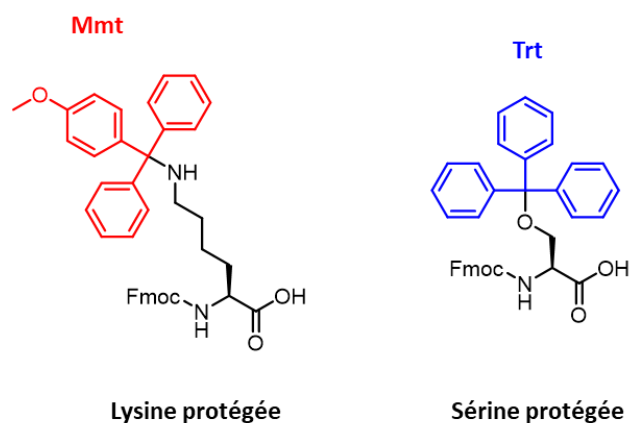
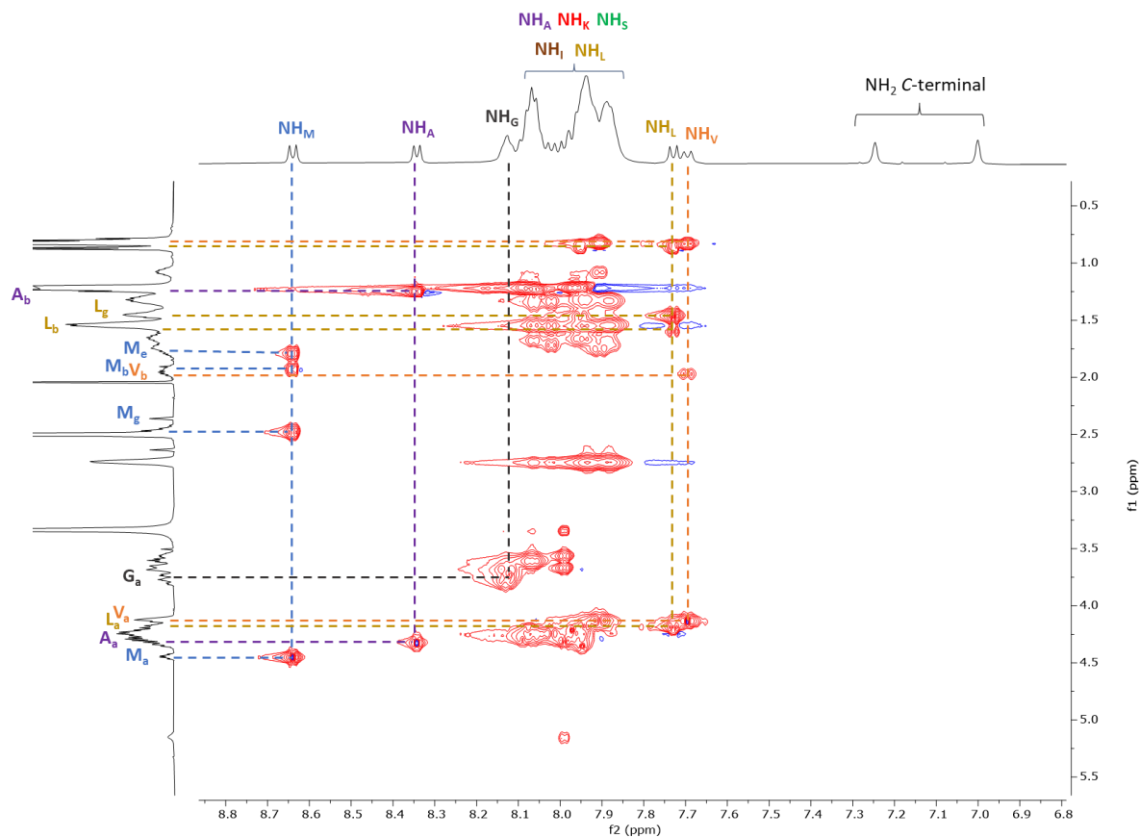
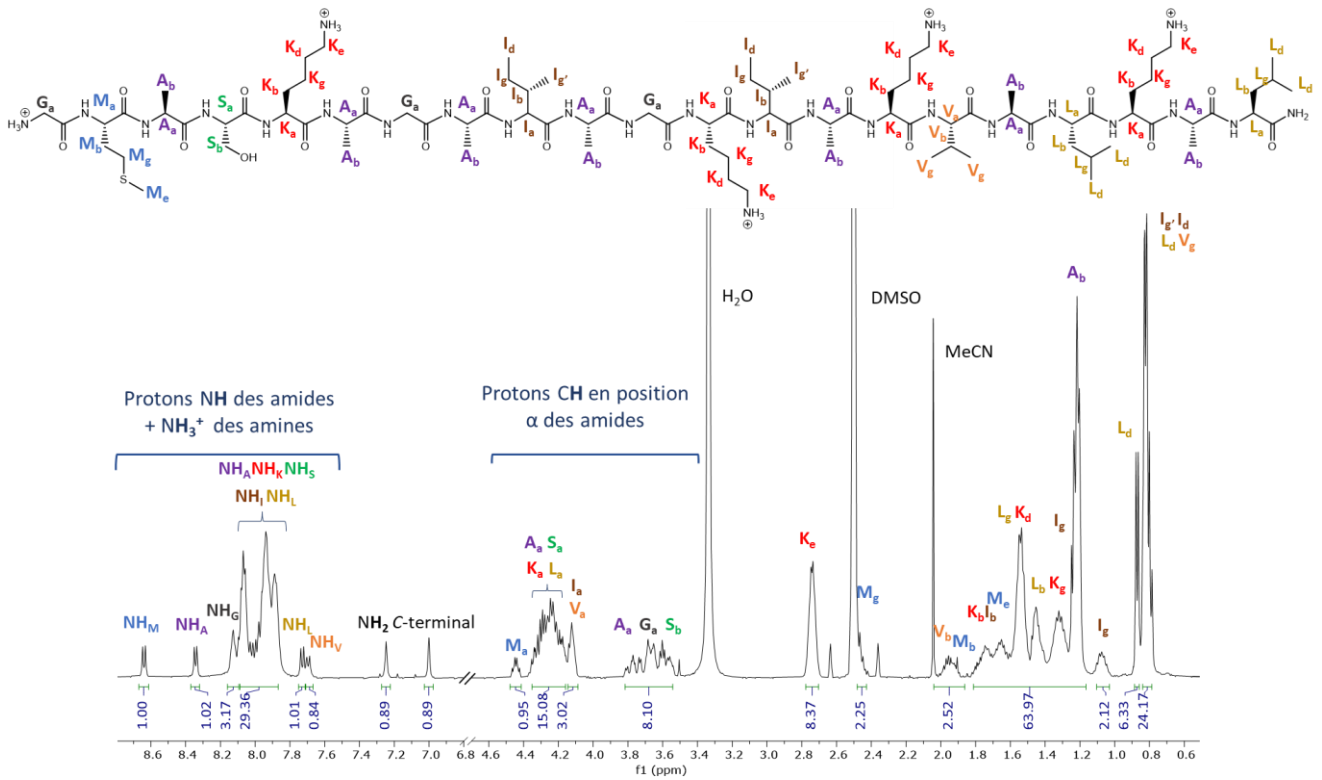


Figure 62. Structure des acides aminés protégés Fmoc-Lys(Mmt)-OH (à gauche) et Fmoc-Ser(Trt)-OH (à droite).

L'avantage de ces groupes protecteurs par rapport aux groupes *ter*-butyle et *ter*-butoxycarbonyle (Boc) généralement utilisés réside dans leur forte labilité en milieu acide, permettant une déprotection dans des conditions douces.

Afin d'obtenir le peptide **PGLa** seul comme composé de référence, environ un quart du peptide synthétisé a été clivé de la résine dans des conditions acides classiques TFA/H₂O/EDT/TIS (94 : 2,5 : 2,5 : 1). Le **PGLa**, dont l'extrémité C-terminale du peptide est sous forme amide, a été obtenu quantitativement et a été caractérisé par RMN ¹H, TOCSY (**Figure 63**) et HSQC (**Figure 64**) et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Annexe 2).



L'expérience de RMN TOCSY est particulièrement utile pour l'analyse des peptides car elle permet de corrélérer tous les protons appartenant au même système de spin. Les spins vicinaux et distants sont corrélés et identifiés par une seule ligne de résonance. Chaque acide aminé de la séquence du peptide **PGLa** est ainsi identifié par les corrélations situées sur une ligne. La spectroscopie HSQC permet de corrélérer aux protons identifiés les déplacements chimiques des atomes de carbone (Annexe 3).

4.3 Synthèse du conjugué **PS₁-PGLa**

Afin de pouvoir effectuer le couplage entre la porphyrine et le peptide, la fonction ester du **PS₁** est hydrolysée en condition basique avec une solution aqueuse de LiOH 0,5 M (**Figure 65**). Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé **14** est isolé sous forme de sel avec 86 % de rendement.

La fonction carboxylate de la porphyrine **14** est activée dans du DMF par 3 éq. de TBTU en présence de 10 éq. de DIPEA pendant une heure.¹⁸² La solution obtenue est ensuite additionnée au peptide greffé sur résine dans le DMF et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 72 h. Après filtration, le conjugué est clivé de la résine et les chaînes latérales du peptide sont déprotégées dans des conditions douces en utilisant une solution d'hexafluoroisopropanol (HFIP) à 1 % de TFA.²⁰⁸ Le composé est précipité dans l'éther diéthylique à froid et centrifugé trois fois afin de solubiliser les groupes protecteurs dans le surnageant. Le conjugué est ensuite solubilisé dans l'eau puis lyophilisé. Le brut réactionnel est purifié par HPLC préparative (colonne C18) à l'aide d'un gradient de solvant H₂O/MeCN/0,1 % TFA. Il est important de ne pas évaporer à sec les différentes fractions obtenues par HPLC afin d'éviter une dégradation du produit.

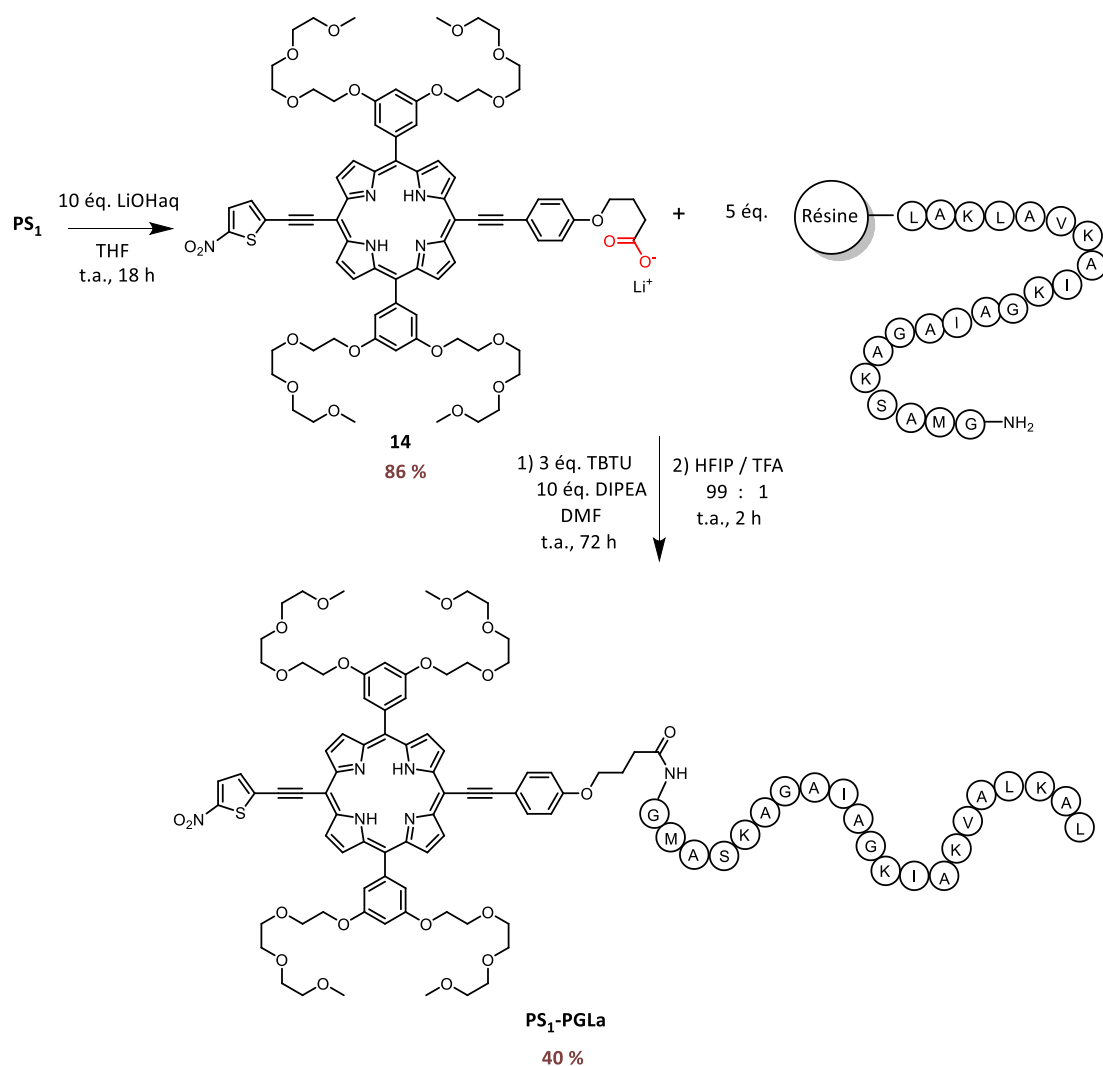


Figure 65. Synth\u00e8se du conjugu\u00e9 **PS₁-PGLa**.

Le produit est obtenu sous forme d'un solide vert apr\u00e8s lyophilisation avec un rendement de 40 %. En engageant 11 mg de la porphyrine **14**, plus de 10 mg de conjugu\u00e9 **PS₁-PGLa** sont isol\u00e9s. Cette quantit\u00e9 est amplement suffisante pour effectuer l'ensemble des tests biologiques, majoritairement r\u00e9alis\u00e9s \u00e0 concentration micromolaire.

Le **PS₁-PGLa** a un temps de r\u00e9tention de 20,76 min en HPLC analytique et une puret\u00e9 \u00e9valu\u00e9e \u00e0 plus de 97 % (**Figure 66**).

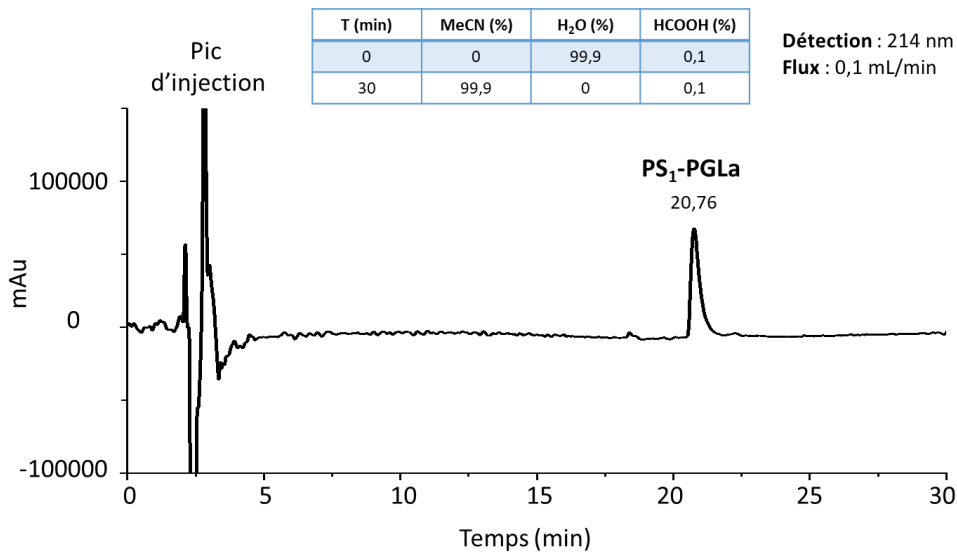


Figure 66. Chromatogramme de **PS₁-PGLa** obtenu en HPLC analytique et conditions d'élution utilisées.

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution confirme l'obtention du conjugué **PS₁-PGLa**. La fonction thioéther du résidu méthionine est oxydée en sulfoxyde. Les pics majoritaires de masse $M = 1716,3968$, $1144,6018$ et $858,7046$ correspondent respectivement à la molécule deux fois $[M + 2H]^{2+}$, trois fois $[M + 3H]^{3+}$ et quatre fois $[M + 4H]^{4+}$ protonée (**Figure 67**). Les profils isotopiques expérimentaux sont en accord avec les profils isotopiques calculés.

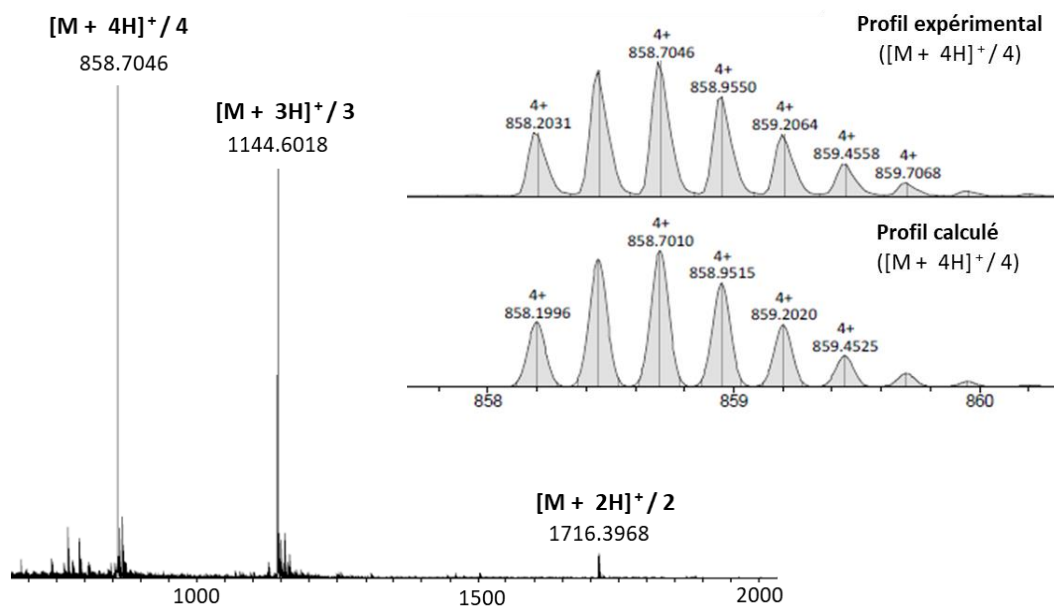


Figure 67. Spectre HR ESI-MS de **PS₁-PGLa** et profil isotopique expérimental et profil isotopique calculés pour le pic le plus intense.

Le conjugué **PS₁-PGLa** a également été caractérisé par RMN ¹H dans le DMSO (Figure 74). Les protons portés par les atomes d'azote des fonctions amides sont situés entre 7,5 et 8,6 ppm. Les protons situés en position alpha des amides ont un déplacement chimique compris entre 3,5 et 4,5 ppm, et le reste des signaux correspond aux divers protons aliphatiques des chaînes latérales. La liaison entre la porphyrine et le peptide implique l'apparition de signaux caractéristiques de cette dernière sur le spectre RMN ¹H du conjugué. Les protons pyrroliques, ceux portés par les phényles directement liés en position *meso*, les protons des chaînes TEG ainsi que ceux des azotes des pyrroles sont bien résolus et identifiables sur le spectre de **PS₁-PGLa** (Figure 68).

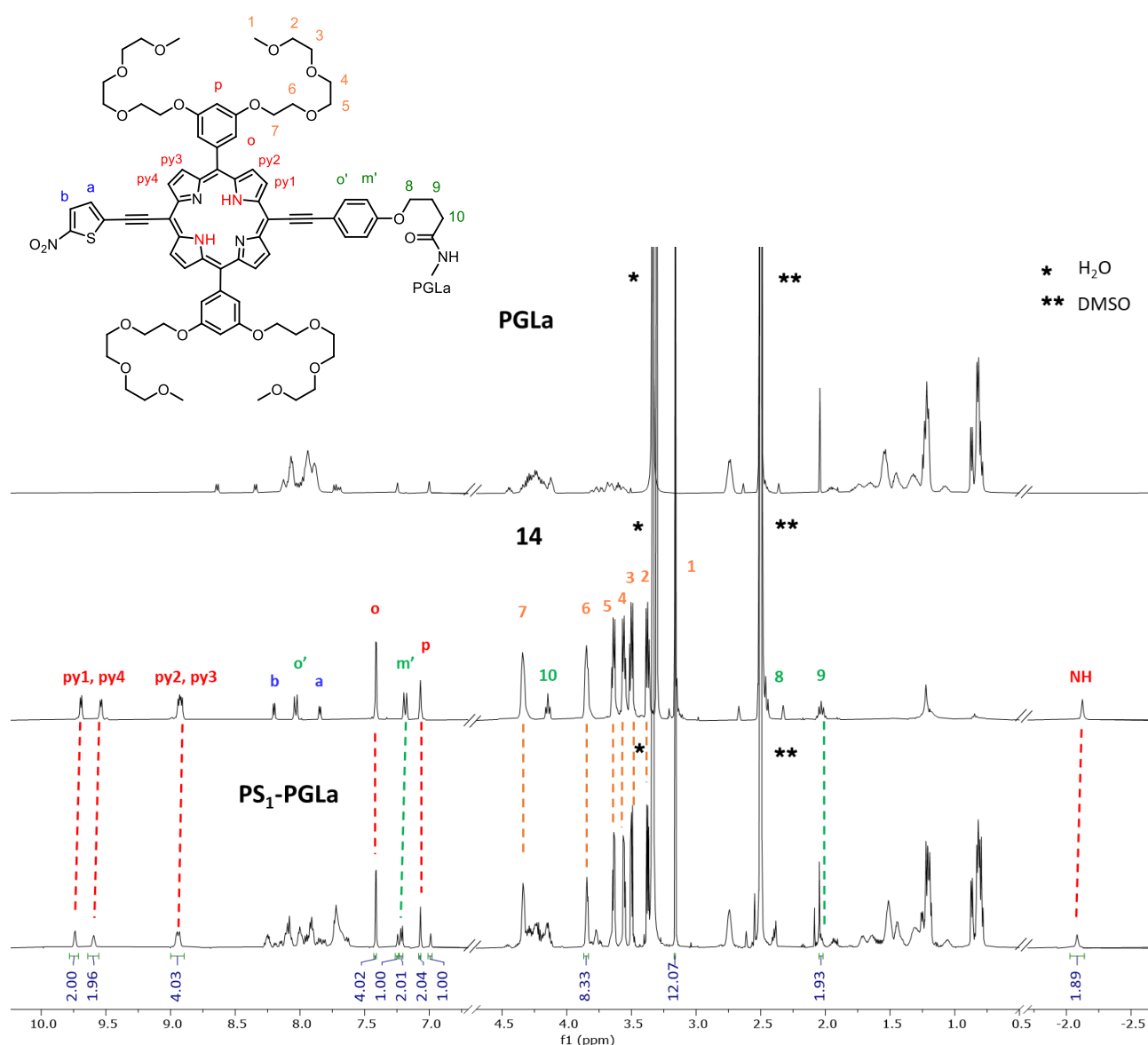


Figure 68. Spectres RMN ¹H (500 MHz, 298 K, (CD₃)₂SO) du **PGLa**, de la porphyrine **14** et du conjugué **PS₁-PGLa**.

5 Synthèse du conjugué antibactérien PS₂-PGLa

5.1 Synthèse du composé bromo-BTD

Le composé bromo-BTD **15** est synthétisé par substitution électrophile aromatique du BTD commercial par 1 éq. de NBS dans l'acide sulfurique à 60 °C (**Figure 69**).²⁰⁹ Après recristallisations successives dans de l'EtOH, il est obtenu avec 35 % de rendement sous la forme d'un solide beige.

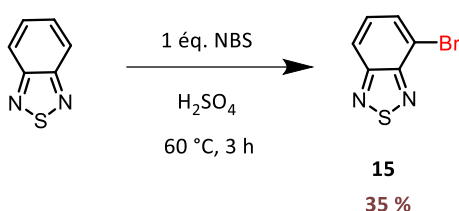


Figure 69. Synthèse du bromo-benzothiadiazole **15**.

5.2 Synthèse du photosensibilisateur PS₂

Le photosensibilisateur **PS₂** est obtenu en trois étapes (**Figure 70**).

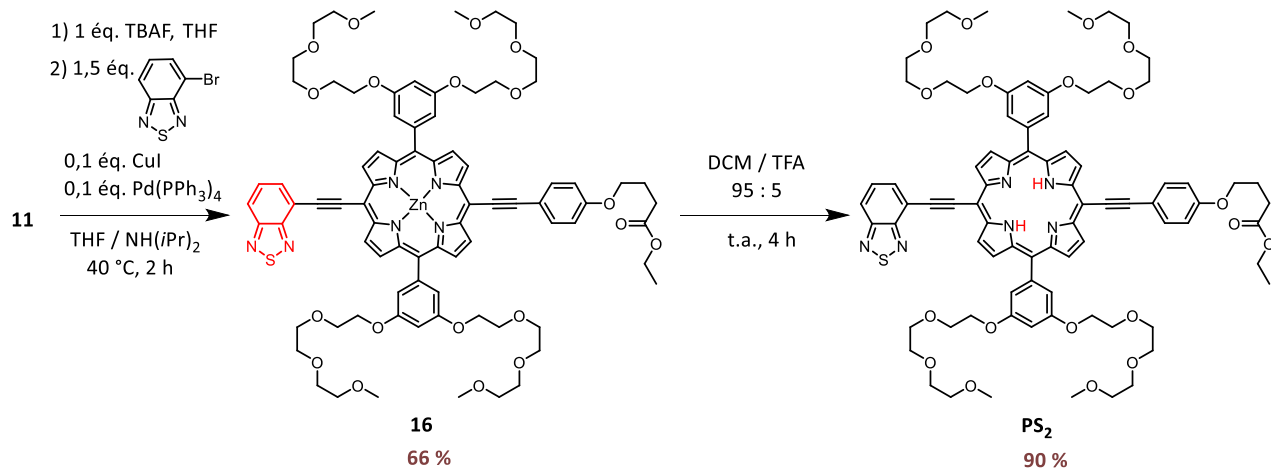


Figure 70. Synthèse du photosensibilisateur **PS₂**.

La fonction alcyne protégée de la porphyrine **11** est déprotégée par 1 éq. de TBAF dans le THF et l'intermédiaire est purifié par filtration sur silice. Il est directement engagé dans une réaction de Sonogashira avec 1,5 éq. du composé **15** afin d'obtenir la porphyrine **16** après purification par

chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 66 %. On observe davantage de dimère issu de la réaction secondaire d'homocouplage (également appelée réaction de Glaser) pour cette synthèse en comparaison avec celle impliquant le dérivé iodé du nitro-thiophène (**Figure 56**), expliquant le rendement plus faible obtenu (**Figure 71**).²¹⁰

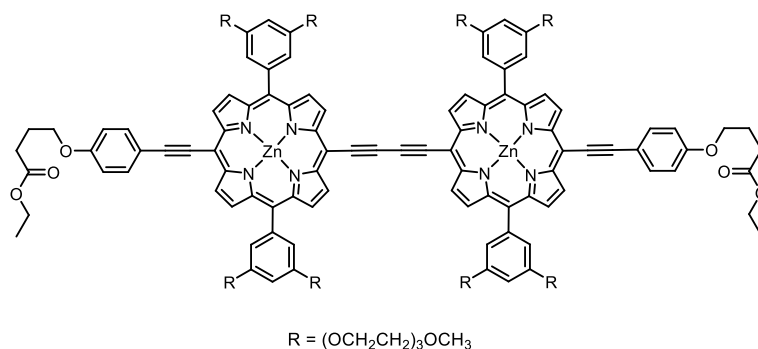


Figure 71. Structure du dimère obtenu à la suite de la réaction secondaire de Glaser.

La porphyrine **16** est ensuite démétaillée par du TFA dans du DCM et le composé **PS₂** est obtenu avec un rendement de 90 % sous la forme d'un solide vert. Les protons ont été attribués à l'aide des spectres RMN 2D COSY, NOESY et HMBC donnés en Annexe 4. La présence des trois signaux des protons du BTD et l'absence du proton de la fonction alcyne sur le spectre RMN ¹H (**Figure 72**) ainsi que la spectrométrie de masse confirment l'obtention du produit.

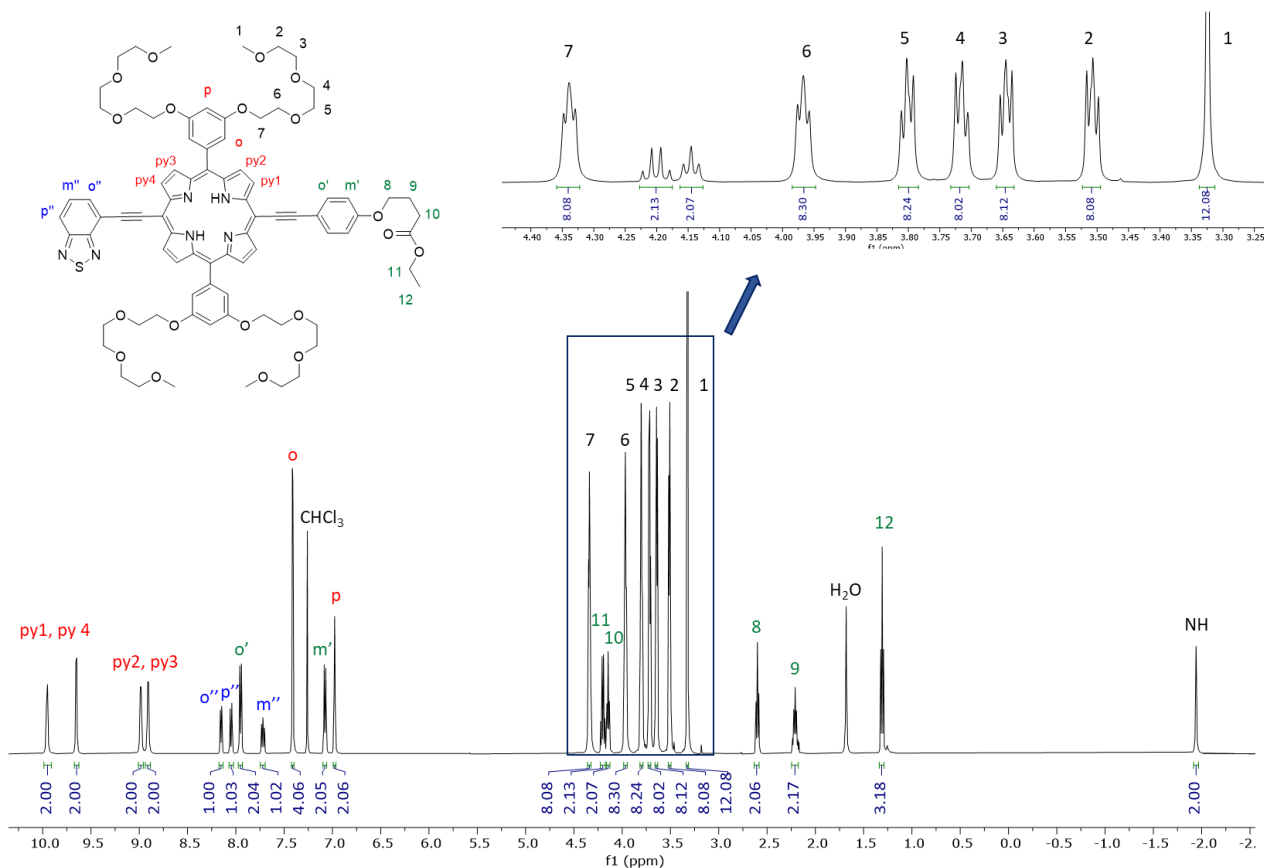


Figure 72. Spectre RMN ¹H (500 MHz, 298 K, CDCl₃) de PS₂.

5.3 Synthèse de PS₂-PGLa

Après hydrolyse de la fonction ester par une solution aqueuse de LiOH, la porphyrine **17** est obtenue sous forme de sel avec 84 % de rendement. Le couplage réalisé sur résine avec le peptide PGLa est effectué selon le même protocole que celui décrit dans le paragraphe 4.3 et le conjugué PS₂-PGLa est obtenu sous forme d'un solide vert avec 43 % de rendement après purification par HPLC préparative (colonne C18) et lyophilisation (**Figure 73**).

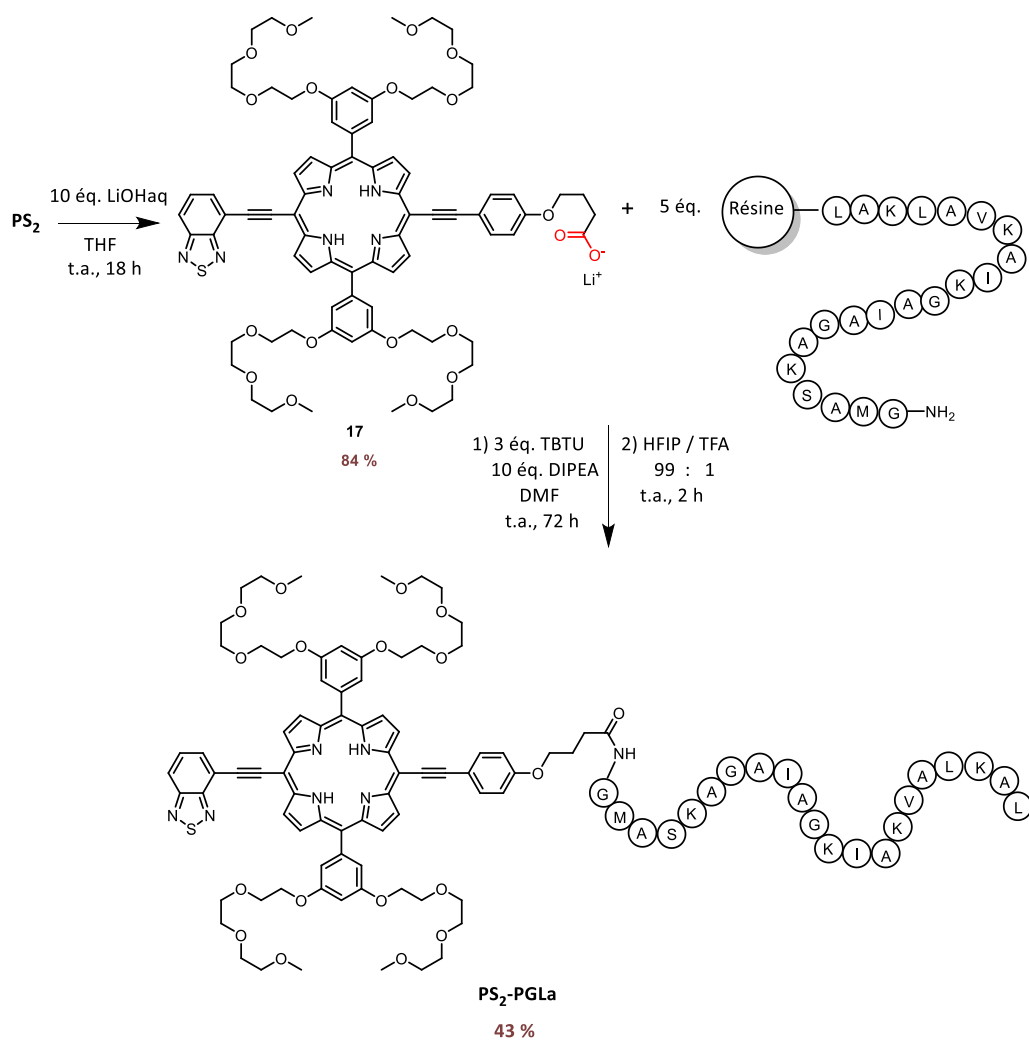


Figure 73. Synthèse du conjugué PS₂-PGLa.

L'HPLC analytique indique la présence d'un seul produit avec un temps de rétention de 21,12 min et la pureté de PS₂-PGLa est supérieure à 97 % (**Figure 74**).

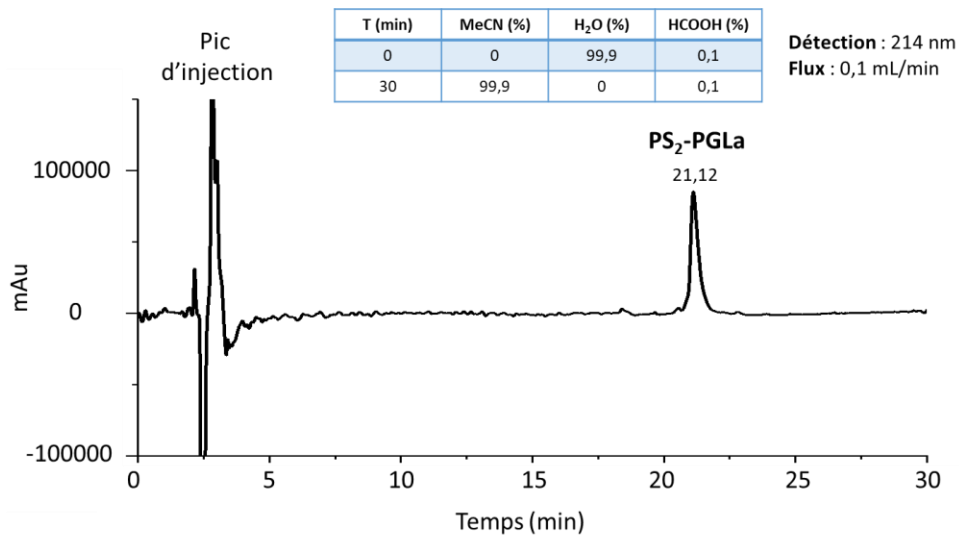


Figure 74. Chromatogramme de **PS₂-PGLa** obtenu en HPLC analytique et conditions d'élution utilisées.

L'obtention du conjugué, dont la fonction méthionine est oxydée, est confirmée par spectrométrie de masse HR ESI-MS. Le pic à $m/z = 1146,6038$ correspond à l'espèce ionisée $[M + 3H]^3+$, et les pics à 860,4585 et 688,5690 correspondent respectivement à $[M + 4H]^4+$ et $[M + 5H]^5+$ (**Figure 75**). Les profils isotopiques expérimentaux sont en accord avec les profils isotopiques calculés.

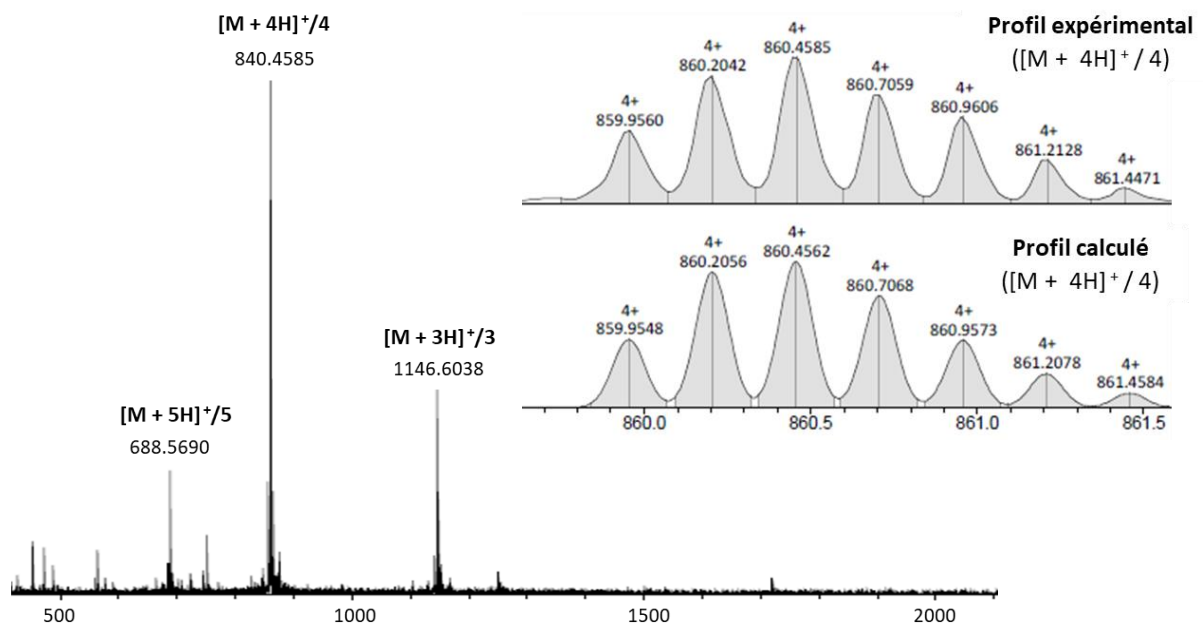


Figure 75. Spectre HR ESI-MS de **PS₂-PGLa** et profil isotopique expérimental et calculé pour le pic le plus intense $[M + 4H]^4/4$.

Le spectre RMN ^1H du conjugué confirme également l'obtention du produit avec l'apparition des signaux de la porphyrine (**Figure 76**).

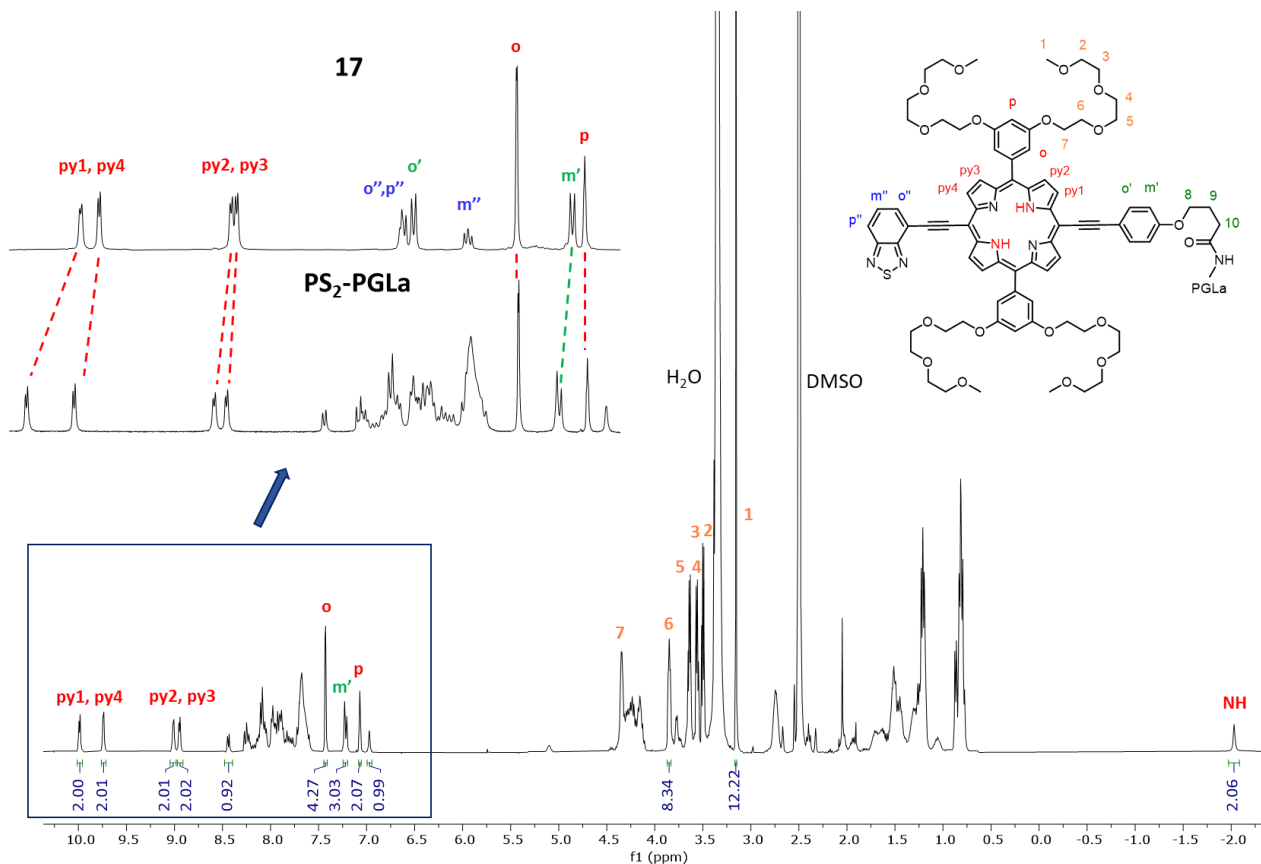


Figure 76. Spectre RMN ^1H (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) du conjugué $\text{PS}_2\text{-PGLa}$.

6 Propriétés photophysiques des photosensibilisateurs et des conjugués pour l'aPDT

6.1 Etudes par spectroscopie d'absorption UV-visible

6.1.1 Effet de la fonctionnalisation des porphyrines de zinc(II) sur leurs propriétés d'absorption

Les spectres d'absorption de différentes porphyrines métallées au zinc(II) obtenues au cours de la synthèse sont présentés **Figure 77**.

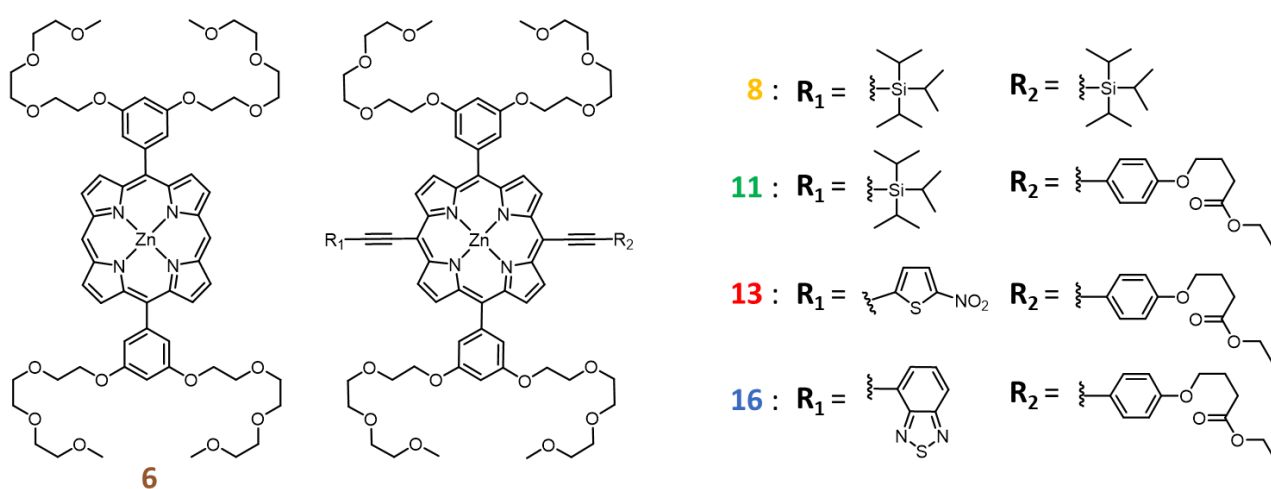
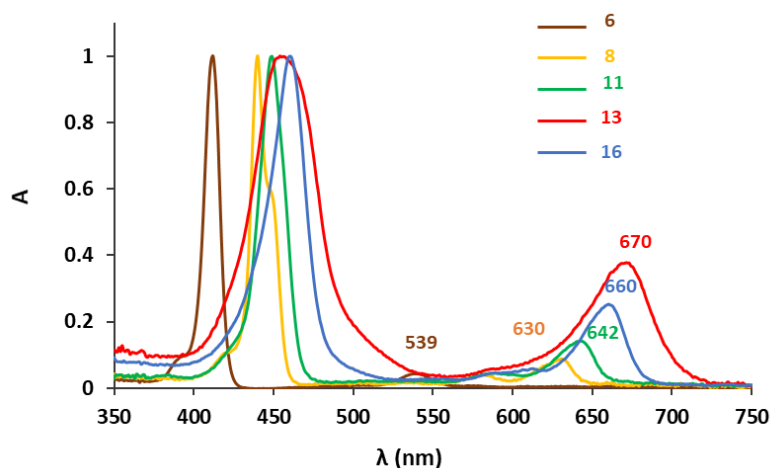


Figure 77. Structures des différentes porphyrines métallées au zinc(II) et spectres d'absorption normalisés dans le DCM des composés **6**, **8**, **11**, **13** et **16** ($C = 1 \mu M$).

L'introduction de deux fragments éthyne en position *meso* influe fortement sur la délocalisation électronique : on observe un déplacement bathochrome de la bande de Soret de 28 nm et de la bande Q la moins énergétique de 91 nm de la porphyrine **8** par rapport à la porphyrine **6**. La fonctionnalisation des alcynes des porphyrines **11**, **13** et **16** entraîne un déplacement des maxima d'absorption des bandes Q vers le rouge. La conjugaison de l'une des fonctions alcyne à un phényle entraîne un déplacement bathochrome de la bande d'absorption la moins énergétique de **11** de 12 nm, et l'introduction des groupements électroattracteurs engendre un déplacement supplémentaire de 18 nm pour le composé **16** fonctionnalisé par le BTD et 28 nm pour le composé **13** fonctionnalisé par le nitro-thiophène. On constate également un élargissement des bandes d'absorption par rapport aux porphyrines **6** et **8** non fonctionnalisées. En plus des trois transitions

classiques $\pi \rightarrow \pi^*$ de la bande de Soret ($S_0 \rightarrow S_2$) et des 2 bandes Q ($S_0 \rightarrow S_1$), de nouvelles transitions électroniques impliquant la porphyrine et les substituants nitro-thiophène et BTD peuvent avoir lieu et contribuer à l'élargissement des bandes d'absorption. Des calculs par TD-DFT concernant ces deux porphyrines bases libres ont été réalisés pour connaître la nature des transitions électroniques et font l'objet de la section 7.

6.1.2 Absorption des photosensibilisateurs PS_1 et PS_2 et des conjugués PS_1 -PGLa et PS_2 -PGLa

Les spectres d'absorption des photosensibilisateurs PS_1 et PS_2 constitués de porphyrines base libre ainsi que ceux des conjugués PS_1 -PGLa et PS_2 -PGLa dans le DMSO sont reportés **Figure 78**.

Le dédoublement des bandes Q par rapport aux spectres des analogues métallés est caractéristique des porphyrines base libre. Les spectres dans le DMSO des porphyrines seules et de leurs conjugués sont très proches, témoignant du faible effet du peptide dans ce solvant.

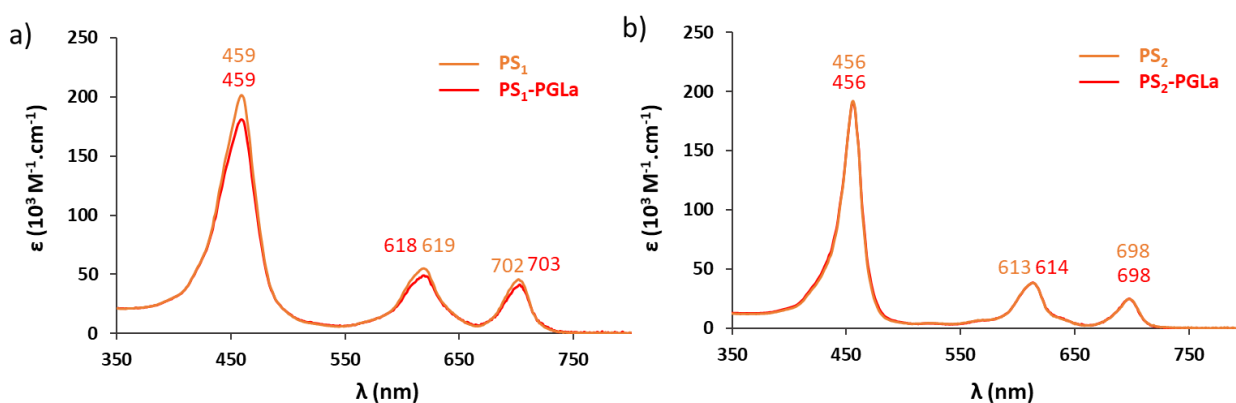


Figure 78. Spectres d'absorption dans le DMSO ($C = 1 \mu\text{M}$) des composés a) PS_1 et PS_1 -PGLa et b) PS_2 et PS_2 -PGLa.

Les spectres d'absorption de ces mêmes composés dans une solution aqueuse de sels de phosphate à pH physiologique (PBS, pH = 7,4) sont reportés **Figure 79**.

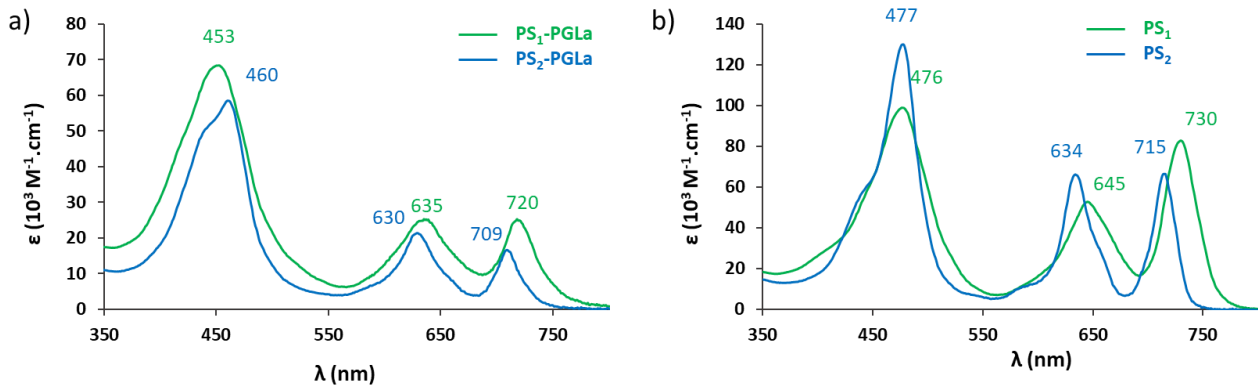


Figure 79. Spectres d'absorption ($C = 2,5 \mu\text{M}$) des composés a) $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ et $\text{PS}_2\text{-PGLa}$ dans PBS et b) PS_1 et PS_2 dans PBS + 1 % de DMSO.

Les conjugués $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ et $\text{PS}_2\text{-PGLa}$ sont solubles dans l'eau. On observe un élargissement des bandes d'absorption en milieux aqueux par rapport à celles obtenues dans le DMSO ainsi qu'une diminution du coefficient d'extinction molaire aux maxima d'absorption qui témoignent d'un phénomène d'agrégation dans le milieu. Les bandes Q les moins énergétiques se situent au-delà de 700 nm dans l'eau et présentent des coefficients d'extinction molaire de $25\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ et $18\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour $\text{PS}_2\text{-PGLa}$, indiquant la possibilité d'irradier ces composés dans le proche IR pour pouvoir travailler dans la fenêtre thérapeutique optique.

Les PS_1 et PS_2 ne sont pas solubles dans l'eau et il est nécessaire de les dissoudre au préalable dans du DMSO afin d'obtenir une solution aqueuse à 1 % de DMSO. Néanmoins, la formation d'agrégats visibles à l'œil nu s'effectue après quelques heures en solution.

Les valeurs numériques des maxima d'absorption et des coefficients d'extinction molaire sont reportés **Tableau 4**.

Tableau 4. Maxima des bandes d'absorption et coefficients d'extinction molaire de **PS₁**, **PS₂**, **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**.

Composés	Solvants	λ_{\max} /nm (ϵ / $M^{-1}.cm^{-1}$) Région de Soret	λ_{\max} /nm (ϵ / $M^{-1}.cm^{-1}$) Bandes Q
PS₁	DMSO	459 (201 000)	619 (55 000), 702 (46 000)
	PBS + 1 % DMSO	476 (99 000)	645(52 000), 730 (83 000)
PS₂	DMSO	456 (192 000)	613 (39 000), 698 (26 000)
	PBS + 1 % DMSO	477 (130 000)	634 (66 000), 715 (66 000)
PS₁-PGLa	DMSO	459 (181 000)	618 (49 000), 703 (41 000)
	PBS	453 (68 000)	635 (25 000), 720 (25 000)
PS₂-PGLa	DMSO	456 (188 000)	614 (38 000), 698 (25 000)
	PBS	460 (59 000)	630 (22 000), 709 (18 000)

6.2 Rendements quantiques et durées de vie de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées par le docteur Barbara Ventura de l'Institut ISOF (Université de Bologne, Italie). Les spectres d'émission de **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** ont été réalisés dans le DMSO et H₂O à une excitation de 450 nm (**Figure 80**).

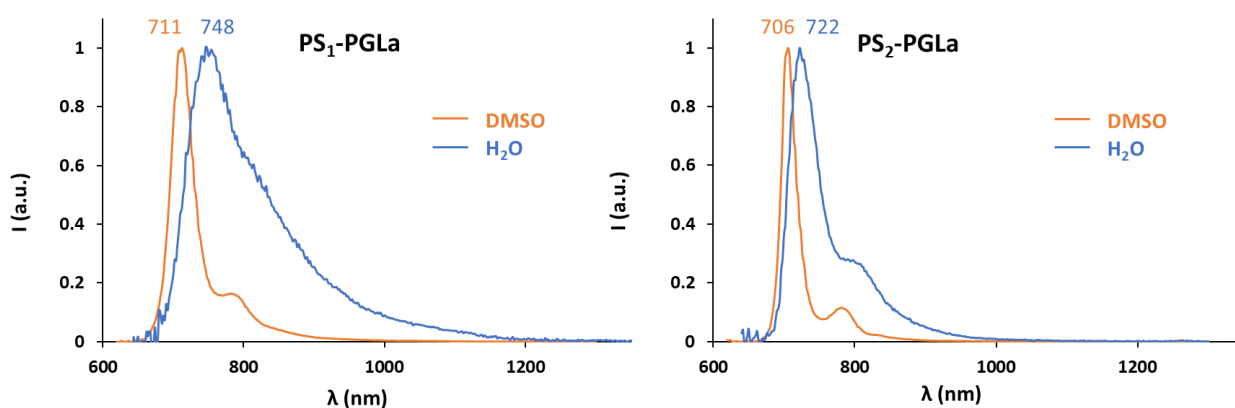


Figure 80. Spectres d'émission normalisés de **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** dans le DMSO et H₂O.

Les spectres d'émission des porphyrines de référence **PS₁** et **PS₂** et des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** sont identiques dans le DMSO. On observe un maximum d'émission à 712 nm pour **PS₁** et 711

nm pour **PS₁-PGLa** fonctionnalisés par une unité nitro-thiophène et 706 nm pour les composés **PS₂** et **PS₂-PGLa** liés au BTB. Le profil est différent dans l'eau avec des bandes d'émission plus larges et un déplacement des maxima d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées, à 748 nm pour **PS₁-PGLa** et à 722 nm pour **PS₂-PGLa**.

Les valeurs des rendements quantiques de fluorescence et les durées de vie à l'état excité sont regroupés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Maxima d'émission, rendements quantiques et durées de vie de fluorescence de **PS₁**, **PS₂**, **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**.

Composés	Solvants	λ_{em} (nm)	Φ_{fi}	τ (ns)
PS₁	DCM	708, 782	0,16	2,3
	DMSO	712, 786	0,10	1,2
PS₂	DCM	702, 778	0,21	4,6
	DMSO	706, 780	0,27	5,7
PS₁-PGLa	DMSO	711, 786 sh	0,048	1,0
	H ₂ O	748	$8,0 \times 10^{-4}$	0,3 (80 %) ; 1,3 (20 %)
PS₂-PGLa	DMSO	706, 782	0,22	5,4
	H ₂ O	722, 808 sh	0,040	5,4

Les rendements de fluorescence de **PS₁** dans le DCM et le DMSO sont similaires et proches de celui mesuré dans le benzène pour la porphyrine H₂TPP utilisée comme référence ($\Phi_{fi} = 0,11$).²¹¹ Cependant les temps de vie de fluorescence τ sont courts dans ces solvants et bien inférieurs à celui mesuré pour H₂TPP ($\tau = 16$ ns dans le benzène).²¹¹ En ce qui concerne **PS₂**, les rendements de fluorescence de 0,21 dans le DCM et 0,27 dans le DMSO sont élevés pour une porphyrine non métallée en comparaison avec la porphyrine H₂TPP, et les temps de vie, bien que plus importants que ceux de **PS₁**, restent faibles car près de trois fois inférieurs aux valeurs obtenues pour H₂TPP. Concernant l'effet du **PGLa**, on note que le rendement de fluorescence du conjugué **PS₁-PGLa** dans le DMSO est beaucoup plus faible que celui de la porphyrine mais les temps de vie sont similaires. Une telle différence n'est pas observée pour le conjugué **PS₂-PGLa**, les rendements de fluorescence et le temps de vie étant similaires à ceux mesurés pour **PS₂**. Les rendements de fluorescence mesurés dans l'eau sont quant à eux plus faibles que ceux obtenus dans le DMSO. Une décroissance de fluorescence bi-exponentielle liée à un phénomène d'agrégation est observée pour **PS₁-PGLa** et peut expliquer le rendement extrêmement faible mesuré. La décroissance mono-exponentielle

observée pour **PS₂-PGLa** ne reflète pas la diminution de fluorescence dans l'eau par rapport au DMSO, le rendement étant seulement de 0,040 en milieu aqueux. Au vu du spectre d'absorption dans l'eau, des agrégats semblent présents et peuvent expliquer la chute du rendement quantique de fluorescence. La faible émission de fluorescence mesurée peut provenir d'une petite fraction du conjugué présent sous la forme de monomères tandis que les agrégats du conjugué ne sont pas émissifs.

6.3 Rendements quantiques de production d'oxygène singulet

Les rendements quantiques de production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ont également été mesurés par le Dr. Barbara Ventura. Dans le DCM, le rendement quantique de formation de l'oxygène singulet est mesuré par l'émission de phosphorescence à 1275 nm de $^1\text{O}_2$ généré par transfert d'énergie à la suite de l'excitation du PS (méthode directe).

Dans le DMSO, la trop faible émission de l'oxygène singulet ne permet pas d'effectuer des mesures correctes. Une méthode indirecte, qui consiste à utiliser des molécules sensibles à l'action de $^1\text{O}_2$, est employée. Le 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) est un bon indicateur de la présence d'oxygène à l'état excité singulet car il réagit rapidement avec lui mais ne réagit pas avec l'oxygène à l'état fondamental triplet (**Figure 81**).²¹²

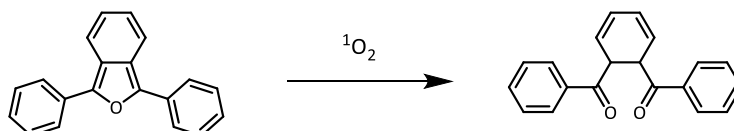


Figure 81. Réaction du DPBF en présence de l'oxygène singulet.

La dégradation du DPBF est suivie par spectroscopie UV-visible en analysant la diminution de l'absorbance à 417 nm au cours de 8 min d'irradiation à 616 nm de la solution contenant les composés. La même expérience est réalisée en utilisant la phtalocyanine de zinc (ZnPc) comme référence. Les résultats sont présentés **Figure 82**.

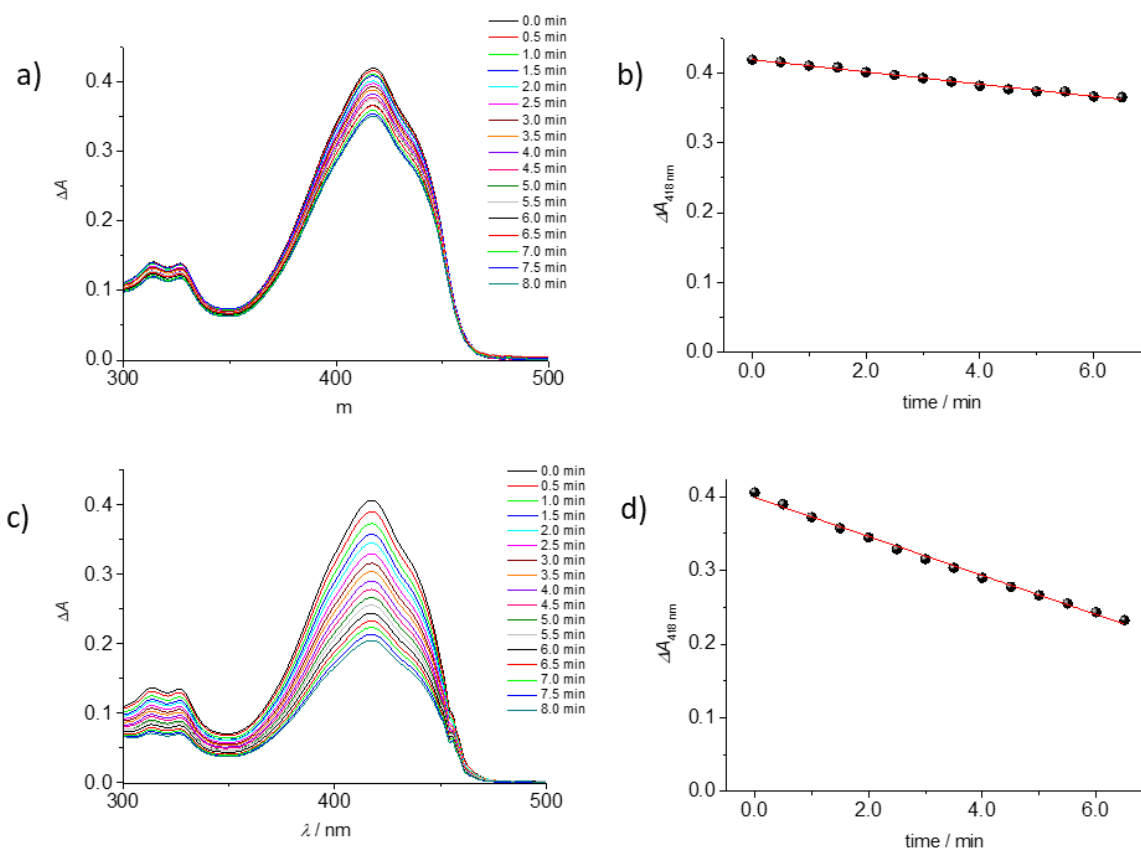


Figure 82. Absorbance du DPBF dans le DMSO en fonction du temps d'irradiation avec soustraction de l'absorbance de **PS₁** (a) ou de **PS₂** (c).

Diminution de l'absorbance du DPBF à 417 nm en fonction du temps d'irradiation en présence de **PS₁** (b) ou de **PS₂** (d).

Il apparaît clairement d'après les spectres d'absorption du DPBF (**Figure 82**) que le **PS₁** produit moins de $^1\text{O}_2$ que le **PS₂**. Les valeurs numériques des rendements quantiques de production d'oxygène singulet sont reportées **Tableau 6**. Le **PS₁** présente des valeurs assez éloignées entre le DCM ($\Phi_{\Delta} = 0,35$) et le DMSO ($\Phi_{\Delta} = 0,21$). Le conjugué **PS₁-PGLa** présente un rendement quantique dans le DMSO ($\Phi_{\Delta} = 0,18$) similaire à celui de la porphyrine **PS₁**.

Les rendements pour le **PS₂** sont bien supérieurs et les valeurs dans les deux solvants sont quasiment identiques ($\Phi_{\Delta} = 0,55$ dans le DCM et $\Phi_{\Delta} = 0,56$ dans le DMSO). L'ajout du peptide diminue le rendement quantique de production d'oxygène singulet dans le DMSO ($\Phi_{\Delta} = 0,42$), mais il reste plus de deux fois supérieur à celui mesuré pour **PS₁-PGLa**.

Les rendements quantiques de production de $^1\text{O}_2$ ont également été mesurés dans l'eau pour les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**. La méthode indirecte a été employée car la mesure directe de

l'émission de phosphorescence de $^1\text{O}_2$ s'est avérée compliquée en raison de la faible intensité du signal. L'acide anthracène-9,10-dipropionique (ADPA) a été utilisé comme piègeur de l'oxygène à l'état singulet. Les conjugués ont été irradiés à 630 nm et la diminution de l'absorbance de l'ADPA à 359 nm a été mesurée au cours de l'irradiation. Les valeurs obtenues pour les deux conjugués sont très proches de celles déterminées dans le DMSO, le rendement de production d'oxygène singulet de **PS₁-PGLa** étant de 0,23 et celui de **PS₂-PGLa** de 0,40.

Tableau 6. Rendements quantiques de production d'oxygène singulet des photosensibilisateurs **PS₁**, **PS₂** et des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**.

Composés	Solvants	Φ_{Δ}
PS₁	DCM	0,35
	DMSO	0,21
PS₂	DCM	0,55
	DMSO	0,56
PS₁-PGLa	DMSO	0,18
	H ₂ O	0,23
PS₂-PGLa	DMSO	0,42
	H ₂ O	0,40

6.4 Dichroïsme circulaire électronique

Pour un milieu optiquement actif, le dichroïsme circulaire électronique (DCE) permet de mesurer la différence d'absorption de la lumière polarisée « circulairement gauche » de celle polarisée « circulairement droite ». ²¹³ Cette technique est liée à la chiralité et est donc sensible à la configuration absolue ainsi qu'à la conformation d'une molécule. ²¹⁴ Dans l'UV lointain (240-180 nm), le DCE permet d'analyser la structure secondaire des peptides car les électrons des liaisons peptidiques absorbent dans cette gamme d'énergie. ²¹⁵ Des transitions $n \rightarrow \pi^*$ sont observées vers 220 nm et des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ ont lieu vers 190 nm. L'intensité et l'énergie de ces transitions dépendent des angles qu'adoptent les liaisons peptidiques et par conséquent de la structure secondaire du peptide. Selon la conformation des peptides, les signaux observés sur les spectres de dichroïsme circulaire possèdent des caractéristiques particulières (**Figure 83**). ²¹⁶ Si le peptide n'est pas structuré en solution, le signal en DCE correspondant présente une bande négative possédant

un minimum à 196 nm. Lorsque le peptide adopte une structure en feuillet β , une bande d'absorption négative avec un minimum à 217 nm est observé et dans le cas où il présente une structure en hélice α , deux minima à 208 nm et 222 nm sont visibles. Cette spectroscopie est donc utile pour évaluer la conformation des peptides en solution.

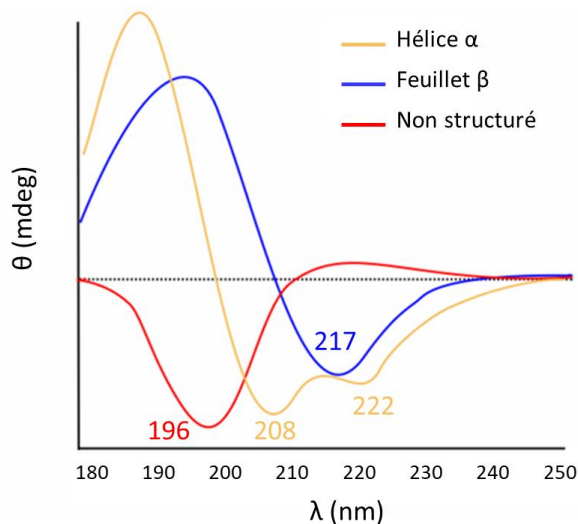


Figure 83. Spectres DCE caractéristiques des structures secondaires des peptides.²¹⁶

6.4.1 Analyse du peptide PGLa

Les spectres DCE du peptide **PGLa** ont été enregistrés dans de l'eau à pH physiologique (tampon TRIS, pH= 7,4) et en présence de vésicules afin d'évaluer la conformation du peptide en interaction avec les membranes anioniques (**Figure 85**). Les vésicules, composées de 75 % de lipides POPE et 25 % de lipides POPG (**Figure 84**), ont été préparées au laboratoire du Pr. Bechinger et miment les membranes bactériennes.

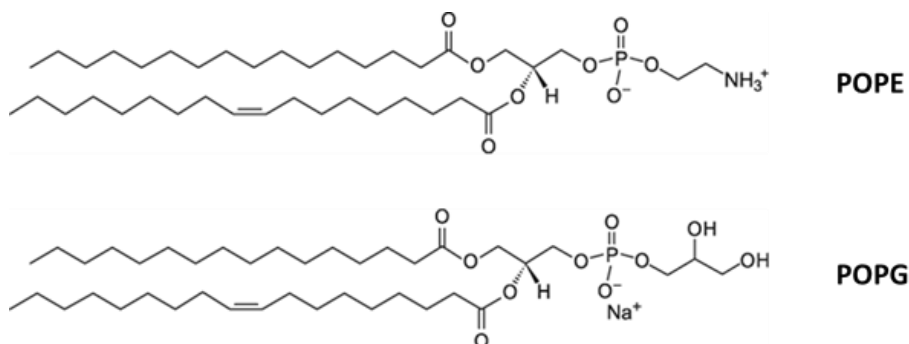


Figure 84. Structures des lipides POPE et POPG.

On constate que le **PGLa** n'est pas structuré en solution aqueuse car le signal observé présente une bande d'absorption avec un minimum à 197 nm, caractéristique de l'absence de structuration (**Figure 85**). Lorsque des vésicules sont ajoutées au milieu ($C_{\text{vésicules}} = 100 \mu\text{M}$), le peptide adopte une structure hélicoïdale car deux minima à 211 nm et 222 nm précédés d'une bande positive à 194 nm sont observés.

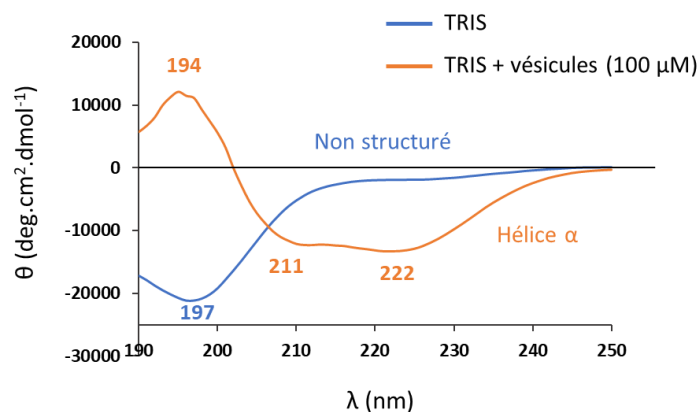


Figure 85. Spectres DCE du peptide **PGLa** ($C = 10 \mu\text{M}$) en l'absence et en présence de vésicules anioniques dans du TRIS ($\text{pH} = 7,4$).

De façon similaire à un grand nombre de peptides non structurés en solution, les interactions électrostatiques entre le **PGLa** et les membranes anioniques induisent un changement de conformation de ce dernier. Celui-ci se structure pour présenter une face hydrophile et une face hydrophobe.

6.4.2 Analyse des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**

Les mêmes mesures ont été réalisées avec les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** afin d'évaluer l'effet des porphyrines sur la conformation du peptide (**Figure 86**).

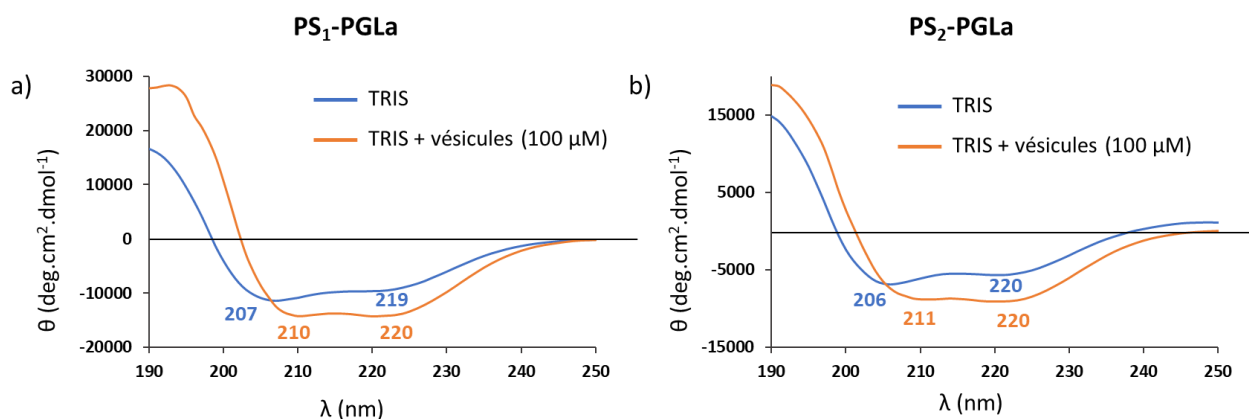


Figure 86. Spectres DCE ($C = 10 \mu\text{M}$) : a) du conjugué **PS₁-PGLa** en l'absence et en présence de vésicules anioniques dans du TRIS ($\text{pH} = 7,4$) et b) du conjugué **PS₂-PGLa** dans les mêmes conditions.

La porphyrine induit un changement de conformation du **PGLa** car les bandes observées sur le spectre DCE du conjugué dans la région UV sont similaires à celles observées sur le spectre du **PGLa** en présence de vésicules. Les signaux obtenus pour les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** montrent deux minima à 207 nm et 219 nm, et 206 nm et 220 nm respectivement et sont en accord avec une structure hélicoïdale de la partie peptidique.

L'ajout des vésicules anioniques a peu d'effet sur la conformation du peptide du conjugué. Le spectre de **PS₁-PGLa** présente deux minima à 210 nm et 220 nm et celui de **PS₂-PGLa** présente également deux minima à 211 nm et 220 nm, indiquant que le peptide reste structuré en hélice α en présence des vésicules. Les signaux observés pour les deux conjugués sont similaires et le **PGLa** semble être structuré par sa liaison covalente à la porphyrine, qu'il s'agisse de **PS₁** ou **PS₂**.

En outre, un signal caractéristique résultant de l'interaction de deux porphyrines peut être observé dans la région de Soret. Lorsque deux chromophores identiques sont proches dans l'espace et forment un agrégat oblique (**Figure 87a**), le couplage de leurs moments dipolaires de transition électrique conduit à un dédoublement de l'état excité (**Figure 87b**).^{213,214}

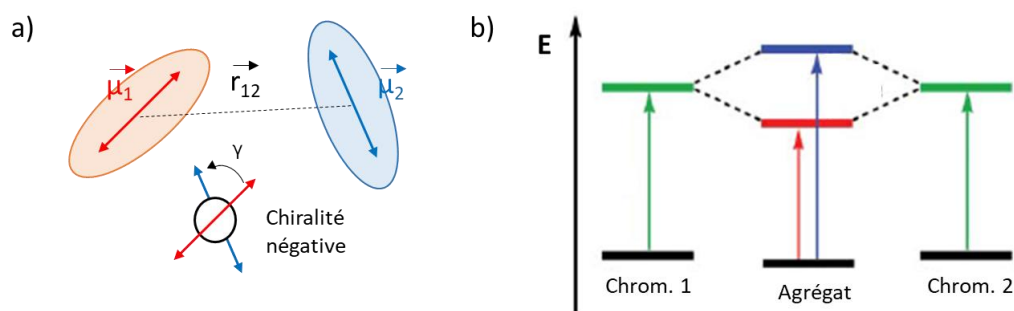


Figure 87. a) Géométrie requise des chromophores pour l'observation d'un couplage excitonique en DCE et b) Dédoublage de l'état excité caractéristique d'un couplage excitonique. Images adaptées de la publication.²¹⁴

Sur le spectre d'absorption UV-visible, le couplage des porphyrines entraîne l'apparition de deux bandes en raison des transitions électroniques de l'état fondamental vers les deux états excités de différentes énergies (**Figure 88a**). Sur le spectre DCE, cela se traduit par la présence de deux bandes de signes opposés d'intensité similaire dont l'intersection avec la ligne de base correspond au maximum d'absorption du monomère (**Figure 88b**).

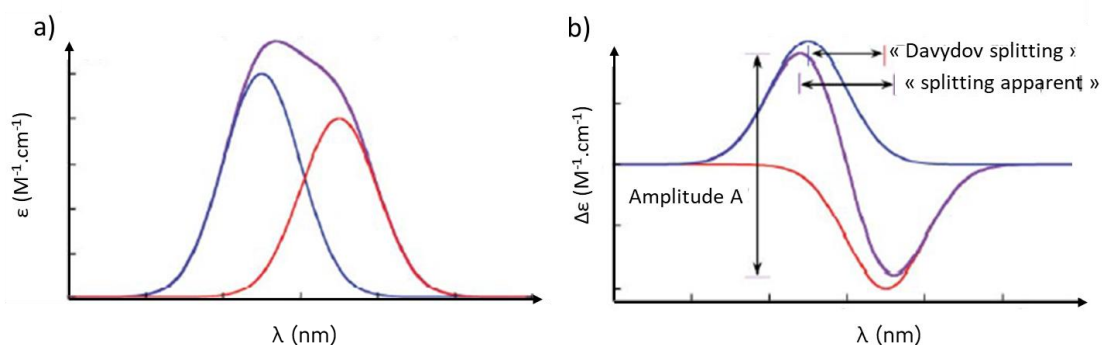


Figure 88. a) Spectre d'absorption théorique pour un agrégat oblique présentant un couplage excitonique et b) Spectre DCE correspondant. Images reproduites de la publication.²¹⁴

Pour le conjugué **PS₁-PGLa**, on observe sur le spectre DCE un signal entre 400 et 550 nm caractéristique de deux porphyrines présentant un couplage excitonique (**Figure 89a**).

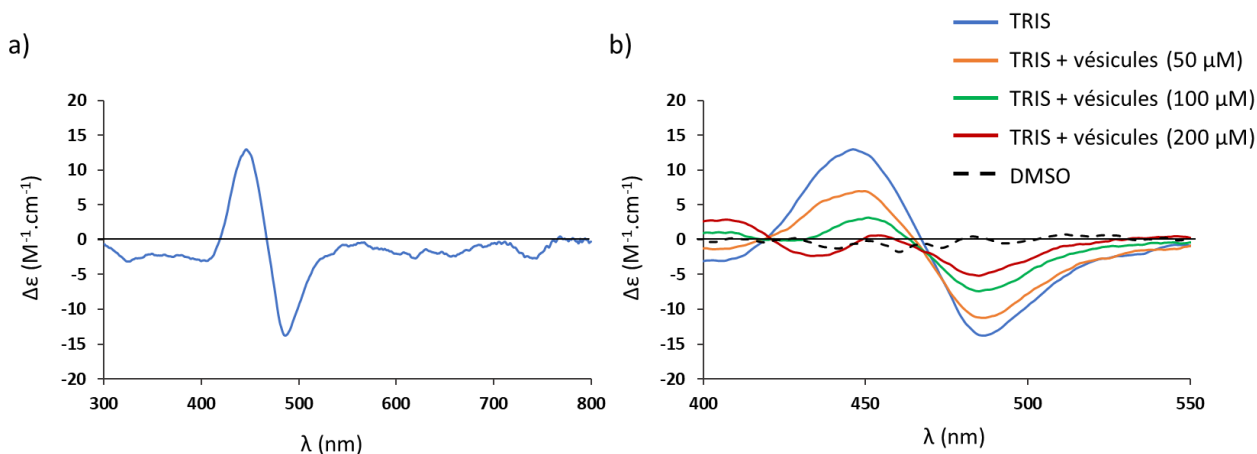


Figure 89. Spectres DCE du conjugué **PS₁-PGLa** ($C = 10 \mu\text{M}$) a) dans du TRIS (pH = 7,4) entre 300 et 800 nm et b) dans du TRIS, dans du DMSO et en présence de vésicules à différentes concentrations (région de Soret).

Les spectres DCE du conjugué **PS₁-PGLa** dans le tampon TRIS en présence de vésicules à différentes concentrations ont été enregistrés (**Figure 89b**). On constate que l'intensité du signal caractéristique du couplage excitonique diminue en fonction de l'augmentation de la concentration en vésicules dans le milieu. L'interaction des conjugués avec les membranes anioniques modifie le positionnement relatif des porphyrines en solution. En effet, l'amplitude entre le minimum et le maximum des deux bandes d'absorption de signes opposés est proportionnelle à l'intensité du couplage excitonique. Cette amplitude est inversement proportionnelle à la distance entre les molécules qui interagissent et est dépendante de l'angle de projection entre les chromophores (**Figure 87a**).²¹⁷ Aucun couplage excitonique n'est observé si les chromophores sont parallèles ou perpendiculaires l'un à l'autre. Pour qu'un couplage excitonique soit de forte intensité, il faut que les chromophores soient proches spatialement et que l'angle de projection soit d'environ 70° .

La diminution de l'intensité du signal caractéristique du couplage excitonique ainsi que la diminution de l'écart entre les deux extrema lorsque des vésicules sont ajoutées au milieu aqueux indiquent un éloignement des porphyrines et/ou une modification de l'angle de projection, supposant une désagrégation par interaction avec les membranes anioniques. Un contrôle dans le DMSO a été réalisé et aucun signal n'est détecté pour **PS₁-PGLa** dans cette gamme de longueurs d'onde, indiquant l'absence de couplage excitonique dans ce solvant. Le conjugué **PS₁-PGLa** semble ainsi interagir avec les membranes anioniques, ce qui constitue une propriété essentielle pour l'application antibactérienne. En l'absence de vésicules, la taille des agrégats formés par le conjugué

dans l'eau sera à déterminer par des mesures DLS et par microscopie électronique à transmission (TEM).

Des mesures réalisées dans les mêmes conditions ont été effectuées pour le conjugué **PS₂-PGLa** (**Figure 90**).

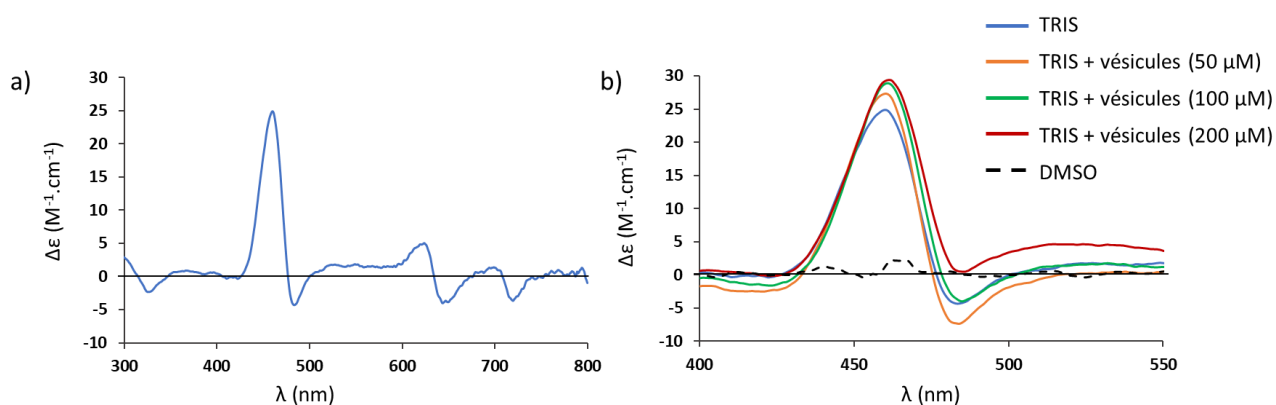


Figure 90. Spectres DCE du conjugué **PS₂-PGLa** ($C = 10 \mu\text{M}$) a) dans du TRIS ($\text{pH} = 7,4$) entre 300 et 800 nm et b) dans du TRIS, dans du DMSO et en présence de vésicules à différentes concentrations (région de Soret).

On constate la présence de deux bandes de signes opposés d'intensités différentes (**Figure 90a**). Contrairement au signal observé pour le conjugué **PS₁-PGLa**, le signal obtenu pour **PS₂-PGLa** montre une bande positive à 460 nm beaucoup plus intense ($\Delta\epsilon = + 24,9 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) que celle négative à 483 nm ($\Delta\epsilon - 4,3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). De plus, des signaux sont également présents dans les régions des deux bandes Q.

La présence de vésicules induit peu d'effet sur le signal observé entre 400 et 550 nm (**Figure 90b**). Les interactions intermoléculaires entre les porphyrines du conjugué **PS₂-PGLa** semblent être différentes de celles ayant lieu pour le conjugué **PS₁-PGLa** et les études envisagées pour caractériser les agrégats dans l'eau permettront de mieux comprendre ces différences.

7 Etudes théoriques par calculs TD-DFT

Afin de comprendre les différences expérimentales observées sur les spectres d'absorption UV-visible entre les photosensibilisateurs **PS₁** et **PS₂**, des calculs utilisant la théorie de la fonctionnelle

de la densité (DFT, ou « Density Functional Theory ») ont été réalisés par le Dr. Christophe Gourlaouen du Laboratoire de Chimie Quantique à l'Université de Strasbourg.

7.1 Etude théorique du photosensibilisateur **PS₁**

La géométrie de **PS₁** utilisée pour les calculs TD-DFT est basée sur la structure de la molécule déterminée par diffraction des RX (**Figure 91**). Les monocristaux analysés ont été obtenus par diffusion lente d'H₂O dans une solution de DMSO contenant **PS₁**.

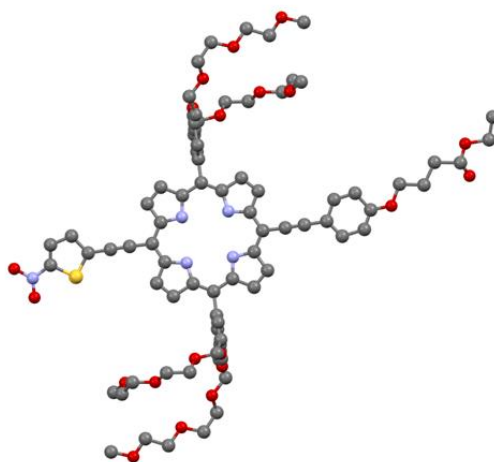


Figure 91. Structure du photosensibilisateur **PS₁** obtenue par diffraction des RX.

Les triples liaisons, l'unité nitro-thiophène, le fragment anisole et la porphyrine sont dans le même plan. On mesure un angle dièdre $\theta = 87,5^\circ$ entre le plan des phényles fonctionnalisés par des chaînes triéthylèneglycol et le plan de la porphyrine. Dans cette conformation, la participation de ces substituants au système aromatique π étendu est négligeable.

Dans le but d'étudier l'effet du nitro-thiophène et de l'anisole sur les propriétés d'absorption électronique du PS, différents conformères ont été simulés. Les chaînes triéthylèneglycol ont été remplacées par des groupes méthoxy afin de diminuer le temps de calcul. Le conformère **C₁** correspond à la structure obtenue par diffraction des RX où les deux substituants nitro-thiophène et anisole sont situés dans le plan de la porphyrine. Pour le conformère **C₂**, le plan de l'anisole est orthogonal au plan de la porphyrine tandis que pour le conformère **C₃**, le plan du nitro-thiophène est orthogonal au plan de la porphyrine (**Figure 92**).

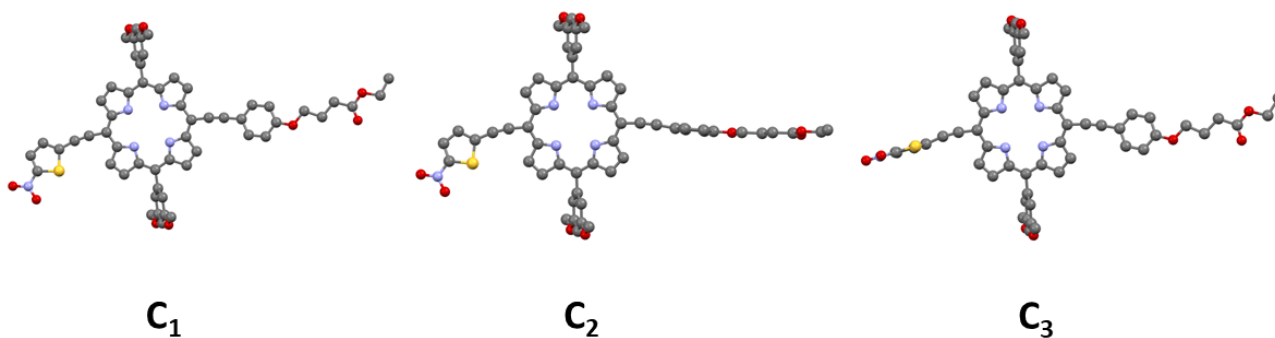


Figure 92. Structures simulées des conformères **C₁**, **C₂** et **C₃**.

Les trois conformères sont envisageables en solution car l'énergie nécessaire pour faire pivoter l'anisole de 90° n'est que de 2,3 kcal.mol⁻¹ et celle pour la rotation du nitro-thiophène est de 3,2 kcal.mol⁻¹. La simulation des spectres d'absorption dans le DCM des trois conformères a été réalisée et est présentée **Figure 93** ainsi que le spectre expérimental mesuré. Le spectre expérimental obtenu à température ambiante correspond à l'ensemble des conformations possibles en solution pour la molécule.

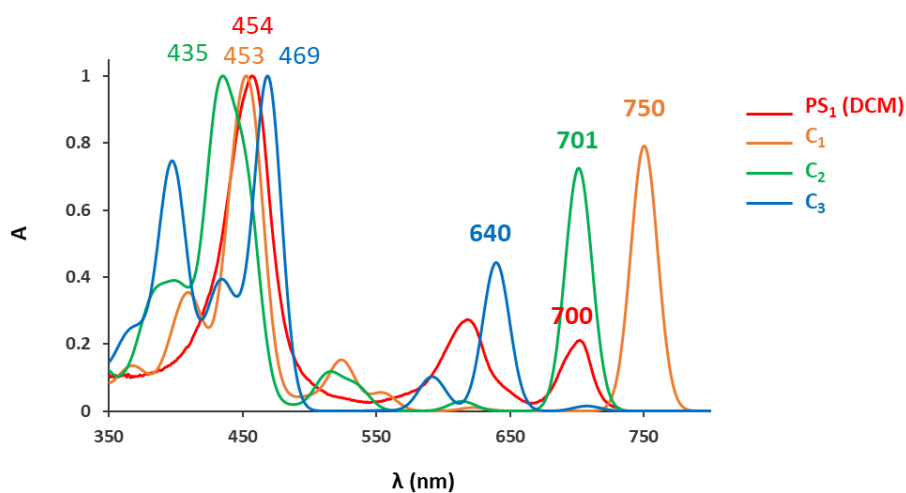


Figure 93. Spectres d'absorption normalisés expérimental de **PS₁** et théoriques des conformères **C₁**, **C₂**, et **C₃**.

On constate un fort effet de l'orientation des substituants sur le déplacement de la bande Q la moins énergétique. Les maxima d'absorption sont de 750 nm, 701 nm et 640 nm respectivement pour les conformères **C₁**, **C₂** et **C₃**. Lorsque les fragments nitro-thiophène et anisole sont dans le même plan, la délocalisation des électrons π est maximale et une bande à 750 nm est observée. La rotation de

l'anisole à 90 ° du plan de la porphyrine induit un déplacement hypsochrome théorique de 49 nm de cette bande tandis que la rotation du nitro-thiophène induit un déplacement hypsochrome théorique bien plus conséquent de 110 nm. Les maxima observés pour la bande de Soret sont moins affectés par les conformations car une différence de 34 nm est obtenue entre le conformère **C₂** et le conformère **C₃**.

La nature de la transition électronique la plus importante dans la région de Soret et dans la région des bandes Q ainsi que la nature des orbitales frontières ont été déterminées pour le conformère **C₁** aux maxima d'absorption de 453 nm et 750 nm (**Figure 94**).

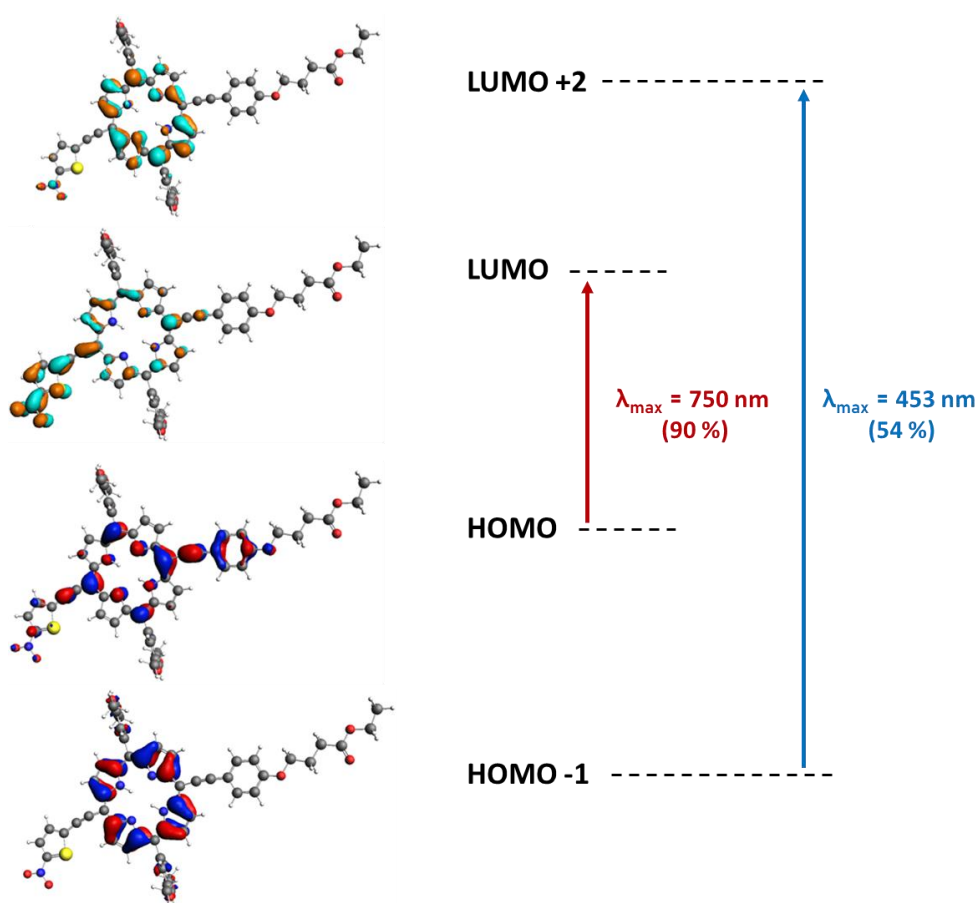


Figure 94. Nature des bandes à 453 nm et 750 nm et nature des orbitales frontières du conformère **C₁**.

Les calculs montrent que la HOMO est délocalisée de l'anisole à la porphyrine et la LUMO est essentiellement située sur le nitro-thiophène. La bande d'absorption à 750 nm correspond à une transition de transfert de charge de l'orbitale HOMO vers l'orbitale LUMO. La bande située à 453 nm dans la région de Soret correspond à 54 % à une transition HOMO-1 → LUMO +2 de nature $\pi \rightarrow \pi^*$

impliquant essentiellement la porphyrine. Cette bande est donc peu affectée par la rotation des deux fragments. En revanche, pour les conformères **C₂** et **C₃**, la délocalisation est partiellement rompue par la disposition orthogonale des substituants et un déplacement hypsochrome de la bande Q la moins énergétique est observé.

Les niveaux énergétiques de la HOMO et de la LUMO ont été calculés pour les différents conformères et sont présentés **Figure 95**.

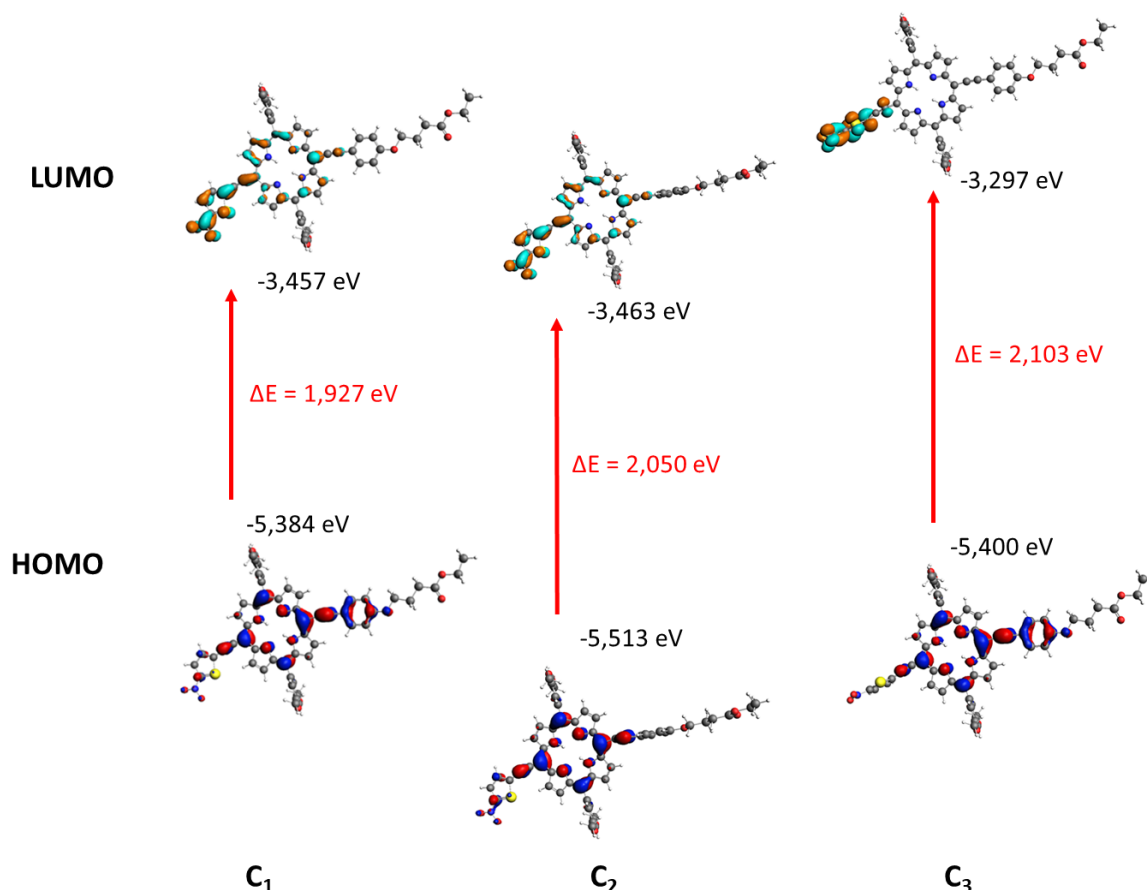


Figure 95. Energies des orbitales frontières HOMO et LUMO des conformères **C₁**, **C₂** et **C₃**.

Lorsque le fragment anisole du conformère **C₂** est orthogonal au plan de la porphyrine, on observe une stabilisation de la HOMO (- 0,129 eV) par rapport à **C₁**. L'anisole ne participe pas à la délocalisation électronique et l'augmentation de l'écart énergétique est en accord avec le déplacement hypsochrome de la bande Q de 49 nm.

Pour le conformère **C₃**, lorsque l'unité nitro-thiophène est orthogonale au plan de la porphyrine et ne participe pas à la délocalisation, la LUMO est fortement déstabilisée (+ 0,160 eV). Ceci s'explique

car la LUMO est située sur le substituant nitro-thiophène. Dans ce cas, un déplacement hypsochrome important de la bande Q de 110 nm est observé, en accord avec cette forte déstabilisation.

Afin d'évaluer l'influence des chaînes triéthylèneglycol, une optimisation géométrique a été réalisée à partir de la structure expérimentale obtenue par diffraction des RX (**Figure 96a**, conformère **C₄**). Il est intéressant de noter la forte influence des chaînes, par des interactions de Van der Waals, sur l'énergie des transitions électroniques (**Figure 96b**). Elles modifient en effet la géométrie de la porphyrine et l'orientation des phényles, et peuvent interagir avec les différents substituants. Néanmoins, des calculs sur ce conformère ne peuvent pas être effectués de façon précise en raison de la complexité et de la flexibilité de la molécule.

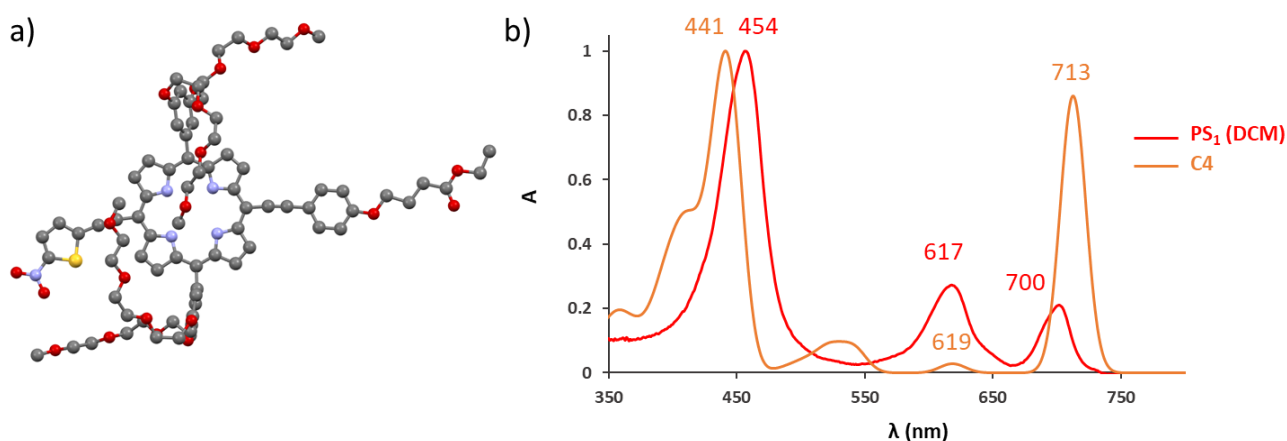


Figure 96. a) Structure du conformère **C₄** et b) Spectres d'absorption normalisés expérimental de **PS₁** et théorique du conformère **C₄**.

7.2 Etude théorique du photosensibilisateur **PS₂**

Des calculs TD-DFT similaires à ceux réalisés pour le photosensibilisateur **PS₁** ont été effectués pour **PS₂**. Trois conformères de géométries différentes ont été étudiés : **C₅** dont l'unité BTM et le fragment anisole se situent dans le même plan que la porphyrine, et **C₆** et **C₇** dont le fragment anisole et le BTM sont respectivement orthogonaux au plan de la porphyrine. Les chaînes triéthylèneglycol ont été remplacées par des groupes méthoxy.

Le spectre d'absorption expérimental du photosensibilisateur **PS₂** dans le DCM ainsi que ceux des conformères sont présentés **Figure 97**.

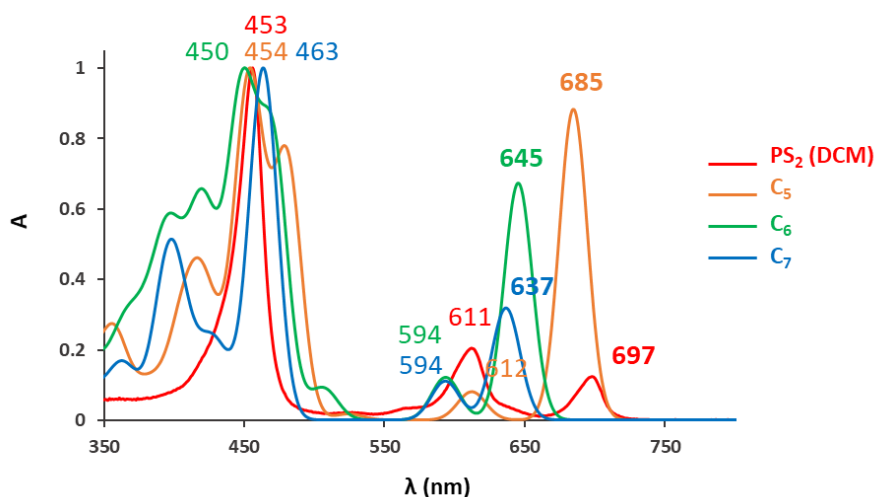


Figure 97. Spectres d'absorption normalisés expérimental de PS₂ et théoriques des conformères C₅, C₆ et C₇.

Le maximum d'absorption de la bande Q la moins énergétique est influencé par l'orientation du BDT et du fragment anisole. Lorsqu'ils sont dans le même plan que la porphyrine pour le conformère C₅, une bande à 685 nm est observée, et des déplacements hypsochromes de 40 nm et 48 nm sont respectivement obtenus pour C₆ et C₇. On constate que le déplacement hypsochrome de 48 nm lorsque le plan du BTD est orthogonal à la porphyrine est bien plus faible que celui observé lorsque le nitro-thiophène est orthogonal au plan de la porphyrine (110 nm).

La bande d'absorption de la bande Q la plus énergétique se situe entre 594 nm et 612 nm. Les bandes situées dans la région de Soret sont très proches en énergie, les maxima d'absorption des différents conformères étant situés dans une gamme de moins de 10 nm.

Pour le conformère C₅, la nature des transitions et des orbitales frontières aux maxima d'absorption de 454 nm, 612 nm et 685 nm ont été déterminés (**Figure 98**).

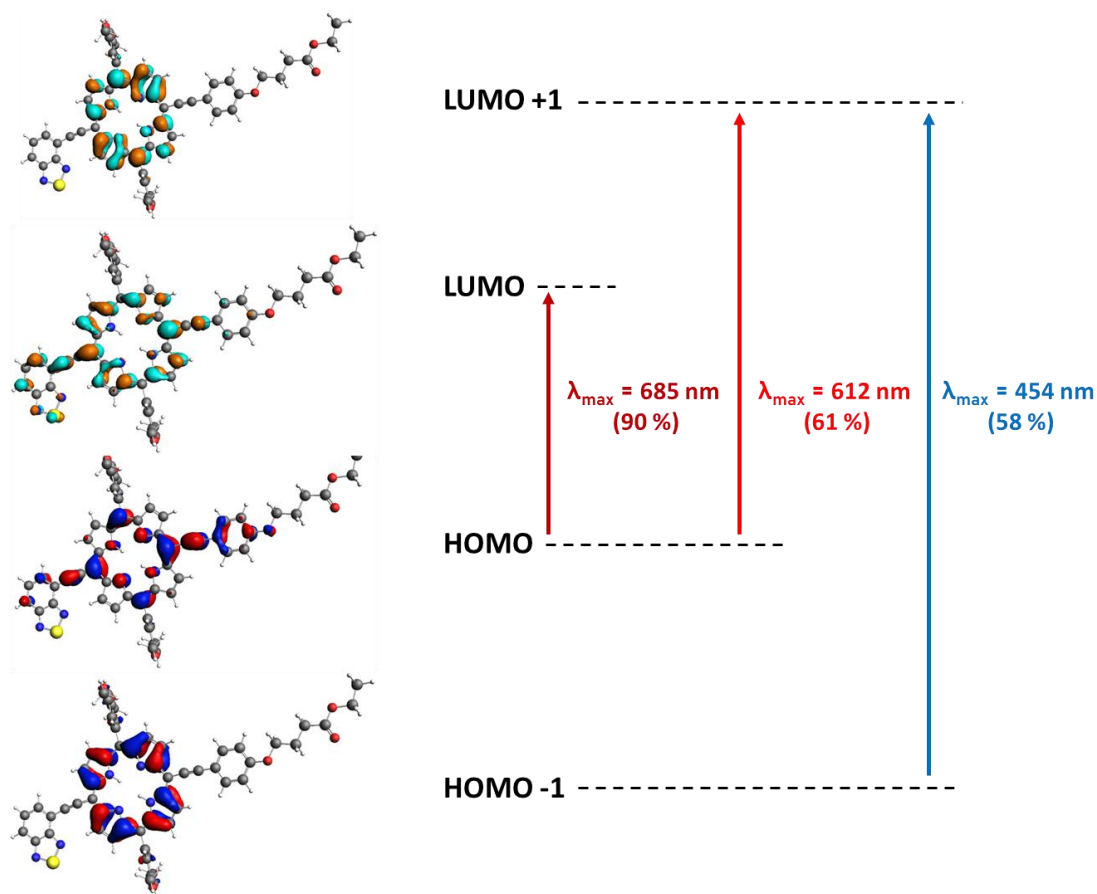


Figure 98. Nature des bandes à 454 nm, 612 nm et 685 nm et nature des orbitales frontières du conformère C_5 .

La transition majoritaire à 454 nm est une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ principalement localisée sur la porphyrine. Elle est donc faiblement affectée par l'orientation des substituants.

Pour la HOMO, on note une forte contribution de la porphyrine, de l'anisole et des alcynes. La LUMO est quant à elle délocalisée sur la porphyrine et le BTD. Pour cette transition HOMO \rightarrow LUMO, le caractère de transfert de charge est moins marqué que pour celle du PS_1 car la contribution du BTD à la LUMO n'est pas prépondérante. On observe ainsi une différence entre les conformères C_1 et C_5 des deux photosensibilisateurs PS_1 et PS_2 . L'unité nitro-thiophène apporte en effet une contribution beaucoup plus importante que le BTD à la LUMO impliquée dans la transition de plus basse énergie. Les niveaux énergétiques de la HOMO et de la LUMO ont été calculés pour les différents conformères et sont présentés en Annexe 5.

Le spectre d'absorption du conformère C_8 qui incorpore les chaînes triéthylèneglycol montre à nouveau que ces chaînes influencent la position des bandes d'absorption (**Figure 99**).

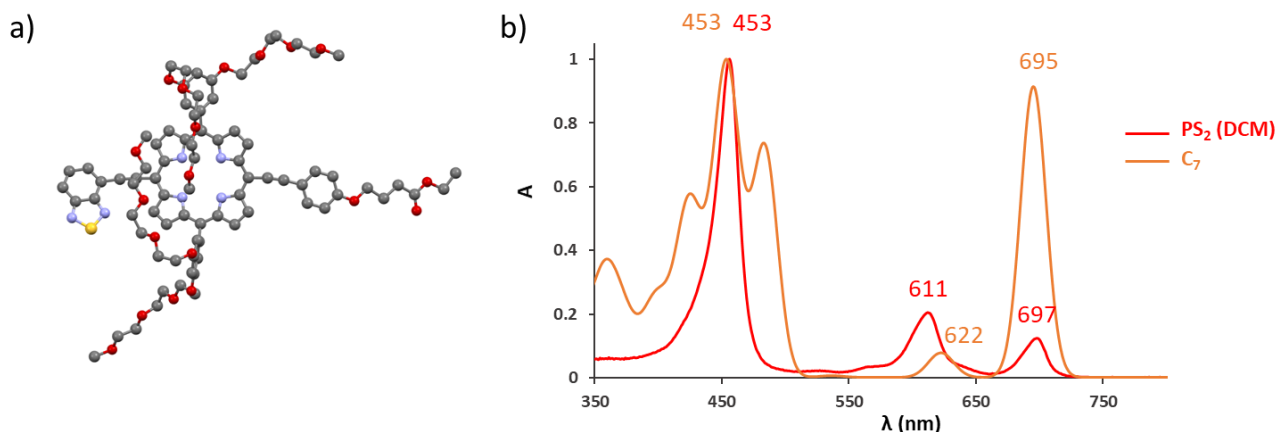


Figure 99. a) Structure du conformère C_8 et b) Spectres d'absorption normalisés expérimental de PS_2 et théorique du conformère C_8 .

7.3 Limitations des calculs théoriques par TD-DFT

Les résultats obtenus par calculs TD-DFT sont limités par l'approche statique de cette méthode. Les très faibles énergies de rotation du fragment anisole et des groupements électroattracteurs laissent supposer une libre rotation de ces unités en solution. Ainsi, le modèle statique utilisé pour les calculs DFT ne tient pas compte du dynamisme moléculaire en solution où plusieurs conformères sont présents simultanément. De plus, la présence des chaînes triéthylèneglycol influe également sur la conformation des photosensibilisateurs en solution mais l'évaluation de leur contribution par calculs TD-DFT est compliquée en raison de la flexibilité de la molécule.

8 Etudes par RMN à l'état solide de PS_1 -PGLa en présence de bicouches lipidiques orientées

Une étude par RMN à l'état solide a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Bechinger afin de déterminer l'orientation du peptide du conjugué PS_1 -PGLa en présence de bicouches lipidiques mimant les membranes bactériennes. Pour réaliser cette étude par RMN du solide, le PGLa a été marqué lors de sa synthèse à l'azote ^{15}N sur l'alanine située en quatorzième position de la séquence. Le conjugué PS_1 -PGLa a été obtenu dans les conditions décrites dans le paragraphe 4.3. Les

bicouches mimant les membranes bactériennes sont composées des lipides POPE et POPG en proportions (3 : 1). Les lipides POPG chargés négativement constituent environ 20 à 25 % de la membrane cytoplasmique des bactéries *E. coli* et sont à l'origine des interactions électrostatiques avec les AMP cationiques tandis que les lipides POPE constituent environ 75 % de cette membrane.²¹⁸ Les lipides et le conjugué sont dissous dans une solution CHCl₃/MeOH (1 : 1) qui est ensuite partiellement évaporée par flux d'argon puis le film lipidique est étalé sur plusieurs plaques de verre. Après évaporation des solvants organiques sous vide pendant une nuit, l'échantillon sur plaques de verre est hydraté pendant 2 h puis ces dernières sont empilées les unes sur les autres afin de former des bicouches lipidiques orientées (**Figure 100a**). La concentration en conjugué par rapport aux bicouches lipidiques est de 2 %.

Des études précédentes réalisées par Bechinger *et al.* ont permis d'établir une corrélation entre le déplacement chimique de l'azote ¹⁵N du peptide **PGLa** ou de l'un de ses analogues, la magainine II, et leur orientation dans les bicouches lipidiques (**Figure 100b**).¹⁹⁷ Lorsque le **PGLa** ou la magainine II ne sont pas présents dans le même échantillon de bicouches lipidiques, ils adoptent une orientation parallèle à la surface des membranes et un déplacement chimique de l'azote est observé aux alentours de 80 ppm. En revanche, lorsque le **PGLa** et la magainine II sont présents à la même concentration molaire dans un échantillon, l'interaction entre les deux peptides induit une orientation transmembranaire de la magainine II qui s'insère dans la bicouche de lipides. Un déplacement de l'azote vers 200 ppm est alors observé.

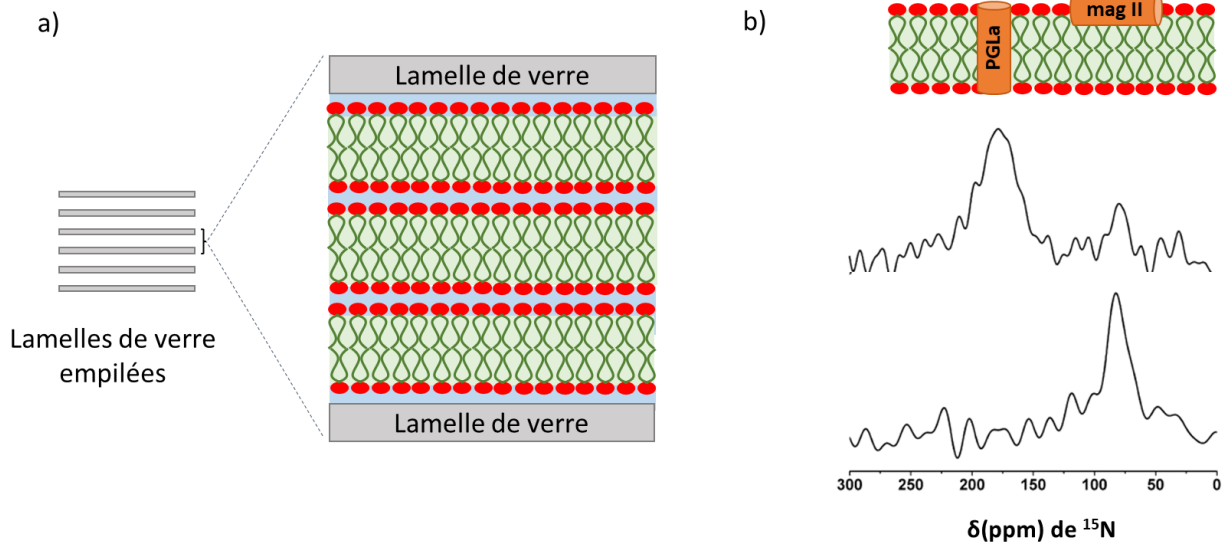


Figure 100. a) Schéma de bicouches lipidiques hydratées orientées entre des lamelles de verres. b) Orientation des peptides **PGLa** et magainine II (**mag II**) en proportion équimolaire corrélée au déplacement chimique de ^{15}N en RMN de l'état solide. Image adaptée de la publication.¹⁹⁷

Une étude RMN ^{31}P de la bicouche a été réalisée au préalable afin de s'assurer de l'orientation des lipides. Le déplacement chimique du ^{31}P indique que les bicouches lipidiques sont orientées et relativement bien alignées (**Figure 101a**).

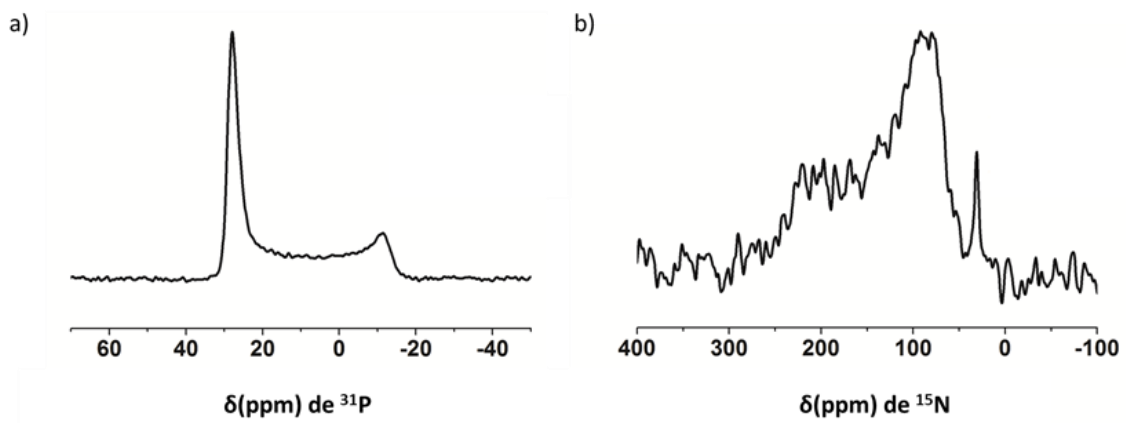


Figure 101. a) Spectre RMN ^{31}P (304 MHz, 310 K) des bicouches lipidiques POPE/POPG (3 : 1) ; b) Spectre RMN ^{15}N (76 MHz, 310 K) du conjugué **PS₁-PGLa** en présence de bicouches lipidiques POPE/POPG (3 : 1).

Concernant l'orientation du conjugué, les signaux observés par RMN ^{15}N indiquent une large gamme de déplacement chimique de l'azote entre 80 et 200 ppm. Le conjugué **PS₁-PGLa** ne semble pas

adopter une orientation préférentielle mais un ensemble d'orientation lorsqu'il est au contact de la bicouche lipidique (**Figure 101b**).

Une seconde étude a été réalisée en structurant les bicouches lipidiques en présence de **PS₁-PGLa** à partir d'une solution composée de 50 % de HFIP et 50 % d'H₂O. Ce mode opératoire est utilisé pour les peptides formant des agrégats en milieu aqueux car l'utilisation de HFIP permet de limiter ce phénomène. Les résultats sont présentés **Figure 102**.

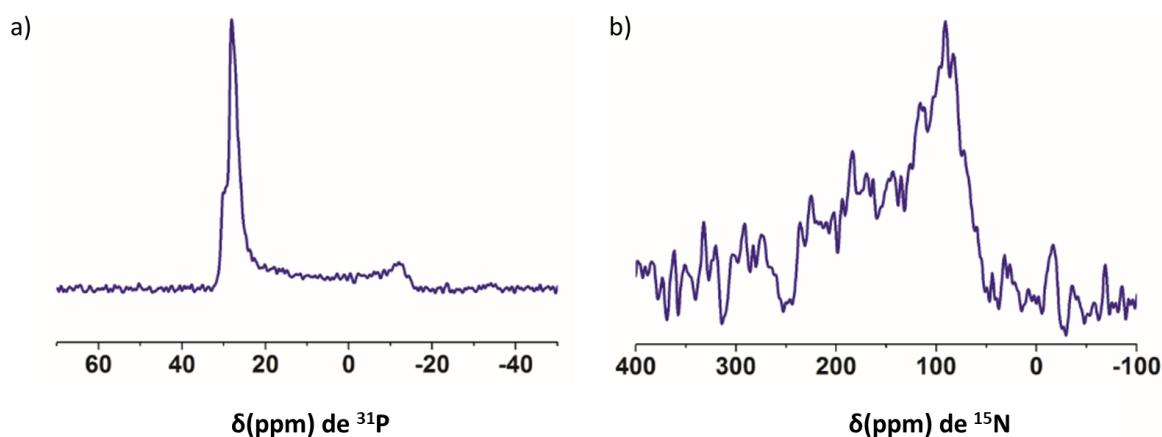


Figure 102. a) Spectre RMN ³¹P (304 MHz, 310 K) des bicouches lipidiques POPE/POPG (3 : 1) ; b) Spectre RMN ¹⁵N (76 MHz, 310 K) du conjugué **PS₁-PGLa** en présence de bicouches lipidiques POPE/POPG (3 : 1).

On observe des résultats très similaires à ceux obtenus avec le mélange CHCl₃/MeOH. Bien que les bicouches lipidiques soient structurées, le signal observé sur le spectre RMN de ¹⁵N indique que toutes les orientations du peptide sont représentées et qu'il n'adopte pas une orientation parallèle ou transmembranaire définie.

Les études par RMN du solide implique un faible degré de liberté du conjugué car l'espacement entre les plaques de verre contenant les bicouches lipidiques est restreint. Cette contrainte peut être à l'origine de l'absence d'orientation définie du peptide en présence des membranes.

9 Synthèse et caractérisation du conjugué antibactérien PS₂-Gly-D-Ctl

9.1 Synthèse des peptides D-Ctl et Gly-D-Ctl

La synthèse des peptides **D-Ctl** et **Gly-D-Ctl** a été effectuée sur phase solide selon le même protocole que celui décrit pour le **PGLa** dans le paragraphe 4.2. Le peptide **Gly-D-Ctl** a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Annexe 6)

9.2 Synthèse du conjugué PS₂-Gly-D-Ctl

La réaction de couplage entre la porphyrine **17** et le peptide **D-Ctl** greffé sur résine a tout d'abord été testée dans les conditions décrites au paragraphe 4.3. Cette réaction n'a cependant pas conduit au produit attendu. La réactivité de la fonction amine du résidu arginine à l'extrémité du peptide peut être entravée par la gêne stérique induite par le groupe protecteur Pbf de la fonction guanidine (**Figure 103**). Des problèmes de réactivité d'un peptide sur résine dont le résidu terminal est une arginine protégée ont déjà été observés par l'équipe de Reddi.¹⁸² Pour pallier ce problème, les auteurs ont ajouté un résidu glycine sur l'acide aminé encombré afin de réaliser le couplage entre le peptide et une porphyrine. Ainsi, un résidu glycine a été ajouté à la séquence de la **D-Ctl** lors de l'étape b de la synthèse du peptide en phase solide (**Figure 60**) afin de limiter l'encombrement stérique lors du couplage peptidique avec la porphyrine. Le couplage entre **17** et la Glycine-Cateslytine, **Gly-D-Ctl**, a pu être envisagé. Les conditions de clivage de la résine et de déprotection des chaînes latérales ont cependant dû être modifiées.

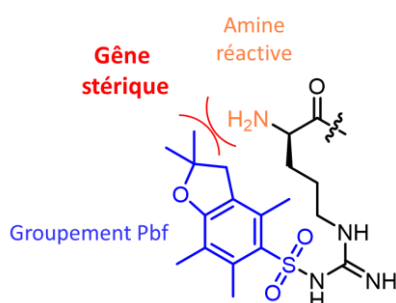


Figure 103. Encombrement stérique de la fonction guanidine protégée du dernier résidu arginine.

En effet, les guanidines des arginines sont protégées par des groupes Pbf qui sont moins réactifs lors de leurs déprotections en condition acide que les groupes protecteurs couramment utilisés lors des synthèses peptidiques tels que MMT, TRT ou *t*-Bu. La difficulté de déprotection des groupes Pbf est également corrélée au nombre de résidus arginines protégés : plus la séquence en comporte, plus la déprotection totale est délicate à obtenir.²¹⁹ Les conditions de clivage utilisées pour **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** (HFIP/TFA 99 : 1) ne permettent pas de déprotéger les cinq résidus arginines du peptide **Gly-D-Ctl**, et ce même en prolongeant le temps de réaction. Une augmentation du pourcentage de TFA de 1 à 10 % n'est également pas suffisante. Le clivage et la déprotection totale ont donc été réalisées dans des conditions standards dans une solution constituée de 94 % de TFA, 2,5 % d'eau, 2,5 % d'EDT et 1 % de TIS pendant 2 h (**Figure 104**).

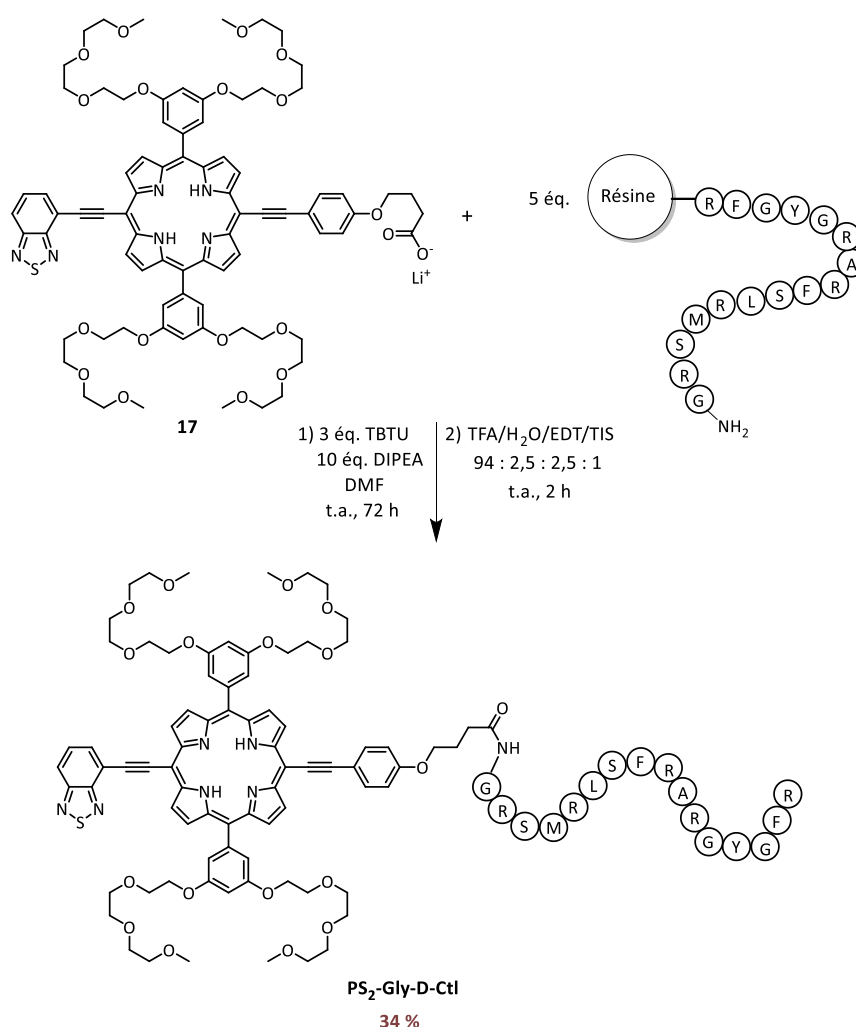


Figure 104. Synthèse du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**.

Des tests préalables réalisés sur la porphyrine **17** ont permis de s'assurer de la stabilité de la molécule dans ces conditions. Le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** est obtenu avec 34 % de rendement sous la forme d'un solide vert après purification par HPLC préparative (colonne C18) puis lyophilisation. Les analyses par HPLC analytique et HR ESI-MS confirment l'obtention et la pureté du produit, supérieure à 95 % (**Figure 105**).

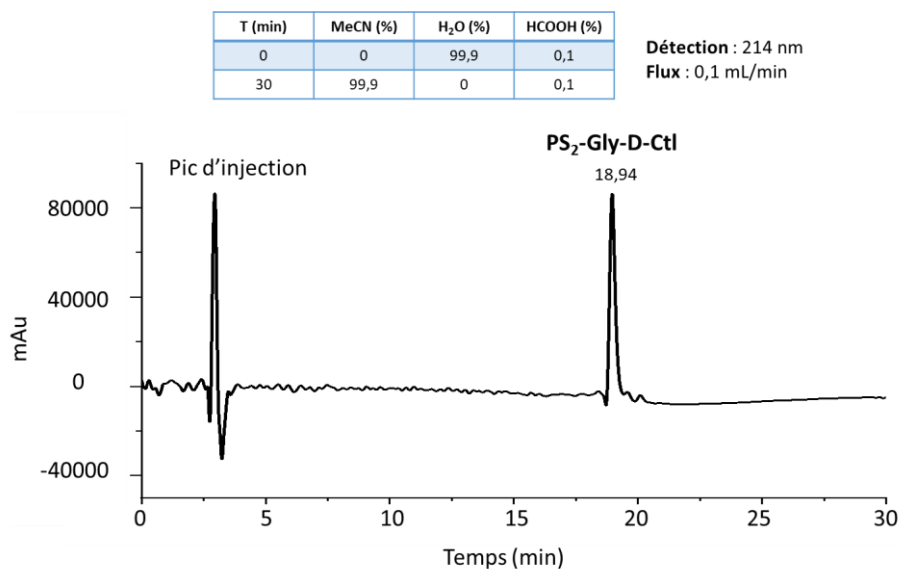


Figure 105. Chromatogramme obtenu par HPLC analytique pour **PS₂-Gly-D-Ctl** et conditions d'éluion utilisées.

Le profil isotopique expérimental de $[M + 3H]^{3+}$ est détecté à 1129.5410 et correspond au profil théorique calculé. Les signaux du produit deux, quatre et cinq fois protoné sont également détectés (**Figure 106**).

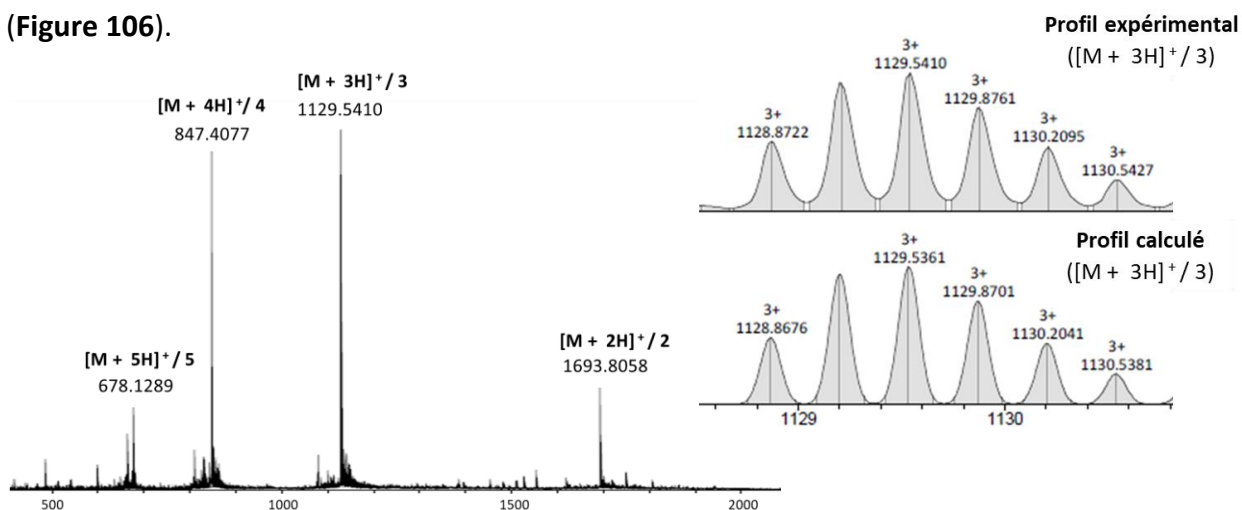


Figure 106. Spectre HR ESI-MS de **PS₂-Gly-D-Ctl** et profil isotopique expérimental et calculé pour le pic le plus intense.

9.3 Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible de **PS₂** et du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO et dans PBS + 1 % de DMSO sont présentés **Figure 107**.

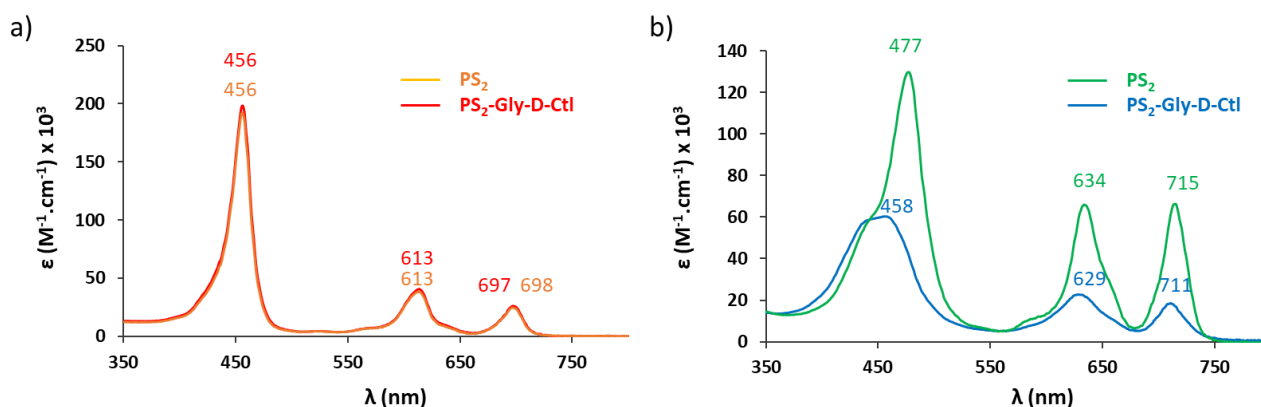


Figure 107. Spectres d'absorption des composés **PS₂** et **PS₂-Gly-D-Ctl** ($C = 2,5 \mu M$) a) dans le DMSO et b) dans PBS + 1 % DMSO.

Les spectres de **PS₂** et **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO sont quasiment identiques et la présence du peptide n'a pas d'effet sur l'absorption de la porphyrine dans ce solvant. Des résultats similaires avaient été observés pour le conjugué **PS₂-PGLa**.

Cependant, contrairement aux conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa**, **PS₂-Gly-D-Ctl** n'est pas soluble dans le PBS et doit être solubilisé dans du DMSO avant d'être dilué en milieu aqueux. L'élargissement des bandes d'absorption dans le PBS indique un probable phénomène d'agrégation de **PS₂-Gly-D-Ctl**. Néanmoins, contrairement à la porphyrine neutre **PS₂**, aucune agrégation du conjugué n'est visible à l'œil nu même après plusieurs jours en solution.

Les valeurs des maxima d'absorption ainsi que les coefficients d'extinction molaire associés de **PS₂-Gly-D-Ctl** sont reportés dans le **Tableau 7**. Les valeurs de **PS₂** sont également rappelées.

Tableau 7. Maxima des bandes d'absorption et coefficients d'extinction molaire de **PS₂** et **PS₂-Gly-D-Ctl**.

Composés	Solvants	λ_{\max} /nm (ϵ / M ⁻¹ .cm ⁻¹) Région de Soret	λ_{\max} /nm (ϵ / M ⁻¹ .cm ⁻¹) Bandes Q
PS₂	DMSO	456 (192 000)	613 (39 000), 698 (26 000)
	PBS + 1 % DMSO	477 (130 000)	634 (66 000), 715 (66 000)
PS₂-Gly-D-Ctl	DMSO	456 (198 000)	614 (40 000), 697 (26 000)
	PBS	458 (60 000)	629 (23 000), 711 (19 500)

9.4 Propriétés photophysiques de **PS₂-Gly-D-Ctl**

Les mesures de fluorescence et des rendements quantiques de production d'oxygène singulet ont été réalisées par le Dr. Barbara Ventura. Les spectres d'émission de **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO et H₂O + 1 % de DMSO sont reportés (**Figure 108**).

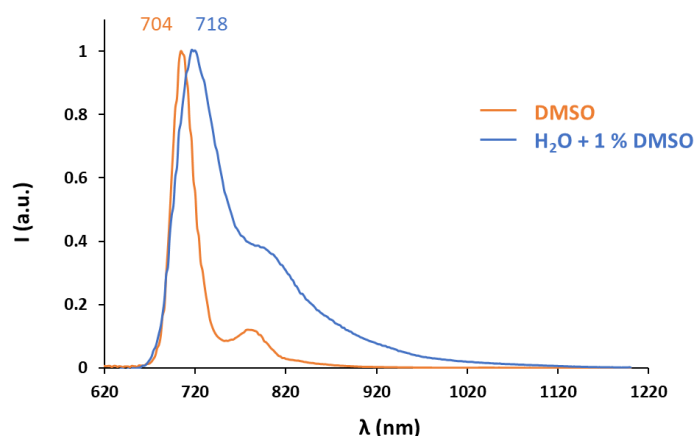


Figure 108. Spectres d'émission normalisés de **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO et H₂O + 1 % DMSO.

On observe un élargissement de la bande ainsi qu'un déplacement bathochrome du maximum d'émission dans l'eau par rapport au DMSO. Les valeurs des rendements quantiques de fluorescence, les durées de vie à l'état excité et les rendements quantiques de production d'oxygène singulet sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Propriétés de fluorescence, durées de vie et rendements quantiques de production d'oxygène singulet de **PS₂** et **PS₂-Gly-D-Ctl**.

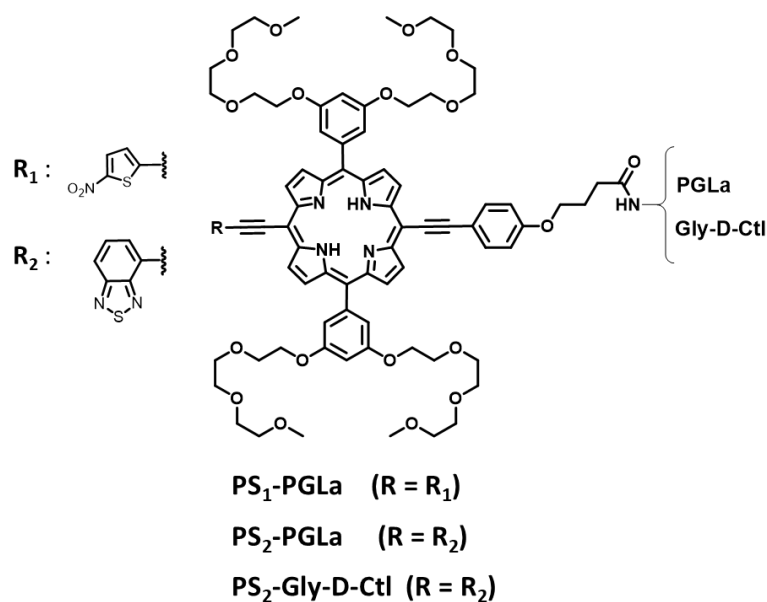
Composés	Solvants	λ_{em} (nm)	Φ_{fl}	τ (ns)	Φ_{Δ}
PS₂	DMSO	706, 780	0,27	5,7	0,56
PS₂-Gly-D-Ctl	DMSO	704, 780	0,24	5,4	0,59
	H ₂ O + 1 % DMSO	718, 794 sh	$8,8 \times 10^{-3}$	1,2 (20 %) ; 4,3 (80 %)	/

Dans le DMSO, les rendements quantiques de fluorescence et les durées de vie de l'état excité de **PS₂** et de **PS₂-Gly-D-Ctl** sont très proches, respectivement $\Phi_{fl} = 0,27$ et $\tau = 5,7$ ns et $\Phi_f = 0,24$ et $\tau = 5,4$ ns. Les rendements quantiques de production de ¹O₂ sont également similaires ($\Phi_{\Delta} = 0,56$ pour **PS₂** et $\Phi_{\Delta} = 0,59$ pour **PS₂-Gly-D-Ctl**). Le peptide ne semble pas avoir d'influence sur les propriétés photophysiques de **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO.

Le conjugué émet également de la fluorescence à une faible intensité dans l'eau en présence de 1 % de DMSO et cette propriété peut être utilisée pour réaliser des études par microscopie optique.

10 Conclusion

Trois nouveaux agents antibactériens **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** ont été obtenus grâce à une synthèse convergente impliquant quatre synthons. Ces conjugués sont constitués d'une porphyrine fonctionnalisée amphiphile et d'un peptide antimicrobien cationique. Le choix des constituants a permis d'obtenir des conjugués utilisables pour l'aPDT dont les principales caractéristiques sont indiquées **Figure 109**. En effet, ces trois composés peuvent être irradiés dans la fenêtre thérapeutique optique dans le PBS à pH physiologique et ont la capacité de générer de l'oxygène singulet.



Composés	λ_{\max} /nm ($\epsilon / M^{-1}.cm^{-1}$) (PBS)	Φ_{fl} (DMSO)	Φ_{Δ} (DMSO)
PS₁-PGLa	720 (25 000)	0,048	0,18
PS₂-PGLa	709 (18 000)	0,22	0,42
PS₂-Gly-D-Ctl	711 (19 500)	0,24	0,59

Figure 109. Principales caractéristiques photophysiques des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** pour une application aPDT.

Par ailleurs, des études théoriques par calculs TD-DFT ont permis de comprendre les différences observées sur les spectres d'absorption UV-visible de **PS₁** et **PS₂**. En effet, l'unité nitro-thiophène de **PS₁** contribue fortement à la transition électronique HOMO-LUMO et lui confère un caractère de transfert de charge. La délocalisation électronique vers le substituant BTD du **PS₂** est en revanche limitée et les transitions électroniques observées pour ce PS sont de nature $\pi \rightarrow \pi^*$ et principalement localisées sur la porphyrine.

Les études spectroscopiques par dichroïsme circulaire électronique menées sur le **PGLa** et **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** indiquent un effet de pré-organisation du peptide lorsqu'il est lié à une porphyrine alors qu'aucune structuration n'est observée lorsqu'il est seul en solution. La conformation hélicoïdale de la partie peptidique des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** peut potentiellement favoriser les interactions électrostatiques avec les membranes anioniques des bactéries. D'autre part, un signal caractéristique d'un couplage excitonique est observé dans la région de Soret pour **PS₁-PGLa**, indiquant une proximité spatiale des porphyrines et une probable agrégation du conjugué en milieu

aqueux en accord avec le spectre d'absorption UV-visible obtenu dans l'eau.

Des études par RMN du solide ont été réalisées sur ce conjugué. En présence de bicouches lipidiques, la partie peptidique de **PS₁-PGLa** ne semble pas adopter d'orientation préférentielle vis-à-vis de la membrane. Des études sur des bicelles sont en cours afin de déterminer l'orientation du peptide à proximité de bicouches anioniques structurées en solution.

L'ensemble de ces résultats obtenus pour les conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** permet d'envisager leur étude en tant qu'agent photobactéricide par irradiation dans le proche IR.

Chapitre III : Etudes biologiques des conjugués porphyrine-peptide

Ce chapitre est consacré à l'étude des activités antibactériennes et photobactéricides des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa**, et **PS₂-Gly-D-Ctl** sur deux espèces de bactéries, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), une bactérie à Gram positif et *Escherichia coli* (*E. coli*), une bactérie à Gram négatif. L'évaluation de la toxicité et de la phototoxicité de **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** sur des cellules eucaryotes a également été réalisée. Ces études biologiques ont été effectuées en collaboration avec le Dr. Elise Glattard de l'équipe du Pr. Burkhard Bechinger de l'Université de Strasbourg et le Dr. Tan-Sothea Ouk de l'équipe du Pr. Vincent Sol de l'Université de Limoges.

1 Optimisation du protocole d'irradiation

Le protocole d'irradiation a nécessité de nombreux ajustements pour déterminer les conditions expérimentales optimales qui ont été utilisées dans la suite de ce manuscrit. Les premiers montages n'induisaient pas une irradiation homogène sur l'ensemble des puits. Pour pallier cela, les DEL ont été fixées sur le dissipateur de chaleur par du ruban adhésif possédant une excellente conductivité thermique (**Figure 110**).

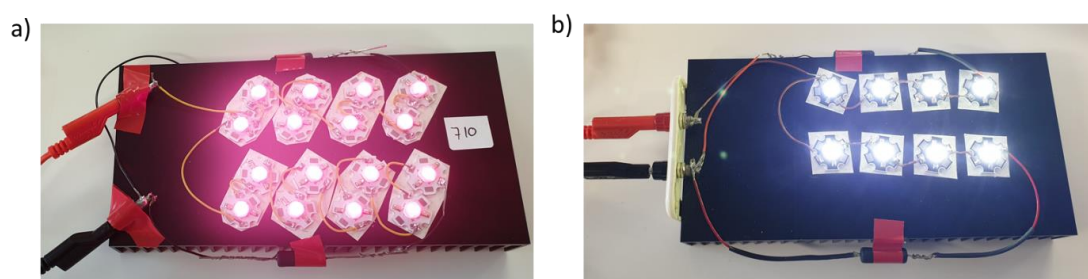


Figure 110. Montages d'irradiation composés de DEL émettant a) à 710 nm dans le proche IR b) une lumière blanche (400 et 700 nm).

Le dissipateur thermique permet d'éviter toute élévation de la température du milieu contenant les bactéries pendant les expériences d'irradiation. Les différents montages utilisés permettent une irradiation dans le proche IR (710 nm ou 720 nm) ou une irradiation par lumière blanche (400-700

nm). Les spectres d'émission des DEL sont donnés Annexe 7.

La position des DEL a également été modifiée après différents essais. Une irradiation par des DEL situées sous la plaque 96 puits a dans un premier temps été testée, puis une irradiation par des DEL placées au-dessus de la microplaque a été privilégiée en raison d'une plus grande similitude expérimentale avec les traitements lumineux utilisés en PDT (**Figure 111**).

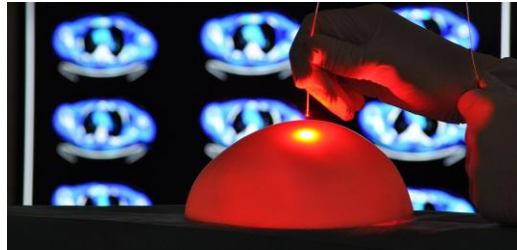


Figure 111. Dispositif lumineux développé au CHRU de Lille pour la thérapie photodynamique clinique.²²⁰

La surface réfléchissante de la paillasse a également été prise en compte et nous avons décidé de placer le système sur une surface noire afin de limiter le phénomène de réflexion des rayons lumineux (**Figure 112**).

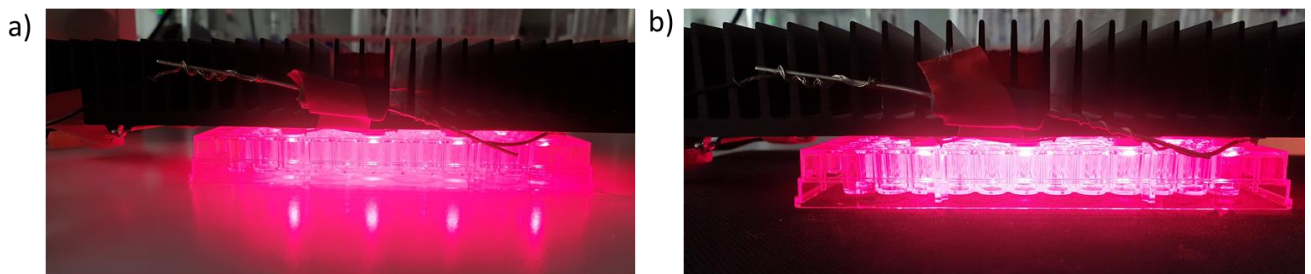


Figure 112. Conditions d'irradiation par des DEL situées au-dessus de la plaque 96 puits a) avec la microplaque directement sur la paillasse et b) avec introduction d'une surface noire non réfléchissante entre la microplaque et la paillasse (conditions retenues).

2 Protocole utilisé pour les tests antibactériens et les tests de toxicité sur les cellules eucaryotes

Les tests sont réalisés en microplaques de 96 puits ($V_{\text{puits}} = 200 \mu\text{L}$) dans une solution tampon de phosphate (PBS) au pH physiologique de 7,4. La densité bactérienne initiale est de 10^7 UFC/mL,

valeur classiquement utilisée pour réaliser des tests évaluant les propriétés bactéricides d'un composé.¹⁸² Les bactéries et les composés sont incubés dans le noir à 37 °C pendant 15 min, puis placés à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 15 min supplémentaires pour les tests réalisés en l'absence d'irradiation, ou irradiés pendant 15 min à température ambiante.

Le même protocole a été utilisé pour les tests sur les cellules eucaryotes (densité cellulaire : 10⁴ cellules par millilitre).

3 Etudes de l'activité et de la photoactivité de **PS₁-PGLa** et de ses composants **PS₁** et **PGLa**

La structure des molécules étudiées dans cette partie ainsi que leurs principales propriétés photophysiques sont rappelées **Figure 113**.

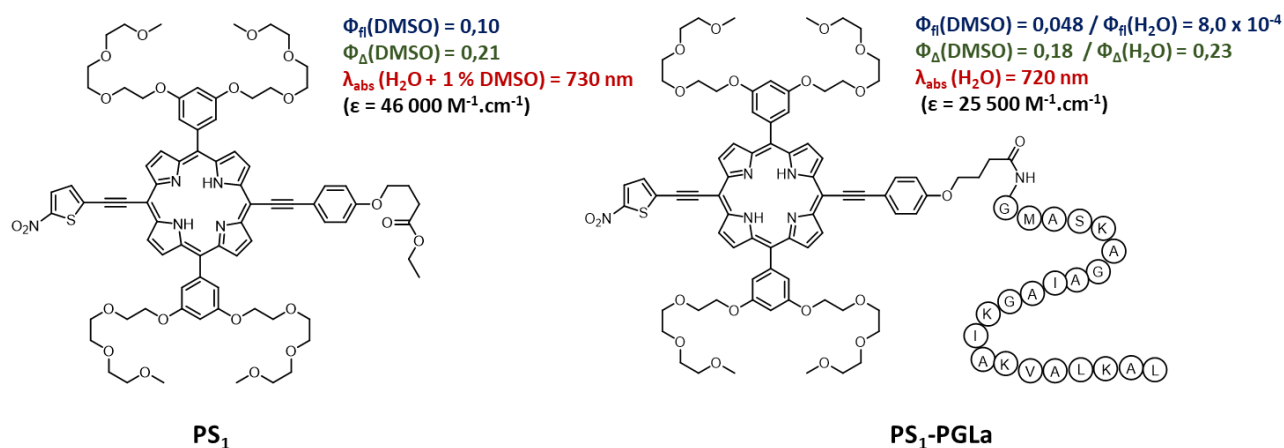


Figure 113. Structures et propriétés photophysiques du photosensibilisateur **PS₁** et du conjugué **PS₁-PGLa**.

3.1 Activité antibactérienne des composés sur *S. aureus*, une bactérie à Gram positif

Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif en forme de coque d'environ 1 µm de diamètre (**Figure 114**). Le staphylocoque doré est l'un des principaux responsables d'infections nosocomiales et d'intoxications alimentaires en France.²²¹ De nombreuses souches présentent de multiples résistances aux antibiotiques et sont difficiles à éradiquer, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline, appelés MRSA (« Methicillin-resistant Staphylococcus aureus »).

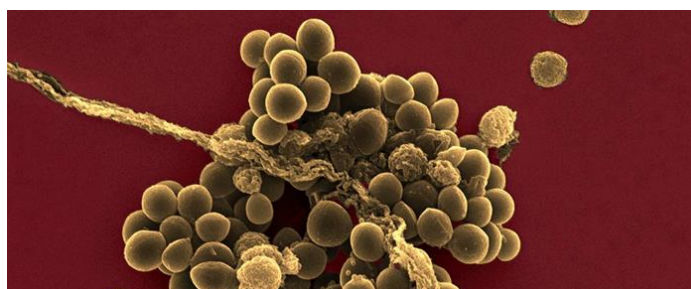


Figure 114. Amas de staphylocoques dorés observé en microscopie électronique.²²¹

Selon l'OMS, les staphylocoques dorés font partie des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux traitements en raison de leur résistance à la méticilline et à la vancomycine, deux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane.²²²

3.1.1 Activité antibactérienne en l'absence de lumière

L'évaluation de l'activité des composés en l'absence de lumière a été réalisée à diverses concentrations d'incubation de 0,5, 1, 2,5 et 5 µM en présence des bactéries. Le peptide **PGLa** et le conjugué **PS₁-PGLa** sont directement solubilisés dans du PBS alors que le photosensibilisateur **PS₁** est tout d'abord dissout dans du DMSO puis dilué dans du PBS. Le pourcentage final de DMSO dans les puits n'excède jamais 0,5 %. Des puits contenant des bactéries en présence de 0,5 % de DMSO dans le PBS sont également préparés afin de s'assurer de l'absence de toxicité du solvant à cette concentration.

Après 30 min d'incubation, le contenu de chaque puits est dilué dans du PBS puis étalé sur géloses qui sont ensuite incubées à 37 °C pendant 12 h. La survie bactérienne est déterminée par

dénombrement de colonies formées. Les résultats sont exprimés en échelle logarithmique et présentés **Figure 115**. Le calcul des barres d'erreur est explicité Annexe 9.

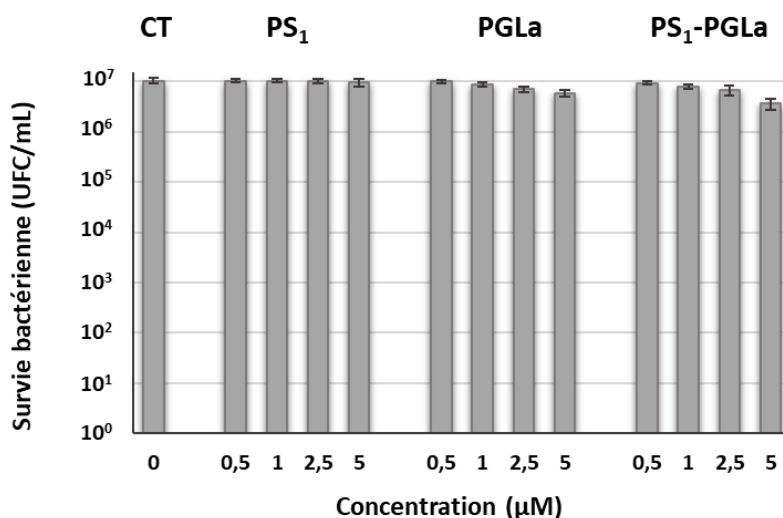


Figure 115. Survie des bactéries *S. aureus* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations en l'absence d'irradiation. Le contrôle (CT) des bactéries sans composés est représenté.

Activité antibactérienne des composants **PS₁** et **PGLa**

La porphyrine **PS₁** engendre une mort bactérienne négligeable car aucune activité n'est observée à la concentration de 1 µM et seulement 8 % des bactéries initiales sont tuées à 5 µM.

Le peptide **PGLa** est plus actif et son activité augmente en fonction de sa concentration dans le milieu. Il induit respectivement la mort de 5 %, 16 %, 33 % et 44 % des bactéries aux concentrations de 0,5, 1, 2,5 et 5 µM. Dans la littérature, l'activité des peptides antimicrobiens est principalement évaluée en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI correspond à la concentration minimale à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée et caractérise ainsi le potentiel bactériostatique d'un composé. Ulrich *et al.* ont déterminé la CMI du peptide **PGLa** sur des bactéries *S. aureus* (DSM 1104) à 16 µg/mL soit environ 8 µM. Lors de cette expérience, les bactéries sont placées dans un milieu de culture riche en nutriments. Les tests que nous avons réalisés déterminent le potentiel bactéricide des composés, c'est-à-dire leur capacité à tuer les bactéries et non pas à inhiber leur croissance. Il est couramment admis qu'un composé peut être considéré comme bactéricide si son action induit une réduction de plus de 3 log de la viabilité bactérienne, soit plus de 99,9 % de bactéries tuées. On définit alors la concentration minimale

bactéricide (CMB) comme étant la concentration minimale d'un agent antibactérien pour atteindre ce résultat.²²³

Un tableau exprimant les principales différences expérimentales des deux expériences est présenté ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9. Conditions expérimentales utilisées par Ulrich *et al.*¹⁸⁶ pour déterminer la CMI du peptide **PGLa** sur des bactéries *S. aureus* et conditions expérimentales utilisées au cours de ce travail pour déterminer la CMB des composés.

	Densité bactérienne	Milieu de test	Phase de croissance	Temps d'incubation
CMI (conditions utilisées par Ulrich <i>et al.</i>)	10 ⁶ UFC/mL	Milieu de culture Luria-Bertani	Exponentielle	20 h
CMB (conditions utilisées dans notre laboratoire)	10 ⁷ UFC/mL	PBS (pH = 7,4)	Stationnaire	30 min (15 min incubation + 15 min irradiation)

Il n'est donc pas pertinent de comparer la CMI décrite dans la littérature et l'activité du peptide mesurée lors de nos tests. Les différences d'activités observées peuvent notamment s'expliquer par :

- Le temps d'incubation entre les bactéries et les composés est très différent.
- Les bactéries utilisées lors des tests de CMB sont en phase stationnaire et ont un métabolisme différent de celles utilisées pour les tests de CMI qui sont en phase exponentielle. Les bactéries en phase stationnaire sont habituellement plus difficiles à éradiquer car la raréfaction des ressources dans le milieu entraîne un état de déprivation. Elles synthétisent alors des protéines qui rendent la cellule plus résistante aux dommages externes : des protéines chaperons peuvent par exemple empêcher la dégradation protéique et renaturer celles qui sont endommagées. Le pontage du peptidoglycane peut être augmenté afin de renforcer l'intégrité de la paroi bactérienne.²²⁴ Contrairement au milieu de culture riche en ressources, l'absence de nutriments dans le PBS peut renforcer l'état de déprivation des bactéries.

- La densité bactérienne est différente : dans le cadre de nos expériences, une densité de 10^7 UFC/mL est utilisée alors qu'elle est généralement plus faible pour les tests de CMI, de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC/mL. Pour une concentration de peptide comparable en solution, un nombre plus important de bactéries est présent lors des tests de CMB. Le ratio peptide/bactéries étant inférieur à 10^7 UCF/mL par rapport à 10^6 UFC/mL, il se peut que la quantité de peptide soit trop faible pour induire une lyse bactérienne.

Activité antibactérienne du conjugué **PS₁-PGLa**

L'activité du conjugué **PS₁-PGLa** en l'absence de lumière est semblable à celle du peptide **PGLa** car 9 %, 24 %, 35 % et 65 % de mort cellulaire est observée aux concentrations respectives de 0,5, 1, 2,5 et 5 μ M. Ces valeurs peuvent paraître relativement élevées mais la population bactérienne initiale est de l'ordre de 10^7 UFC/mL. Une réduction de 50 % de la viabilité implique une population résultante d'environ $5 \cdot 10^6$ UFC/mL. Ainsi, pour évaluer une activité antibactérienne, il peut être préférable de raisonner en échelle logarithmique lorsque le pourcentage de mort induite est élevé. Une diminution de 50 % de la population des bactéries correspond à une réduction de leur viabilité de 0,3 log tandis qu'une diminution de 90 % implique une réduction de leur viabilité de 1 log. L'activité des différents composés dans le noir, bien que non nulle, reste donc limitée sur *S. aureus* car inférieure à 0,5 log.

3.1.2 Photoinactivation bactérienne à la suite d'une irradiation dans le proche

IR

Afin d'évaluer la photoactivité à la suite d'une irradiation dans le proche IR, les puits contenant les bactéries et les différents composés ont été irradiés pendant 15 min à 720 nm ($36 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) après 15 min d'incubation dans le noir (**Figure 116**). Cette longueur d'onde d'irradiation correspond au maximum d'absorption de la bande Q la moins énergétique du conjugué **PS₁-PGLa** dans le PBS ($\epsilon = 25\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 720 nm).

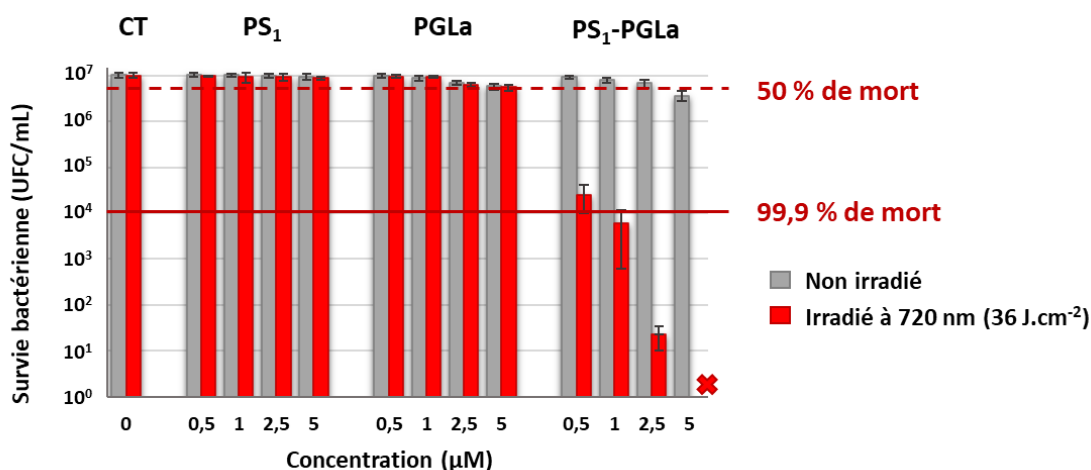


Figure 116. Survie des bactéries *S. aureus* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations, dans le noir ou à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm⁻²). La croix à la concentration de 5 µM indique une éradication totale des bactéries.

L'excitation lumineuse du peptide **PGLa** ne semble pas avoir d'effet sur son activité car une mortalité bactérienne comprise entre 4 % et 37 % est observée aux différentes concentrations. Ce résultat, comparable à celui obtenu en l'absence d'irradiation, est attendu car le peptide n'absorbe pas de lumière à cette longueur d'onde.

Le photosensibilisateur **PS₁** possède une activité similaire à celle observée dans l'obscurité car il diminue la viabilité bactérienne d'environ 13 % à une concentration de 5 µM. A cette même concentration, 8 % des bactéries étaient tuées en l'absence d'irradiation. L'excitation lumineuse du PS à 720 nm ne semble pas avoir d'effet sur son activité antibactérienne. La faible affinité de **PS₁** pour les membranes cationiques des bactéries est sans doute à l'origine de ce résultat. En effet, les PS excités non liés aux bactéries ne permettent pas à l'oxygène singulet généré d'agir sur ces dernières car son rayon d'action est limité à environ 150 nm.⁹⁸ De plus, l'agrégation observable à l'œil nu du PS dans le PBS plusieurs heures après solubilisation peut également contribuer au manque d'activité constaté.

Les résultats observés pour **PS₁-PGLa** sont bien différents car l'irradiation à 720 nm conduit à une forte activité photobactéricide du conjugué. On constate un accroissement de l'efficacité en fonction de l'augmentation de la concentration : à 0,5 µM, une réduction de 2,6 log de la survie bactérienne est observée et une réduction de 3,2 log est obtenue à 1 µM. Le composé **PS₁-PGLa** possède donc une CMB de 1 µM vis-à-vis de *S. aureus* après irradiation à 720 nm pour une dose

lumineuse de 36 J.cm^{-2} . L'augmentation de la concentration à $2,5 \mu\text{M}$ permet de tuer $5,7 \text{ log}$ des bactéries présentes et nous avons obtenu une photoéradication totale de *S. aureus* à $5 \mu\text{M}$, soit une réduction de 7 log de la survie bactérienne.

3.1.3 Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche

Bien que l'irradiation par une lumière rouge constitue un enjeu déterminant pour l'aPDT, il peut être intéressant de varier la source lumineuse. La lumière blanche, souvent utilisée dans la littérature pour les tests aPDT, couvre l'ensemble du spectre visible d'absorption entre 400 et 700 nm . Dans le cas du conjugué **PS₁-PGLa**, cela permet de mettre à contribution la région de Soret de la porphyrine située aux alentours de 450 nm ($\epsilon = 65\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ainsi que la bande Q à 630 nm ($\epsilon = 26\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) mais pas celle à 720 nm .

Les premiers tests ont été réalisés au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) à Limoges en collaboration avec le Dr. Tan-Sothea Ouk. Les bactéries en présence des différents composés ont été irradiées par des DEL d'irradiance $4,8 \text{ mW.cm}^{-2}$ émettant une lumière blanche. Après 15 min d'irradiation, la fluence appliquée de $4,3 \text{ J.cm}^{-2}$ est donc plus faible que celle à 720 nm (36 J.cm^{-2}). Les résultats obtenus par irradiation en lumière blanche et par irradiation dans le proche IR sont présentés **Figure 117**.

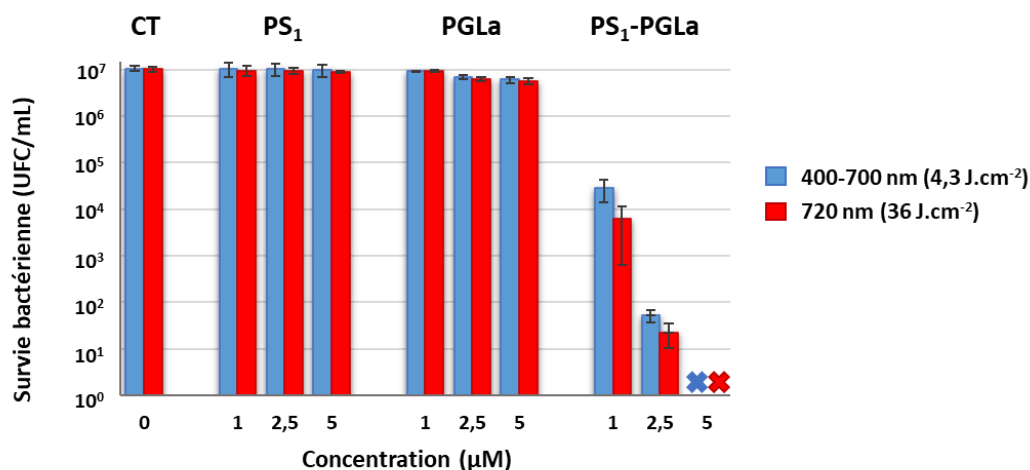


Figure 117. Survie des bactéries *S. aureus* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm^{-2}) ou par des DEL blanches ($4,3 \text{ J.cm}^{-2}$). Les croix à la concentration de $5 \mu\text{M}$ indiquent une éradication totale des bactéries.

Le peptide **PGLa** présente une activité similaire à celle observée pour les précédentes conditions car l'utilisation d'une source lumineuse différente n'affecte pas son mécanisme d'action antibactérien. Le photosensibilisateur **PS₁** possède une activité semblable à celle obtenue dans l'obscurité et par irradiation à 710 nm car seulement 10 % des bactéries sont tuées à une concentration de 5 µM. Des différences de photoactivité sont en revanche observées pour le conjugué **PS₁-PGLa** : après irradiation par des DEL blanches (4,3 J.cm⁻²), la population initiale de bactéries est réduite de 2,6 log à une concentration de 1 µM (contre 3,2 log à 720 nm) et 5,3 log à 2,5 µM (5,7 log à 720 nm). A 5 µM, les résultats sont similaires à une irradiation à 720 nm car une photoéradication totale de *S. aureus* est engendrée alors que la dose lumineuse appliquée est plus de huit fois plus faible. L'excitation de la bande de Soret de **PS₁-PGLa** et de la bande Q à 630 nm permet de partiellement compenser la diminution de la fluence. Une photoactivité moins importante est obtenue aux concentrations de 1 et 2,5 µM après irradiation en lumière blanche avec une faible dose lumineuse. Néanmoins, cette différence d'activité n'est que de 0,6 log à 1 µM et 0,4 log à 2,5 µM par comparaison avec l'irradiation dans le proche IR de plus forte fluence. De plus, à une concentration de 5 µM, des résultats identiques sont obtenus car une réduction de 7 log de la survie bactérienne est constatée.

3.1.4 Conclusion

Le photosensibilisateur **PS₁** exerce une activité minimale sur *S. aureus* quelle que soit la condition testée car moins de 15 % de mortalité est obtenue à la plus forte concentration de 5 µM. L'irradiation n'augmente pas l'efficacité de ce composé, laissant supposer qu'il a peu d'affinité pour les bactéries.

L'activité du peptide **PGLa** est limitée sur *S. aureus* et dépend de sa concentration dans le milieu. A une concentration de 5 µM, environ 40 % des bactéries sont tuées avec ou sans irradiation.

L'activité du conjugué **PS₁-PGLa** dans le noir est légèrement supérieure à celle du peptide **PGLa** car 65 % des bactéries sont tuées à une concentration de 5 µM. A l'échelle logarithmique, ces valeurs sont néanmoins très proches, correspondant respectivement à une réduction de 0,3 log de la viabilité bactérienne induite par le peptide **PGLa** et 0,5 log par le conjugué **PS₁-PGLa**. L'action du conjugué sur les bactéries semble donc principalement induite par le peptide **PGLa**, mais une contribution de la porphyrine à la déstabilisation membranaire peut être supposée.

Le conjugué **PS₁-PGLa** exerce une activité photobactéricide dépendante de sa concentration et de la source lumineuse utilisée. Il est capable de réduire de plus de 3 log la survie de *S. aureus* après irradiation à 720 nm (36 J.cm⁻²) à 1 µM, et d'éradiquer totalement la population bactérienne à 5 µM après irradiation par l'une ou l'autre des sources lumineuses.

3.2 Activité antibactérienne des composés sur *E. coli*, une bactérie à Gram négatif

Escherichia coli, également appelée colibacille, est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet d'une taille variant de 1 à 3 µm pour 0,5 µm de diamètre en moyenne (**Figure 118**).

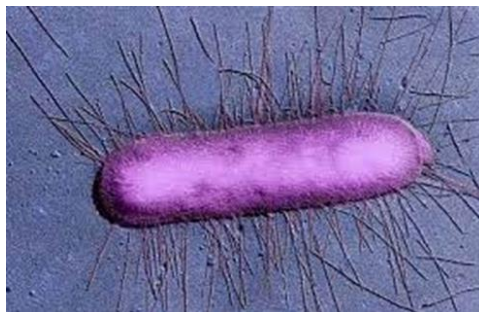


Figure 118. *E. coli* observé en microscopie électronique.²²⁵

Les souches de *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont pathogènes pour l'homme et responsables de diarrhées sanglantes et du syndrome hémolytique et urémique (SHU).²²⁶ Tout comme *S. aureus*, *E. coli* est l'un des responsables majeurs des infections nosocomiales et des intoxication alimentaires. Il fait partie des entérobactéries pour lesquelles le développement de nouveaux antibiotiques est classé comme critique par l'OMS. En effet, de nombreuses souches sont résistantes à diverses classes d'antibiotiques dont les carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération, actuellement utilisés pour traiter les BMR.²²²

3.2.1 Activité antibactérienne en l'absence de lumière

L'activité dans le noir des différents composés a été évaluée aux concentrations de 1, 2,5 et 5 µM en utilisant les mêmes conditions que pour *S. aureus*. Les résultats obtenus sont reportés **Figure 119**.

La porphyrine neutre **PS₁** n'est pas active en l'absence de lumière car moins de 3 % des bactéries sont tuées à une concentration de 5 μM .

Le peptide **PGLa** exerce une faible activité sur *E. coli*. A la concentration la plus élevée de 5 μM , 13 % des bactéries sont tuées, et ce taux diminue à 8 % à 2,5 μM et 1 % à 1 μM .

Le conjugué **PS₁-PGLa** est légèrement plus actif : il induit la mort de 8 %, 20 % et 22 % des bactéries aux concentrations de 1, 2,5 et 5 μM respectivement, soit une réduction d'environ 0,1 log à la concentration la plus élevée.

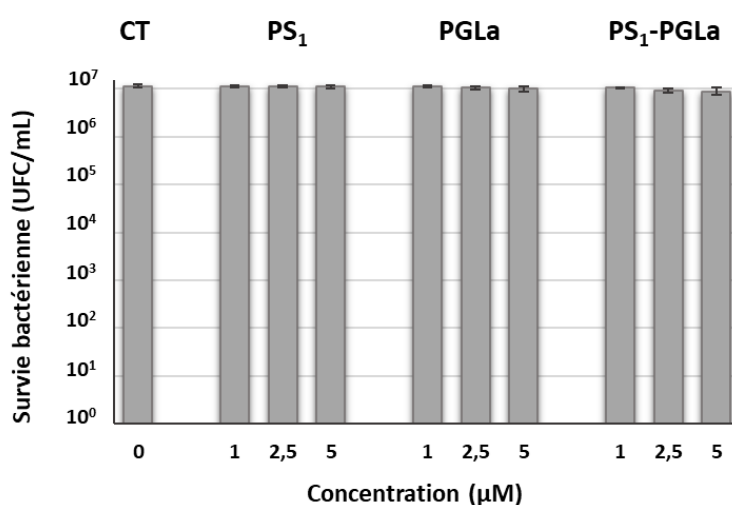


Figure 119. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations en l'absence d'irradiation. Le contrôle (CT) des bactéries sans composés est représenté.

3.2.2 Photoinactivation bactérienne à la suite d'une irradiation dans le proche IR

Après 15 min d'incubation dans le noir, les puits contenant les bactéries et les composés ont été irradiés à 720 nm pendant 15 min ($\Phi = 36 \text{ J.cm}^{-2}$). Les résultats sont présentés **Figure 120**.

L'irradiation ne semble pas avoir d'effet sur les puits contenant **PS₁** car moins de 3 % des bactéries sont tuées à une concentration de 5 μM . Cette photoactivité négligeable sur *E. coli* est en accord avec les résultats décrits dans la littérature pour les porphyrines neutres vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.²²⁷

Le peptide **PGLa** exerce une activité très faible, similaire à celle observée dans l'obscurité, avec une

mort bactérienne de 15 % à la plus haute concentration de 5 μM . Aucune activité n'est observée à 1 μM .

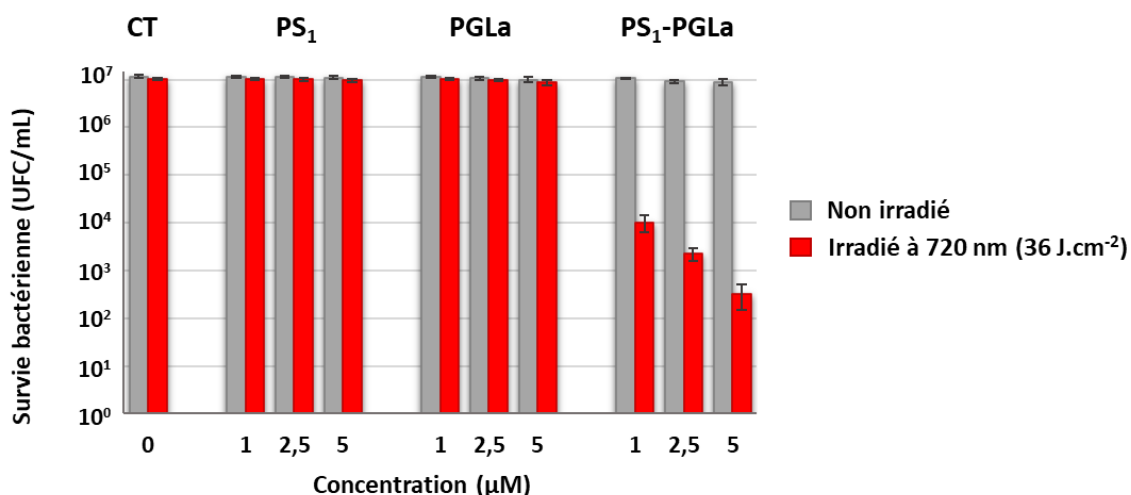


Figure 120. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations, dans le noir ou à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm⁻²).

L'activité photobactéricide du conjugué **PS₁-PGLa** est quant à elle élevée sur *E. coli*. A une concentration de 1 μM , la CMB est atteinte, soit une réduction de la viabilité bactérienne de 3,0 log. A 2,5 et 5 μM , l'effet photobactéricide est accru car des réductions de 3,7 log et 4,5 log de la survie bactérienne sont respectivement obtenues pour ces deux concentrations.

Comme pour *S. aureus*, la CMB est atteinte dès 1 μM . En revanche, les résultats diffèrent avec l'augmentation de la concentration car la hausse de l'activité antibactérienne est moins marquée sur *E. coli*. En effet, à une concentration de 5 μM après irradiation à 720 nm, le conjugué **PS₁-PGLa** réduit de plus de 7 log la viabilité de *S. aureus* contre seulement 4,5 log pour *E. coli* (**Figure 121**).

La plus faible activité du conjugué sur *E. coli* par rapport à *S. aureus* provient probablement de la différence de structure membranaire de ces deux bactéries. La paroi d'une bactérie à Gram positif est perméable et il est plus facile pour les composés de la traverser et d'interagir avec la membrane cytoplasmique. En revanche, *E. coli* est une bactérie à Gram négatif et possède donc une membrane externe peu perméable. Cette dernière peut agir comme une protection contre les agents externes et ainsi limiter la pénétration des composés et leurs interactions avec la membrane plasmique comme démontré dans la littérature.¹²¹

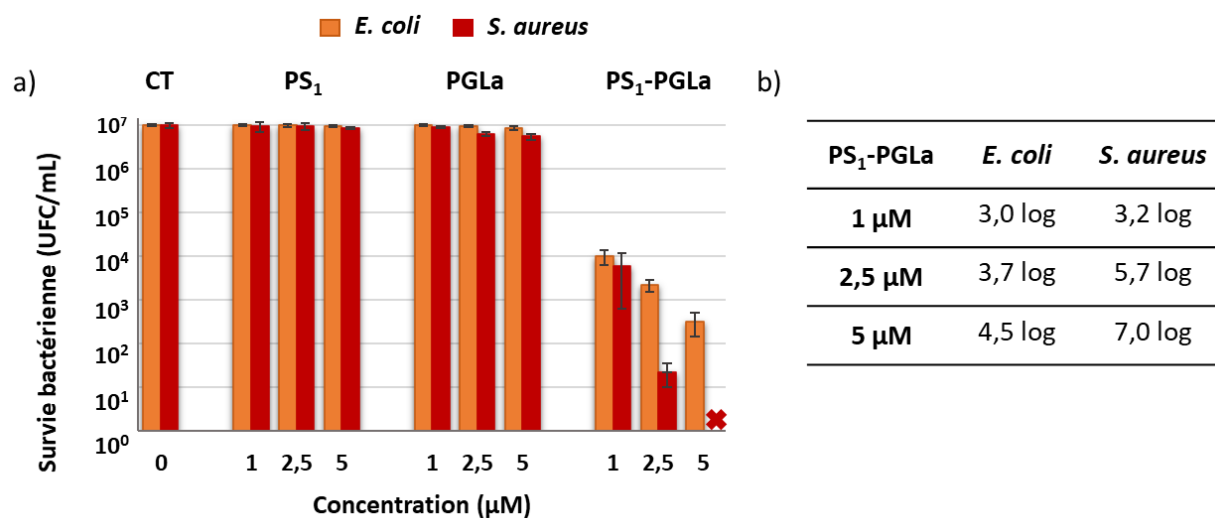


Figure 121. a) Survie des bactéries *E. coli* et *S. aureus* en présence de PS_1 , PGLa et $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ à différentes concentrations à la suite d’une irradiation à 720 nm (36 J.cm^{-2}). La croix à une concentration de 5 μM indique une éradication totale des bactéries. b) Photoinactivation de *E. coli* et *S. aureus* induite par le conjugué $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ en fonction de la concentration.

Effet du temps d’irradiation et de la fluence

Afin d’évaluer l’effet du temps d’irradiation et celui de la fluence sur la photoactivité des différents composés, des expériences ont été menées sur les bactéries *E. coli*. Les puits ont été irradiés 15 min supplémentaires dans le but de doubler la dose lumineuse appliquée (72 J.cm^{-2}). Les résultats obtenus pour les composés de référence PS_1 et PGLa ne sont pas présentés car aucune évolution de la photoactivité n’est observée lorsque le temps d’irradiation est doublé.

L’augmentation de l’activité photobactéricide du conjugué $\text{PS}_1\text{-PGLa}$ en fonction du temps d’irradiation et de la fluence est présentée **Figure 122**. La réduction de la viabilité de *E. coli* augmente de 3,7 log à 4,4 log à 2,5 μM et de 4,5 log à 5,2 log à 5 μM . On observe un gain de la photoinactivation bactérienne d’environ 0,7 log pour ces deux concentrations lorsque la fluence augmente de 36 J.cm^{-2} à 72 J.cm^{-2} pour un temps d’irradiation total de 30 min. Le gain est légèrement plus modeste à 1 μM car la réduction de la viabilité bactérienne passe de 3,0 log à 3,5 log, soit une hausse de la photoactivité d’environ 0,5 log.

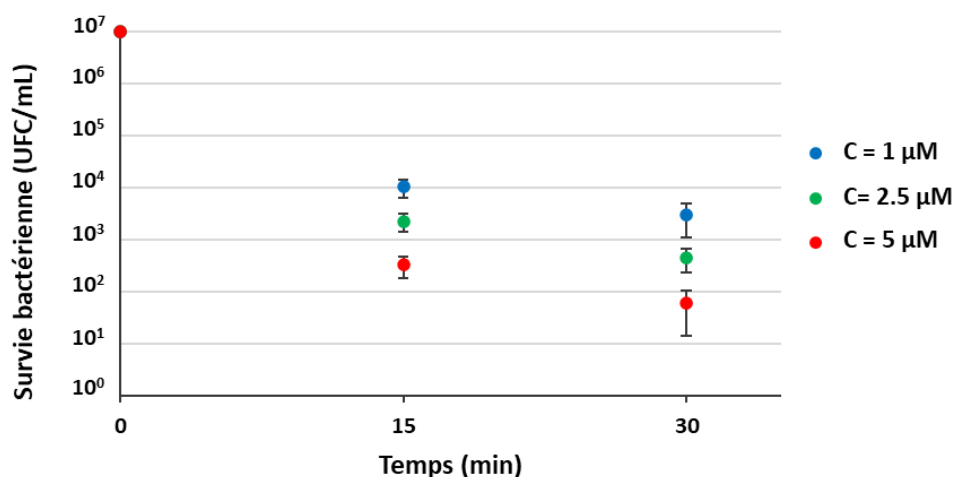
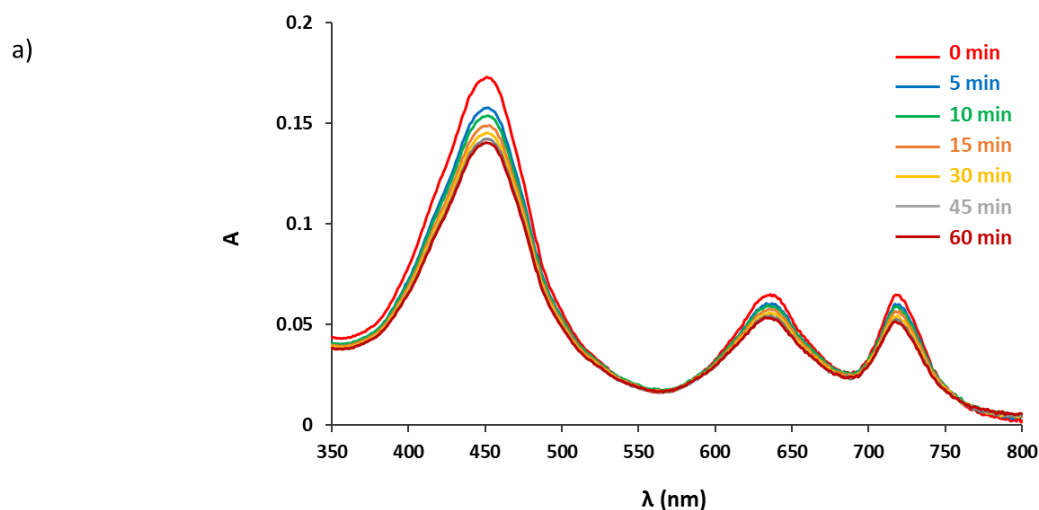


Figure 122. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₁-PGLa** en fonction du temps d’irradiation et de la fluence appliquée à 720 nm à 15 min (36 J.cm⁻²) et 30 min (72 J.cm⁻²).

L’augmentation de la dose lumineuse et du temps d’irradiation ne semblent donc pas être proportionnels à l’activité photobactéricide du conjugué **PS₁-PGLa** car le prolongement de l’illumination pendant 15 min supplémentaires avec la même irradiance n’entraîne qu’un faible gain d’activité de 0,5 à 0,7 log. Dans ces conditions, une irradiation prolongée n’est pas judicieuse pour diminuer la viabilité des bactéries *E. coli* avec **PS₁-PGLa**.

La photodégradation du conjugué pourrait être à l’origine de ce résultat. La photostabilité de **PS₁-PGLa** au cours de l’irradiation a donc été évaluée en réalisant des tests de photoblanchiment (**Figure 123**). Entre 15 et 30 min d’irradiation, la valeur du coefficient d’extinction molaire diminue de 4 % pour la bande à 720 nm. Le photoblanchiment du conjugué en fonction du temps d’irradiation est donc faible dans la gamme de temps considérée pour une irradiance de 40 mW.cm⁻². La photodégradation de la molécule ne semble donc pas être le facteur limitant l’activité photobactéricide sous irradiation prolongée.



b)

t_{irr}	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min
Fluence	12 J.cm ⁻²	24 J.cm ⁻²	36 J.cm ⁻²	72 J.cm ⁻²	108 J.cm ⁻²	144 J.cm ⁻²
455 nm	9 %	11 %	14 %	16 %	18 %	19 %
636 nm	7 %	9 %	11 %	14 %	16 %	18 %
720 nm	7 %	8 %	12 %	16 %	18 %	20 %

Figure 123. a) Spectres UV-visible du conjugué **PS₁-PGLa** à 2,5 μM en fonction du temps d'irradiation à 720 nm (40 mW.cm⁻²) et b) Taux de diminution du coefficient d'extinction molaire des bandes d'absorption du conjugué **PS₁-PGLa** après différents temps d'irradiation à 720 nm (40 mW.cm⁻²).

D'autre part, l'activité du conjugué dans le noir évolue peu quelle que soit la concentration étudiée : à 1 μM, 0,04 log des bactéries initiales sont tuées après 15 min et 0,07 log le sont après 30 min. A une concentration de 5 μM, la viabilité bactérienne est réduite de 0,1 log après 15 min et 30 min en l'absence de lumière.

3.2.3 Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche

Des études en lumière blanche ont également été réalisées dans des conditions identiques à celles utilisées sur les bactéries *S. aureus* ($t_{\text{irr}}=15$ min, 4,3 J.cm⁻²). Les résultats sont présentés **Figure 124**. L'activité du photosensibilisateur neutre **PS₁** est négligeable et l'activité du peptide **PGLa** est semblable avec ou sans irradiation, induisant une mortalité bactérienne d'environ 10 % à une concentration de 2,5 μM et 20 % à 5 μM.

Le conjugué **PS₁-PGLa** exerce une faible activité photobactéricide dans ces conditions. Aux

concentrations de 1 et 2,5 μM , 66 % et 77 % des bactéries sont tuées représentant respectivement une réduction de 0,5 et 0,6 log de la survie bactérienne. A 5 μM , le conjugué induit 92 % de mort bactérienne soit une réduction de 1,1 log. Ces résultats confirment que les bactéries *E. coli* sont moins sensibles à l'action de l'aPDT que les bactéries *S. aureus*, particulièrement lorsque la dose lumineuse est faible.

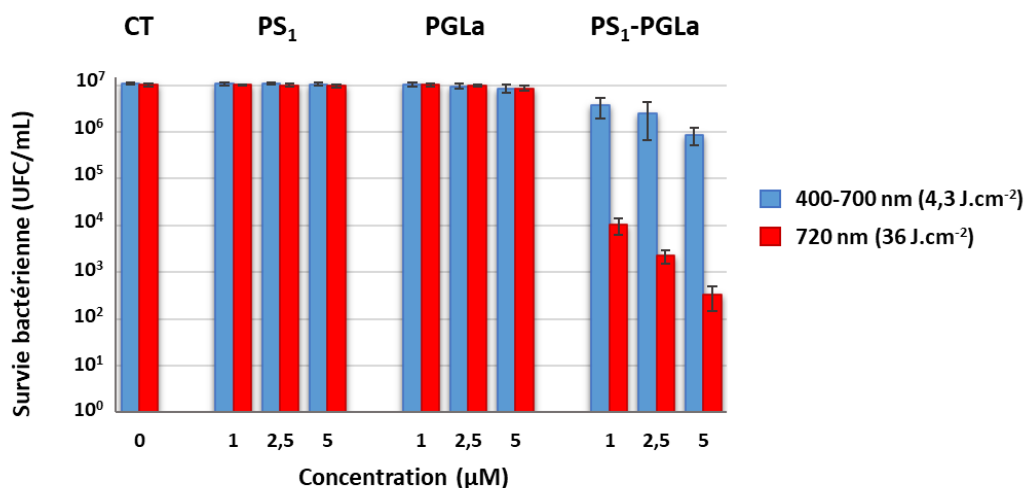


Figure 124. Survie de *E. coli* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm^{-2}) ou par des DEL blanches ($4,3 \text{ J.cm}^{-2}$).

Dans le but de comparer la photoactivité des composés soumis à la même dose de lumière rouge ou blanche, des tests antibactériens avec irradiation par des DEL blanches d'irradiance 40 mW.cm^{-2} ont été réalisés à Strasbourg. Après 15 min d'irradiation, la fluence appliquée est de 36 J.cm^{-2} , une valeur identique à celle délivrée par irradiation à 720 nm. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 125**.

Le photosensibilisateur **PS₁** et le peptide **PGLa** sont très peu actifs et des résultats similaires à ceux observés pour les conditions décrites précédemment sont obtenus.

On constate en revanche une augmentation significative de la photoactivité du conjugué **PS₁-PGLa** lorsqu'il est irradié par des DEL blanches à 36 J.cm^{-2} . A 1 μM , la survie bactérienne de *E. coli* est réduite de 3,9 log contre seulement 0,47 log pour une fluence de $4,3 \text{ J.cm}^{-2}$. La photoactivité du conjugué à 2,5 et 5 μM se traduit par une réduction de 4,6 log et 7 log de la viabilité bactérienne alors que cette réduction n'est que de 0,64 log et 1,1 log lorsque la fluence est de $4,3 \text{ J.cm}^{-2}$.

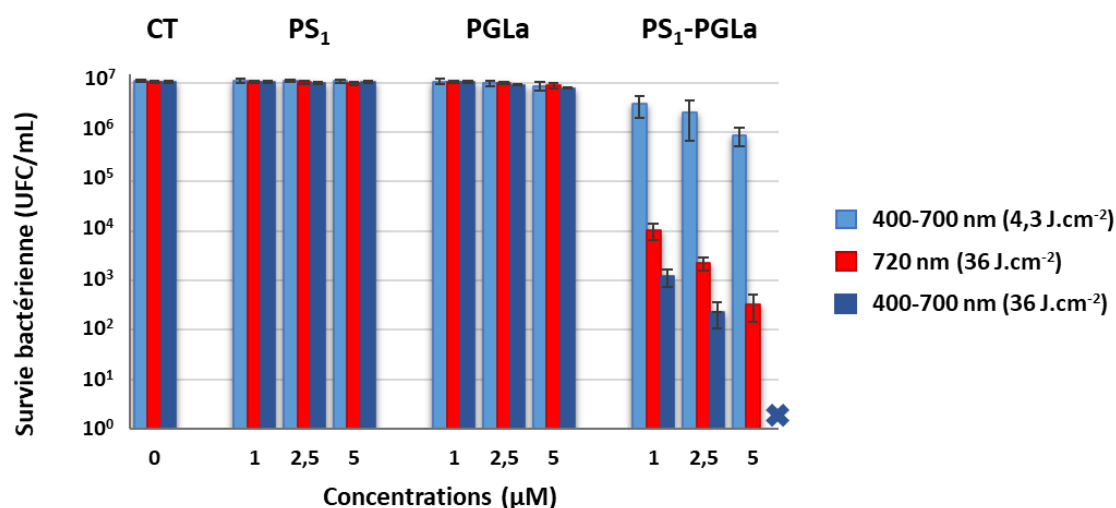


Figure 125. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm⁻²) ou par des DEL blanches (4,3 J.cm⁻² ou 36 J.cm⁻²). La croix à une concentration de 5 μM indique une éradication totale des bactéries.

Par ailleurs, on constate que pour une dose lumineuse identique, l'irradiation par une lumière blanche permet d'obtenir de meilleurs résultats que l'irradiation à 720 nm : un gain d'activité de 0,9 log est obtenu aux concentrations de 1 et 2,5 μM, et un gain important de 2,5 log est observé à 5 μM car une photoéradication totale des bactéries est engendrée. Cette différence d'activité peut s'expliquer par la contribution de la bande d'absorption située dans la région de Soret à l'excitation du PS dont le coefficient d'extinction molaire est en effet près de 2,5 fois supérieur à celui de la bande située à 720 nm.

3.2.4 Conclusion

La porphyrine neutre **PS₁** n'exerce aucune activité sur les bactéries *E. coli* aux concentrations étudiées quelle que soit la condition testée.

Le peptide **PGLa** possède une activité très modérée indépendante de la lumière, induisant 15 à 20 % de mort bactérienne à une concentration de 5 μM.

En l'absence d'irradiation, le conjugué **PS₁-PGLa** engendre une mortalité des bactéries inférieure à 25 %, soit environ 0,1 log. Après irradiation à une fluence de 36 J.cm⁻² par l'une ou l'autre source lumineuse, ce conjugué a un effet photobactéricide important car la CMB est atteinte à 1 μM avec

une réduction de plus de 3 log de la viabilité bactérienne. Une photoéradication totale de *E. coli* est obtenue à 5 µM lorsqu'il est irradié en lumière blanche (36 J.cm⁻²).

3.3 Etudes de la toxicité et de la phototoxicité des composés sur des cellules eucaryotes, les kératinocytes (NHEK)

3.3.1 Caractéristiques des kératinocytes

Les kératinocytes représentent environ 80 à 90 % de l'épiderme, la couche la plus superficielle de la peau et jouent un rôle important dans la structuration de cette dernière. Ils garantissent son caractère imperméable grâce à la production de kératine qui est une protéine insoluble dans l'eau et forment une barrière contre les agents infectieux externes. Ils participent également à la stimulation du système immunitaire et à la cicatrisation car ils sécrètent des cytokines telles que les interleukines ainsi que des facteurs de croissance.²²⁸ De plus, ils protègent les noyaux contenant l'ADN contre les effets mutagènes des rayons ultraviolets en accumulant de la mélanine.²²⁹

Les kératinocytes NHEK (« Normal Human Epidermal Keratinocytes ») sont des cellules primaires dont le nombre de divisions cellulaires est limité car elles sont sujettes au phénomène de sénescence. Elles sont ainsi représentatives de l'état physiologique des cellules *in vivo* contrairement aux cellules immortalisées qui ont elles la capacité de proliférer indéfiniment. Ces dernières sont également utilisées pour des tests *in vitro* décrits dans la littérature mais elles peuvent être moins sensibles que les cellules primaires aux agents externes.

Il est intéressant d'évaluer la viabilité des kératinocytes en présence des conjugués porphyrine-peptide car les traitements envisagés avec les molécules développées concernent les plaies localisées en surface. Il est donc important que les composés antibactériens soient le moins toxiques possible sur ces cellules eucaryotes endogènes. J'ai réalisé les tests de toxicité et de phototoxicité des composés sur les kératinocytes NHEK au laboratoire LCSN à Limoges en collaboration avec le Dr. Tan-Sothea Ouk.

3.3.2 Détermination de la viabilité cellulaire

La survie des cellules eucaryotes telles que les kératinocytes est mesurée à l'aide d'un test classique utilisant un sel de tetrazolium, le XTT. Seules les cellules vivantes produisent une enzyme, le NADH, capable de réduire ce sel incolore en formazan de couleur orange (**Figure 126**). La viabilité cellulaire est estimée en effectuant le rapport entre l'absorbance mesurée dans les puits traités et l'absorbance mesurée dans les puits de référence contenant seulement les cellules dans le milieu.

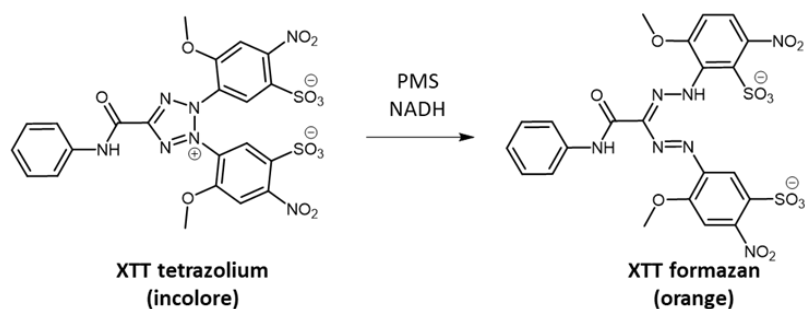


Figure 126. Réduction du sel de tetrazolium en formazan par action du méthosulfate de phénazine (PMS) et du NADH.

3.3.3 Cytotoxicité en l'absence de lumière

La cytotoxicité du conjugué **PS₁-PGLa** et de ses composant **PS₁** et **PGLa** vis-à-vis des cellules NHEK a été évaluée. Les résultats obtenus sont reportés **Figure 127**.

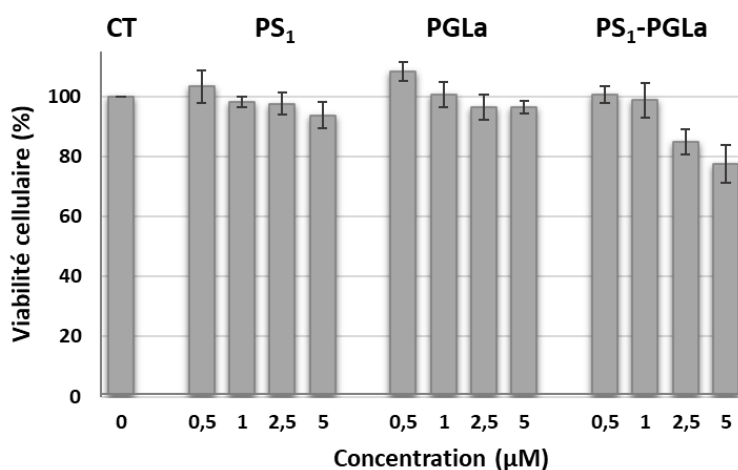


Figure 127. Cytotoxicité induite par les composés **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations sur les kératinocytes (NHEK) en l'absence d'irradiation.

On constate que la mort cellulaire induite par **PS₁** et le peptide **PGLa** est négligeable aux concentrations étudiées car moins de 5 % des kératinocytes sont tués à 5 μM .

Le conjugué **PS₁-PGLa** induit une cytotoxicité dépendante de sa concentration. A 0,5 et 1 μM , la cytotoxicité sur les cellules est négligeable car inférieure à 2 %. Elle augmente mais reste limitée aux concentrations de 2,5 μM et 5 μM , atteignant respectivement 15 % et 23 %.

3.3.4 Phototoxicité à la suite d'une irradiation à 720 nm

Afin d'évaluer la phototoxicité des différentes molécules, des tests d'irradiation à 720 nm de fluence 36 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ont été réalisés et les résultats obtenus sont exprimés **Figure 128**.

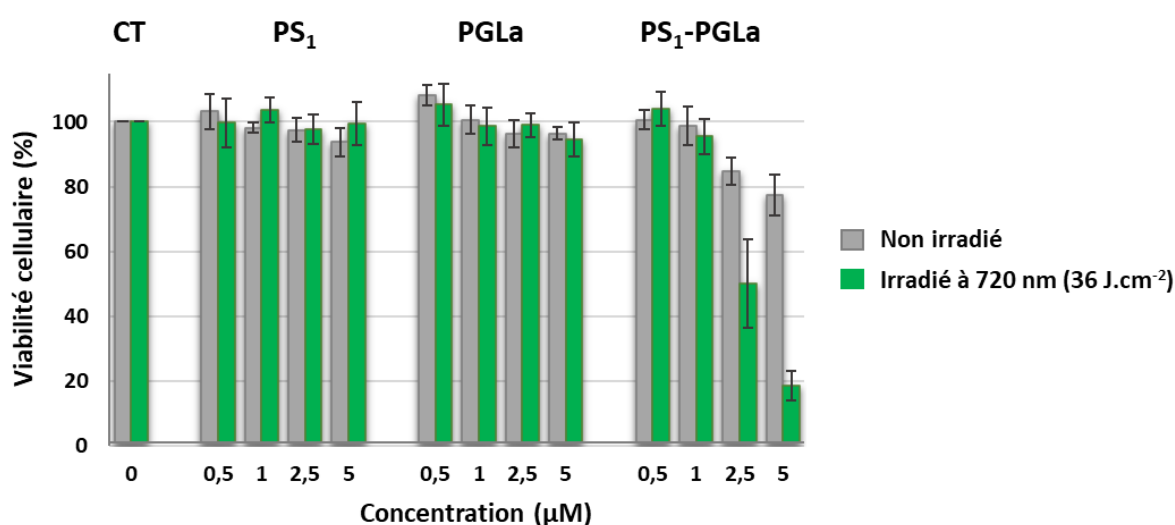


Figure 128. Cytotoxicité et phototoxicité ($\lambda_{\text{irr}} = 720 \text{ nm}$, 36 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) induites par les composés **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** à différentes concentrations sur les kératinocytes (NHEK).

Les composés **PS₁** et **PGLa** n'induisent pas de mort cellulaire supplémentaire à la suite d'une irradiation dans le proche IR par rapport à celle obtenue en l'absence de lumière.

La toxicité du conjugué **PS₁-PGLa** après irradiation est fortement dépendante de la concentration. Aucune phototoxicité n'est observée à 0,5 μM et elle est négligeable à 1 μM car seulement 4,5 % des cellules sont tuées. La mortalité augmente à 2,5 μM pour atteindre 50 % et atteint 81 % à 5 μM . A partir d'une certaine concentration, il semble donc qu'un faible temps d'irradiation en présence du conjugué **PS₁-PGLa** soit suffisant pour induire une forte phototoxicité sur ces cellules. Néanmoins, il est important de souligner que ces tests sont réalisés en l'absence de bactéries. Lors d'un

traitement, le ciblage sélectif du peptide vis-à-vis des pathogènes devrait diminuer la phototoxicité sur les kératinocytes.

Une illustration du résultat expérimental obtenu à la suite d'une irradiation à 720 nm est présentée **Figure 129**. Après irradiation puis incubation pendant 24 h à 37 °C, le test XTT est réalisé dans les puits contenant les kératinocytes seuls et les puits contenant les kératinocytes ayant été en contact avec les conjugués à différentes concentrations.

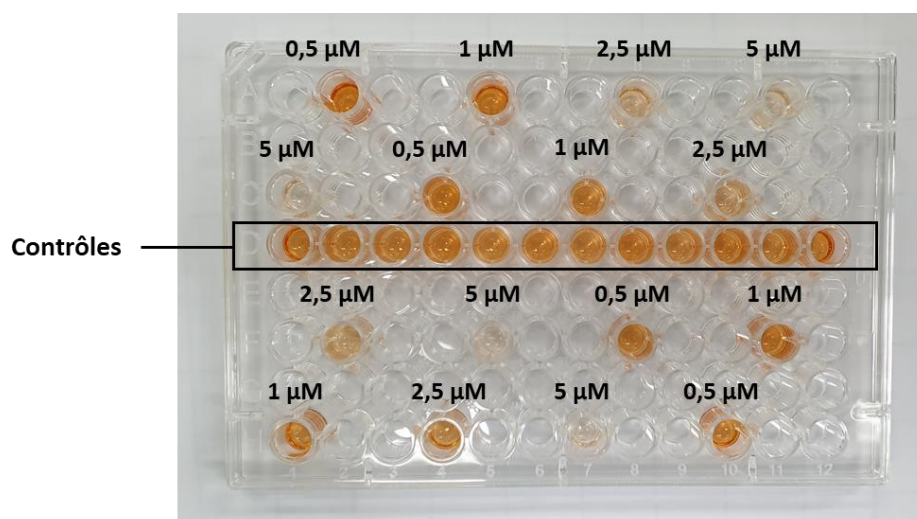


Figure 129. Photographie de la plaque contenant les cellules NHEK 36 h après l'irradiation des puits en présence du conjugué **PS₁-PGLa** à différentes concentrations. Le XTT a été ajouté après 24 h d'incubation à 37 °C à compter de l'arrêt de l'irradiation.

On observe que les puits ayant contenu les concentrations les plus fortes en conjugué sont très faiblement colorés par rapport aux puits dont les concentrations en conjugué étaient faibles.

3.3.5 Phototoxicité en lumière blanche

Les tests de survie des kératinocytes en présence des composés après irradiation en lumière blanche (4,3 J.cm⁻²) ont également été réalisés (**Figure 130**).

Le photosensibilisateur **PS₁** et le peptide **PGLa** ne présentent pas de phototoxicité lorsqu'ils sont irradiés par une lumière blanche : les résultats sont très proches de ceux obtenus après irradiation à 720 nm.

Le conjugué **PS₁-PGLa** n'induit pas de mortalité à 0,5 µM et seulement 3 % des cellules sont tuées à 1 µM. La mortalité des kératinocytes atteint 23 % à 2,5 µM et 39 % à 5 µM. Ces valeurs sont plus

faibles que celles obtenues pour l'irradiation à 720 nm : la fluence appliquée et par conséquent la quantité de ROS produits semble être directement corrélée à la phototoxicité induite sur les kératinocytes.

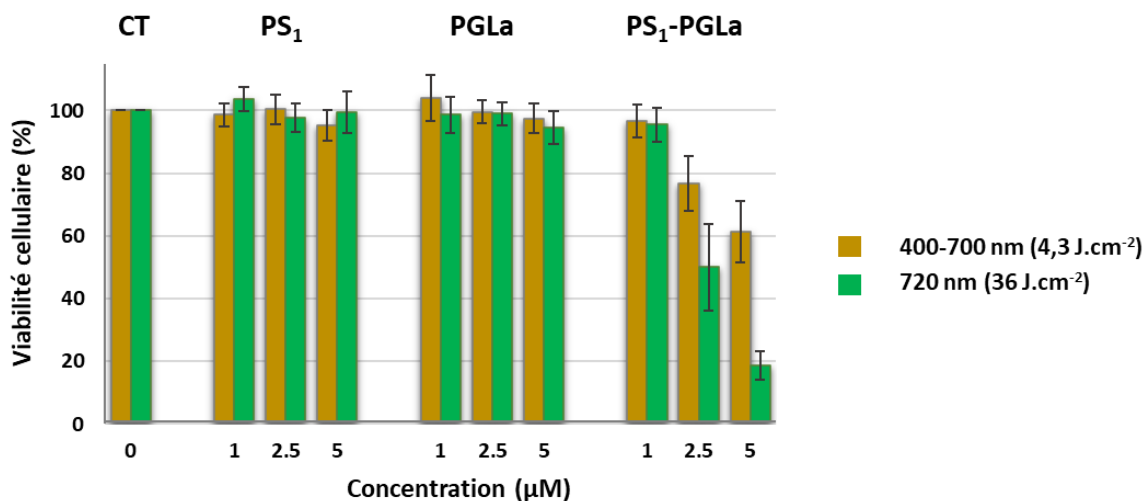


Figure 130. Phototoxicité induite par les composés **PS₁**, **PGLa** et **PS₁-PGLa** sur les kératinocytes (NHEK) à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 720 nm (36 J.cm⁻²) ou en lumière blanche (4,3 J.cm⁻²).

3.3.6 Conclusion

La viabilité des kératinocytes dépend grandement des composés testés ainsi que des conditions d'irradiation imposées.

Aucune cytotoxicité ni phototoxicité n'est observée pour **PS₁** et **PGLa** aux concentrations d'étude. Le conjugué **PS₁-PGLa** induit une cytotoxicité, et surtout une phototoxicité dépendante de la concentration. A 0,5 et 1 µM, une activité négligeable est observée sur les kératinocytes avec ou sans irradiation. Or à 1 µM, un effet bactéricide important est obtenu car la CMB est atteinte à cette concentration. A partir de 2,5 µM, la toxicité dans le noir augmente légèrement et la phototoxicité après irradiation à 720 nm atteint 50 % à 2,5 µM et 81 % à 5 µM. A ces concentrations, l'effet photobactéricide est cependant nettement supérieur. En effet, à 5 µM, une éradication totale de *S. aureus* est obtenue et plus de 99,996 % des bactéries *E. coli* sont tuées à 2,5 µM. Il s'agira donc de vérifier si le ciblage induit par le peptide permet de diminuer la phototoxicité du conjugué **PS₁-PGLa** vis-à-vis des cellules NHEK en présence des bactéries.

4 Etudes de l'activité et de la photoactivité de **PS₂-PGLa** et de ses composants **PS₂** et **PGLa**

Les structures de **PS₂** et **PS₂-PGLa** et leurs propriétés photophysiques sont rappelées **Figure 131**.

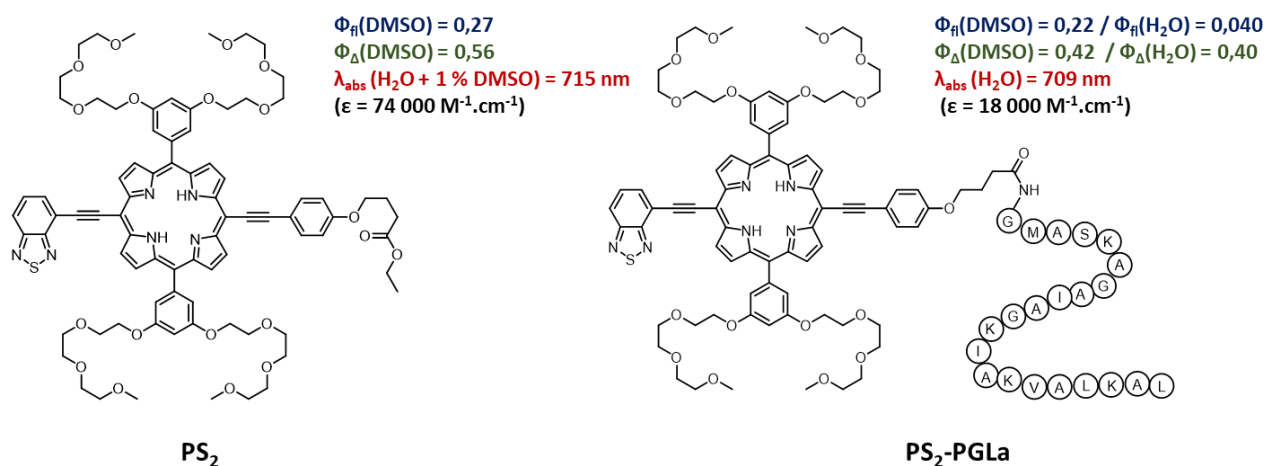


Figure 131. Structures et propriétés photophysiques du photosensibilisateur **PS₂** et du conjugué **PS₂-PGLa**.

4.1 Activité antibactérienne des composés sur les bactéries *S. aureus*

4.1.1 Activité en l'absence de lumière et photoactivité à 710 nm

Les tests antibactériens ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le conjugué **PS₁-PGLa** et ses composants, exceptée la longueur d'irradiation à 710 nm correspondant au maximum d'absorption de la bande Q la moins énergétique de **PS₂-PGLa**.

Pour préparer la solution mère, le photosensibilisateur **PS₂** est d'abord dissout dans du DMSO puis dilué dans du PBS. Le ratio PBS/DMSO dans les puits est de 99,5 : 0,5 pour toutes les concentrations.

Le peptide **PGLa** et le conjugué **PS₂-PGLa** présentent quant à eux une bonne solubilité dans le PBS.

Les résultats obtenus avec la porphyrine **PS₂** sont identiques à ceux obtenus avec la porphyrine **PS₁** et une activité antibactérienne négligeable est observée avec ou sans irradiation (**Figure 132**).

Le peptide **PGLa** n'absorbant pas de lumière dans le proche IR, il exerce la même activité qu'il soit

irradié à 710, à 720 nm ou placé à l’abri de la lumière, soit une réduction de la viabilité bactérienne de 0,05 log à 1 μM et 0,2 log à 5 μM .

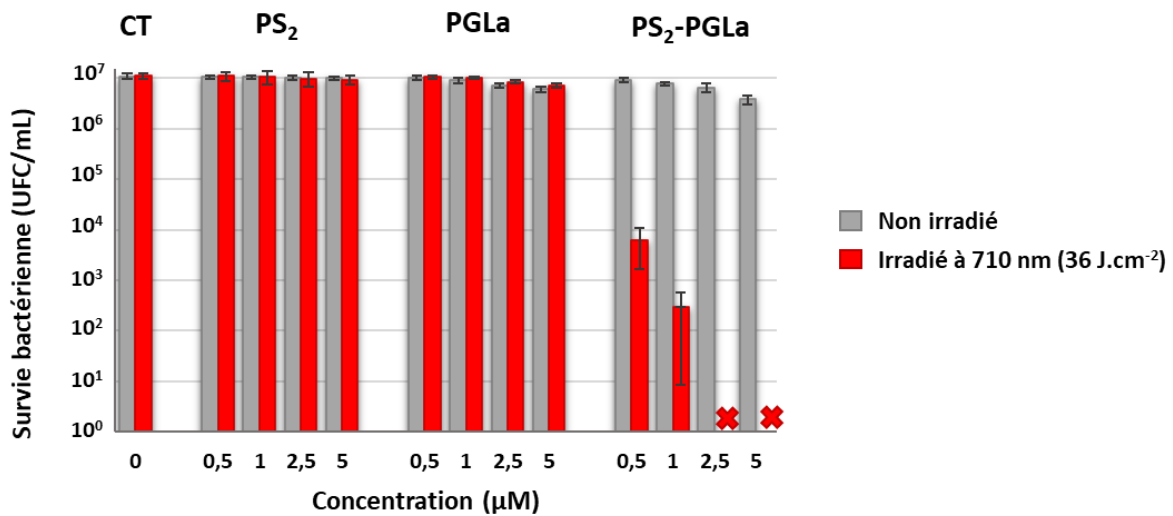


Figure 132. Survie des bactéries *S. aureus* en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, dans le noir ou à la suite d’une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²). Les croix aux concentrations de 2,5 et 5 μM indiquent une éradication totale des bactéries.

L’activité du conjugué **PS₂-PGLa** lorsqu’il n’est pas irradié est également très proche de celle du conjugué **PS₁-PGLa** avec respectivement 67 % et 65 % de réduction de la survie bactérienne à 5 μM , soit environ 0,5 log.

En revanche, l’irradiation dans le proche IR induit un effet photobactéricide plus important du conjugué **PS₂-PGLa**. Une réduction de 3,3 log de la survie bactérienne est constatée à une concentration de 0,5 μM et une réduction de 4,6 log est obtenue à 1 μM . D’autre part, Une photoéradication totale des bactéries est engendrée à la suite de l’irradiation à 710 nm aux concentrations de 2,5 et 5 μM .

Les résultats concernant la photoactivité des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** après irradiation en lumière rouge (36 J.cm⁻²) sont résumés **Tableau 10**.

Tableau 10. Photoinactivation des bactéries *S. aureus* induite par les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** en fonction de la concentration.

	PS₁-PGLa	PS₂-PGLa
0,5 μM	2,6 log	3,3 log
1 μM	3,2 log	4,6 log
2,5 μM	5,7 log	7,0 log
5 μM	7,0 log	7,0 log

La CMB est atteinte dès 0,5 μM sur *S. aureus* avec le conjugué **PS₂-PGLa**. A cette concentration, le conjugué **PS₁-PGLa** entraîne une diminution de la survie de *E. coli* de 2,6 log et atteint la CMB à 1 μM en éliminant 3,2 log des bactéries initiales. La plus forte photoactivité de **PS₂-PGLa** peut s'expliquer par un rendement quantique de production d'oxygène singulet dans l'eau ($\Phi_{\Delta} = 0,40$) près de deux fois supérieur à celui du conjugué **PS₁-PGLa** ($\Phi_{\Delta} = 0,23$).

4.1.2 Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche

Des tests ont également été effectués par irradiation avec des DEL blanches induisant une faible fluence de 4,3 J.cm⁻². Aucune différence d'activité n'est observée pour le photosensibilisateur **PS₂** ainsi que le peptide **PGLa** lorsqu'ils sont irradiés en lumière blanche en comparaison à une irradiation à 710 nm (**Figure 133**).

En revanche, une photoactivité plus faible du conjugué **PS₂-PGLa** est constatée aux concentrations de 1 et 2,5 μM par rapport aux résultats obtenus après irradiation à 710 nm. En effet, respectivement 4 log et 6,4 log des bactéries initiales sont tuées à 1 et 2,5 μM après irradiation par une lumière blanche (4,3 J.cm⁻²) alors qu'une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²) permet des réductions de viabilité de 4,6 log et 7 log. A 5 μM, une photoéradication totale de *S. aureus* est néanmoins observée pour les deux sources lumineuses testées malgré la plus faible fluence en lumière blanche.

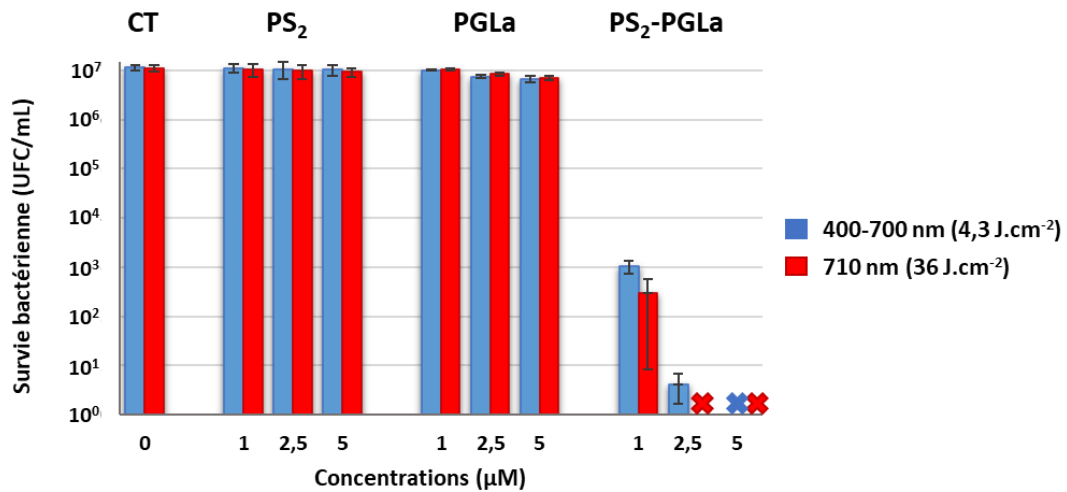


Figure 133. Survie des bactéries *S. aureus* en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d’une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²) par des DEL blanches (4,3 J.cm⁻²). Les croix aux concentrations de 2,5 et 5 μM indiquent une éradication totale des bactéries.

4.2 Activité antibactérienne des composés sur les bactéries *E. coli*

4.2.1 Activité en l’absence de lumière et photoactivité à 710 nm

Les résultats obtenus sur *E. coli* en l’absence de lumière ou à la suite d’une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²) sont présentés **Figure 134**.

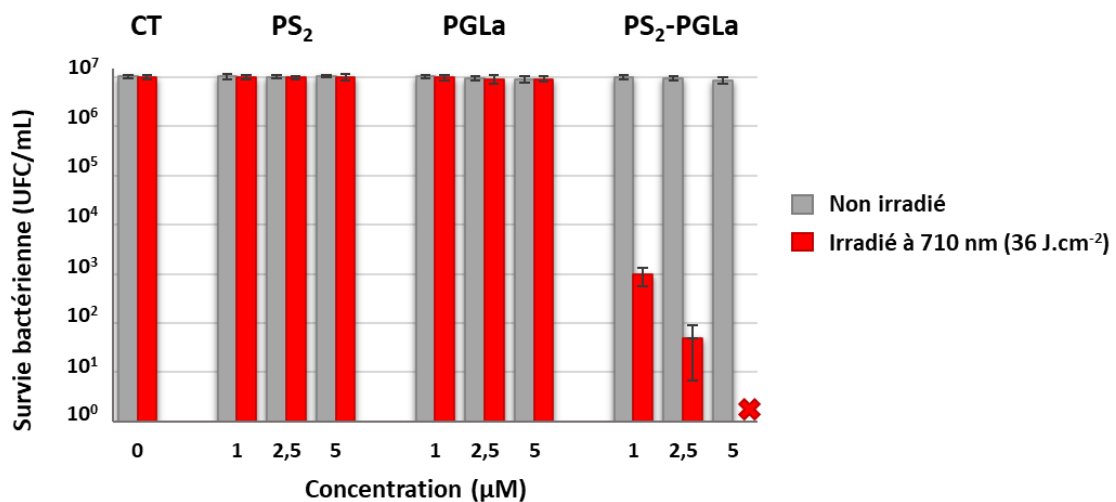


Figure 134. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, dans le noir ou à la suite d’une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²). La croix à la concentration de 5 μM indique une éradication totale des bactéries.

Le photosensibilisateur **PS₂** n'exerce aucune activité bactéricide avec ou sans irradiation car moins de 3 % des bactéries sont tuées quelques soient les concentrations testées.

La faible activité du conjugué **PS₂-PGLa** en l'absence de lumière est très proche de celle observée pour le conjugué **PS₁-PGLa**. Une diminution de 17 % de la viabilité bactérienne est obtenue à une concentration de 5 µM, comparable à la baisse de viabilité de 22 % engendrée par **PS₁-PGLa** à cette même concentration, soit une réduction d'environ 0,1 log.

L'activité photobactéricide de **PS₂-PGLa** est cependant plus forte sur *E. coli*. En effet, une réduction de la survie bactérienne de 4,1 log est obtenue à 1 µM, 5,3 log à 2,5 µM et 7 log à 5 µM contre respectivement 3,2 log, 3,7 log et 4,5 log pour le conjugué **PS₁-PGLa**.

En comparant avec les résultats obtenus sur la souche à Gram positif (*S. aureus*), on constate que le conjugué **PS₂-PGLa** est moins actif sur *E. coli* (**Figure 135**). A une concentration de 1 µM, on observe une différence d'activité du conjugué **PS₂-PGLa** après irradiation de 0,5 log entre *E. coli* et *S. aureus*, et cet écart augmente à 1,7 log à une concentration de 2,5 µM. Aucune différence n'est observée à 5 µM car la totalité des bactéries est tuée.

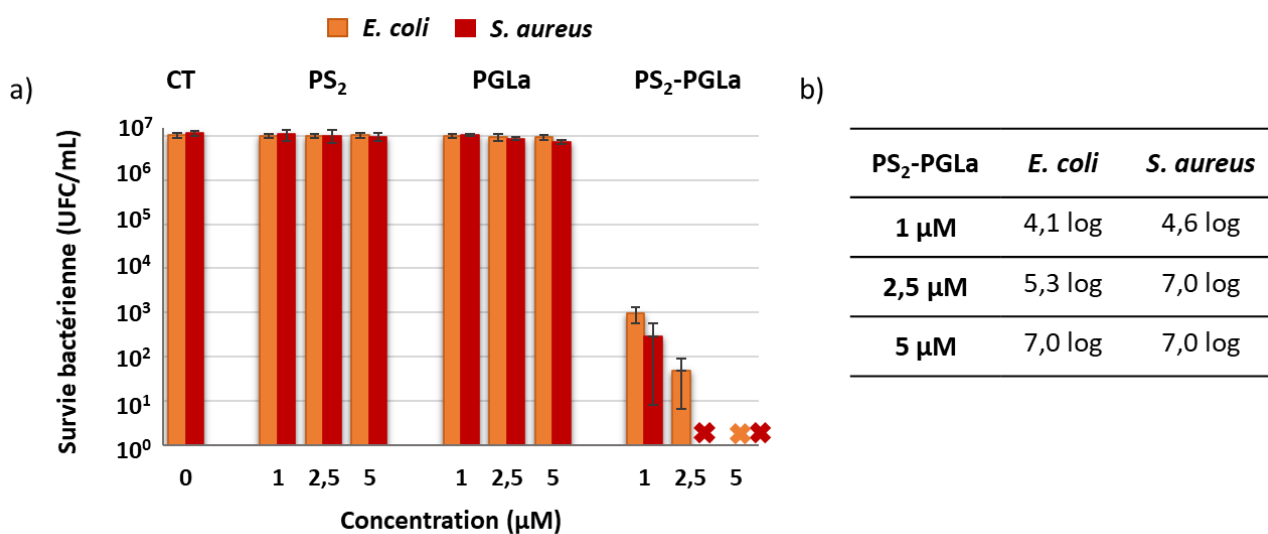


Figure 135. a) Survie des bactéries *E. coli* et *S. aureus* en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 710 nm (36 J.cm⁻²). Les croix aux concentrations de 2,5 et 5 µM indiquent une éradication totale des bactéries. b) Photoinactivation de *E. coli* et *S. aureus* induite par le conjugué **PS₂-PGLa** en fonction de la concentration.

4.2.2 Photoinactivation bactérienne après irradiation par une lumière blanche

Les résultats concernant l'activité des composés en lumière blanche pour une fluence de $4,3 \text{ J.cm}^{-2}$ ou 36 J.cm^{-2} sont présentés **Figure 136** et peuvent être comparés aux résultats précédemment obtenus en lumière rouge.

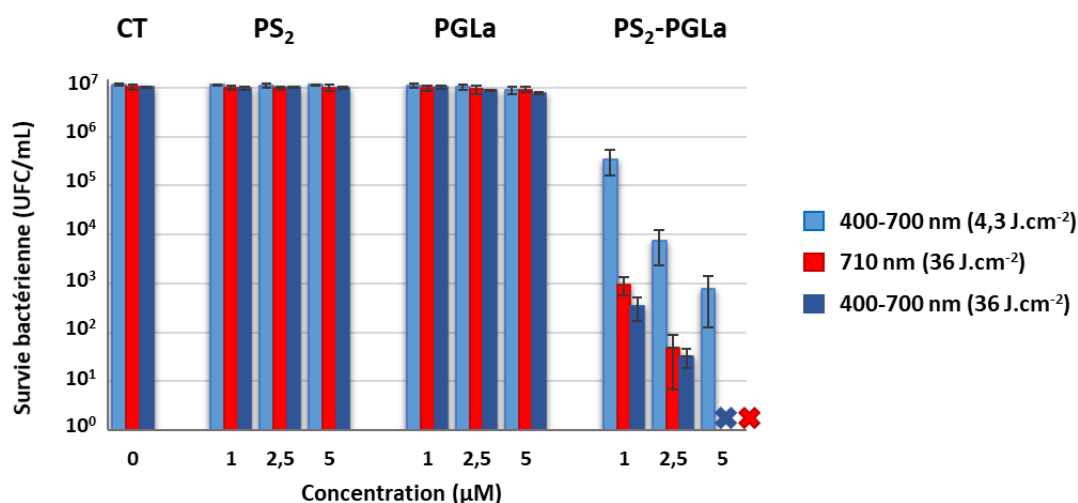


Figure 136. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, à la suite d'une irradiation à 710 nm (36 J.cm^{-2}) ou en lumière blanche ($4,3 \text{ J.cm}^{-2}$ ou 36 J.cm^{-2}). Les croix à une concentration de 5 µM indiquent une éradication totale des bactéries.

On constate que l'activité du photosensibilisateur **PS₂** est négligeable quelle que soit la concentration testée et la source lumineuse utilisée.

L'activité du conjugué **PS₂-PGLa** sous irradiation dépend de la source lumineuse utilisée et de la fluence appliquée. Pour une dose lumineuse de $4,3 \text{ J.cm}^{-2}$, la viabilité bactérienne est réduite de 1,5 log à une concentration de 1 µM, 3,2 log à 2,5 µM et 4,2 log à 5 µM. La CMB est donc atteinte à la concentration de 2,5 µM dans ces conditions.

Lorsque l'on augmente la fluence, l'effet photobactéricide du conjugué **PS₂-PGLa** est plus important. Le gain de photoactivité lorsque la dose lumineuse délivrée par les DEL blanches passe de $4,3$ à 36 J.cm^{-2} est de 3 log à 1 µM, 2,3 log à 2,5 µM et 2,8 log à 5 µM.

On observe également un léger gain d'activité lorsque la source lumineuse varie mais que la fluence est identique. A la suite d'une irradiation par des DEL blanches délivrant une dose lumineuse totale de 36 J.cm^{-2} , un gain d'activité de 0,5 log est obtenu à une concentration de 1 µM par comparaison

avec une irradiation à 710 nm dans les mêmes conditions, et un gain de 0,2 log est observé à 2,5 μM . Ces gains d'activité aux concentrations de 1 et 2,5 μM sont plus modestes que ceux observés pour le conjugué **PS₂-PGLa** qui étaient de 0,9 log pour les deux concentrations. A la plus forte concentration testée de 5 μM , une photoéradication totale des bactéries est obtenue quelle que soit la source lumineuse utilisée.

4.2.3 Effet du temps d'incubation avant irradiation à 710 nm

Une augmentation de 15 à 60 min du temps d'incubation à 37 °C entre les bactéries et les composés avant irradiation a été testée afin de mesurer l'effet de ce paramètre sur l'activité antibactérienne.

Effet du temps d'incubation en l'absence d'irradiation

Après 60 min d'incubation à 37 °C, une incubation de 15 min supplémentaires dans l'obscurité à température ambiante a été réalisée, correspondant au temps d'irradiation lorsque les puits sont éclairés. Les résultats en l'absence d'irradiation sont présentés **Figure 137**.

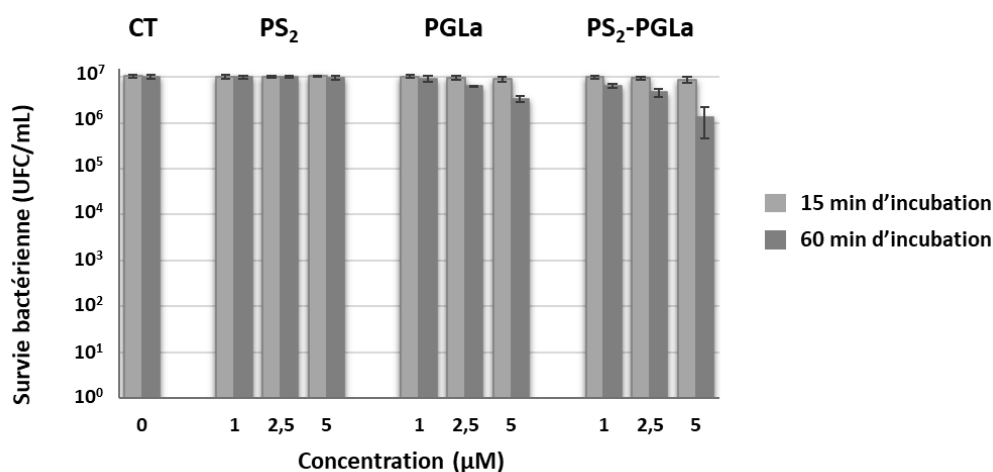


Figure 137. Survie des bactéries *E. coli* dans le noir incubées 15 ou 60 min à 37 °C en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations, suivies de 15 min supplémentaires dans l'obscurité à t.a.

Le temps d'incubation n'a pas d'effet sur **PS₂** car aucune activité n'est observée sur les bactéries.

Le peptide **PGLa** est légèrement plus actif après 60 min d'incubation. On constate une augmentation de la mortalité de *E. coli* de 0,04 log à une concentration de 1 μM par rapport à une incubation de 15 min. Cette augmentation est de 0,2 log à 2,5 μM et 0,4 log à 5 μM .

Cet accroissement de l'activité est plus marqué pour le conjugué **PS₂-PGLa** car une réduction de 0,2 log de la viabilité bactérienne est observée à une concentration de 1 μM , 0,3 log à 2,5 μM et 0,9 log à 5 μM . En comparaison avec un temps d'incubation de 15 min, cela représente un gain de 0,2 log à 1 μM , 0,3 log à 2,5 μM et 0,8 log à 5 μM . L'augmentation de l'activité du peptide et du conjugué peut être due à l'action du **PGLa** sur la membrane bactérienne. La perturbation de cette dernière au cours du temps peut engendrer la formation de pores transmembranaire qui conduisent à la lyse bactérienne.

Effet du temps d'incubation lorsque les puits sont irradiés dans le proche IR

Les résultats obtenus après 15 min d'irradiation à 710 nm diffèrent également selon le temps d'incubation (**Figure 138**).

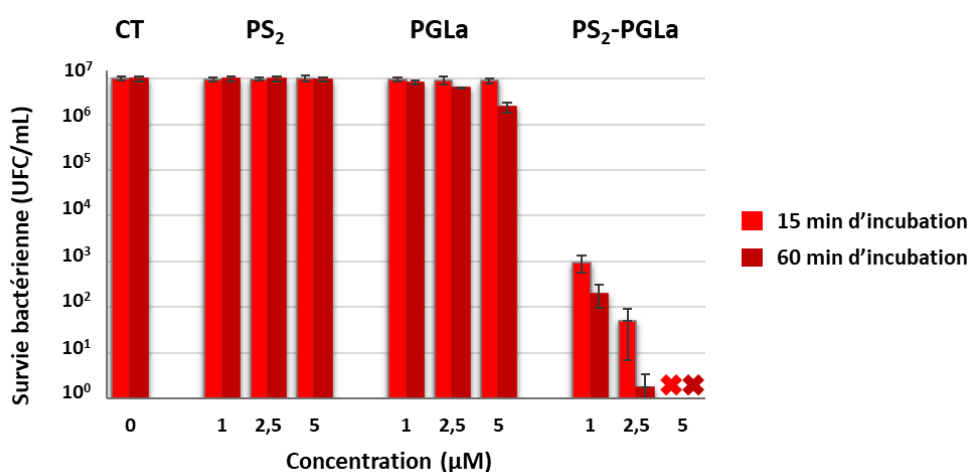


Figure 138. Survie des bactéries *E. coli* à la suite d'une irradiation à 710 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) après 15 ou 60 min d'incubation dans le noir en présence de **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations. Les croix à 5 μM indiquent une éradication totale des bactéries.

Un temps d'incubation de 60 min permet un gain d'activité de 0,7 log à une concentration de 1 μM et de 1,5 log à 2,5 μM par rapport à un temps court de 15 min. Une éradication totale est observée à 5 μM pour les deux temps d'incubation.

Ces résultats contrastent avec ceux décrits dans la littérature par Reddi *et al.* pour des conjugués porphyrine-peptide.¹⁸² Aucune différence significative d'activité antibactérienne n'a été observée pour des temps d'incubation variant de 30 min à 5 h avant irradiation. La nature des peptides et des porphyrines utilisés semblent donc avoir un effet sur l'interaction des conjugués avec les bactéries.

En revanche, les études menées par Pereira *et al.* indiquent un fort accroissement de la photoactivité des PS lorsque le temps d'incubation avant irradiation est prolongé.¹⁴¹ Une augmentation de l'effet photobactéricide de plus de 3 log est ainsi observée sur *S. aureus* et *E. coli* lorsque le temps d'incubation est doublé (30 à 60 min).

4.3 Etudes de la toxicité et de la phototoxicité des composés sur les cellules kératinocytes (NHEK)

4.3.1 Cytotoxicité dans le noir et phototoxicité à 710 nm

Les résultats de toxicité et de phototoxicité obtenus sur les kératinocytes NHEK sont reportés **Figure 139**.

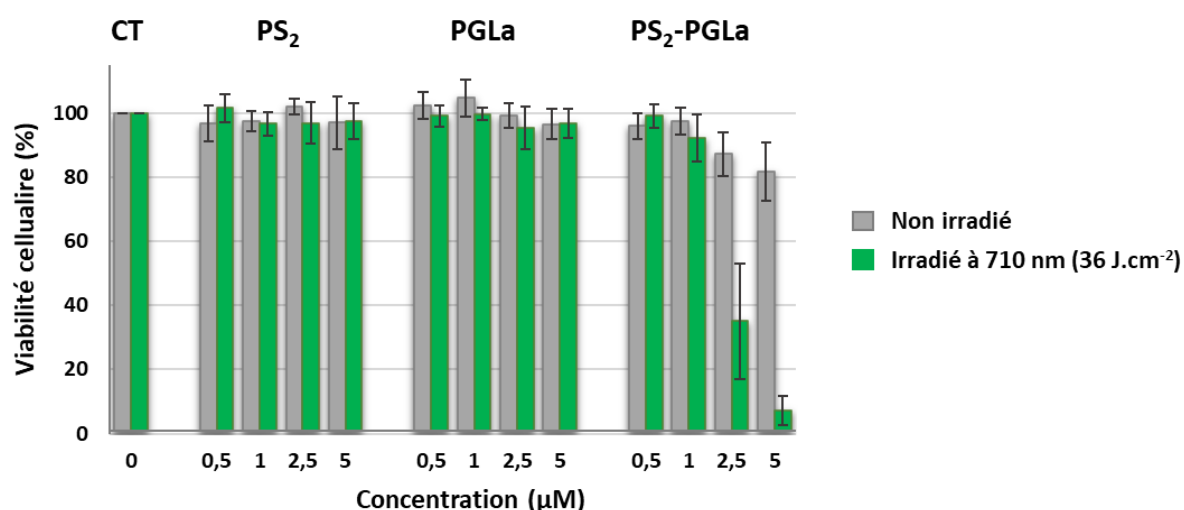


Figure 139. Cytotoxicité et phototoxicité ($\lambda_{irr} = 710 \text{ nm}$, 36 J.cm^{-2}) induites par les composés **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** à différentes concentrations sur les kératinocytes (NHEK).

La toxicité et la phototoxicité du photosensibilisateur **PS₂** sont négligeables car il induit moins de 6 % de mort cellulaire à la plus forte de concentration de 5 µM.

Le conjugué **PS₂-PGLa** exerce une faible toxicité comparable à celle observée pour **PS₁-PGLa** car moins de 5 % des cellules sont tuées aux concentrations de 0,5 et 1 µM. La mortalité cellulaire passe à 13 % à 2,5 µM et 19 % à 5 µM.

Concernant la phototoxicité du conjugué **PS₂-PGLa**, elle augmente en fonction de la concentration.

Aucune mort cellulaire n'est observée à 0,5 μM et 8 % des cellules sont tuées à 1 μM . Aux concentrations de 2,5 et 5 μM , on observe respectivement 65 % et 93 % de mort cellulaire. Cette plus forte phototoxicité du conjugué **PS₂-PGLa** par rapport au conjugué **PS₁-PGLa** (81 % à 5 μM) peut être imputable à la formation plus importante d'oxygène singulet car les deux conjugués induisent la même toxicité en l'absence d'irradiation.

4.3.2 Phototoxicité en lumière blanche

La phototoxicité des composés a également été évaluée sur les cellules NHEK par irradiation en lumière blanche pour une dose lumineuse totale de 4,3 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (**Figure 140**).

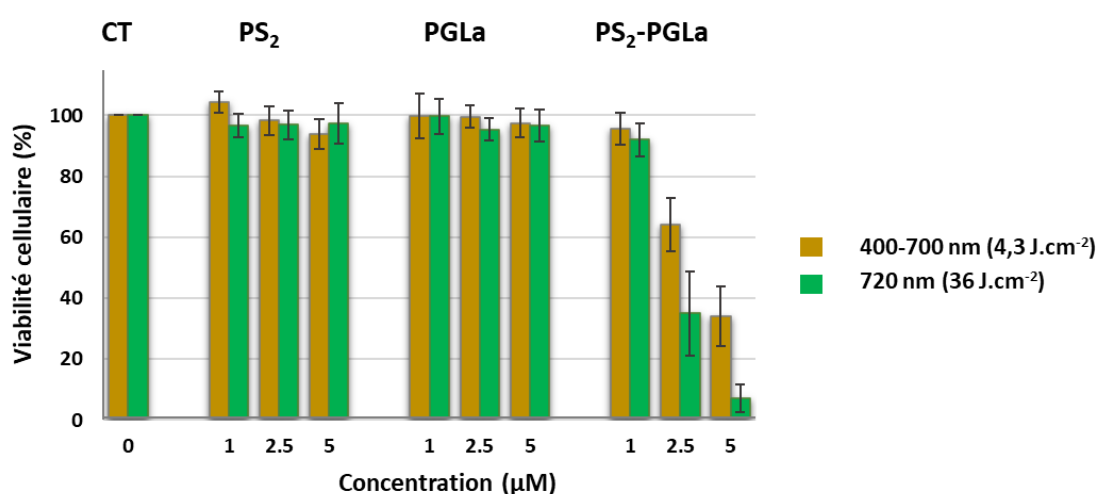


Figure 140. Phototoxicité induite par les composés **PS₂**, **PGLa** et **PS₂-PGLa** sur les kératinocytes (NHEK) à différentes concentrations, à la suite de 15 min d'irradiation à 710 nm (36 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$) ou en lumière blanche (4,3 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

L'irradiation du photosensibilisateur **PS₂** par une lumière blanche n'a pas d'effet sur son activité et une phototoxicité négligeable est observée pour les concentrations testées.

De manière similaire aux résultats obtenus par irradiation en lumière rouge, la phototoxicité du conjugué **PS₂-PGLa** augmente en fonction de la concentration du composé : moins de 4 % de mort cellulaire est engendrée aux concentrations de 0,5 et 1 μM , 36 % à 2,5 μM et 66 % à 5 μM . Ces valeurs de phototoxicité sont inférieures à celles obtenues aux concentrations de 2,5 et 5 μM par irradiation à 710 nm délivrant une fluence de 36 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. La concentration en photosensibilisateur ainsi que la fluence sont donc des paramètres à optimiser lors d'un traitement aPDT afin de limiter

la phototoxicité sur les cellules saines.

5 Etudes de l'activité et de la photoactivité du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** et de ses composants **PS₂** et **Gly-D-Ctl**

Les structures et les propriétés photophysiques du photosensibilisateur **PS₂** et du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** sont rappelées **Figure 141**.

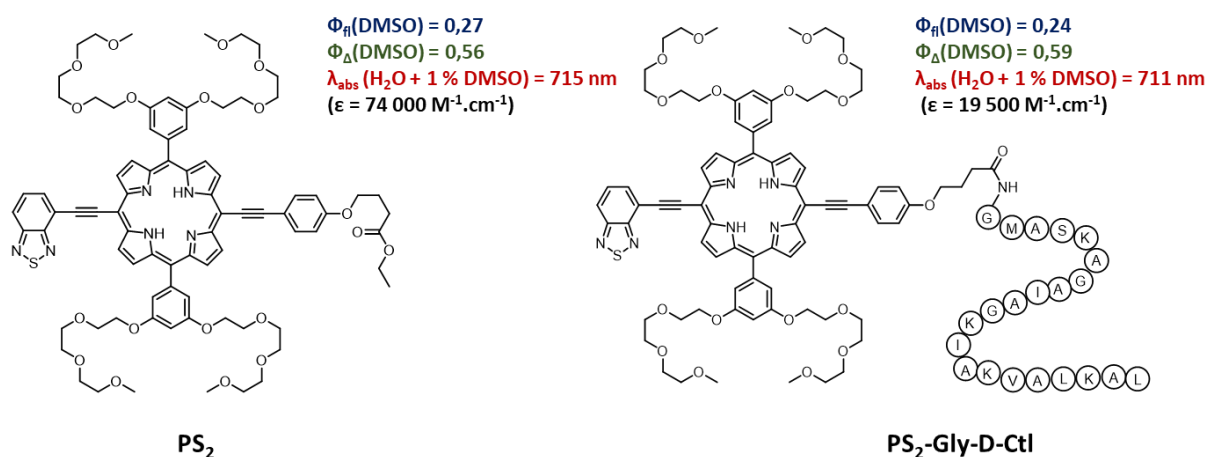


Figure 141. Structures et propriétés photophysiques du photosensibilisateur **PS₂** et du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**.

5.1 Activité antibactérienne des composés sur les bactéries *E. coli*

5.1.1 Activité dans le noir et à la suite d'une irradiation à 710 nm

Des problèmes de solubilisation du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le PBS ont été rencontrés. Le photosensibilisateur **PS₂**, le peptide **Gly-D-Ctl** et le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** sont donc dissous dans du DMSO puis dilués dans du PBS. Le taux de DMSO dans tous les puits est de 0,5 % et aucune toxicité sur les bactéries n'est observée. Les résultats des tests obtenus en l'absence de lumière et à la suite d'une irradiation à 710 nm sont présentés **Figure 142**.

L'activité du peptide **Gly-D-Ctl** est similaire avec ou sans irradiation et est négligeable à 1 μM . Une

diminution de la viabilité bactérienne de 14 % est obtenue à 2,5 μM et 35 % des bactéries sont éliminées à 5 μM , soit une réduction d'environ 0,2 log.

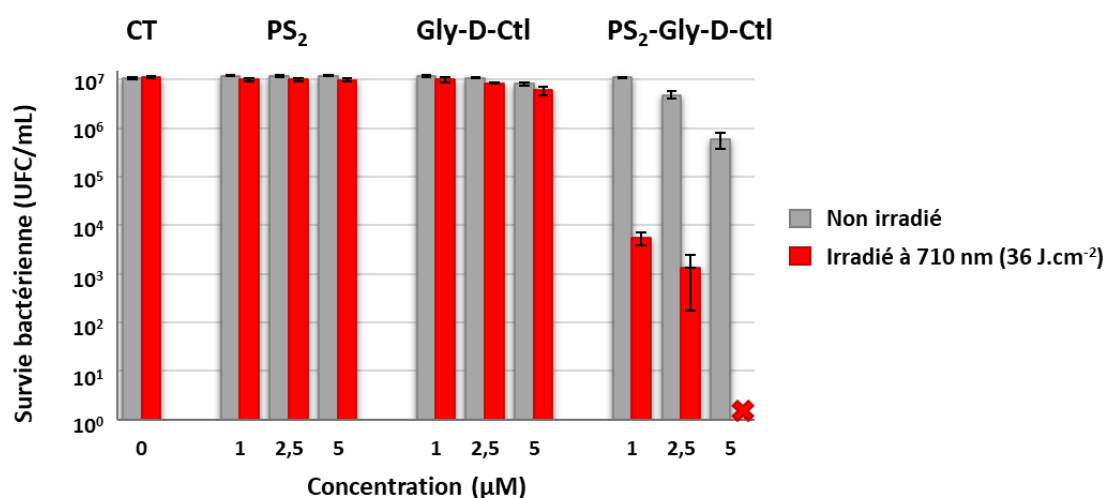


Figure 142. Survie des bactéries *E. coli* en présence de **PS₂**, **Gly-D-Ctl** et **PS₂-Gly-D-Ctl** à différentes concentrations, dans le noir ou à la suite d'une irradiation à 710 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). La croix à la concentration de 5 μM indique une éradication totale des bactéries.

L'activité antibactérienne du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** diffère de celle du conjugué **PS₂-PGLa**. En effet, si les activités observées des deux conjugués à une concentration de 1 μM sont proches avec respectivement 8 % et 5 % de mortalité bactérienne engendrée, l'activité du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le noir est bien plus forte à 2,5 et 5 μM . A ces concentrations, il induit une létalité bactérienne de 60 % et 95 % (soit 1,3 log) contre 9 % et 17 % pour le conjugué **PS₂-PGLa**.

L'activité photobactéricide de **PS₂-Gly-D-Ctl** à la suite d'une irradiation à 710 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) est plus forte que son activité dans le noir. Il induit en effet une réduction de la viabilité de *E. coli* de 3,3 log à une concentration de 1 μM et de 3,9 log à 2,5 μM . Comme pour les deux précédents conjugués, la CMI est atteinte dès 1 μM pour **PS₂-Gly-D-Ctl**. A une concentration de 5 μM , une photoéradication totale des bactéries est obtenue.

5.1.2 Effet du temps d'incubation avant irradiation à 710 nm

Un temps d'incubation de 60 min avant irradiation a été testé afin de mesurer l'effet de ce dernier sur l'activité antibactérienne des composés (**Figure 143**).

Effet du temps d'incubation en l'absence d'irradiation

L'activité du peptide **Gly-D-Ctl** augmente légèrement lorsqu'il est incubé 60 min avec les bactéries en comparaison de 15 min. Un gain d'activité de 0,04 log est observée à une concentration de 1 μM , 0,05 log à 2,5 μM et 0,1 log à 5 μM .

Le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** s'avère beaucoup plus actif lorsque le temps d'incubation est prolongé. A une concentration de 1 μM , 0,4 log des bactéries sont tuées lorsque le conjugué est incubé 60 min, contre 0,04 log lorsqu'il est incubé 15 min.

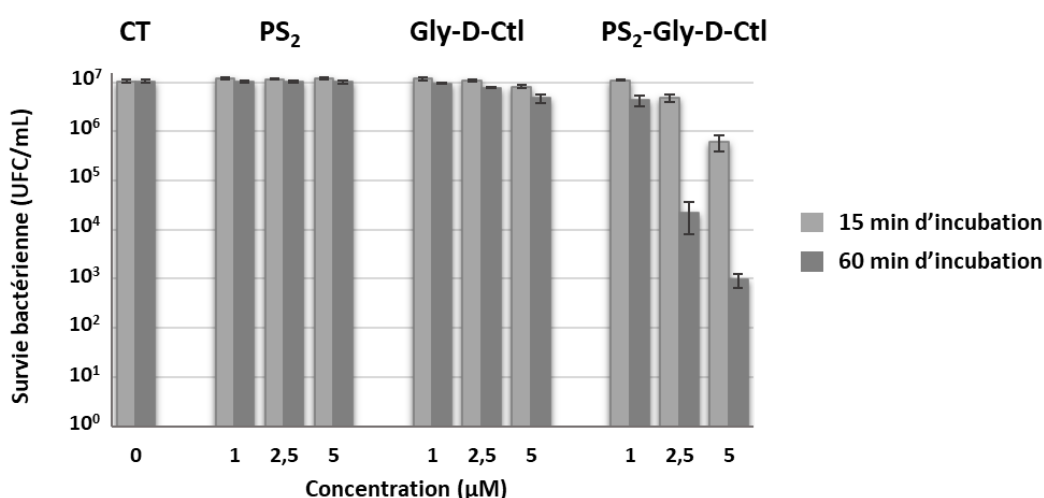


Figure 143. Survie des bactéries *E. coli* dans le noir incubées 15 ou 60 min à 37 °C en présence de PS₂, Gly-D-Ctl et PS₂-Gly-D-Ctl à différentes concentrations, suivies de 15 min supplémentaires dans l'obscurité à t.a.

L'augmentation de l'activité est édifiante aux concentrations de 2,5 μM et 5 μM lorsque le temps d'incubation passe de 15 à 60 min. En effet, la survie bactérienne est réduite de plus de 2,7 log à une concentration de 2,5 μM après 60 min d'incubation, et 4 log à 5 μM . Par comparaison avec un temps d'incubation de 15 min, cela représente un gain d'activité dans l'obscurité de 2,3 log à 2,5 μM et 2,7 log à 5 μM .

Effet du temps d'incubation lorsque les puits sont irradiés dans le proche IR

Les résultats obtenus après irradiation à 710 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) sont présentés **Figure 144**.

A une concentration de 1 μM , un gain d'activité de 0,9 log est obtenu en passant de 15 min à 60 min d'irradiation, et un gain de 2 log est observé à 2,5 μM . A 5 μM , une photoéradication totale des bactéries est engendrée après irradiation à 710 nm pour les deux temps d'incubation testés.

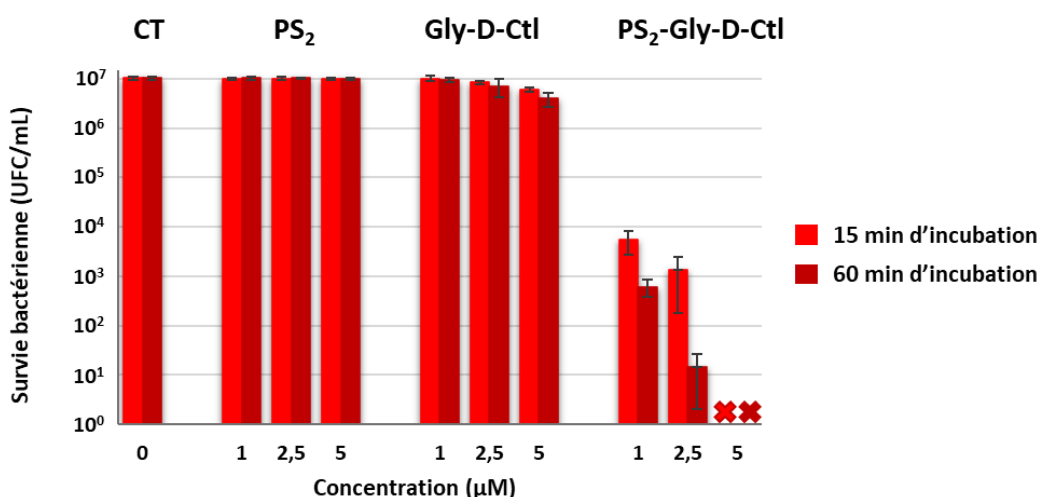


Figure 144. Survie des bactéries *E. coli* à la suite d'une irradiation à 710 nm (36 J.cm^{-2}) après 15 ou 60 min d'incubation dans le noir en présence de **PS₂**, **Gly-D-Ctl** et **PS₂-Gly-D-Ctl** à différentes concentrations. Les croix à 5 μM indiquent une éradication totale des bactéries.

L'augmentation du temps d'incubation avant l'irradiation a donc un effet sur la photoactivité du conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** en présence des bactéries, mais également sur son activité lorsqu'il est à l'abri de la lumière.

Comparaison de l'effet du temps d'incubation entre **PS₂-Gly-D-Ctl** et **PS₂-PGLa**

L'activité et la photoactivité de **PS₂-Gly-D-Ctl** et **PS₂-PGLa** après 60 min d'incubation en présence des bactéries sont résumées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11. Réduction de la viabilité des bactéries *E. coli* par les conjugués **PS₂-Gly-D-Ctl** et **PS₂-PGLa** en fonction de la concentration après 60 min d'incubation, suivies de 15 min dans le noir ou 15 min d'irradiation à 710 nm (36 J.cm^{-2}).

	Sans irradiation		Avec irradiation	
	PS ₂ -PGLa	PS ₂ -Gly-D-Ctl	PS ₂ -PGLa	PS ₂ -Gly-D-Ctl
1 μM	0,2 log	0,4 log	4,7 log	4,2 log
2,5 μM	0,3 log	2,7 log	6,8 log	5,9 log
5 μM	0,9 log	4,0 log	7,0 log	7,0 log

En l'absence de lumière, le conjugué **PS₂-PGLa** exerce une activité modérée sur *E. coli*. Le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** est bien plus actif dans le noir et son action bactéricide semble dépendre du temps de contact avec les bactéries. Cette différence d'activité entre les deux conjugués peut être due à la nature et au mécanisme d'action du peptide **Gly-D-Ctl** qui pénètre dans les bactéries contrairement au peptide **PGLa** qui reste à la surface des membranes lipidiques. Une hypothèse peut donc être formulée quant aux différences observées. Le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** est potentiellement capable de pénétrer à l'intérieur des bactéries, ou peut du moins s'insérer partiellement dans la membrane cytoplasmique. Cela pourrait engendrer des dysfonctionnements et des perturbations importantes de cette dernière et ainsi expliquer la forte activité observée dans le noir. A l'inverse, si le conjugué **PS₂-PGLa** reste en surface de la membrane plasmique, cela pourrait impliquer une plus faible mortalité dans l'obscurité mais augmenter fortement son activité lorsqu'il est irradié. De manière surprenante, **PS₂-Gly-D-Ctl** s'avère moins photoactif que **PS₂-PGLa** lorsqu'il est irradié à 710 nm à 1 µM et 2,5 µM. A une concentration de 5 µM, une éradication totale des bactéries est en revanche obtenue pour les deux composés. La photostabilité des deux conjugués a également été évaluée et aucune différence notable n'a été observée sur les spectres d'absorption des composés à la suite de 15 min d'irradiation, éliminant l'hypothèse d'une plus forte photodégradation de **PS₂-Gly-D-Ctl** (Annexe 9).

6 Affinité des conjugués pour les parois de *E. coli*

6.1 Evaluation par spectroscopie UV-visible

Afin d'évaluer l'affinité des conjugués pour les parois bactériennes, des tests d'association ont été réalisés (**Figure 145**).²³⁰ Après 15 min ou 60 min d'incubation de *E. coli* (10⁸ UFC/mL) en présence des conjugués à 5 µM, le PBS contenant les bactéries et les composés est centrifugé pendant 5 min et la densité optique du surnageant est mesurée par spectroscopie UV-visible. Des mesures de l'absorbance d'échantillons ne contenant que les conjugués en solution dans le PBS à 5 µM en l'absence de bactéries sont également effectuées.

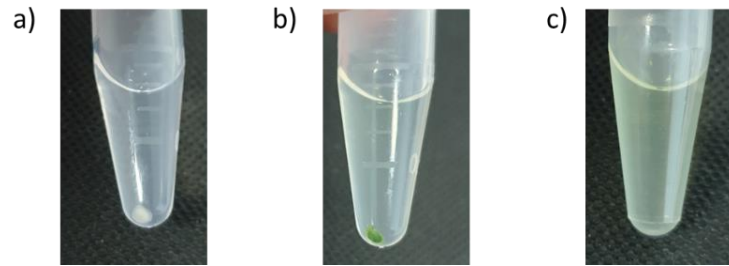


Figure 145. Photographies montrant les surnageants et les culots obtenus après centrifugation à la suite de 60 min d'incubation : a) *E. coli* dans du PBS ; b) *E. coli* en présence du conjugué **PS₂-PGLa** à une concentration de 5 μ M dans du PBS ; c) Conjugué **PS₂-PGLa** à une concentration de 5 μ M dans du PBS.

La différence entre l'absorption du conjugué dans le surnageant en l'absence de bactéries et l'absorption mesurée dans le surnageant après incubation du composé en présence de *E. coli* permet d'estimer le taux d'association (**Figure 146**).

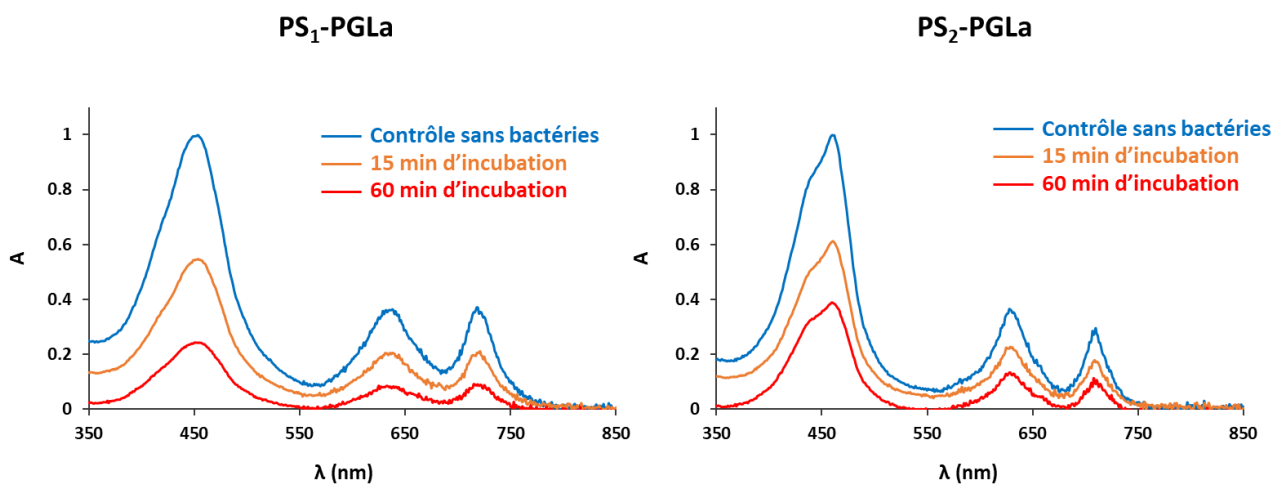


Figure 146. Absorption UV-visible normalisée des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** à une concentration de 5 μ M après 15 ou 60 min d'incubation en présence de *E. coli*.

On constate une diminution de l'absorbance du surnageant lorsque les conjugués sont incubés en présence des bactéries. Après 15 min d'incubation, la concentration de **PS₁-PGLa** dans le surnageant a diminué de 45 % et cette valeur augmente après 1 h d'incubation (76 % de diminution). Les résultats pour **PS₂-PGLa** sont similaires après 15 min d'incubation en présence des bactéries car on observe une diminution de 39 % de l'absorbance du conjugué dans le surnageant. Après 60 min d'incubation, une diminution de 62 % est constatée. Ces résultats indiquent ainsi que les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** interagissent avec les parois de *E. coli*. De plus, ils peuvent expliquer la plus

forte photoactivité de **PS₂-PGLa** à la suite de l'irradiation à 710 nm après 60 min d'incubation par rapport à celle obtenue après 15 min d'incubation car une part plus importante du conjugué est liée aux bactéries.

Les mêmes tests ont été réalisés pour le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le PBS avec 0,5 % de DMSO mais les résultats ne sont pas exploitables. Après 5 min de centrifugation du milieu contenant **PS₂-Gly-D-Ctl** seul sans les bactéries, l'analyse par spectroscopie UV-visible du surnageant ne permet de détecter qu'une absorbance très faible inférieure à 0,02 unité car le conjugué précipite dans le culot.

6.2 Evaluation par microscopie confocale

Des acquisitions par microscopie confocale ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Morgane Rabineau de l'équipe du Dr. Philippe Laval à Strasbourg afin de visualiser les interactions entre *E. coli* et les conjugués. Après 60 min d'incubation des bactéries (10^7 UFC/mL) en présence des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** à une concentration de 5 μ M, la fluorescence des échantillons est détectée par microscopie confocale ($\lambda_{exc} = 458$ nm) de 680 à 750 nm (**Figure 147**).

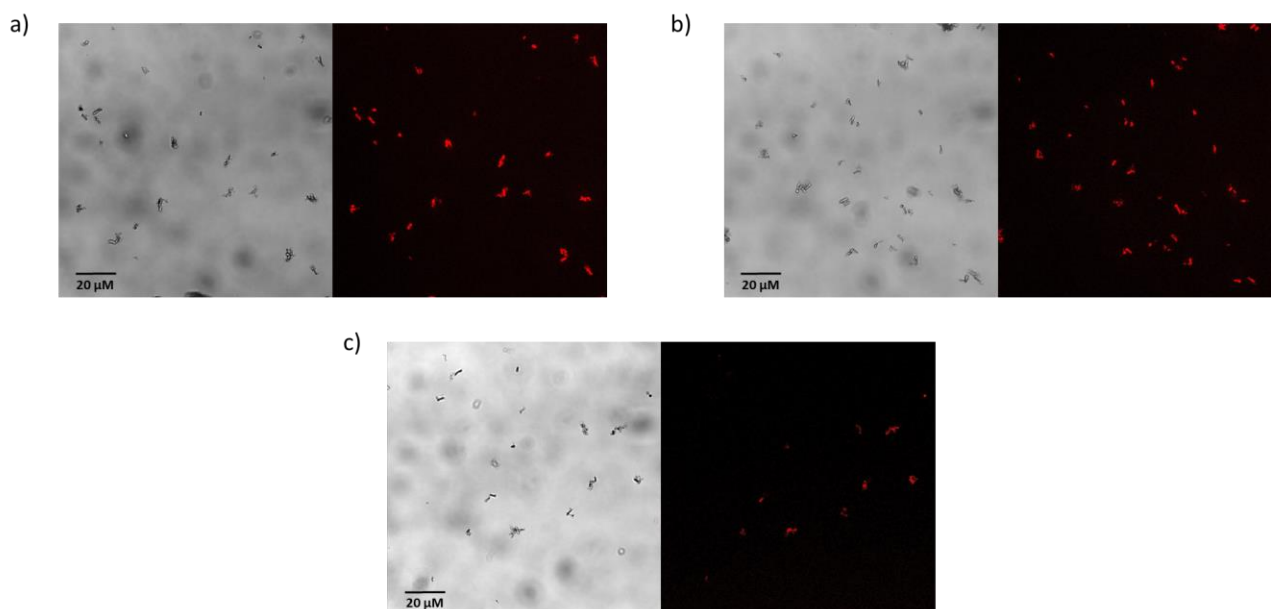


Figure 147. Images obtenues par microscopie confocale après 60 min d'incubation des bactéries *E. coli* et a) **PS₁-PGLa**, b) **PS₂-PGLa** et c) **PS₂-GlyD-Ctl** à 5 μ M dans le PBS.

On constate que de nombreux conjugués sont localisés sur les bactéries, ce qui confirme l'interaction entre les composés et les membranes bactériennes. Aucune fluorescence du milieu contenant les bactéries n'est observée en l'absence des conjugués.

Les résultats obtenus par mesure d'absorption et par imagerie au microscope indiquent que les conjugués porphyrine-peptide ont une affinité pour les membranes anioniques de *E. coli*, expliquant les fortes photoactivités antibactériennes observées après irradiation.

7 Evaluation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

L'évaluation du caractère bactériostatique des peptides **PGLa** et **Gly-D-Ctl** et des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** aux concentrations de 10, 5, 2,5 et 1,25 μM a également été réalisée. Les différents composés ont été incubés à 37 °C pendant 20 h dans du milieu de culture Mueller-Hinton (MH) en présence des bactéries *E. coli* à la population initiale de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.¹⁸⁶ Tous les composés ont été dissous dans du DMSO au préalable puis dilués dans du MH afin d'éviter tout problème de solubilisation. Dans le milieu de culture MH, le DMSO est présent à hauteur de 0,5 % et ne présente pas de toxicité sur les bactéries. Le suivi de la croissance bactérienne a été effectué par lecture de la densité optique à 550 nm et les résultats sont présentés **Tableau 12**.

Tableau 12. Taux d'inhibition de la croissance bactérienne des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa**, **PS₂-Gly-D-Ctl** et des peptides **PGLa** et **Gly-D-Ctl** incubés avec *E. coli* pendant 20h à 37 °C à l'abri de la lumière dans du MH.

	1,25 μM	2,5 μM	5 μM	10 μM
PS₁-PGLa	0 %	0 %	0 %	9 %
PS₂-PGLa	0 %	0 %	0 %	0 %
PS₂-Gly-D-Ctl	0 %	0 %	0 %	0 %
PGLa	0 %	85 %	100 %	100 %
Gly-D-Ctl	4 %	98 %	100 %	100 %

On constate que les trois conjugués n'exercent aucune activité bactériostatique dans le noir et ce même à une concentration de 10 μM . Seul le conjugué **PS₁-PGLa** semble avoir un très faible effet sur la croissance bactérienne à 10 μM mais l'inhibition est inférieure à 10 % et peut être comprise dans la marge d'erreur estimée à cette même valeur. Malgré la présence de DMSO, des problèmes

de solubilité des conjugués persistent dans le milieu de culture MH car des précipités sont observés dans les puits après 20h d'incubation.

En revanche, les peptides inhibent totalement la croissance bactérienne aux concentrations de 10 μM et 5 μM . A une concentration de 2,5 μM , le peptide **PGLa** implique une inhibition de croissance de *E. coli* de 85 % et le peptide **Gly-D-Ctl** une inhibition de 98 %. La valeur de la CMI de ces peptides se situe donc légèrement au-dessus de 2,5 μM , ce qui concorde avec les résultats décrits dans la littérature attribuant une CMI d'environ 4 μM au **PGLa** et à la **D-Ctl** sur *E. coli* dans du milieu de culture Luria-Bertani.^{186,187} A 1 μM , l'activité des peptides est négligeable.

Ces résultats indiquent ainsi que l'activité bactéricide et l'activité bactériostatique sont bien distinctes. Les peptides seuls exercent une très faible activité à une concentration de 5 μM lors des tests de CMB sur *E. coli* dans du PBS mais ils inhibent totalement la croissance bactérienne à cette même concentration dans du milieu de culture. A l'inverse, les conjugués porphyrine-peptide s'avèrent très photoactifs sur *E. coli* après irradiation dans du PBS car la CMB est atteinte dès 1 μM . Ils n'exercent cependant aucune activité d'inhibition de croissance dans du milieu MH et **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** ne diminuent la viabilité bactérienne que de 0,1 log dans le PBS à 5 μM .

8 Conclusion

Les études antibactériennes menées sur *S. aureus* (bactérie à Gram positif) et *E. coli* (bactérie à Gram négatif) ont permis de déterminer l'activité dans le noir et la photoactivité des conjugués porphyrine-peptide. Les résultats obtenus pour **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** sont résumés dans le **Tableau 13** et le **Tableau 14**.

Une très bonne photoactivité des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** a été obtenue sur *S. aureus*. Ainsi, la CMB est atteinte à une faible concentration de 1 μM pour **PS₁-PGLa** et à 0,5 μM pour **PS₂-PGLa** à la suite d'une irradiation à 720 nm ou 710 nm avec une fluence de 36 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Une photoéradication totale des bactéries, soit une diminution de 7 log de la viabilité bactérienne, est par ailleurs obtenue pour les deux conjugués à 5 μM . A cette concentration, une réduction de la viabilité des bactéries de 7 log est également observée lorsque les conjugués sont irradiés par des DEL blanches avec une faible fluence de 4,3 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Il reste à réaliser des tests antibactériens avec le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**

sur *S. aureus*.

Concernant la photoactivité des conjugués sur *E. coli* à la suite d'une irradiation dans le proche IR, les études ont mené à d'excellents résultats. La CMB est atteinte à 1 μM pour les trois conjugués lorsqu'ils sont irradiés à 720 nm ou 710 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) après 15 min d'incubation avec les bactéries mais **PS₂-PGLa** implique une mortalité supérieure aux deux autres conjugués. En effet, il entraîne une diminution de la viabilité de *E. coli* de 4,1 log contre 3,0 log pour **PS₁-PGLa** et 3,3 log pour **PS₂-Gly-D-Ctl**. Par ailleurs, les conjugués exercent une très faible activité dans le noir à cette concentration car une réduction maximale de 0,04 log de la viabilité bactérienne est constatée. Cette absence d'activité d'un PS lorsqu'il n'est pas irradié est une propriété essentielle afin de prévenir d'éventuels développements de résistances. A 5 μM , une photoéradication totale des bactéries est engendrée par les conjugués **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** tandis que le conjugué **PS₁-PGLa** s'avère moins actif. Lorsqu'ils sont irradiés par une lumière blanche ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) à la concentration de 1 μM , **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** exercent une plus forte photoactivité sur *E. coli* que lorsqu'ils sont irradiés dans le proche IR car des réductions de la viabilité bactérienne de 3,9 log et 4,5 log sont observées. Ces résultats d'activité photobactéricide sont particulièrement intéressants car le temps total du traitement aPDT est court (15 min d'incubation + 15 min d'irradiation). En outre, la vectorisation du PS par l'AMP induit une forte affinité pour les parois bactériennes qui a été mise en évidence par microscopie confocale et par des études spectroscopiques UV-visible.

A toutes les concentrations testées, les porphyrines **PS₁** et **PS₂** et les peptides **PGLa** et **Gly-D-Ctl** exercent une activité et une photactivité négligeables sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus*, montrant ainsi l'intérêt de leur conjugaison

Le potentiel des conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** pour être utilisés comme agents antibactériens a été confirmé par les résultats des tests obtenus en présence de kératinocytes. En effet, ces composés ne sont ni toxiques ni phototoxiques à 1 μM , concentration à laquelle ils exercent un fort pouvoir photobactéricide. Il reste à mener cette étude sur le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**.

Les résultats des tests antibactériens sont donc prometteurs car une forte activité photobactéricide des trois conjugués est obtenue à une faible concentration de 1 μM sur des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif lorsqu'ils sont irradiés dans la fenêtre thérapeutique optique. Le conjugué **PS₂-PGLa** s'avère être le plus photoactif et des futures études sur d'autres souches

bactériennes ainsi que sur des bactéries résistantes aux antibiotiques seront réalisées avec ce composé.

Tableau 13. Tableau récapitulatif des résultats biologiques obtenus avec **PS₁-PGLa** sur *S. aureus*, *E. coli* et NHEK en l'absence de lumière ou à la suite d'une irradiation après 15 min d'incubation. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage et l'équivalent logarithmique est indiqué pour les tests antibactériens.

	Sans irradiation (obscurité)				Irradiation à 720 nm ($\Phi = 36 \text{ J.cm}^{-2}$)				Irradiation en lumière blanche ($\Phi = 4,3 \text{ J.cm}^{-2}$)				Irradiation en lumière blanche ($\Phi = 36 \text{ J.cm}^{-2}$)			
	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM
<i>S. aureus</i>	9 (0,04 log)	24 (0,1 log)	35 (0,2 log)	65 (0,5 log)	99,75 (2,6 log)	99,942 (3,2 log)	99,99978 (5,7 log)	100 (7,0)		99,73 (2,6 log)	99,99951 (5,3 log)	100 (7,0 log)				
<i>E. coli</i>		8 (0,04 log)	20 (0,1log)	22 (0,1 log)		99,910 (3,0 log)	99,978 (3,7 log)	99,9968 (4,5 log)		66 (0,5 log)	77 (0,6 log)	92 (1,1 log)		99,988 (3,9 log)	99,9977 (4,6 log)	100 (7,0 log)
NHEK	0	1	15	23	0	4,5	50	81	0	3	23	39				

Tableau 14. Tableau récapitulatif des résultats biologiques obtenus avec **PS₂-PGLa** sur *S. aureus*, *E. coli* et NHEK en l'absence de lumière ou à la suite d'une irradiation après 15 min d'incubation. La mort cellulaire est exprimée en pourcentage et l'équivalent logarithmique est indiqué pour les tests antibactériens.

	Sans irradiation (obscurité)				Irradiation à 710 nm ($\Phi = 36 \text{ J.cm}^{-2}$)				Irradiation en lumière blanche ($\Phi = 4,3 \text{ J.cm}^{-2}$)				Irradiation en lumière blanche ($\Phi = 36 \text{ J.cm}^{-2}$)			
	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM	0,5 μM	1 μM	2,5 μM	5 μM
<i>S. aureus</i>	16 (0,08 log)	28 (0,1 log)	39 (0,2 log)	67 (0,5 log)	99,945 (3,3 log)	99,9973 (4,6 log)	100 (7,0 log)	100 (7,0)		99,991 (4,0 log)	99,999962 (6,4 log)	100 (7,0 log)				
<i>E. coli</i>		5 (0,02 log)	9 (0,04 log)	17 (0,08 log)		99,9931 (4,1 log)	99,99950 (5,3 log)	100 (7,0 log)		97 (1,5 log)	99,937 (3,2 log)	99,9932 (4,2 log)		99,9966 (4,5 log)	99,99968 (5,5 log)	100 (7,0 log)
NHEK	4	2,5	13	19	1	8	65	93	3	4	36	66				

Chapitre IV : Synthèse de nouveaux photosensibilisateurs cationiques et de photosensibilisateurs métallés pour l'aPDT

1 Photosensibilisateurs fonctionnalisés par des unités imidazolium

Les porphyrines développées par Pereira *et al.* fonctionnalisées par des unités imidazolium (**Figure 148**) ont récemment montré de fortes photoactivités sur des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif à la suite de leur irradiation à 415 nm par des DEL bleues.¹⁴¹

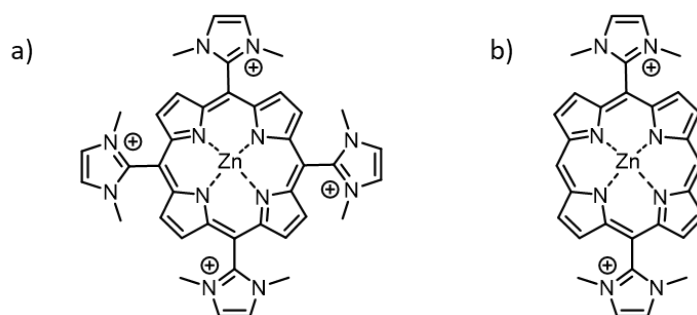


Figure 148. Structures des PS porphyriniques a) *meso*-tétraimidazolium et b) *meso*-bisimidazolium développés par Pereira *et al.*¹⁴¹

Ces résultats nous ont conduit à développer des PS cationiques fonctionnalisés par des unités imidazolium excitables dans le proche IR. Des porphyrines bis-éthynyle décorées de chaînes triéthylèneglycol ont ainsi été fonctionnalisées par des substituants imidazolium et leur activité antibactérienne a été évaluée.

1.1 Synthèse et caractérisations des photosensibilisateurs bis-imidazolium **PZn-imi** et **PH₂-imi**

Les PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** ont été obtenus par synthèse convergente (**Figure 149**) entre la porphyrine **8** décrite au chapitre II.4.1.1 et le synthon 2-iodo-1-méthylimidazole **18** suivie d'une méthylation des imidazoles.

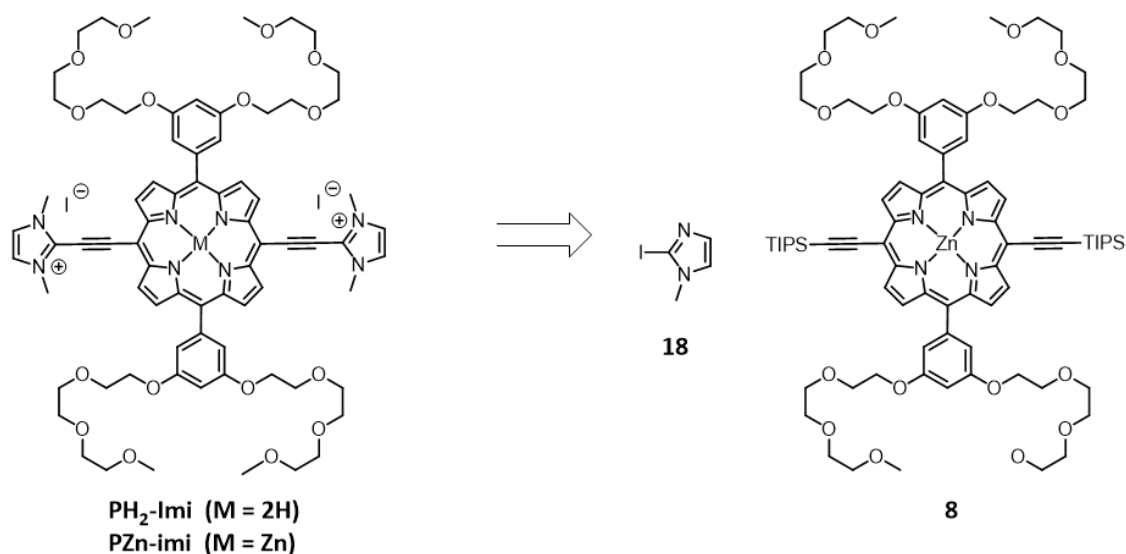


Figure 149. Rétrosynthèse des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi**.

1.1.1 Obtention du synthon 2-iodo-1-méthylimidazole **18**

Le composé 2-iodo-1-méthylimidazole **18** est synthétisé par déprotonation du 1-méthylimidazole commercial à -78 °C suivie d'une substitution nucléophile sur 1,2 éq. de diiode à température ambiante (**Figure 150**).²³¹ Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé **18** est obtenu avec 88 % de rendement.

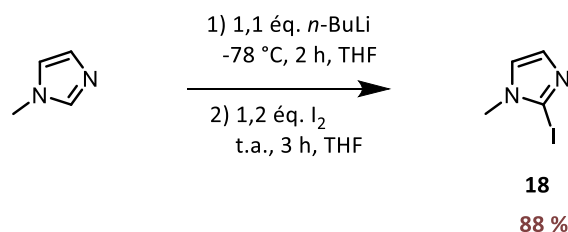


Figure 150. Synthèse du 2-iodo-1-méthylimidazole **18**.

1.1.2 Synthèse des PS PH₂-imi et PZn-imi

Les photosensibilisateurs **PZn-imi** et **PH₂-imi** ont été synthétisés à partir de la porphyrine bis-éthynyle protégés **8** (Figure 151).

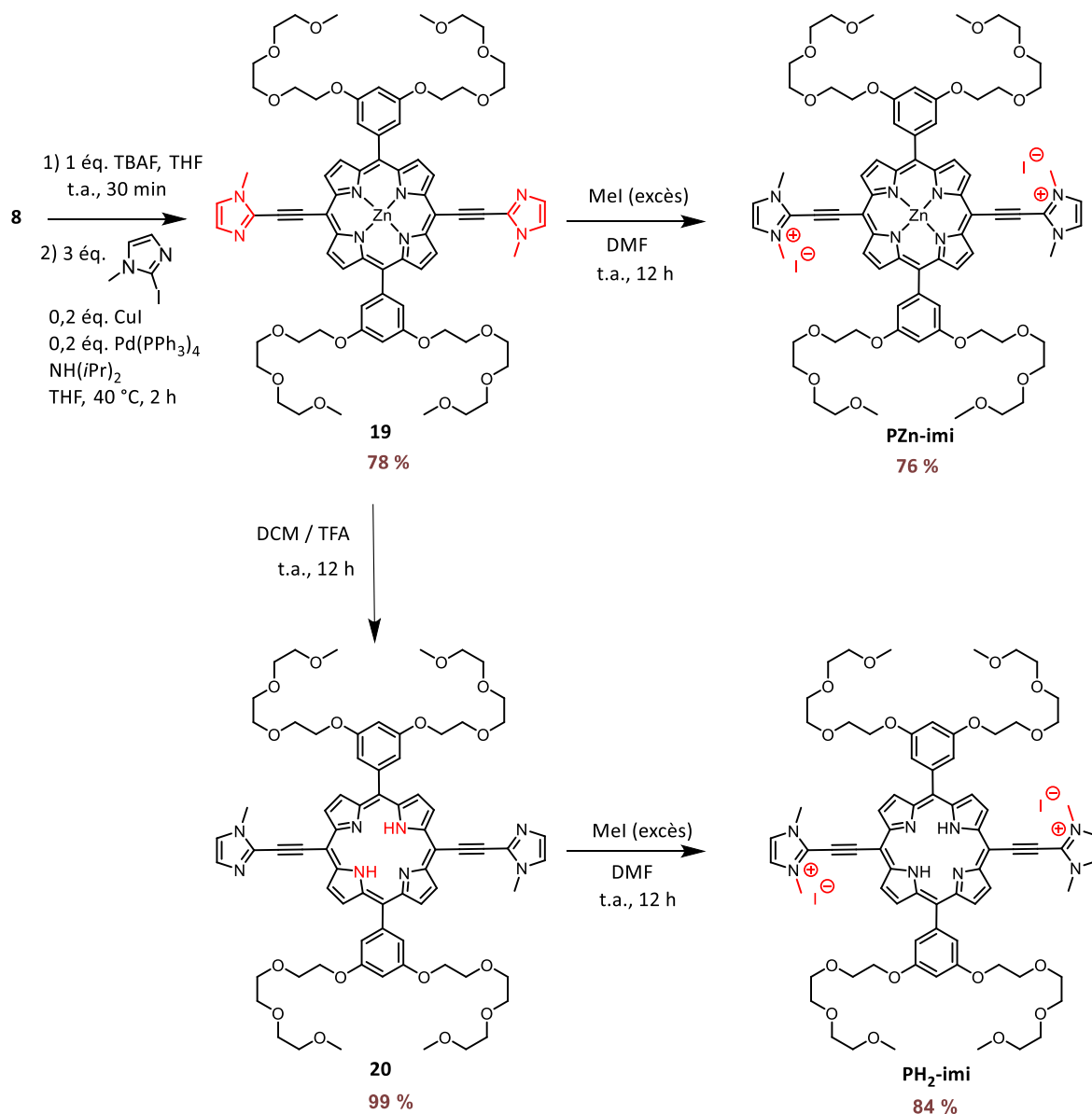


Figure 151. Synthèse des photosensibilisateurs **PZn-imi** et **PH₂-imi**.

La déprotection des groupes TIPS de la porphyrine **8** par 1 éq. de TBAF dans du THF permet d'obtenir l'intermédiaire comportant deux alcynes vrais, isolé par filtration sur silice. Il est directement engagé dans une réaction de couplage de Sonogashira avec le 2-iodo-1-méthylimidazole **18** pour conduire à la porphyrine **19** obtenue après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 78 %. Une fraction du composé **19** est ensuite démétallée dans du DCM en présence

de 5 % de TFA pendant 12 h et la porphyrine **20** est obtenue quasi-quantitativement. Afin d'obtenir les PS **PZn-imi** et **PH₂-imi**, la porphyrine métallée au zinc(II) **19** et la porphyrine base libre **20** sont mises en réaction à t.a. avec un large excès de iodométhane dans du DMF anhydre. Après précipitation dans de l'éther diéthylique, les composés sont dissous dans de l'eau et lyophilisés. Les PS cationiques **PZn-imi** et **PH₂-imi** sont obtenus respectivement avec 76 % et 84 % de rendement. Ils ont été caractérisés par spectroscopies RMN ¹H, COSY, NOESY, ¹³C, spectrométrie HR ESI-MS et spectroscopie d'absorption UV-visible.

1.1.2.1 Caractérisation de PH₂-imi

Le spectre RMN ¹H de **PH₂-imi** indique la présence des protons α et β des unités imidazolium sous forme d'un singulet à 8,11 ppm (**Figure 152**). Le signal des protons méthyliques portés par les azotes des imidazoles est confondu avec le multiplet des protons 7.

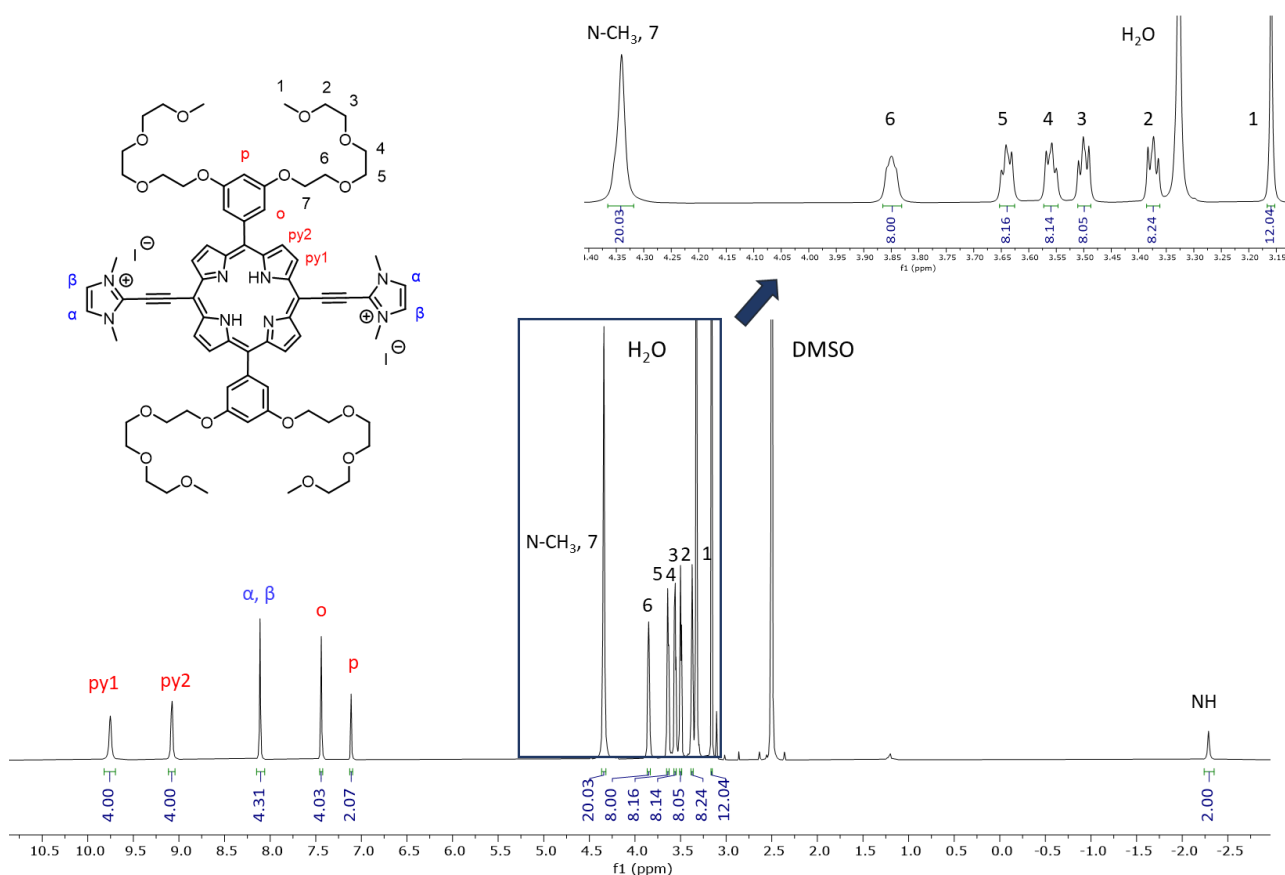


Figure 152. Spectre RMN ¹H (500 MHz, 298 K, (CD₃)₂SO) de **PH₂-imi**.

Le spectre COSY indique des corrélations scalaires entre les protons pyrroliques py1 et py2, entre les protons o et p en position ortho et para du phényle ainsi qu'entre les protons α et β et les protons

méthyliques des imidazoles (**Figure 153**).

Le spectre NOESY permet d'attribuer les protons py2 par corrélation spatiale avec les protons o des phényles (**Figure 154**). Une corrélation spatiale entre les protons o et p du phényle et les protons 7 portés par la chaîne triéthylène glycol est également présente.

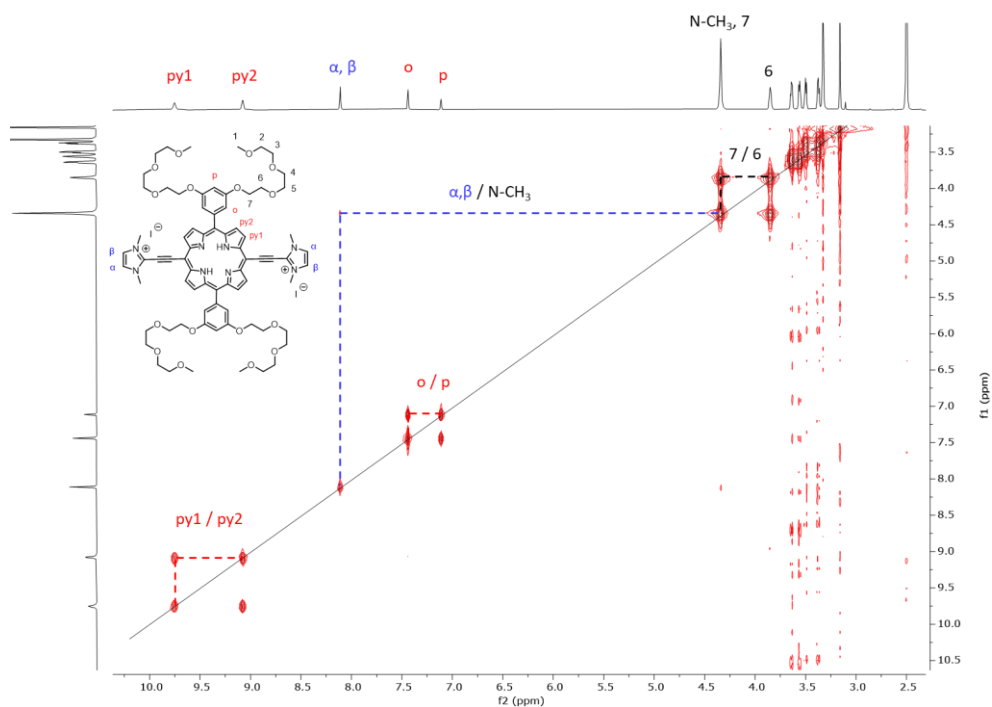


Figure 153. Spectre RMN COSY (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de $\text{PH}_2\text{-imi}$.

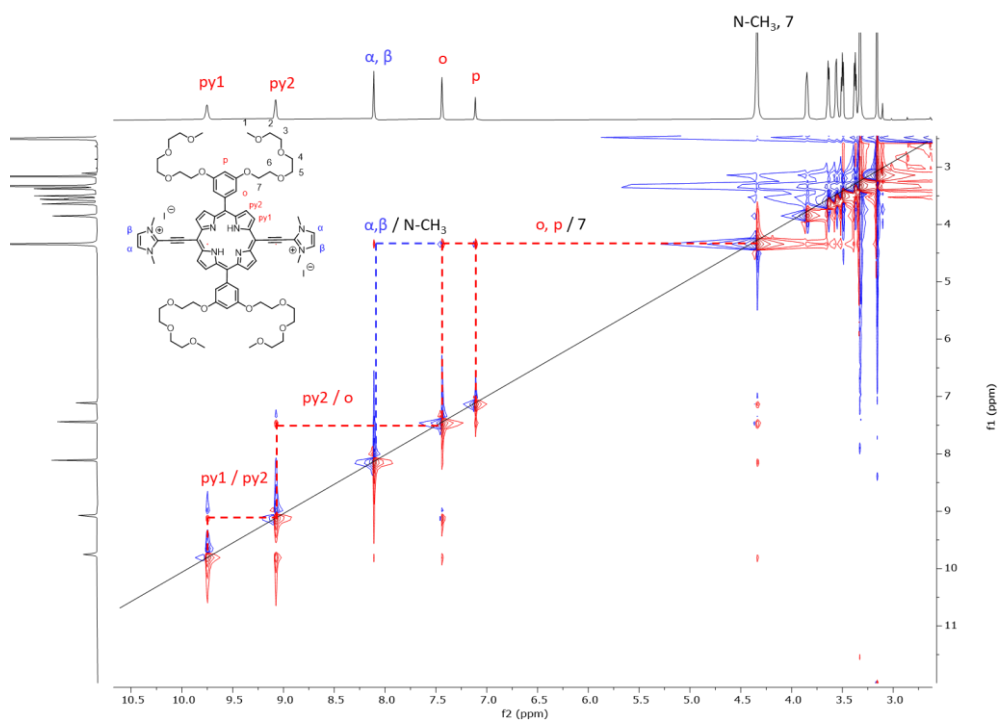


Figure 154. Spectre RMN NOESY (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de $\text{PH}_2\text{-imi}$.

L'analyse par spectrométrie de masse HR ESI-MS réalisée pour la porphyrine **PH₂-imi** montre que le profil isotopique de l'espèce moléculaire ionique doublement chargée $[M]^{2+}$ détectée à 674,3334 est en accord avec celui calculé à 674,3310 (**Figure 155**).

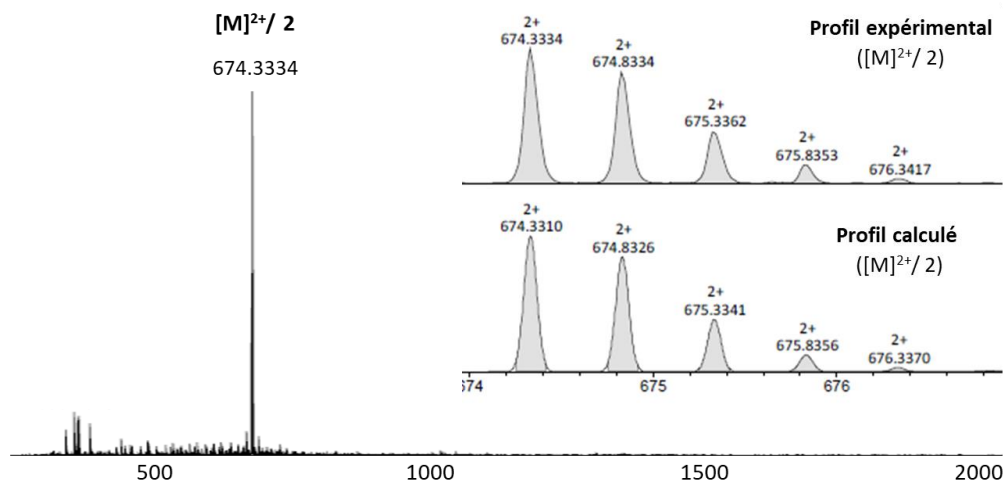


Figure 155. Spectre HR ESI-MS de **PH₂-imi** et profil isotopique expérimental et profil isotopique calculés.

Le chromatogramme obtenu par HPLC analytique du composé **PH₂-imi** témoigne d'une pureté supérieure à 99 %. Le temps de rétention du produit est de 16,15 min (**Figure 156**).

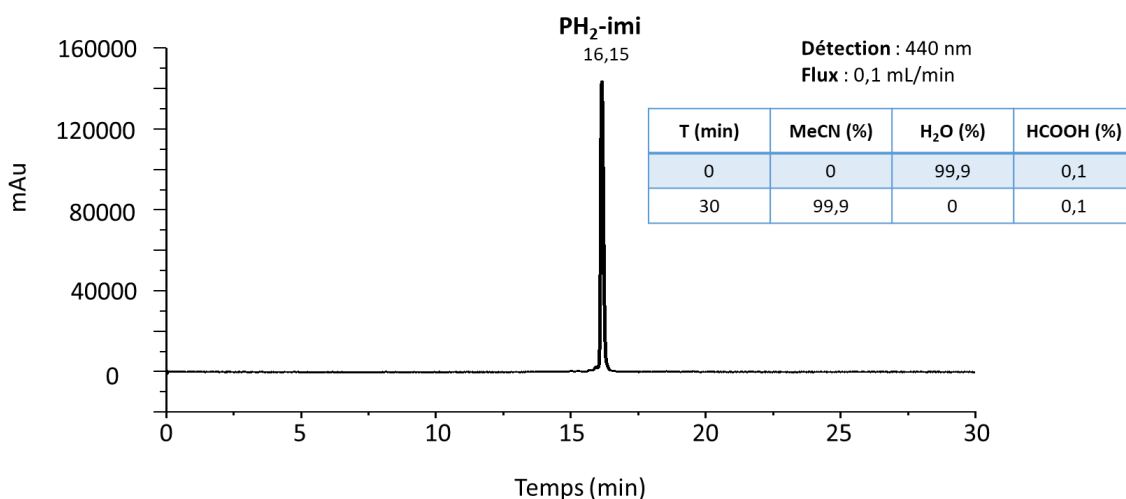


Figure 156. Chromatogramme de **PH₂-imi** obtenu en HPLC analytique et conditions d'élution utilisées.

1.1.2.2 Caractérisation de PZn-imi

Les spectres RMN ^1H , COSY et NOESY obtenus pour la porphyrine **PZn-imi** sont très similaires à ceux obtenus pour la porphyrine **PH₂-imi** (Annexe 10). L'absence du signal à -2,29 ppm indique que la porphyrine est métallée au zinc(II).

Le spectre de masse haute résolution confirme l'obtention de **PZn-imi** (Figure 157). Le pic à $m/z = 705,2908$ correspond à l'espèce $[\text{M}]^{2+}$.

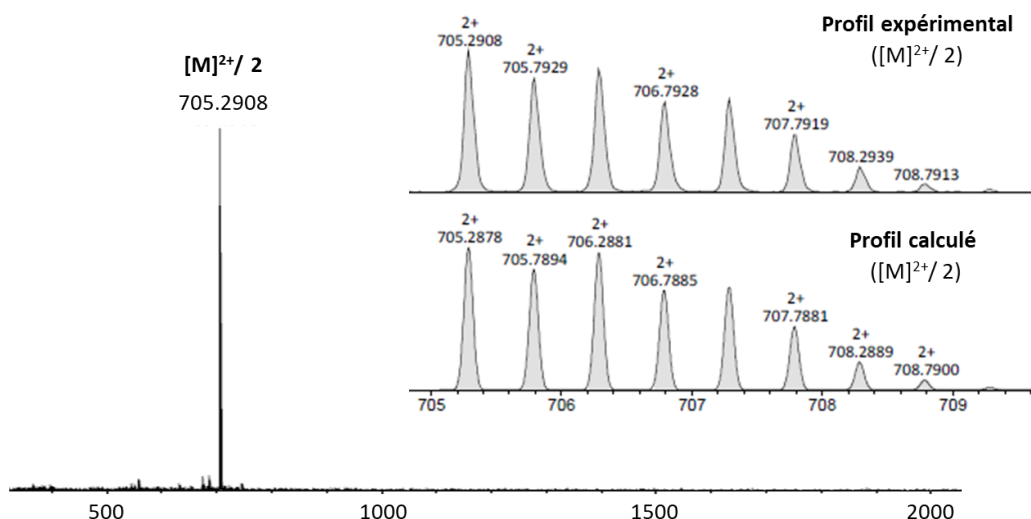


Figure 157. Spectre HR ESI-MS de **PZn-imi** et profil isotopique expérimental et profil isotopique calculés.

Le composé **PZn-imi** possède un temps de rétention de 16,01 min en HPLC analytique et une pureté supérieure à 99 % (Figure 158).

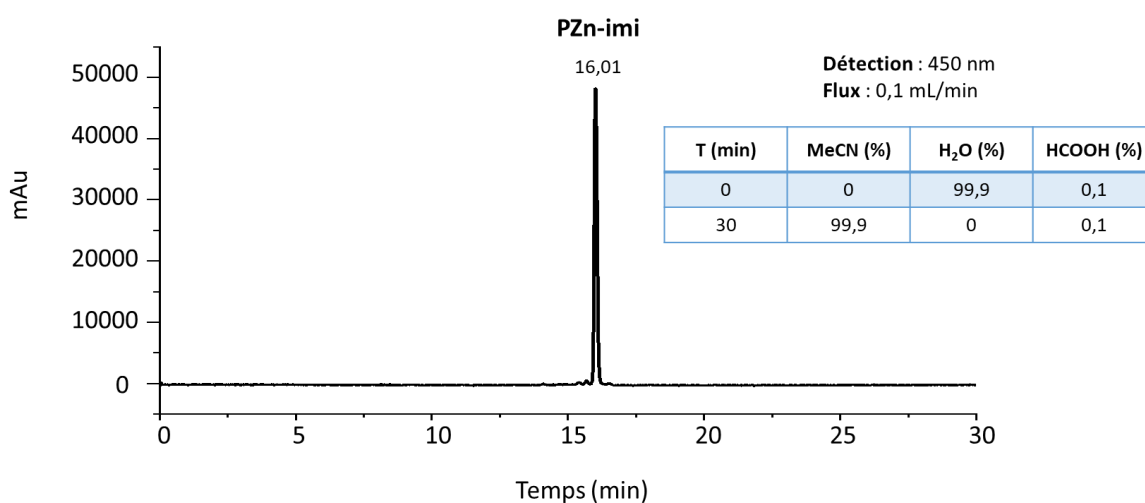


Figure 158. Chromatogramme obtenu par HPLC analytique pour **PZn-imi** et conditions d'élution utilisées.

1.2 Spectres d'absorption UV-visible et propriétés photophysiques de **PH₂-imi** et **PZn-imi**

1.2.1 Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption des porphyrines **PH₂-imi** et **PZn-imi** dans le DMSO et dans le PBS sont présentés **Figure 159**.

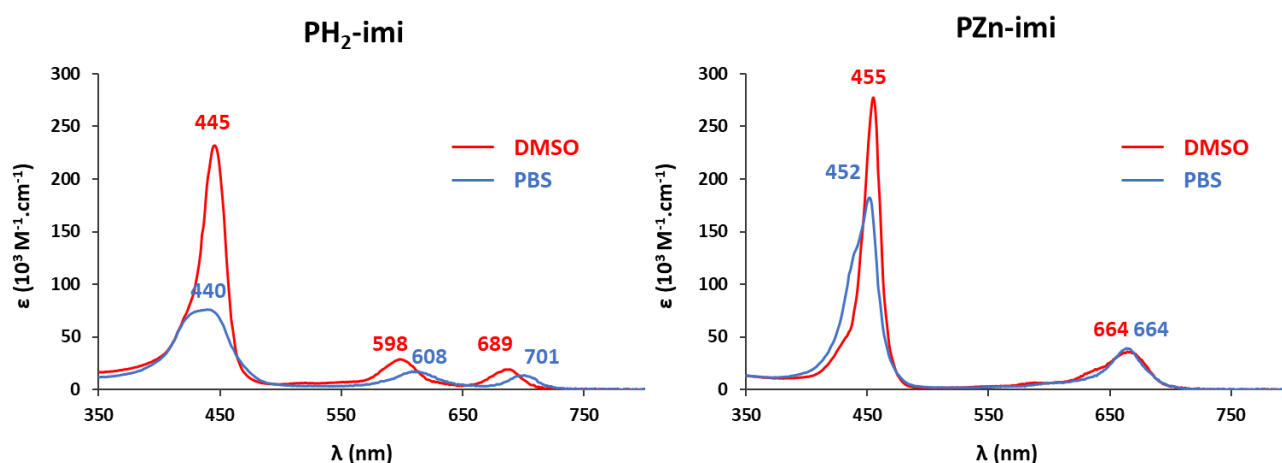


Figure 159. Spectres d'absorption des composés **PH₂-imi** et **PZn-imi** dans le DMSO et dans le PBS à une concentration de 1 µM.

Le spectre d'absorption de la porphyrine base libre **PH₂-imi** dans le DMSO présente une bande de Soret à 445 nm ainsi que deux bandes à 598 nm et 689 nm. Des déplacements bathochromes des bandes Q de 10 nm et 12 nm sont observés sur le spectre mesuré dans le PBS. Un élargissement ainsi qu'une forte diminution de l'intensité de la bande de Soret, passant de 233 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans le DMSO à 76 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans le PBS, sont également observés. Ces données suggèrent un phénomène d'agrégation de la porphyrine **PH₂-imi** en milieu aqueux.

Ce phénomène d'agrégation est moins prononcé pour **PZn-imi** dans la région de Soret, située aux alentours de 455 nm dans les deux solvants. Les spectres d'absorption de la porphyrine métallée présentent une bande Q située à 664 nm de coefficient d'extinction molaire 38 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans le DMSO et 39 000 M⁻¹.cm⁻¹ dans l'eau. Les données d'absorption sont résumées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15. Maxima des bandes d'absorption et coefficients d'extinction molaire des composés **PH₂-imi** et **PZn-imi**.

Composés	Solvants	λ_{\max} /nm (ϵ / M ⁻¹ .cm ⁻¹) Région de Soret	λ_{\max} /nm (ϵ / M ⁻¹ .cm ⁻¹) Bandes Q
PH₂-imi	DMSO	445 (233 000)	598 (29 000), 689 (19 000)
	PBS	440 (76 000)	608 (18 000), 701 (14 000)
PZn-imi	DMSO	455 (278 000)	664 (38 000)
	PBS	452 (182 000)	664 (39 000)

1.2.2 Propriétés d'émission des composés **PH₂-imi** et **PZn-imi**

Les spectres d'émission de **PH₂-imi** et **PZn-imi** ont été mesurés dans le DMSO et H₂O par le Dr. Barbara Ventura après excitation à 465 nm (**Figure 160**).

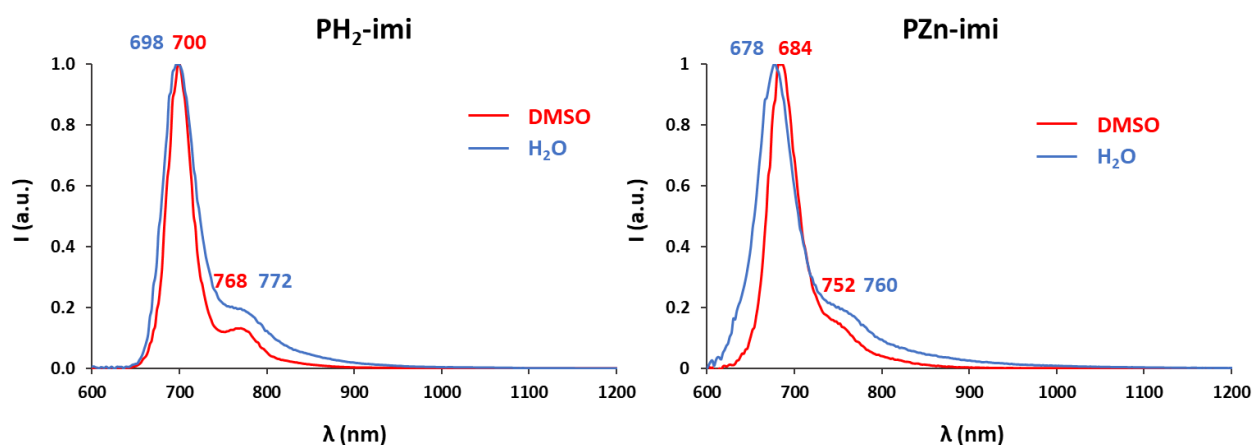


Figure 160. Spectre d'émission des composés **PH₂-imi** et **PZn-imi** dans le DMSO et H₂O.

Les longueurs d'onde des maxima de la bande la plus intense sont peu affectées par le solvant. Les données de luminescence des composés sont reportées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16. Données de luminescence de **PH₂-imi** et **PZn-imi**.

Composés	Solvants	λ_{em} (nm)	Φ_{fl}	τ (ns)
PH₂-imi	DMSO	700, 768	0,23	6,0
	H ₂ O	698, 772 sh	0,012	1,0 (60 %) ; 5,3 (40 %)
PZn-imi	DMSO	684, 752 sh	0,15	1,4
	H ₂ O	678, 760 sh	$3,5 \times 10^{-3}$	$\leq 0,2$ (40 %) ; 1,0 (60 %)

Les rendements quantiques de fluorescence déterminés dans H₂O sont plus faibles que ceux obtenus dans le DMSO, indiquant un phénomène d'agrégation en milieu aqueux qui se traduit par une décroissance biexponentielle de la fluorescence des deux PS. Ces résultats sont en accord avec l'élargissement des bandes de Soret observé sur les spectres d'absorption des porphyrines **PH₂-imi** et **PZn-imi** caractéristique de l'agrégation.

La durée de vie de fluorescence de la porphyrine base libre **PH₂-imi** ($\tau = 6$ ns) est semblable à celle mesurée pour **PS₂** ($\tau = 5,7$ ns) dans le DMSO et bien inférieure à celle mesurée pour la porphyrine H₂TPP utilisée comme référence ($\tau = 16$ ns dans le benzène).²¹¹ En revanche, le temps de vie de fluorescence du PS métallé **PZn-imi** dans le DMSO ($\tau = 1,4$ ns) est proche de celui déterminé pour la porphyrine ZnTPP dans le benzène ($\tau = 1,8$ ns).²¹¹

1.2.3 Rendements quantiques de production d'oxygène singulet

Les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des porphyrines **PZn-imi** et **PH₂-imi** dans le DMSO ont été déterminés par le Dr. Barbara Ventura en utilisant la méthode indirecte décrite au chapitre II.6.3. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17. Rendements quantiques de formation d'oxygène singulet dans le DMSO.

Composés	Solvants	Φ_{Δ}
PH₂-imi	DMSO	0,60
PZn-imi	DMSO	0,73

Le rendement quantique de formation d'oxygène singulet de la porphyrine métallée ($\Phi_{\Delta} = 0,73$) est supérieur à celui de la porphyrine base libre ($\Phi_{\Delta} = 0,60$), tandis que le rendement quantique de fluorescence de **PH₂-imi** ($\Phi_{fl} = 0,23$) est supérieur à celui de **PZn-imi** ($\Phi_{fl} = 0,15$). La coordination de l'ion Zn²⁺ permet d'augmenter la production d'oxygène singulet en favorisant le croisement intersystème par effet d'atome lourd mais diminue le rendement de fluorescence de la molécule.²³²

1.2.4 Etudes théoriques par calculs TD-DFT

Des études théoriques concernant les porphyrines cationiques **PH₂-imi** et **PZn-imi** ont été réalisées par le Dr. Christophe Gourlaouen.

1.2.4.1 Porphyrine **PH₂-imi**

Deux conformères **I₁** et **I₂** de la porphyrine **PH₂-imi** ont été modélisés et étudiés. Les chaînes triéthylène glycol ont été remplacées par des groupes méthoxy. Le conformère **I₁** possède les deux unités imidazolium dans le même plan que la porphyrine tandis que pour le conformère **I₂**, le plan de l'un des imidazolium est orthogonal au plan de la porphyrine (**Figure 161**).

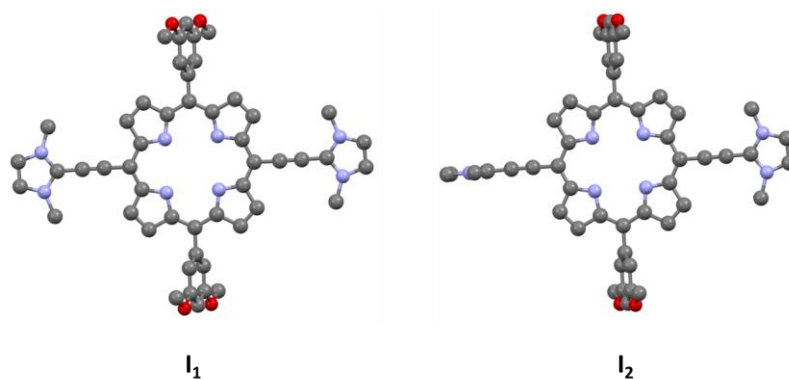


Figure 161. Structures simulées des conformères **I₁** et **I₂**.

Le spectre d'absorption expérimental de **PH₂-imi** ainsi que la simulation des spectres d'absorption des conformères **I₁** et **I₂** dans le DMSO sont reportés **Figure 162**. La conformation a un effet important sur la bande Q située aux plus grandes longueurs d'onde. Un déplacement hypsochrome théorique du maximum de cette bande de 39 nm est observé pour **I₂** par rapport à **I₁**. En revanche, ce changement de conformation a un impact très faible sur la bande Q la plus énergétique et la bande de Soret.

Le spectre d'absorption expérimental de **PH₂-imi** est plus proche du spectre d'absorption théorique de **I₁** qui correspond à une conformation de la molécule où les unités imidazolium sont situées dans le plan de la porphyrine.

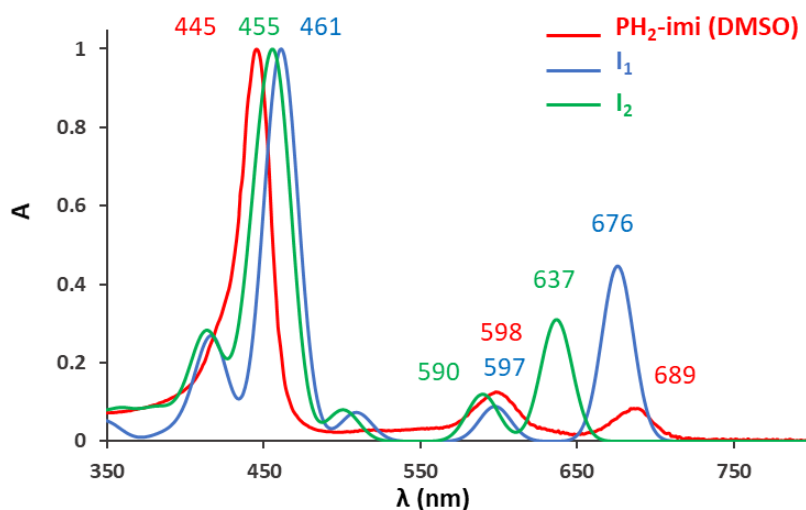


Figure 162. Spectres d'absorption normalisés expérimental de **PH₂-imi** et théoriques des conformères **I₁** et **I₂**.

1.2.4.2 Porphyrine **PZn-imi**

Le conformère **I₃** de la porphyrine **PZn-imi** a été modélisé et comporte les fragments imidazolium dans le même plan que la porphyrine (**Figure 163**).

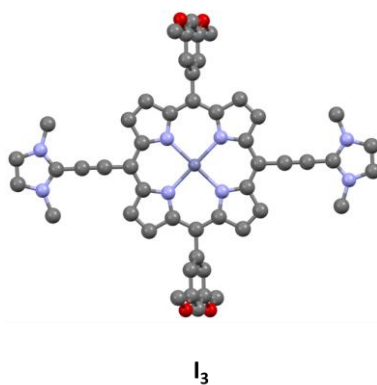


Figure 163. Structure simulée du conformère **I₃**.

Le spectre d'absorption expérimental ainsi que le spectre théorique de **I₃** dans le DMSO sont reportés **Figure 164**. Le spectre d'absorption simulé du conformère **I₃** est proche de celui obtenu expérimentalement dans le DMSO et les bandes de Soret sont très similaires. Le maximum de la bande Q la moins énergétique du conformère **I₃** est située à 653 nm et celle du spectre expérimental est située à 665 nm.

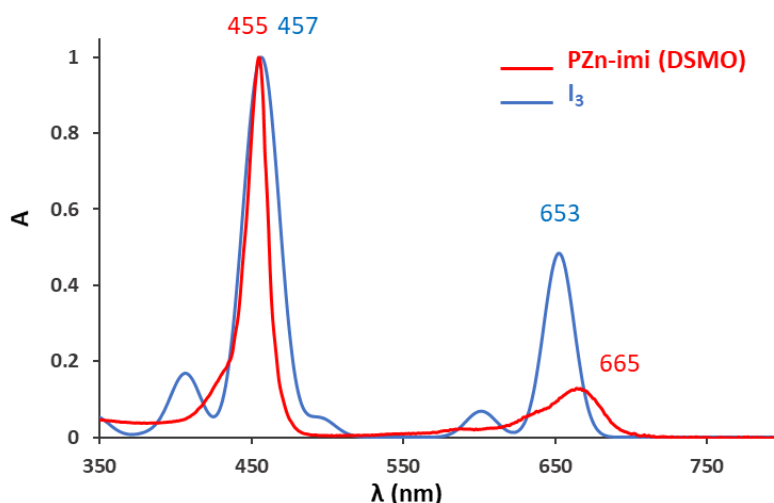


Figure 164. Spectres d'absorption normalisés expérimental de **PZn-imi** et théorique du conformère **I₃**.

1.2.4.3 Orbitales frontières et transitions électroniques

La nature des orbitales frontières HOMO et LUMO des conformères **I₁**, **I₂** et **I₃** a été déterminée (**Figure 165**). Le déplacement hypsochrome de la bande Q la moins énergétique sur le spectre d'absorption du conformère **I₂** de **PH₂-imi** par rapport au conformère **I₁** provient de l'accroissement de l'écart énergétique entre la HOMO et la LUMO. En effet, lorsque l'un des imidazolium est orthogonal à la porphyrine, une stabilisation de la HOMO et une déstabilisation de la LUMO sont observées.

La complexation du métal par la porphyrine entraîne une déstabilisation de la HOMO et de la LUMO de **I₃** par rapport au conformère **I₁** de la porphyrine base libre à géométrie équivalente.

Pour les trois conformères, on constate que les transitions énergétiques sont de nature $\pi \rightarrow \pi^*$ principalement localisées sur la porphyrine et que les unités imidazolium sont faiblement impliquées dans ces dernières.

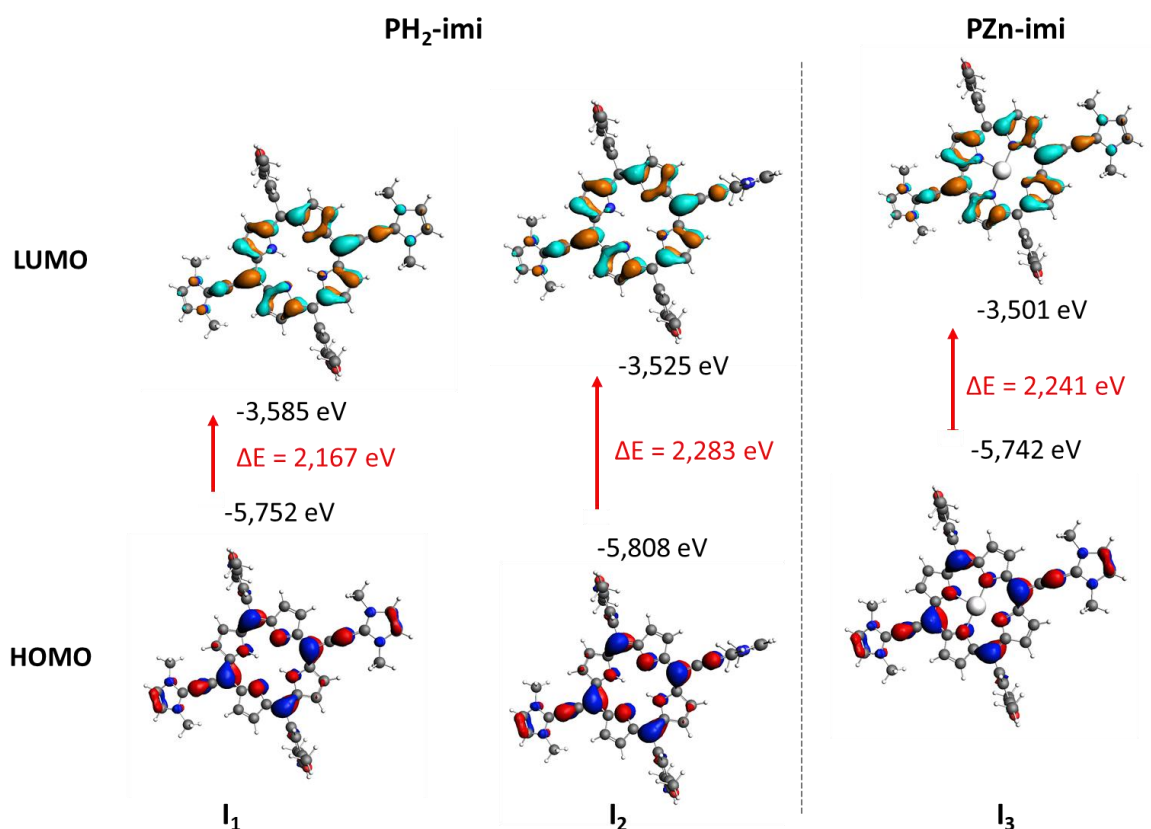


Figure 165. Energies des orbitales frontières HOMO et LUMO des conformères I_1 et I_2 de **PH₂-imi** et I_3 de **PZn-imi**.

1.3 Etudes biologiques des PS cationiques

Ces études antibactériennes ont été réalisées sur *S. aureus* et *E. coli* uniquement en lumière blanche par manque de temps et seront complétées par des études par irradiation dans le proche IR.

1.3.1 Activité antibactérienne des PS PH₂-imi et PZn-imi sur *S. aureus*

L'évaluation de l'activité bactéricide des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** sur *S. aureus* a été évaluée dans l'obscurité et à la suite d'une irradiation par une lumière blanche de fluence 4,3 J.cm⁻². Les conditions expérimentales utilisées sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe III.3.1.3 et les résultats obtenus sont présentés **Figure 166**.

La mort bactérienne induite par chaque PS en l'absence de lumière est négligeable car moins de 15 % des bactéries sont éliminées à la concentration de 5 μM.

A la suite d'une irradiation par une lumière blanche, la porphyrine base libre **PH₂-imi** entraîne une réduction de la viabilité de *S. aureus* de 1,3 log à une concentration de 1 μM, 1,7 log à 2,5 μM et 2,5

log à 5 μM . La porphyrine métallée **PZn-imi** s'avère plus photoactive car elle élimine respectivement 1,5 log et 1,9 log des bactéries initiales à 1 et 2,5 μM . A la concentration de 5 μM , la CMB est atteinte car une réduction de 3 log de la viabilité bactérienne est observée. Cette plus forte photoactivité de **PZn-imi** est probablement liée à sa capacité à générer davantage d'oxygène singulet ($\Phi_{\Delta} = 0,73$ dans le DMSO) que le PS **PH₂-imi** ($\Phi_{\Delta} = 0,60$).

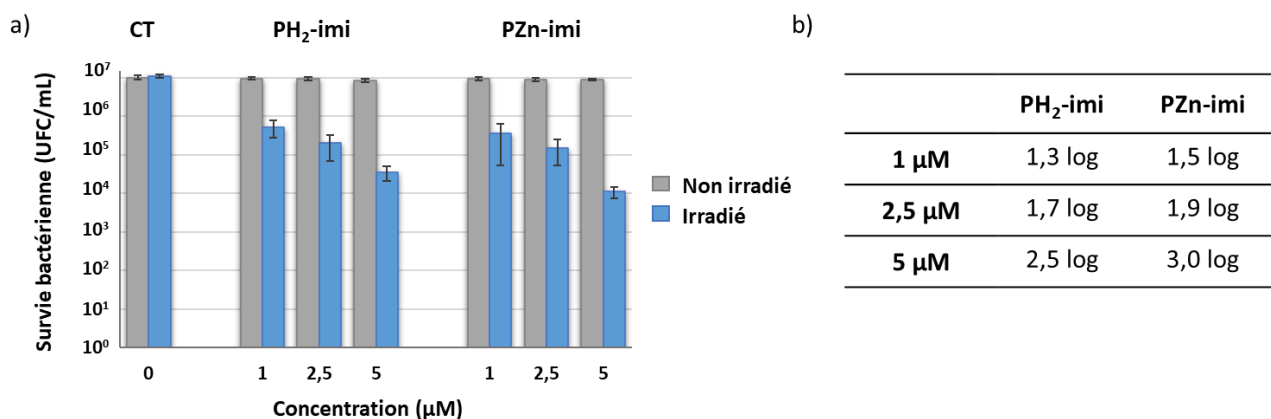


Figure 166. a) Survie de *S. aureus* en présence de **PH₂-imi** ou **PZn-imi** à différentes concentrations, en l'absence de lumière ou à la suite d'une irradiation en lumière blanche (4,3 J.cm⁻²).
b) Photoinactivation de *S. aureus* induite par les PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** en fonction de la concentration.

Néanmoins, l'effet photobactéricide des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** est beaucoup plus faible que celui observé pour les conjugués porphyrine-peptide **PS₁-PGLa** (paragraphe III.3.1.3) et **PS₂-PGLa** (paragraphe III.4.1.2) qui entraînent une photoéradication totale des bactéries à 5 μM dans les mêmes conditions expérimentales.

1.3.2 Activité antibactérienne des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** sur *E. coli*

Des tests identiques ont été réalisés sur *E. coli* et les résultats obtenus sont présentés **Figure 167**. Les PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** n'exercent aucune activité dans le noir aux différentes concentrations testées et présentent une photoactivité négligeable à la suite d'une irradiation par des DEL blanches (4,3 J. cm⁻²). En effet, une très faible réduction de la viabilité de *E. coli* de 0,04 log est induite par **PH₂-imi** à 5 μM . A cette même concentration, le PS **PZn-imi** entraîne une diminution de la survie bactérienne de 0,07 log.

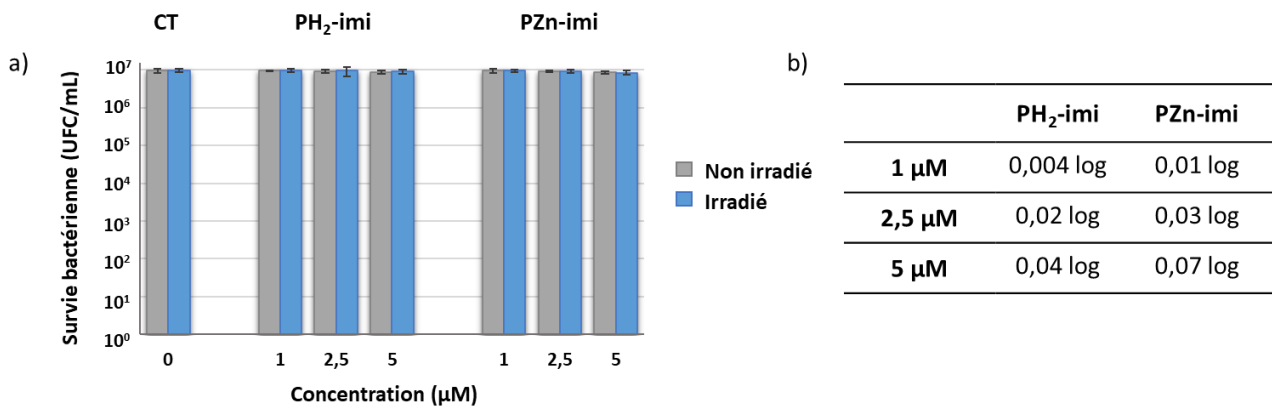


Figure 167. a) Survie de *E. coli* en présence de PH₂-imi ou PZn-imi à différentes concentrations, en l'absence de lumière ou à la suite d'une irradiation en lumière blanche (4,3 J.cm⁻²)
 b) Photoinactivation de *E. coli* induite par PH₂-imi et PZn-imi en fonction de la concentration.

Dans les mêmes conditions d'irradiation et à une concentration de 5 μM, PS₁-PGLa permet de réduire la viabilité de *E. coli* de 1,1 log et PS₂-PGLa diminue entraîne la mort de 4,2 log des bactéries, confirmant la plus forte photoactivité des conjugués porphyrine-peptide.

1.3.3 Affinité des PS PH₂-imi et PZn-imi vis-à-vis des bactéries *E. coli*

Pour comprendre le faible effet photobactéricide des PS PZn-imi et PH₂-imi vis-à-vis de *E. coli*, l'évaluation de leur affinité pour ces bactéries a été effectuée par spectroscopie UV-visible selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre III.6.1. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 168**.

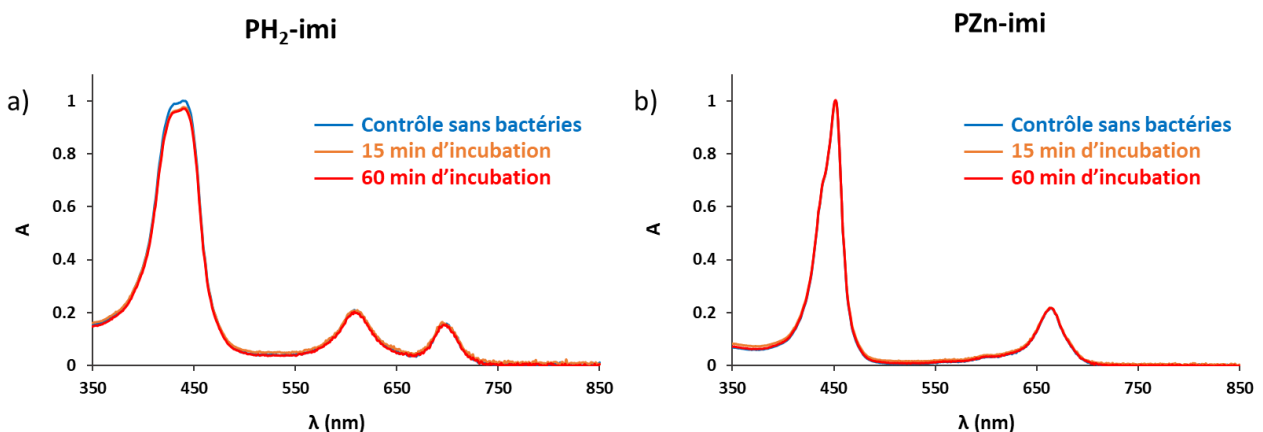


Figure 168. Absorption UV-visible normalisée des PS PH₂-imi et PZn-imi (C = 5 μM) après 15 min ou 60 min d'incubation en présence de *E. coli*.

Il n'y a pas de variation de l'absorption entre le surnageant de **PZn-imi** obtenu en l'absence des bactéries et celui obtenu après 15 min ou 60 min d'incubation en présence de *E. coli*. Une différence négligeable est observée pour **PH₂-imi** car une diminution de 3 % du maximum d'absorption de la bande de Soret est observé après 60 min d'incubation en présence des bactéries. Contrairement aux résultats observés pour les conjugués porphyrine-peptide, le taux d'association des PS cationiques **PZn-imi** et **PH₂-imi** avec les membranes anioniques de *E. coli* est nul. Les PS cationiques bis-imidazolium ne semblent donc pas interagir avec les bactéries. Ces résultats peuvent expliquer l'absence de photoactivité observée pour **PZn-imi** et **PH₂-imi** vis-à-vis de *E. coli* lors des tests aPDT.

1.3.4 Evaluation de l'activité bactériostatique des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi**

Afin d'évaluer les propriétés bactériostatiques des PS **PZn-imi** et **PH₂-imi** sur *E. coli*, des tests d'inhibition de croissance bactérienne ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe III.7. Aucune activité des PS n'est observée après 20 h d'incubation en présence des bactéries aux concentrations de 1,25, 2,5, 5 et 10 µM. Les porphyrines cationiques **PZn-imi** et **PH₂-imi** n'exercent pas d'activité d'inhibition de croissance de *E. coli* à ces concentrations.

2 Photosensibilisateurs métallés au palladium(II)

Un paramètre clef pour l'aPDT en milieu oxygéné est la production d'oxygène singulet à partir de l'état excité triplet du PS. La présence d'atome lourd au sein d'une molécule peut favoriser le croisement intersystème permettant d'atteindre cet état excité triplet. Notre choix s'est porté sur le palladium(II) car la coordination de ce métal par les porphyrines induit des rendements quantiques de production d'oxygène singulet élevés.¹¹⁵ De plus, la géométrie plan-carrée adoptée par le complexe confère une grande stabilité au palladium(II). Nous avons envisagé la synthèse de conjugués PS-AMP dont la porphyrine est métallée au palladium(II) (**Figure 169**).

Contrairement aux porphyrines de zinc(II), les porphyrines de palladium(II) ne sont pas démétallées en conditions acides. Cela représente un atout majeur lors de la synthèse du conjugué car la porphyrine resterait métallée lors du clivage de la résine réalisé en présence de TFA.

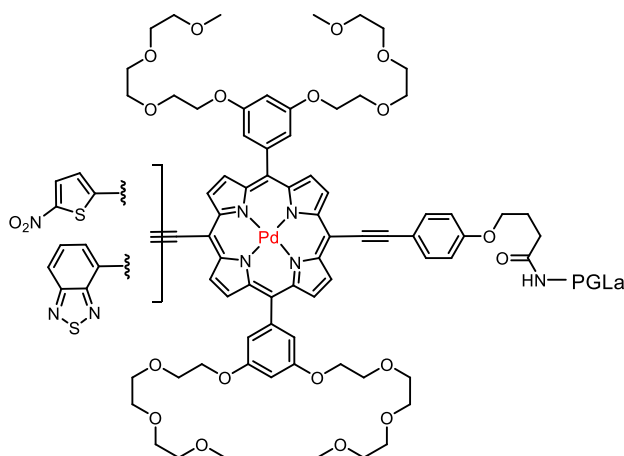


Figure 169. Structure des conjugués porphyrine-peptide métallés au palladium(II) envisagés.

2.1 Métallation au Pd(II) de la porphyrine base libre **5**

La métallation du synthon porphyrine **5** a dans un premier temps été envisagée afin de le fonctionnaliser ensuite selon la même stratégie de synthèse que celle utilisée dans le chapitre II (**Figure 170**).

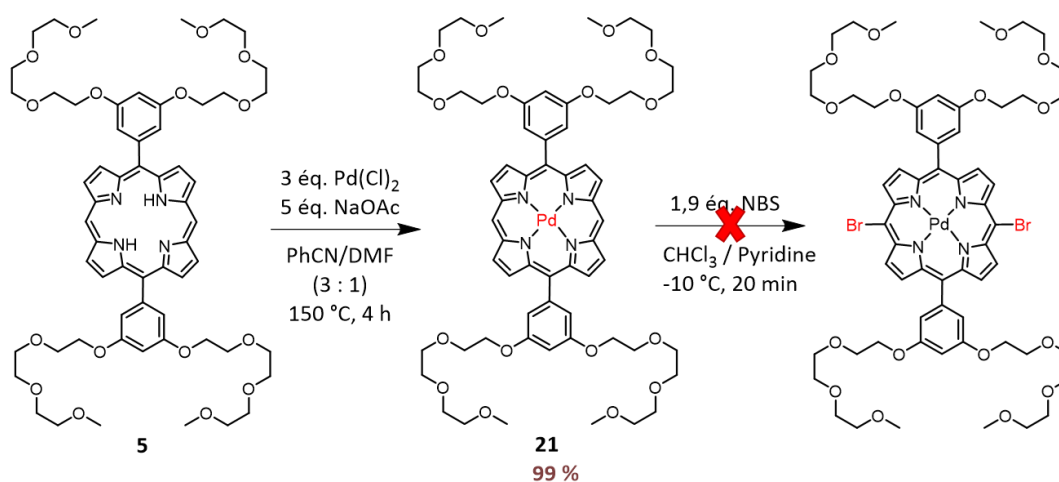


Figure 170. Synthèse de la porphyrine métallée au palladium(II) **21** et tentative de bromation.

La porphyrine **5** a été métallée par 3 éq. de chlorure de palladium(II) en présence de 5 éq. d'acétate de sodium dans un mélange PhCN/DMF (3 : 1) pendant 4 h à 150 °C.²³³ Après l'évaporation des solvants, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice et obtenu quasi quantitativement. La bromation des positions *meso* a ensuite été envisagée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre II.4.4.1. Le spectre RMN ¹H du composé obtenu après purification par chromatographie sur colonne de silice présente de nombreux doublets dans la

région des protons pyrroliques, indiquant la présence de plusieurs porphyrines. Une bromation des positions β -pyrroliques peut être supposée malgré la présence d'un léger défaut de 1,9 éq. de NBS. La modification de la réactivité de la porphyrine de Pd(II) par rapport à la porphyrine de Zn(II) peut expliquer le manque de sélectivité lors de l'étape de bromation.

2.2 Métallation au Pd(II) de la porphyrine base libre bis-éthynyle protégés **23**

L'étape de bromation de la porphyrine de Pd(II) étant compliquée et nécessitant de nombreux ajustements, la métallation de la porphyrine bis-éthynyle protégés par des groupes TIPS a été réalisée (**Figure 171**).

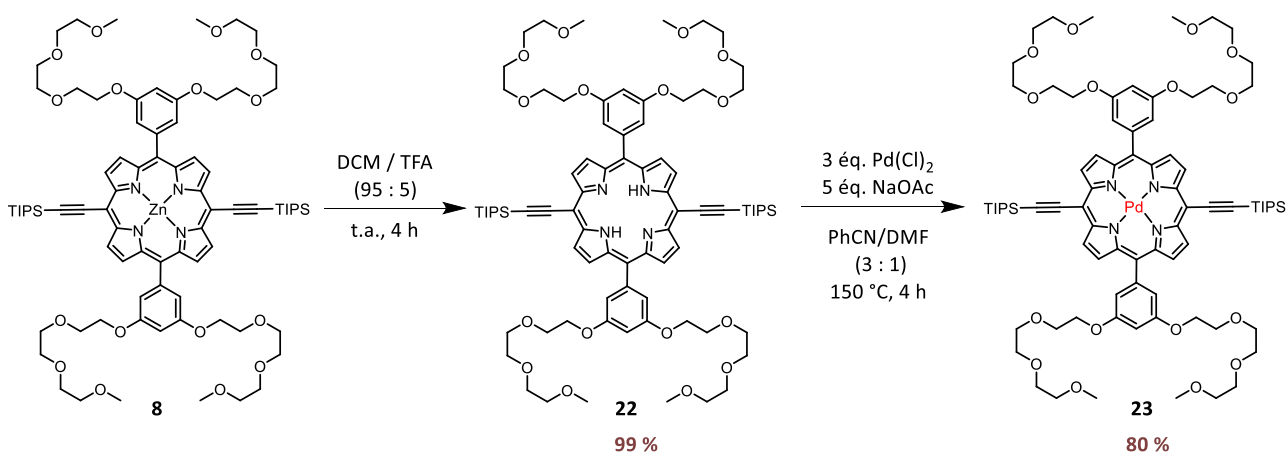
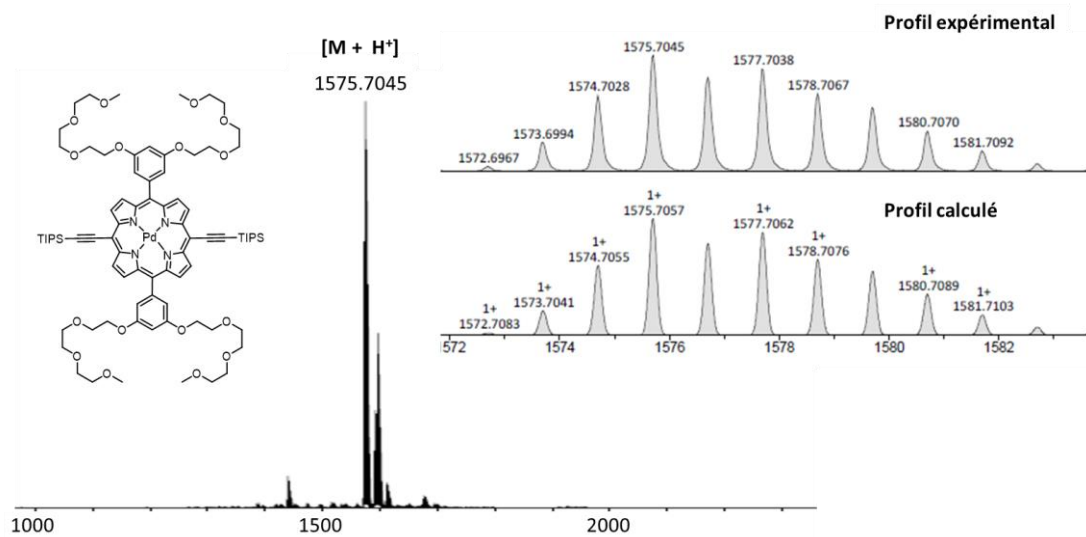
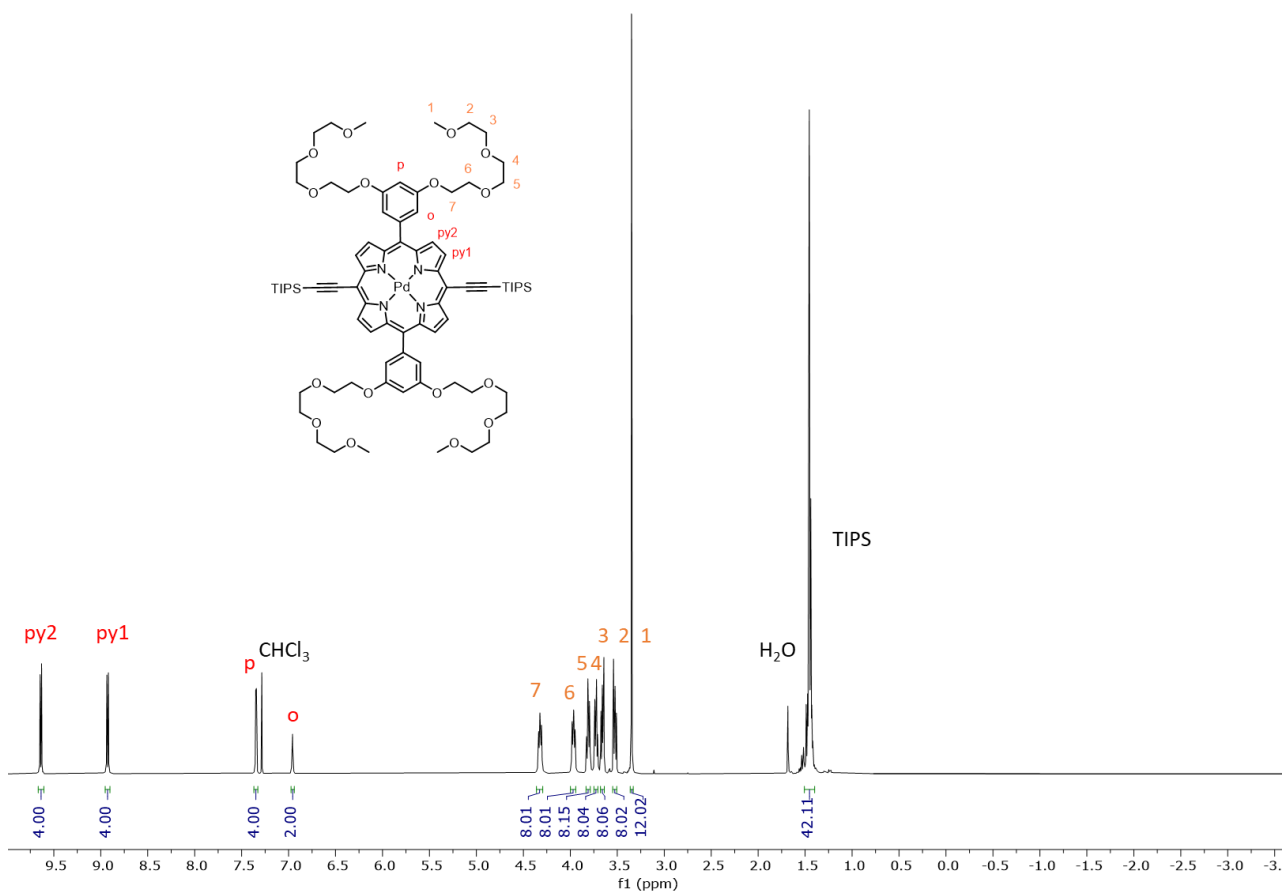


Figure 171. Synthèse de la porphyrine métallée au palladium(II) **23**.

La porphyrine de Zn(II) **8** est tout d'abord démétallée dans du DCM en présence de 5 % de TFA pendant 4 h puis isolée par filtration sur silice. La porphyrine **22** est ensuite métallée par 3 éq. de chlorure de Pd(II) dans les conditions décrites au paragraphe IV.2.2.1. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, la porphyrine **23** est obtenue avec 80 % de rendement. Elle a été caractérisée par spectroscopie RMN ¹H (**Figure 172**), spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse HR ESI-MS (**Figure 173**). L'absence du signal des protons NH sur le spectre RMN ¹H indique que la porphyrine est métallée. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution confirme la complexation au Pd(II) de **23**. Le profil isotopique de l'espèce moléculaire ionique [M + H⁺] à 1575,7045 correspond au profil théorique calculé.



2.3 Déprotection des groupes protecteurs TIPS de la porphyrine **23**

2.3.1 Déprotection statistique des alcynes protégés

La déprotection statistique des fonctions alcynes protégées de **23** nécessaire pour introduire successivement l'espaceur et le groupement électroattracteur a été mise au point (**Figure 174**).

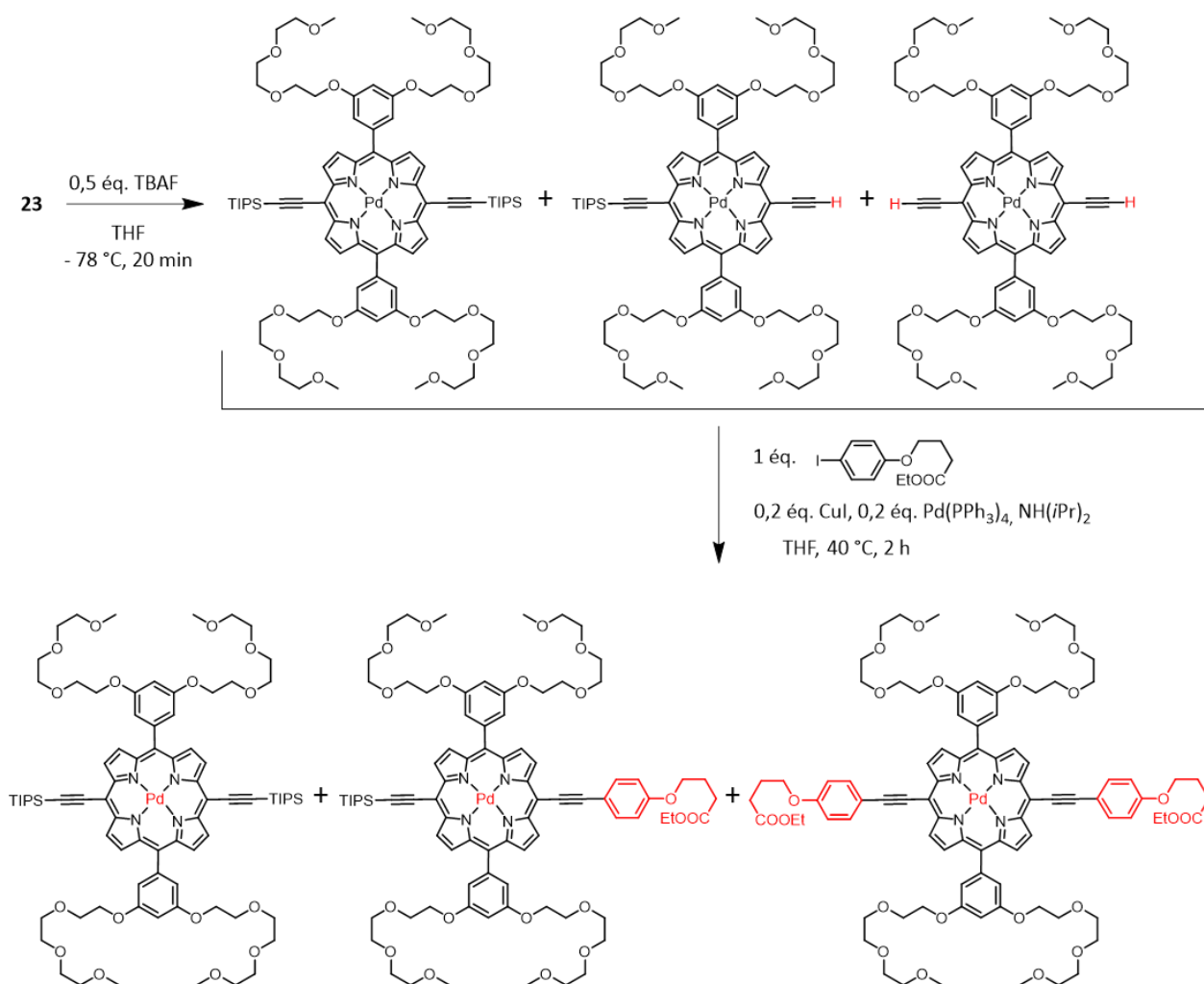


Figure 174. Déprotection de **23** et synthèse des porphyrines mono- et bi-substituées.

L'utilisation de 0,3 éq. de TBAF dans du THF à température ambiante conduit à la déprotection quasi-instantanée des deux fonctions alcynes. Un abaissement de la température à -78 °C permet un meilleur contrôle de la cinétique de la réaction. L'ajout successif de petite quantité de TBAF à hauteur de 0,1 éq. jusqu'à un total de 0,5 éq. permet d'obtenir un ratio de porphyrine mono-déprotégée satisfaisant (environ 40 %). Néanmoins, la purification par chromatographie sur colonne de silice est difficile car les porphyrines mono- et bi-déprotégées sont peu stables et se dégradent

rapidement à l'air. Une alternative consiste à ne pas purifier le mélange de porphyrines obtenu à cette étape et de réaliser un couplage de Sonogashira. La réaction avec 1 éq. de l'espaceur **10** en présence des catalyseurs CuI et Pd(PPh₃)₄ conduit à la formation des porphyrines mono- et bi-substituées. Les porphyrines sont néanmoins très difficiles à séparer à la suite de ce couplage et les diverses tentatives de chromatographie sur colonne de silice se sont avérées infructueuses.

2.3.2 Déprotection totale des alcynes protégés

Il est également intéressant de déprotéger les deux groupes TIPS afin de synthétiser des porphyrines bi-fonctionnalisées par le même substituant. La déprotection totale des alcynes s'effectue avec 1 éq. de TBAF dans du THF à température ambiante (**Figure 175**).

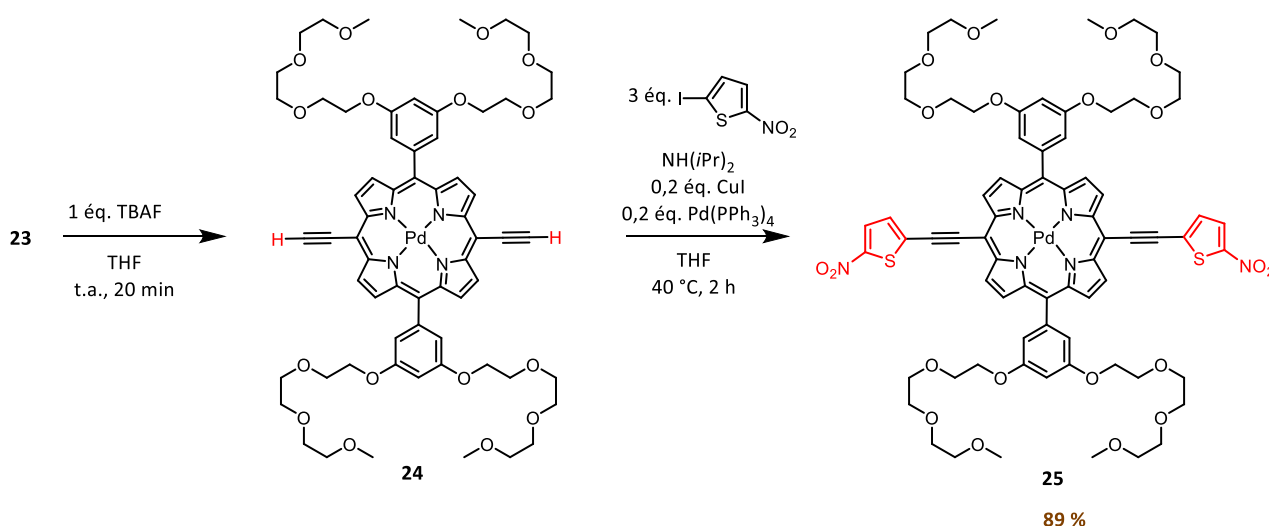


Figure 175. Déprotection totale de **23** et synthèse de la porphyrine bis-nitro-thiophène **25**.

La porphyrine déprotégée **24** est très instable à l'air et à la lumière. Une importante proportion du produit se dégrade sur colonne de silice même lorsque cette dernière est protégée de la lumière. Afin d'éviter toute perte inutile, il est préférable de ne pas l'isoler à la suite de la réaction de déprotection et de l'engager directement pour une réaction de couplage de Sonogashira dans un volume réduit de THF après dégazage du milieu réactionnel. La porphyrine bis-nitro-thiophène **25** a ainsi pu être synthétisée selon ce protocole avec 89 % de rendement après purification par chromatographie sur colonne de silice.

Cette synthèse peut s'avérer efficace pour obtenir une porphyrine de Pd(II) bis-imidazolium afin de comparer ses propriétés photophysiques ainsi que son activité biologique avec les analogues **PZn-imi** et **PH₂-imi**.

2.4 Métallation des porphyrines fonctionnalisées

A la suite des problèmes de purification rencontrés lors de la déprotection sélective des alcynes, une autre stratégie de synthèse a été exploitée. Les porphyrines fonctionnalisées **11**, **13** et **16** ont été démétaillées puis des tests de complexation au Pd(II) ont été réalisés (**Figure 176**).

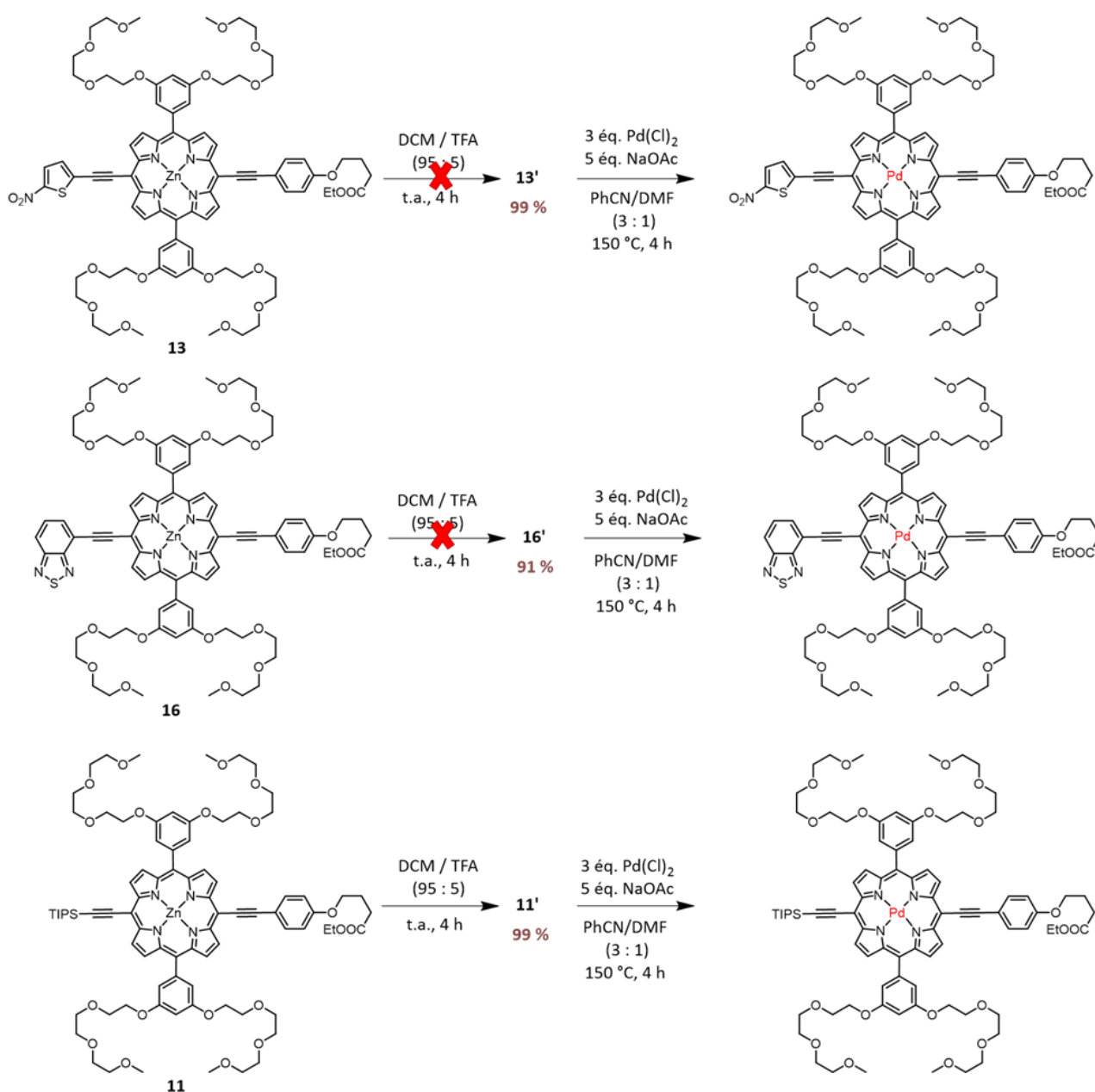


Figure 176. Tentatives de métallation au palladium(II) des porphyrines **13'** et **16'** et métallation de la porphyrine **11'**.

La métallation des porphyrines au Pd(II) composées de l'espaceur **10** et du synthon nitro-thiophène **12** ou du synthon BTD **15** s'est avérée infructueuse car d'importantes dégradations des produits sont observées au cours de la réaction.

La métallation de la porphyrine **11'** a pu être réalisée dans les conditions décrites précédemment. Par manque de temps, nous n'avons cependant pas pu l'isoler et la caractériser.

3 Conclusion

La synthèse, la caractérisation ainsi que les études théoriques et biologiques de deux nouveaux PS cationiques **PH₂-imi** et **PZn-imi** ont été réalisées. Ces composés hydrosolubles sont constitués d'une porphyrine bis-éthynyle fonctionnalisée par deux unités imidazolium. Les principales propriétés caractérisant leur potentiel pour l'aPDT ainsi que les résultats obtenus sur *S. aureus* sont présentés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des PS **PH₂-imi** et **PZn-imi** et activité antibactérienne sur *S. aureus*.

Composés	λ_{\max} /nm (ϵ / M ⁻¹ .cm ⁻¹) (PBS)	Φ_{fl} (DMSO)	Φ_{Δ} (DMSO)	Réduction de la viabilité de <i>S. aureus</i> (4,3 J.cm ⁻² ; C = 5 μ M)
PH₂-imi	440 (76 000) 701 (14 000)	0,23	0,60	2,5 log
PZn-imi	452 (182 000) 664 (39 000)	0,15	0,73	3 log

Les premiers tests antibactériens effectués sur *S. aureus* ont été réalisés par irradiation en lumière blanche. Une photoactivité intéressante a été obtenue à faible fluence (4,3 J.cm⁻²) pour le composé **PZn-imi** car la CMB est atteinte à 5 μ M lorsque le PS est irradié par des DEL blanches. Le PS **PH₂-imi** s'avère moins photoactif à cette concentration mais permet toutefois d'éliminer 2,5 log des bactéries initiales. En l'absence de lumière, aucune activité n'est observée. Des tests antibactériens par irradiation dans le proche IR seront réalisés.

Ces PS ne présentent néanmoins aucune activité photobactéricide sur *E. coli* aux conditions testées. L'absence d'interactions avec ces bactéries semblent être une des raisons du manque d'efficacité observé. En effet, **PZn-imi** et **PH₂-imi** ne semblent pas avoir d'affinité pour les membranes bactérienne de *E. coli* d'après les études menées par spectroscopie UV-visible.

Les PS **PZn-imi** et **PH₂-imi** constituent ainsi de bons candidats pour l'éradication de bactéries à Gram

positif mais leur photoactivité sur des bactéries à Gram négatif reste à démontrer. Des études sur les kératinocytes seront réalisées afin d'évaluer la toxicité et la phototoxicité de ces composés sur ces cellules eucaryotes.

D'autre part, la synthèse de plusieurs porphyrines métallées au palladium(II) a également été réalisée. L'obtention de la porphyrine **23** dont les deux unités alcynes sont protégées est intéressante car elle peut être utilisée comme précurseur pour la synthèse de PS bi-fonctionnalisés. La déprotection statistique de l'une des deux fonctions éthynyle peut être réalisée mais la purification est délicate car le produit se dégrade rapidement. Une réaction de couplage de Sonogashira peut néanmoins être effectuée sur le mélange de porphyrines obtenues à la suite de la déprotection mais les conditions de purification des produits sont à optimiser.

Ces résultats partiels et préliminaires permettent d'ouvrir la voie à la synthèse de nouvelles porphyrines bis-éthynyle métallées au palladium(II) dont les rendements de production d'oxygène singulet seront déterminés afin d'évaluer leur potentiel pour l'aPDT.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de mon travail de thèse j'ai effectué la synthèse, les études physicochimiques et les études biologiques de nouveaux conjugués associant un PS et un peptide antimicrobien pour l'aPDT par excitation dans le proche-IR.

La synthèse organique multi-étapes de type convergent des trois conjugués porphyrine-peptide **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** a été réalisée. Ces conjugués associent un PS porphyrinique fonctionnalisé au système aromatique π étendu à un peptide antimicrobien, le **PGLa** ou la **Gly-D-Ctl**. Le choix des porphyrines et des AMP s'est avéré judicieux car les propriétés escomptées ont été obtenues. En effet, les conjugués amphiphiles sont solubles dans l'eau et présentent un coefficient d'extinction molaire d'environ $20\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à des longueurs d'onde situées entre 710 nm et 720 nm, propriétés essentielles pour une excitation efficace dans la fenêtre thérapeutique optique. De plus, ils génèrent de l'oxygène singulet à hauteur de 18 % pour **PS₁-PGLa**, 42 % pour **PS₂-PGLa** et 59 % pour **PS₂-Gly-D-Ctl** dans le DMSO et présentent une émission résiduelle de fluorescence permettant des études par microscopie optique.

D'autre part, des études théoriques par calculs TD-DFT ont été réalisées sur les **PS₁** et **PS₂**. Le groupe électroattracteur nitro-thiophène de **PS₁** permet une délocalisation électronique importante, effet qui reste limité dans le cas de l'entité BTD de **PS₂**. Ces différences influent sur les niveaux énergétiques des orbitales frontières et la nature des transitions électroniques associées.

La conformation du **PGLa** en solution aqueuse a été étudiée par dichroïsme circulaire. Cette étude montre que lorsque le **PGLa** est lié à la porphyrine, un effet de pré-organisation en solution aqueuse est observé car ce dernier adopte une structure en hélice alpha. Cette conformation prédéfinie peut être favorable aux interactions électrostatiques avec les membranes bactériennes. Par ailleurs, ces études indiquent une proximité spatiale entre les porphyrines des différents conjugués car un couplage excitonique est observé dans la région de Soret. Ce constat ainsi que l'allure des bandes d'absorption laissent supposer un phénomène d'agrégation dans l'eau. Des mesures par DLS et par analyse TEM permettront d'estimer la taille et la forme de ces agrégats.

Différentes études évaluant l'activité et la photoactivité des conjugués **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** ont été menées sur des bactéries à Gram positif (*S. aureus*) et négatif (*E. coli*). Les conjugués ont montré de fortes activités photobactéricides après une courte période d'incubation de 15 min. En effet, la CMB sur *S. aureus* est atteinte à $1\ \mu\text{M}$ pour **PS₁-PGLa** et $0,5\ \mu\text{M}$ pour **PS₂-PGLa** à la suite d'une irradiation dans le proche IR ($36\text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Par ailleurs, les résultats obtenus sur *E. coli*

sont particulièrement intéressants car ces dernières sont habituellement moins sensibles aux effets de l'aPDT que les bactéries à Gram positif. Les trois conjugués exercent une forte photoactivité sur cette bactérie à Gram négatif car ils atteignent la CMB à la faible concentration de 1 μM lorsqu'ils sont irradiés à 710 nm ou 720 nm ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$). L'affinité des conjugués pour les parois bactériennes de *E. coli* a été mise en évidence par microscopie confocale et par spectroscopie UV-visible. De plus, il est important de noter qu'à la concentration de 1 μM pour laquelle la CMB est atteinte, les trois conjugués exercent une activité négligeable en l'absence d'irradiation. Par ailleurs, des tests sur des cellules eucaryotes épidermiques, les kératinocytes, ont été réalisés pour les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** et ont conduit à bons résultats confirmant leur potentiel pour l'aPDT. En effet, aucune toxicité n'a été observée à 1 μM et une très faible phototoxicité inférieure à 10 % a été obtenue à la suite d'une irradiation en lumière rouge ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), concentration à laquelle les conjugués induisent plus de 99,9 % de mortalité bactérienne. Ces études restent à réaliser sur le conjugué **PS₂-Gly-D-Ctl**.

En outre, des tests aPDT en lumière blanche ont conduit à d'excellentes activités photobactéricides des conjugués. Une photoéradication totale des bactéries *S. aureus* a été observée pour **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** à des concentrations de 5 μM et 2,5 μM respectivement. La fluence de $4,3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ utilisée lors de ces tests montre ainsi le potentiel de ces conjugués pour des traitements à faibles doses lumineuses. L'activité de **PS₂-Gly-D-Ctl** sur ces bactéries sera évaluée prochainement. Les tests réalisés sur *E. coli* en lumière blanche ($36 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) ont également conduit à de très bons résultats. A 1 μM , les conjugués **PS₁-PGLa** et **PS₂-PGLa** ont respectivement induit une diminution de la viabilité bactérienne de 3,9 log et 4,5 log, et une éradication totale des bactéries a été obtenue à 5 μM .

L'ensemble de ces résultats montrent la forte activité photobactéricide des conjugués porphyrine-peptide à la suite d'une irradiation dans le visible ou dans le proche IR. Il est intéressant de noter qu'aucune activité antibactérienne notable n'est observée de la part des photosensibilisateurs **PS₁** et **PS₂** ou des peptides **PGLa** et **Gly-D-Ctl** aux différentes concentrations testées, montrant ainsi l'intérêt de lier de façon covalente ces deux molécules.

Le conjugué **PS₂-PGLa** présente une meilleure photoactivité que ses analogues **PS₁-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** et semble donc le composé le plus prometteur pour la suite des études.

La synthèse de PS cationiques **PH₂-imi** et **PZn-imi** constitués de porphyrines fonctionnalisées par des unités imidazolium a également été réalisée. Ces molécules présentent de bons rendements quantiques de production d'oxygène singulet dans le DMSO, respectivement 0,60 pour **PH₂-imi** et 0,73 pour **PZn-imi** qui leur permettent d'être utilisés comme PS. Les premiers tests antibactériens réalisés ont montré une photoactivité intéressante des PS sur *S. aureus* à 5 µM. Une réduction de la viabilité bactérienne de 2,5 log pour **PH₂-imi** et 3 log pour **PZn-imi** a été obtenue à la suite d'une irradiation par des DEL blanches avec une faible fluence de 4,3 J.cm⁻². L'évaluation de l'activité de ces PS à la suite d'une irradiation en lumière rouge devra être réalisée.

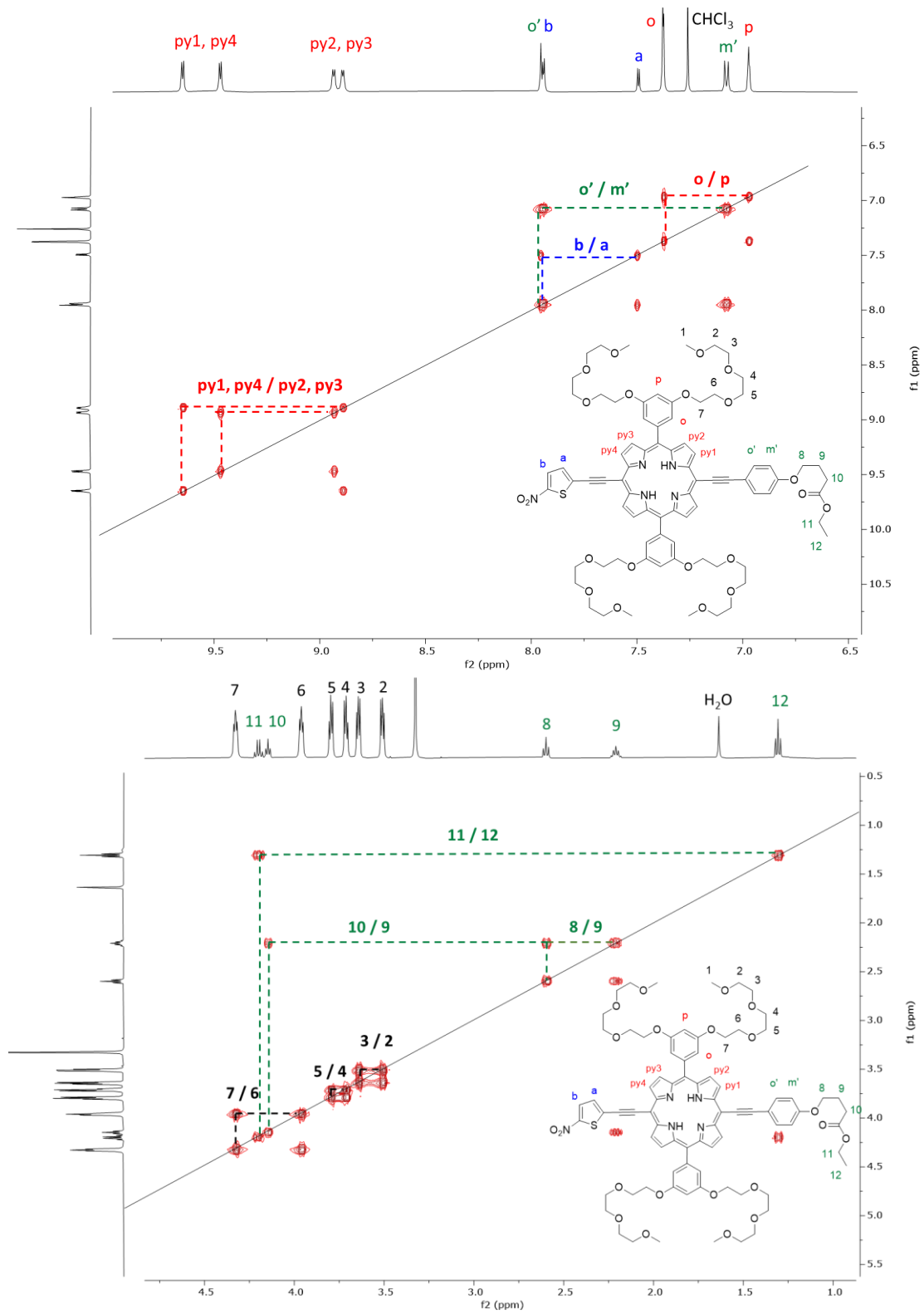
Les tests sur *E. coli* ne se sont en revanche pas montrés concluants mais d'autres conditions d'incubation et d'irradiation sont envisagées pour induire une photoactivité sur ces bactéries à Gram négatif.

Enfin, la synthèse de plusieurs porphyrines métallées au palladium(II) a été réalisée et est présentée. La porphyrine **23** bis-éthynyle protégés par des groupes TIPS et métallée au Pd(II) constitue un synthon intéressant pour le développement de futurs PS.

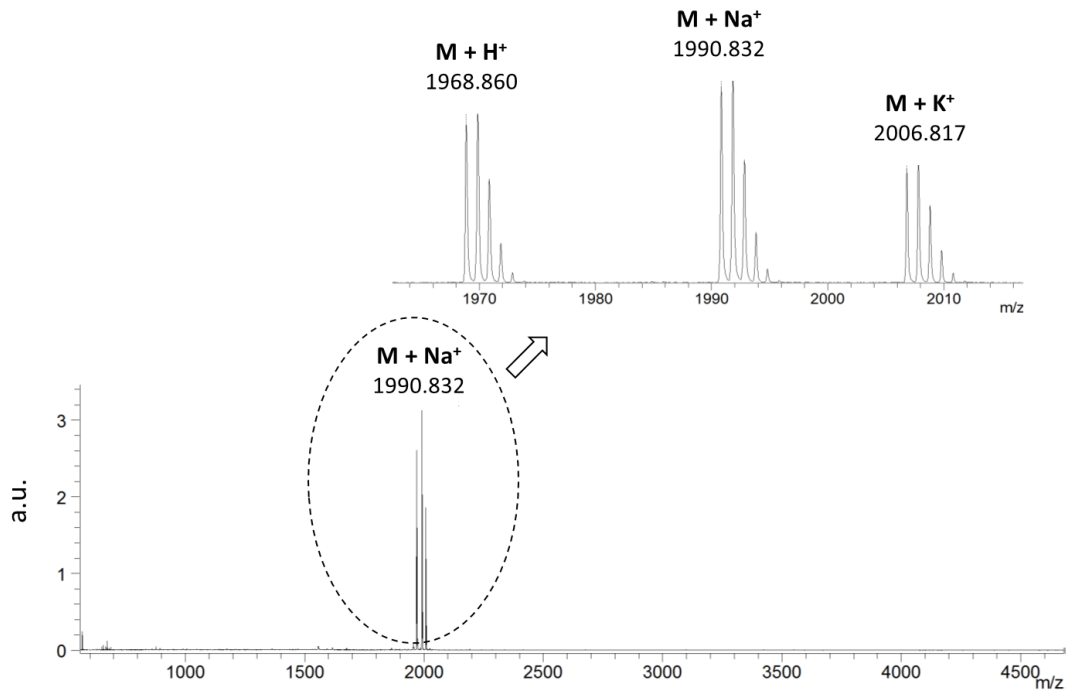
Concernant la suite de ce travail, il est prévu de réaliser des tests aPDT sur des bactéries multi-résistantes (BMR) telles que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (MRSA) et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux carbapénèmes. Ces deux types de bactéries font partie de la liste des pathogènes dont la recherche de nouveaux traitements est classée comme prioritaire par l'OMS et l'aPDT pourrait permettre leur élimination sans induire de nouvelles résistances. Des études dans un milieu riche en nutriments, plus proches de la réalité physiologique, sont également envisagées. De plus, l'évaluation de l'activité photobactéricide du conjugué **PS₂-PGLa** sur biofilms serait intéressante à réaliser car la plupart des infections bactériennes aboutissent à la formation d'une telle structure. La capacité à les altérer ou à les éradiquer constituerait une avancée d'intérêt.

Annexes

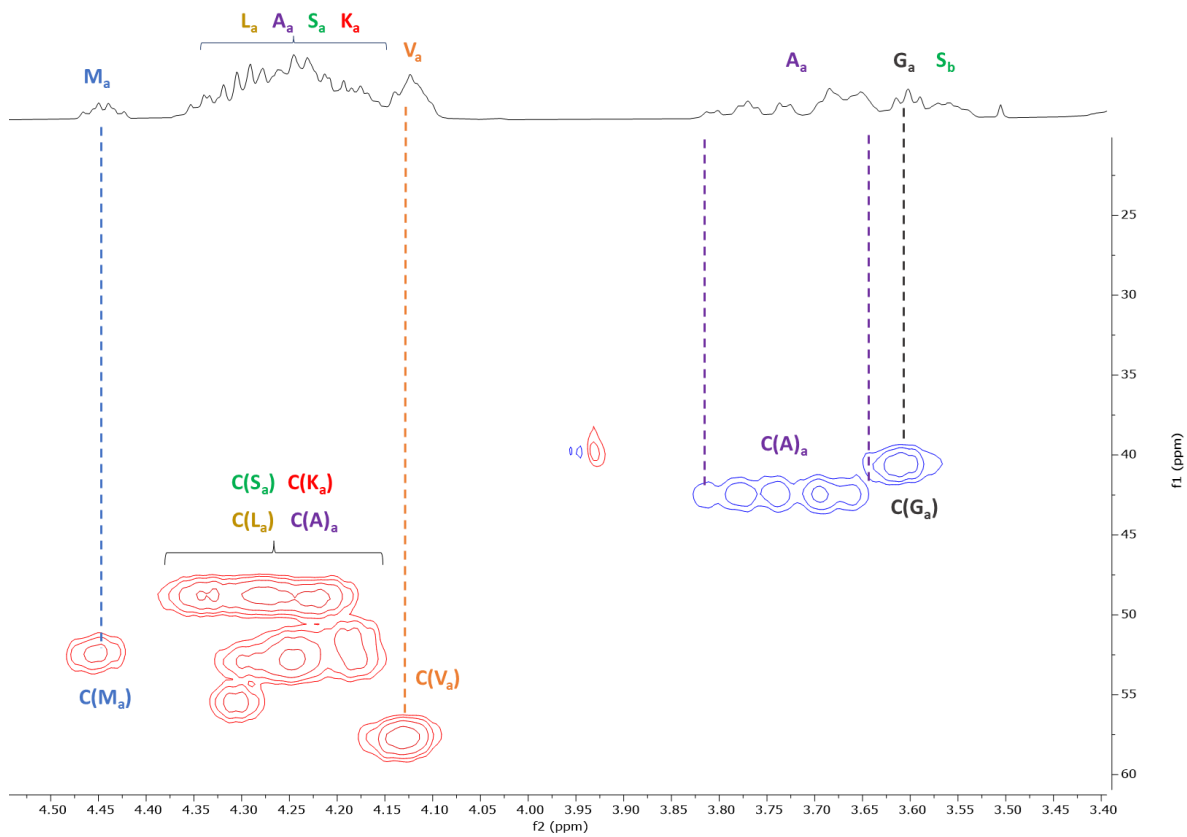
Annexe 1. Spectres RMN COSY (500 MHz, 298 K, CDCl₃) de PS₁.

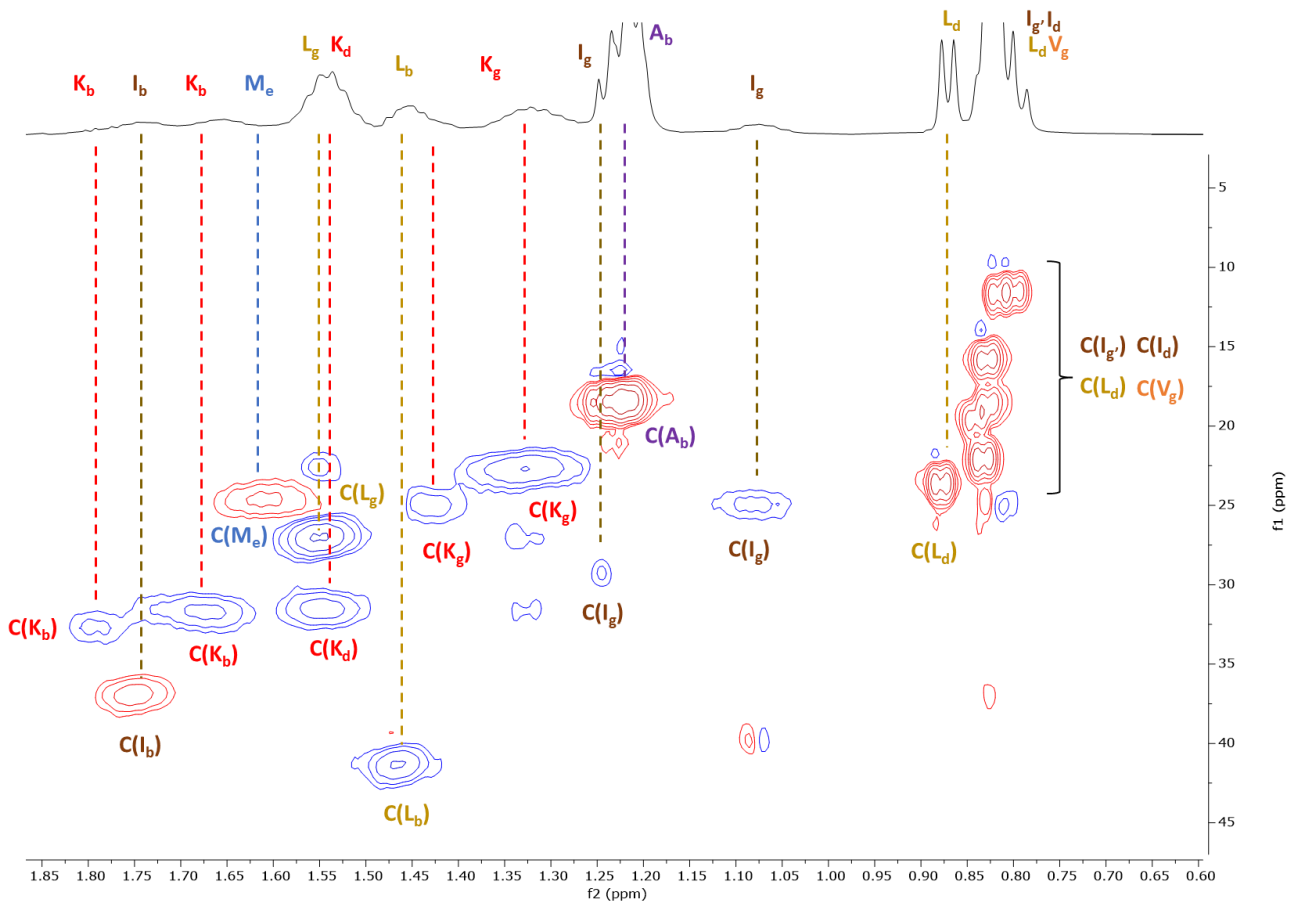
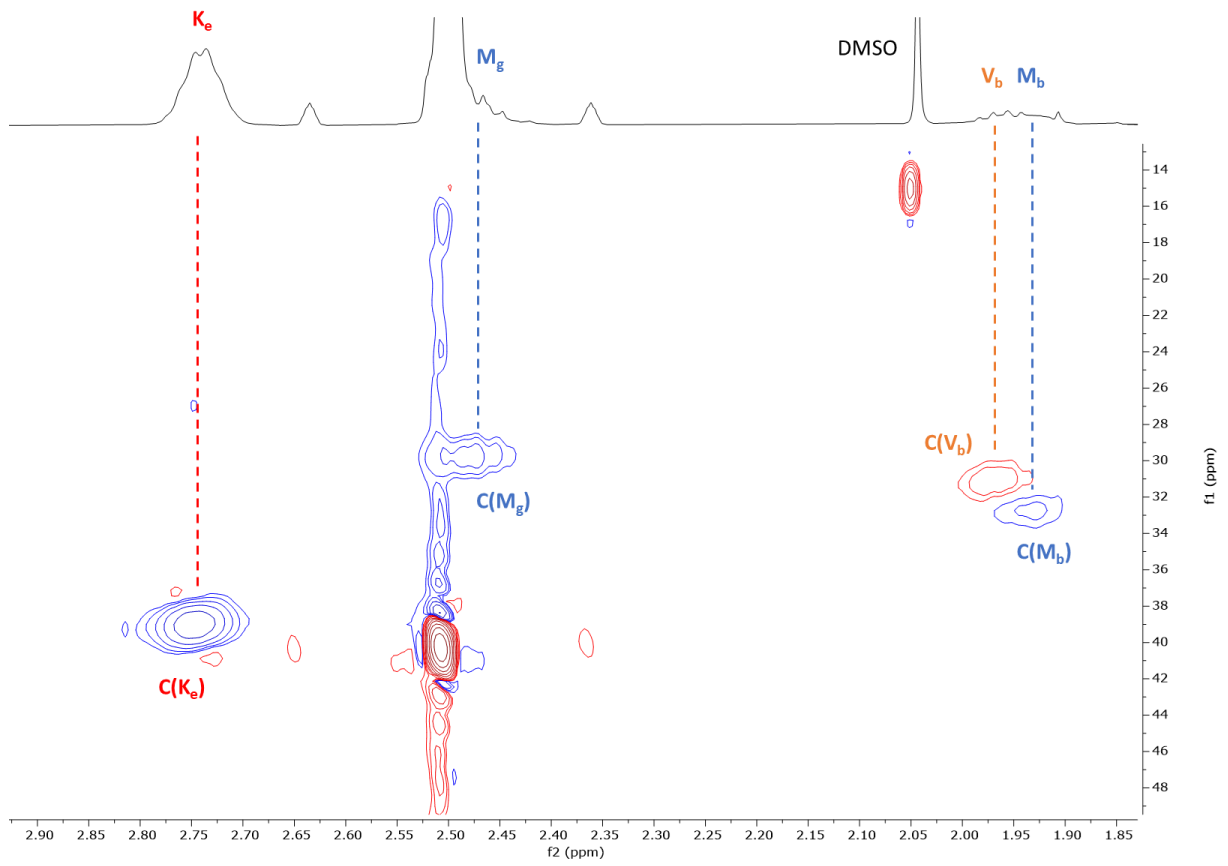


Annexe 2. Spectre de masse MALDI-TOF du peptide PGLa.



Annexe 3. Spectres RMN HSQC (500 MHz, 298 K, $CDCl_3$) de PGLa.





Annexe 4. Spectres RMN 2D de PS₂.

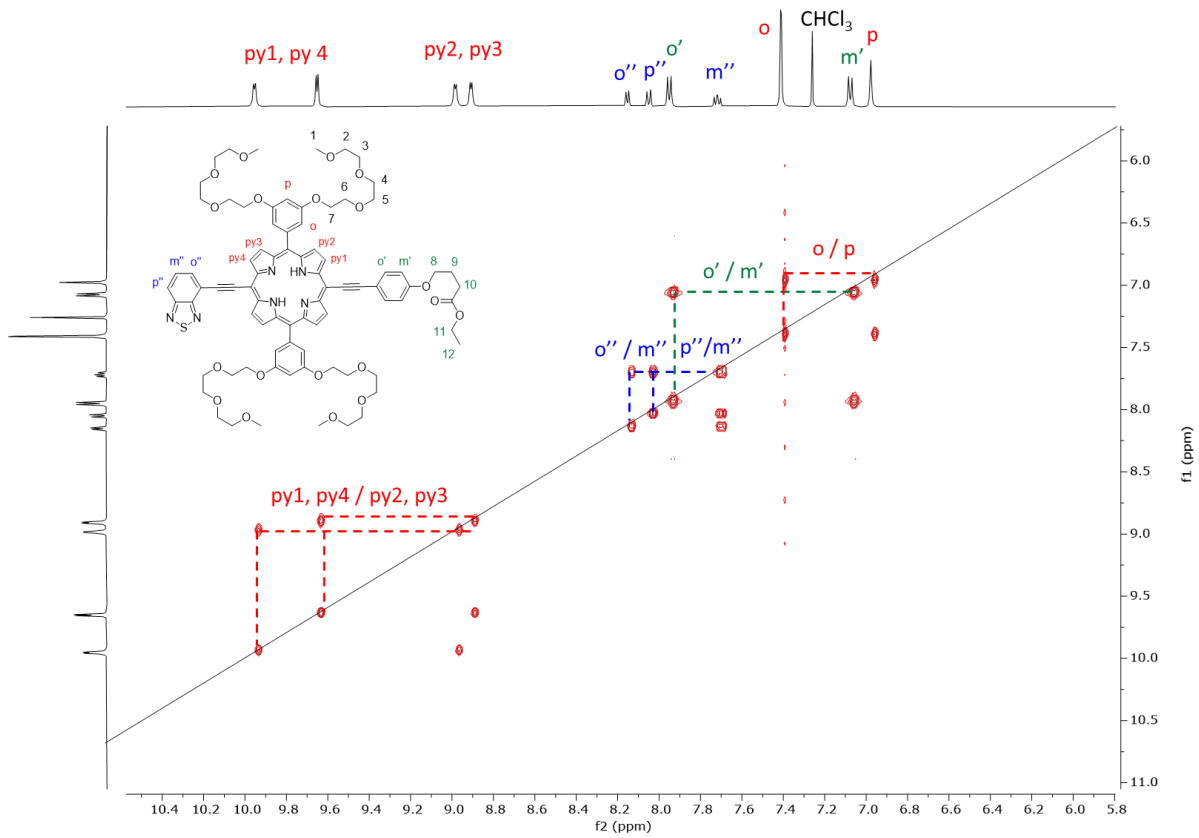


Figure 177. Spectre RMN COSY (500 MHz, 298 K, CDCl₃) de PS₂.

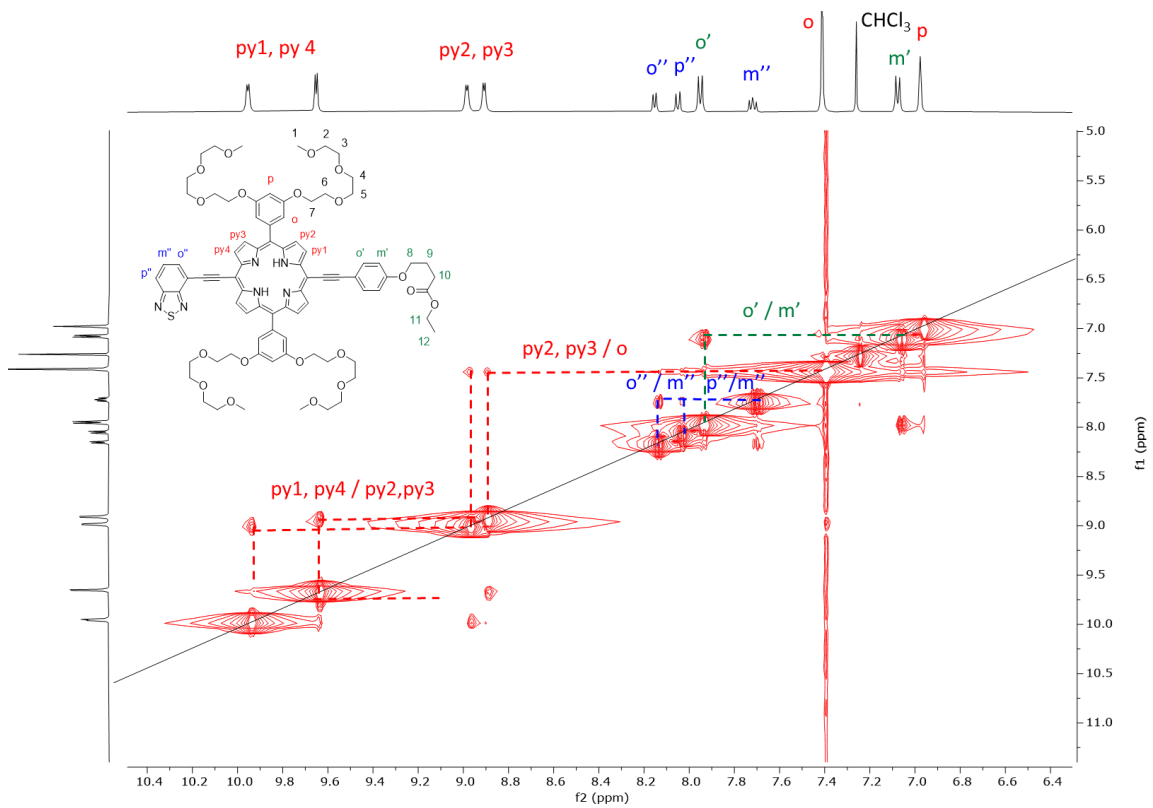


Figure 178. Spectre RMN NOESY (500 MHz, 298 K, CDCl₃) de PS₂.

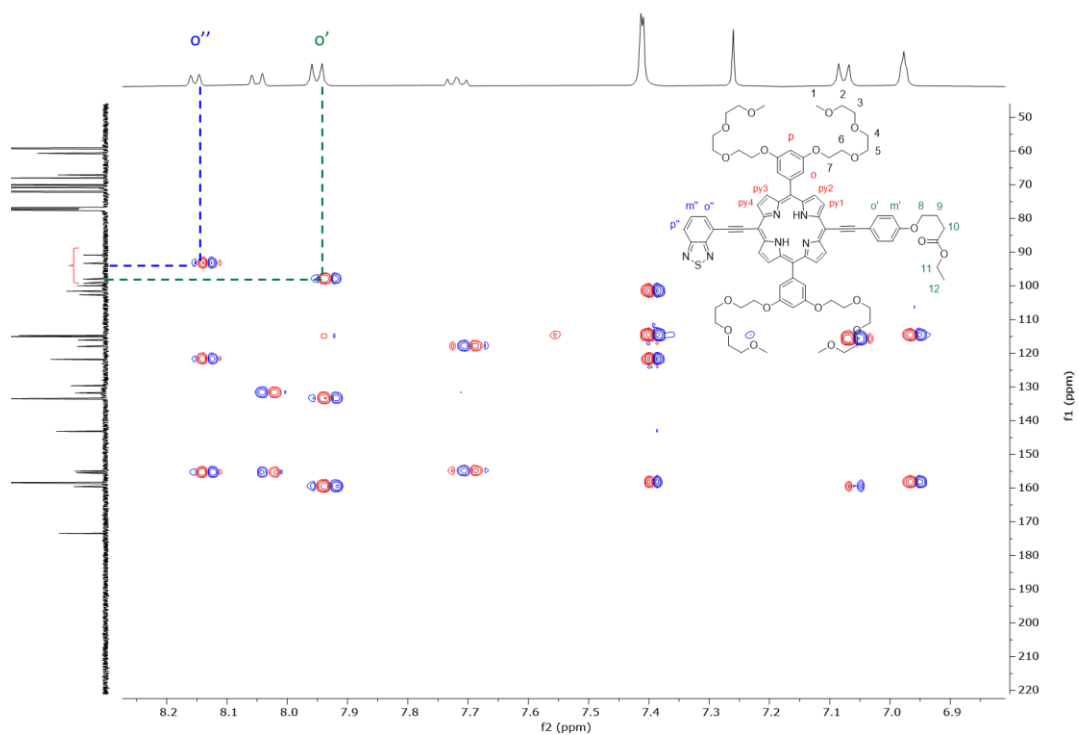
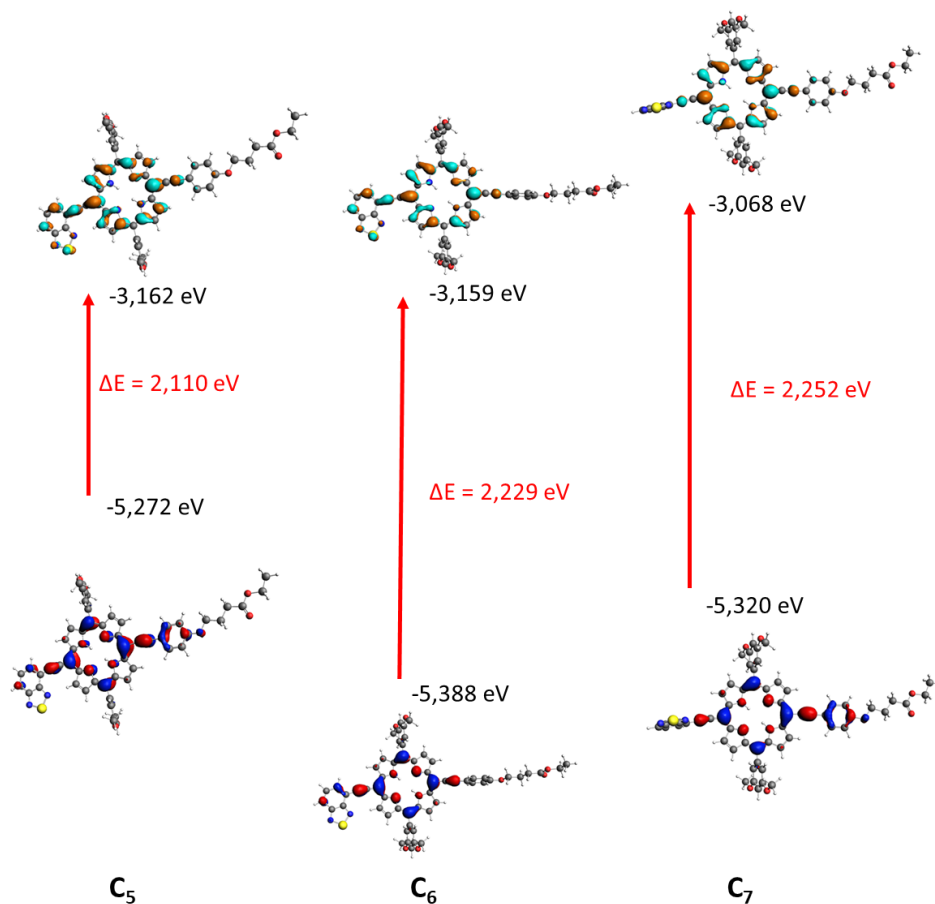
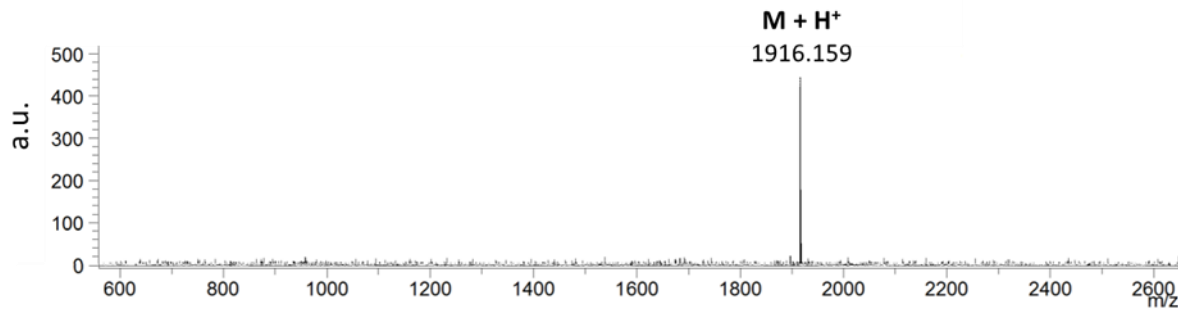


Figure 179. Spectre RMN HMCB (500 MHz, 298 K, CDCl₃) de PS₂.

Annexe 5. Energies des orbitales HOMO et LUMO des conformères C₅, C₆ et C₇ de PS₂.



Annexe 6. Spectre de masse MALDI-TOF du peptide Gly-D-Ctl.



Annexe 7. Caractéristiques des DEL utilisées pour les études biologiques.

L'irradiance des DEL émettant dans le proche IR (710 nm ou 720 nm) a été évaluée à l'aide d'un powermètre (Thorlabs PM100D), placé en sortie du puits irradié de la microplaque. La puissance lumineuse des DEL blanches a été mesurée avec un luxmètre (ISO-TECH LUX-1335). Les spectres d'émission des DELs sont présentés Figure 180 et Figure 181.

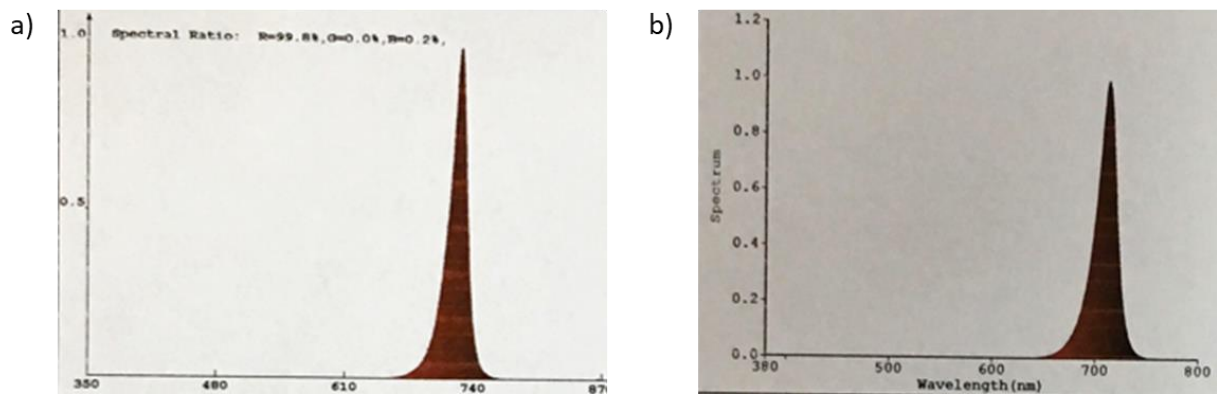


Figure 180. Spectres d'émission des DEL utilisées pour les études biologiques possédant un maximum d'émission à a) 720 nm et b) 710 nm.

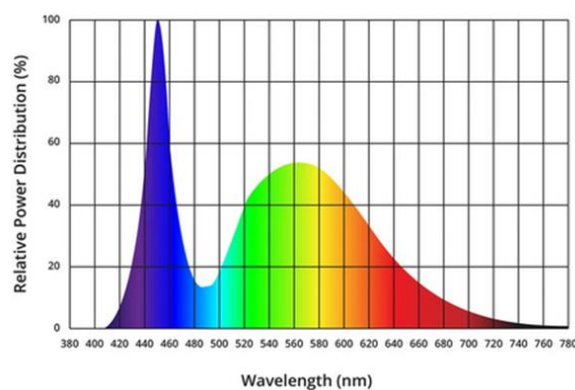


Figure 181. Spectre d'émission des DEL émettant une lumière blanche utilisées pour les études biologiques.

Annexe 8. Calcul de l'erreur standard des études biologiques.

Les barres d'erreurs représentées sur les diagrammes correspondent à l'erreur standard, calculée à partir de la formule :²³⁴

$$\text{Erreur standard} = \frac{\text{Déviation standard}}{\sqrt{\text{Nombre d'expériences indépendantes effectuées}}}$$

Annexe 9. Etudes de photoblanchiment des conjugués **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl**.

Les études de photoblanchiment de **PS₂-PGLa** et **PS₂-Gly-D-Ctl** ont été menées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le conjugué **PS₁-PGLa**. On constate qu'après 15 min d'irradiation, la baisse de la valeur du coefficient d'extinction molaire de la bande Q la plus basse en énergie est similaire pour les deux conjugués, soit 20 % pour **PS₂-PGLa** et 18 % pour **PS₂-Gly-D-Ctl**.

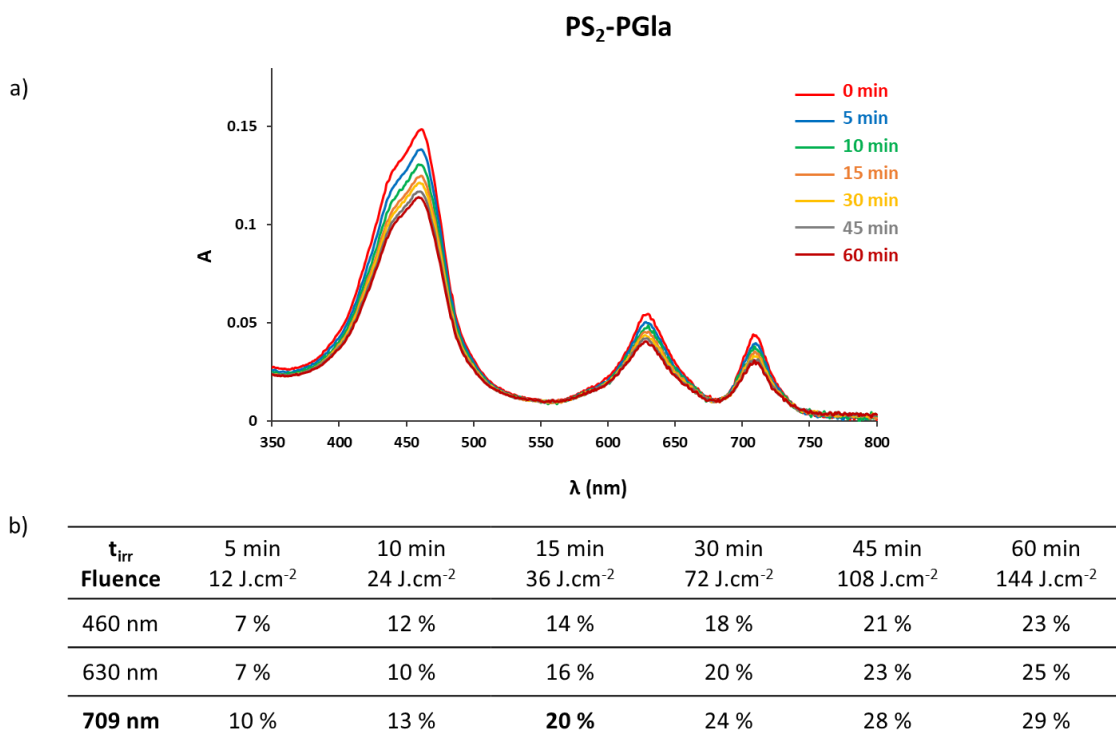


Figure 182. a) Spectres UV-visible de **PS₂-PGLa** à 2,5 μM en fonction du temps d'irradiation à 710 nm (40 mW.cm⁻²) et b) Taux de diminution du coefficient d'extinction molaire des bandes d'absorption de **PS₂-PGLa** après différents temps d'irradiation à 710 nm.

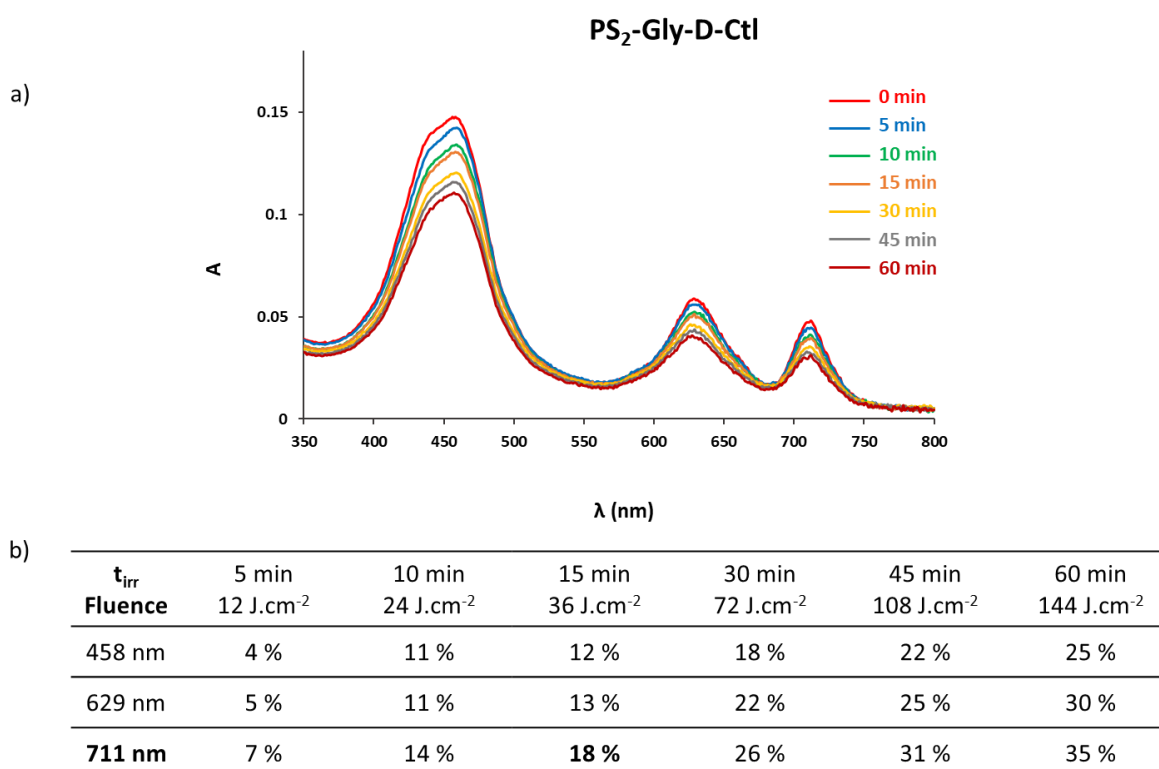


Figure 183. a) Spectres UV-visible de **PS₂-Gly-D-Ctl** à 2,5 μM en fonction du temps d'irradiation à 710 nm (40 mW.cm⁻²) et b) Taux de diminution du coefficient d'extinction molaire des bandes d'absorption de **PS₂-Gly-D-Ctl** après différents temps d'irradiation à 710 nm.

Annexe 10. Spectres RMN de PZn-imi.

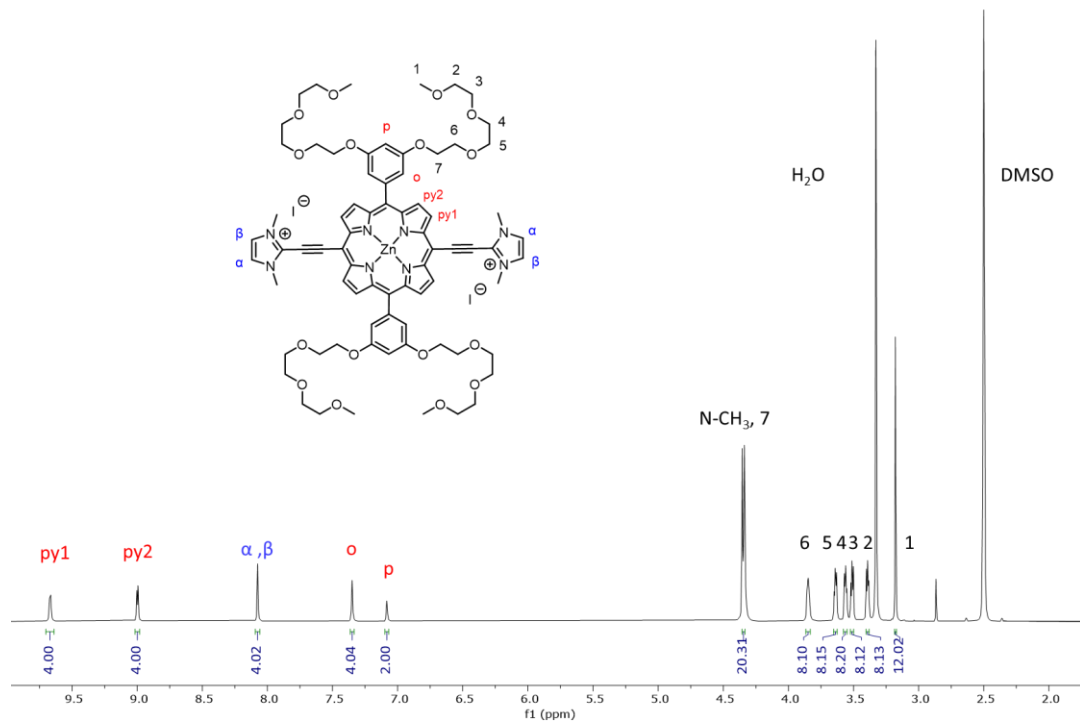


Figure 184. Spectre RMN ^1H (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de PZn-imi.

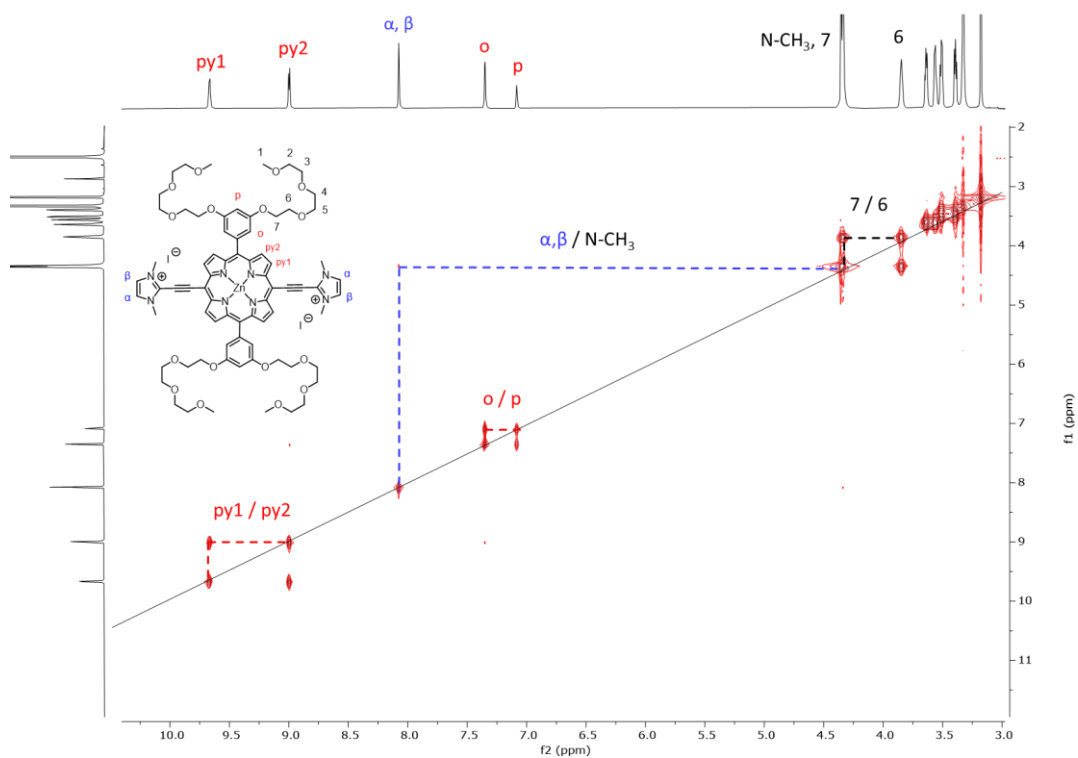


Figure 185. Spectre RMN COSY (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de PZn-imi.

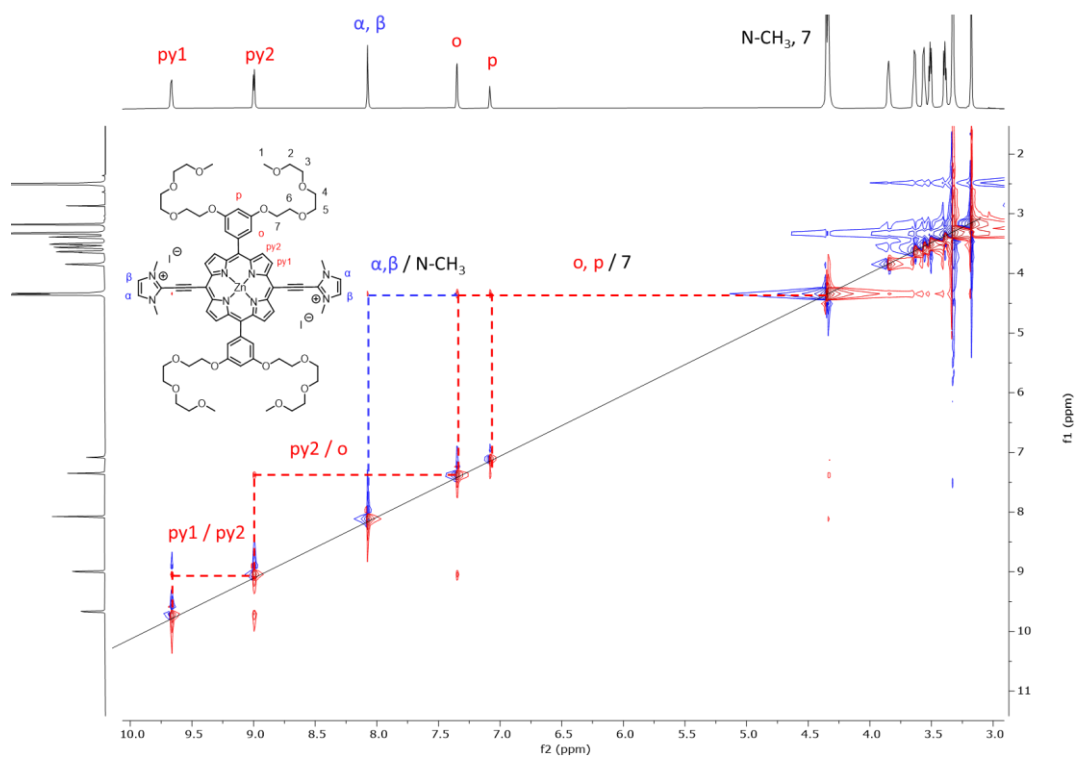


Figure 186. Spectre RMN NOESY (500 MHz, 298 K, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) de PZn-imi.

Partie expérimentale

General information

All reagents and starting chemicals were of the best commercially available grade and used without further purification. Tetrahydrofuran was dried by distillation over Na/benzophenone.

Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on Merck aluminium backed silica gel 60 F254 plates.

Column chromatography purification was carried out on silica gel (VWR chemicals, 40-63 mesh). Flash chromatography was carried out on Puriflash silica HP column using the Spot Ultimate apparatus from Armen Technologies.

Prep-HPLC was performed using a Gilson reverse-phase HPLC and the chromatograms were recorded at 214 nm and 450 nm using a preparative C18 column (Luna, C-18, 100 Å, 5 µm, 30 x 150 mm, Phenomenex, Le Pecq, France) with an acetonitrile/water gradient buffered with 0.1% TFA. Analytical HPLC was performed using a ThermoScientific Ultimate 3000 reverse-phase HPLC and the chromatograms were recorded at 214 nm using a C18 column (Acquity UPLC, C18, 130 Å, 1.7 µm, 1.0 x 150 mm) with an acetonitrile/water gradient buffered with 0.1% HCOOH.

General methods

NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE 300, 400 or 500 MHz 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). 2D-NMR techniques (COSY, NOESY and HMBC) were used for the assignment of NMR signals. In the assignments, the chemical shift (in ppm) is given first, followed, in parentheses, by the multiplicity of the signal (s: singlet; d: doublet; t: triplet; q: quadruplet; tt: triplet of triplet; m: multiplet; br s: broad signal), the number of protons implied, the value of the coupling constants in hertz if applicable, and finally the assignment.

The UVIKON XL spectrophotometer was used to record UV-vis spectra.

The Circular Dichroism measurements were performed on a Jasco J-810 spectropolarimeter (Tokyo, Japan) at 25 °C and standard values for the acquisition parameters were used (1 nm in resolution, 50 nm/min of scanning speed and 1 second for the detector integration time).

Mass spectra were obtained on a Bruker MicroTOF spectrometer (ESI-MS) or a Bruker Autoflex

Speed (MALDI).

Spectroscopy and photophysics

Fluorescence quantum yields

Fluorescence quantum yields were measured with reference to previously studied compound DPP-ZnP-DPP in aerated DCM as a standard ($\Phi_{fl} = 0.16$)¹⁹⁰ using a NIR spectrofluorimeter. Fluorescence lifetimes were measured with a single photon counting apparatus with Nano-LED excitation at 465 nm or 560 nm. The analysis of the luminescence decay profiles against time was accomplished with the DAS6 Decay Analysis Software provided by the manufacturer. Estimated errors are 10 % on exponential lifetimes and 20 % on quantum yields.

Singlet oxygen production quantum yields in DCM

Singlet oxygen production quantum yields in DCM were measured with reference to Rose Bengal bis(triethyl-ammonium) salt in DCM ($\Phi_{\Delta} = 0.48$)²³⁵ 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 was 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 yields in DMSO and H₂O

Singlet oxygen production quantum yields in DMSO were performed by means of an indirect method by using DPBF as a singlet oxygen trap and its degradation was monitored by the decrease of its absorbance at 418 nm.²³⁶ ZnPc was used as a standard ($\Phi_{\Delta} = 0.67$)²³⁶. Solutions of the standard or of the compound containing DPBF ($C = 5.2 \times 10^{-5}$ M), prepared in the dark, was irradiated at 616 nm for **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** and **PS₂-Gly-D-Ctl**, 607 nm for **PH₂-imi** and 643 nm for **PZn-imi** 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 $12 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Estimated errors are 20 % on quantum yields.

The same procedure was used for the determination of singlet oxygen production quantum yields in H_2O (pH= 7) using anthracene-9,10-dipropionic acid (ADPA) as a singlet oxygen trap in presence of **PS₁-PGLa** or **PS₂-PGLa** irradiated at 630 nm.

Computational details

All calculations, except the rotational barriers, were performed using ADF 2019 package at the DFT level of theory with B3LYP functional. All atoms were described by the all-electrons type TZP basis set. Scalar relativistic ZORA Hamiltonian was employed. Weak interactions were treated through the introduction of Grimme's corrections (grimme3). Solvent corrections (DCM) were introduced through a PCM model. The absorption spectra were computed by mean of TD-DFT on the fully optimized structures.

Rotational barriers were computed with GAUSSIAN 09 version D01 at DFT level of theory with wB97XD functional. All atoms were described by Pople's 6-31+G** basis set. Calculations were performed in dichloromethane through a PCM model. All structures were fully optimized and characterized by a frequency calculation. Minima were characterized by a complete set of real frequencies and transition states by one imaginary frequency. Gibbs Free energies were extracted from this frequency calculation.

Solid-state NMR studies

Sample preparation:

A homogeneous mixture of porphyrin-peptide and lipid was obtained in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1 : 1 v/v) or in $\text{H}_2\text{O}/\text{HFIP}$ (1 : 1 v/v). The solution was spread onto ultra thin coverglasses (8 x 22 mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and dried, first in air and thereafter in high vacuum overnight. Membranes thus obtained were equilibrated at 93 % relative humidity and then further exposed to higher temperatures (310 K) and 100 % relative humidity for 2 h before the glass slides were stacked on top of each other.

NMR spectroscopy:

Proton-decoupled ^{31}P solid-state NMR spectra were acquired at 161.953 MHz and proton-decoupled ^{15}N cross-polarization (CP) spectra of static aligned samples were acquired at 40.54 MHz on a Bruker (Rheinstetten, Germany) Avance widebore 750 NMR spectrometer equipped with a double-resonance flat-coil probe.

Bacterial experiments

Bacterial Cultures

Gram-positive bacterial strain (*S. aureus*)

S. aureus CIP76.25 were obtained from Institut Pasteur (Paris, France). These strains were cultured in liquid tryptic soy (pancreatic casein extract, 17 g/L; soy flour papaic digest, 3 g/L; dextrose, 2.5 g/L; NaCl, 5 g/L; and K_2HPO_4 , 2.5 g/L) and incubated overnight at 37 °C under aerobic conditions.

Gram-negative bacterial strain (*E. coli*)

E. coli ATCC25922 were obtained from Thermo Fisher Scientific (Courtaboeuf, France). These strains were cultured in liquid Mueller-Hinton (beef infusion solids, 2 g/L; starch, 1.5 g/L; casein hydrolysate, 17.5 g/L) and incubated overnight at 37 °C under aerobic conditions.

Bacterial photoinactivation

Gram-positive bacterial strain (*S. aureus*)

Bacteria were grown overnight in tryptic soy at 37 °C, harvested by centrifugation (3200 g, 5 min), washed twice with PBS 1X (also called PBS 150 mM, composed of 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) by centrifugation (5000 rpm, 5 min) and resuspended in PBS at a density of $2 \cdot 10^7$ colony-forming units per milliliter (CFU/mL). The bacterial concentration in stationary phase was estimated by reading the turbidity of the suspension at 600 nm in a JENWAY 6320D spectrophotometer. The peptide **PGLa**, the conjugates **PS₁-PGLa** and **PS₂-PGLa** and the cationic porphyrins **PH₂-imi** and **PZn-imi** were solubilized in PBS at different concentrations. The neutral porphyrins **PS₁** and **PS₂** were solubilized in DMSO then in PBS at different concentrations (final DMSO concentration never exceeded 0.5 %). The bacteria were transferred into a 96-well plate

(Thermo Scientific Nunc®) for a final cell density of 10^7 CFU/mL (200 μ L/well) and then incubated in the dark at 37 °C for 15 min with different concentrations of the compounds. The wells containing bacteria and compounds were irradiated for 15 min with red light (710 or 720 nm, 40 mW. cm^{-2} for a fluence of 36 J. cm^{-2}) or white light (fluence of 4.3 J. cm^{-2}) with a homemade apparatus placed above the 96-well plate. As controls without irradiation, plates were kept in the dark at room temperature. Bacterial content of each well was taken and then serially diluted 10-fold in physiological water and 50 μ L of appropriate diluted samples were spread on tryptic soy agar plates using an automatic plater (easySPIRAL, Interscience). For the most photoactive compounds, bacterial content of the well was directly spread on tryptic soy agar plates without dilution. After incubation overnight at 37 °C, colonies were counted to determine total CFU/mL. The survival rate was calculated by comparing the bacterial concentration of the treated wells with the initial concentration obtained from controls. Controls included bacteria incubated without any compounds in the dark, irradiated and in the presence of 0.5 % of DMSO.

Each experiment was performed three times with independent bacterial suspensions.

Gram-negative bacterial strain (*E. coli*)

Bacteria were grown overnight in MH medium at 37 °C, harvested by centrifugation (5000 rpm, 5 min), washed twice with PBS 1X (3200 g, 5 min) and resuspended in PBS at a density of 2.10^7 CFU/mL. The bacterial concentration in stationary phase was estimated by reading the turbidity of the suspension at 550 nm in a Multiskan Go ThermoFisher Scientific spectrophotometer. The peptides **PGLa** and **Gly-D-Ctl**, the conjugates **PS₁-PGLa** and **PS₂-PGLa** and the cationic porphyrins **PH₂-imi** and **PZn-imi** were solubilized in PBS at different concentrations. The neutral porphyrins **PS₁** and **PS₂** and the conjugate **PS₂-Gly-D-Ctl** were solubilized in DMSO then in PBS at different concentrations (final DMSO concentration never exceeded 0.5 %). The bacteria were transferred into a 96-well plate (Thermo Scientific Nunc®) for a final cell density of 10^7 CFU/mL (200 μ L/well) and then incubated in the dark at 37 °C for 15 min with different concentrations of the compounds. The wells containing bacteria and compounds were irradiated for 15 min plate with red light (710 or 720 nm, 40 mW. cm^{-2} for a fluence of 36 J. cm^{-2}) or white light (4.8 mW. cm^{-2} for a fluence of 4.3 J. cm^{-2} or 40 mW. cm^{-2} for a fluence of 36 J. cm^{-2}) with a homemade apparatus placed above the 96-well plate. As controls without irradiation, plates were kept in the dark at room temperature. Bacterial content of each well was taken and then serially diluted in PBS and 100 μ L of appropriate

diluted samples were spread on MH agar plates. For the most photoactive compounds, bacterial content was directly spread on MH agar plates without dilution. After incubation overnight at 37 °C, colonies were counted to determine total CFU/mL. The survival rate was calculated by comparing the bacterial concentrations of the treated wells with the initial concentration obtained from controls. Controls included bacteria incubated without any compounds in the dark, irradiated and in the presence of 0.5 % of DMSO.

Each experiment was performed three times with independent bacterial suspensions.

Evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC)

After overnight growth of *E. coli* bacteria in MH medium at 37 °C (250 rpm), preculture was diluted at an OD₅₅₀ of 0.05. The test cultures were grown for 4 h at 37 °C (250 rpm), and after turbidity was adjusted to an OD₅₅₀ of 0.2 by reading the turbidity of the suspension in logarithmic phase at 550 nm in a Multiskan Go ThermoFisher Scientific spectrophotometer, a 1000-fold diluted bacterial suspension was prepared to reach 10⁶ CFU/ml. The peptides **PGLa** and **Gly-D-Ctl**, the conjugates **PS₁-PGLa**, **PS₂-PGLa** and **PS₂-Gly-D-Ctl**, the cationic porphyrins **PH₂-imi** and **PZn-imi** and the neutral porphyrins **PS₁** and **PS₂** were solubilized in DMSO then diluted in MH (final DMSO concentration is 0.5 %). Microtiter plate (96 wells of 100 µL, Thermo Scientific Nunc®) were filled in triplicates with 50 µL of the diluted samples. The final compound concentration ranges from 10 µM to 1.25 µM. Some wells containing bacteria without compounds served as the positive control for bacterial growth (bacteria in MH with 0.5 % DMSO) and some wells without bacteria nor compounds served as the negative control for contamination (MH with 0.5 % DMSO). Bacterial suspension (50 µL) was added to the wells (except for the negative control) to give a final concentration of 5.10⁶ CFU/mL. The plate was incubated at 37 °C for 20 h and the MIC was determined on the basis of turbidity read at 550 nm as the lowest concentration inhibiting bacterial growth. The growth for each condition is calculated by comparison to the respective positive controls (after subtraction of the average value of the respective negative controls).

Each experiment was performed three times with independent bacterial suspensions.

***E. coli* cells association experiments**

E. coli cells at a density of 10^8 UFC/mL were incubated with the conjugates at a concentration of 5 μ M in PBS 1X at 37 °C for 15 min or 60 min in the dark (total volume of each sample was 400 μ L). After centrifugation of the tubes (3200 g, 5 min), 100 μ L of supernatant was transferred to a clean spectrophotometer cuvette. The absorption was measured with a Multiskan Go ThermoFisher Scientific spectrophotometer. Control samples without bacteria were treated the same and their absorbance values represented the value of reference. The ratio of supernatant values and references values give the amount associated with bacteria. All conditions and controls were measured in triplicate.

Confocal microscopy

Confocal images were acquired on a confocal Zeiss LSM 710 microscope and an argon laser (458 nm) was used to excite the conjugates. Emitted fluorescence was monitored between 680 and 750 nm. Image acquisition and analysis were realized with a Zeiss ZEN software (ZEN 2.3 SPI). Images were obtained with a 40 \times objective lens.

Cell experiments

Keratinocytes (NHEK) cultures

The human normal keratinocyte cell line NHEK (NHEL-Adult KGM-Gold, Lonza) was cultured in keratinocyte basal medium-2 (KBM) supplemented with a keratinocyte growth medium-2 (KBM-2) Bullet kit (Lonza). NHEK cells were cultured at 37 °C in 95 % humidified air in the presence of 5 % CO₂.

Cytotoxicity and phototoxicity on keratinocytes

Keratinocytes in KBM culture medium were seeded in a 96-well plate (Thermo Scientific Nunc®) 24 h prior to the tests (100 μ L, 10^4 cell suspension). The peptide **PGLa** and the conjugates **PS₁-PGLa** and **PS₂-PGLa** were solubilized in PBS 1X at different concentrations. The neutral porphyrins **PS₁** and **PS₂** were solubilized in DMSO then in PBS at different concentrations (final DMSO concentration never exceeded 0.5 %). Culture medium was removed and cells were incubated 15 min in the dark with the compounds. The wells were irradiated for 15 min with red light (710 or 720 nm, 40 mW.cm⁻²,

fluence of 36 J. cm⁻²) or white light (4.8 mW. cm⁻², fluence of 4.3 J.cm⁻²) with a homemade apparatus placed above the 96-well plate. As controls without irradiation, plates were kept in the dark at room temperature. Then, PBS was removed and 150 µL of fresh KBM culture medium was added in the wells. The plates were placed in the incubator at 37 °C and cell viability was determined with the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) test. After 24h at 37 °C, the solution of XTT and PMS was added at a final concentration of 333 µg/mL and 2.5 µg/mL for XTT and PMS respectively in each well, and cells were incubated at 37 °C for 12 h. The absorbance was measured at 450 nm using a Bio-Rad iMark microplate reader. The viability of the treated cells corresponds to the ratio between the absorbance measured for the different conditions and the absorbance of untreated cells that represents 100 % viability.

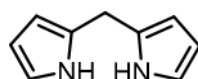
Each experiment was performed three times with independent cells cultures.

Synthesis

Chapitre II

Compounds **1** to **9** were synthesised according to protocols described in literature. Their characterization was in accordance with the one reported.

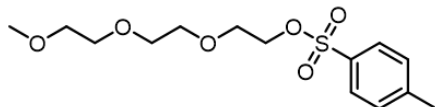
Dipyrromethane **1** ²⁰¹



A solution of pyrrole (90 mL, 1300 mmol, 15 eq) and paraformaldehyde (2.60 g, 86.6 mmol, 1 eq) in a dry round-bottomed flask protected from the light was degassed with a stream of argon for 15 min. The reaction mixture was heated at 90 °C and TFA (564 µL, 8.66 mmol, 0.1 eq) was added. The reaction was stirred at 90 °C under argon for 20 min and then quenched with the addition of aqueous NaOH (25 mL, 2 M). The resulting solution was stirred at room temperature for 1 h. The organic phase was washed with H₂O (2 x 40 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated. The product was purified by silica column chromatography (DCM/PE 1 : 2) and then recrystallised from EtOH / H₂O (9 : 1) to give **1** as a beige solid in 23 % yield (2.91 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 3.99 (s, 2H, CH_2), 6.03-6.05 (m, 2H, Ar-H), 6.14-6.16 (m, 2H, Ar-H), 6.66-6.68 (m, 2H, Ar-H), 7.88 (br, s, 2H, NH).

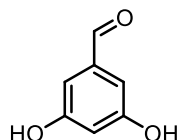
Compound 2 ²⁰²



To a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (7.50 g, 39.3 mmol, 1.2 eq) in pyridine (42 mL) cooled to $-5\text{ }^\circ\text{C}$, triethylene glycol monomethyl ether (5.2 mL, 32.8 mmol, 1 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at $-5\text{ }^\circ\text{C}$ under argon for 4 h. Cold water (65 mL) was added to the mixture and the product was extracted with DCM (3 x 45 mL). The organic layer was washed with HCl_{aq} (75 mL, 6 M), acidic water (2 x 40 mL, pH = 1), brine (40 mL) and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvents were evaporated and **2** was obtained as a yellow viscous oil in 99 % yield (10.4 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 2.45 (s, 3H, Ar- CH_3), 3.37 (s, 3H, O- CH_3), 3.51-3.55 (m, 2H, O- CH_2), 3.59-3.63 (m, 6H, O- CH_2), 3.67-3.70 (m, 2H, O- CH_2), 4.14-4.18 (m, 2H, O- CH_2), 7.34 (d, 2H, $^3J = 8.3\text{ Hz}$, Ar-H), 7.80 (d, 2H, $^3J = 8.3\text{ Hz}$, Ar-H).

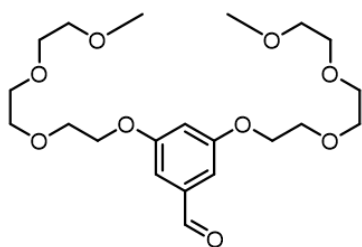
Aldehyde 3 ²⁰³



To a solution of 3,5-dihydroxybenzyl alcohol (5.0 g, 35.7 mmol, 1 eq) in acetone (220 mL) cooled at $0\text{ }^\circ\text{C}$, a freshly prepared Jones' reagent (40 mL, 0.90 M, 1 eq) was added dropwise. The reaction mixture was vigorously stirred at $0\text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min and then poured into diethyl ether (1.9 L). The organic layer was washed with a saturated NaHCO_3 solution (5 x 400 mL), brine (2 x 400 mL) and then dried over Na_2SO_4 . The solvents were evaporated and **3** was obtained as a beige solid in 55 % yield (2.72 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 298 K): δ (ppm) = 6.65 (1H, t, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, Ar-H), 6.88 (2H, d, $^4J = 2.3\text{ Hz}$, Ar-H), 8.73 (2H, s, Ar-OH), 9.85 (1H, s, CHO).

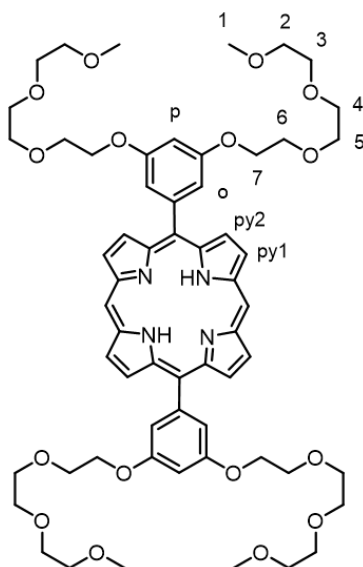
Aldehyde **4** ²⁰²



To a three freeze-thaw cycles degassed mixture of aldehyde **3** (1.55 g, 11.3 mmol, 1 eq) and K_2CO_3 (4.66 g, 33.8 mmol, 3 eq) in dry DMF, a solution of **2** (8.24 g, 25.9 mmol, 2.3 eq) in dry DMF was added. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h. After cooling, water (75 mL) was added and the product was extracted with DCM (4 x 45 mL). The combined organic layer was washed with brine (65 mL), dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated. The crude product was purified by flash silica column chromatography (DCM/MeOH, 1%) to give **4** as a pale-yellow oil in 86 % yield (4.18 g).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm) = 3.38 (s, 6H, O- CH_3), 3.53-3.56 (m, 4H, O- CH_2), 3.64-3.70 (m, 8H, O- CH_2), 3.72-3.76 (m, 4H, O- CH_2) 3.85-3.88 (m, 4H, O- CH_2), 4.15-4.21 (m, 4H, O- CH_2), 6.76 (t, 1H, $^4J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.02 (d, 2H, $^4J = 2.3$ Hz, Ar-H), 9.88 (s, 1H, CHO).

Free-base porphyrin **5** ²⁰⁶



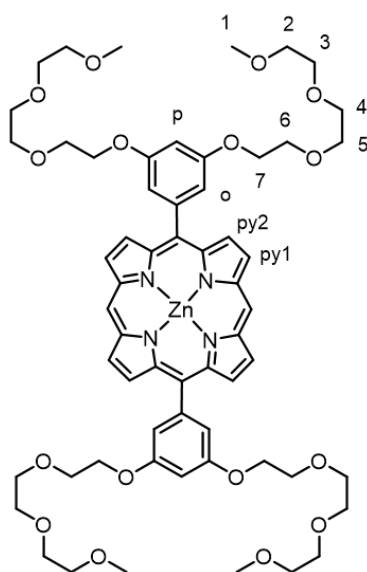
A solution of dipyrromethane **1** (700 mg, 4.79 mmol, 1 eq) and aldehyde **4** (2.06 g, 4.78 mmol, 1 eq) in dry DCM (900 mL) under argon was degassed by three freeze-thaw cycles. TFA (219 μ L, 2.86 mmol, 0.6 eq) was added dropwise and the solution was stirred at room temperature for 4 h under argon.

DDQ (1.45 g, 6.39 mmol, 1.3 eq) was then added to the solution and the reaction mixture was stirred for one hour. The reaction was quenched by addition of NEt_3 (5 mL) and the solvents were evaporated. The crude product was dissolved in dry DCM (20 mL) and poured on a silica gel pad ($\text{CHCl}_2/\text{MeOH}$, 3 %) to remove the polymers. The obtained residue was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 1 to 2 %) to give porphyrin **5** as a red solid in 42 % yield (1.12 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = -3.16 (s, 2H, NH), 3.32 (s, 12H, H_1), 3.48-3.51 (m, 8H, H_2), 3.62-3.65 (m, 8H, H_3), 3.69-3.73 (m, 8H, H_4), 3.77-3.81 (m, 8H, H_5), 3.94-3.97 (m, 8H, H_6), 4.32-4.35 (m, 8H, H_7), 6.98 (t, 2H, $^4J = 2.1$ Hz, H_p), 7.46 (d, 4H, $^4J = 2.1$ Hz, H_o), 9.16 (d, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, py2), 9.38 (d, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, py1), 10.30 (s, 2H, H_{meso}).

UV-Visible (DCM): $\lambda_{\text{max}} = 410, 503, 537, 576, 630$ nm.

Zn(II) porphyrin **6**²⁰⁶

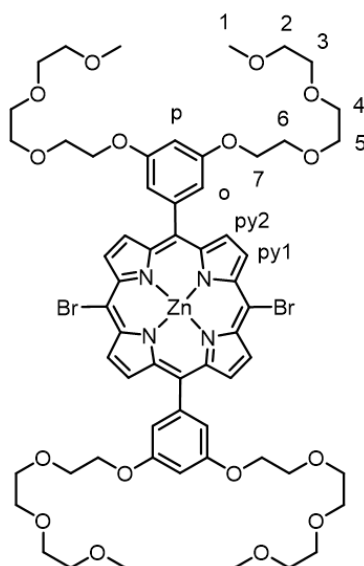


To a solution of porphyrin **5** (1.10 g, 0.99 mmol, 1 eq) in DCM (110 mL) was added a solution of $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (926 mg, 4.95 mmol, 5 eq) in MeOH (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h then the solvents were evaporated. The crude product was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 1 to 2 %) to give **6** as a pink solid quantitatively (1.16 g).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 2.73 (s, 12H, H_1), 2.86-2.89 (m, 8H, H_2), 3.07-3.10 (m, 8H, H_3), 3.36-3.39 (m, 8H, H_4), 3.52-3.55 (m, 8H, H_5), 3.75-3.78 (m, 8H, H_6), 4.19-4.23 (m, 8H, H_7), 6.87 (t, 2H, $^4J = 2.2$ Hz, H_p), 7.46 (d, 4H, $^4J = 2.2$ Hz, H_o), 9.17 (d, 4H, $^3J = 4.5$ Hz, py2), 9.37 (d, 4H, $^3J = 4.5$ Hz, py1), 10.24 (s, 2H, H_{meso}).

UV-Visible (DCM): $\lambda_{\text{max}} = 412, 539, 575 \text{ nm}$.

Zn(II) porphyrin 7 ²⁰⁶

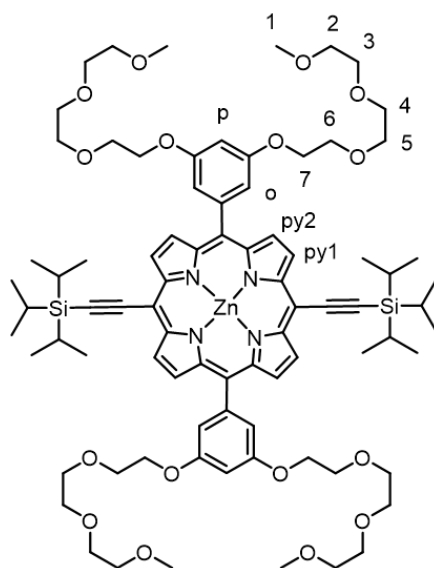


To a solution of porphyrin **6** (384 mg, 0.327 mmol, 1 eq) in CHCl_3 (27 mL) and pyridine (178 μL) cooled at $-10 \text{ }^\circ\text{C}$, a solution of NBS (114 mg, 0.641 mmol, 1.96 eq) in CHCl_3 (13 mL) and pyridine (98 μL) was added dropwise for 10 min. The reaction mixture was stirred at $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min and quenched with acetone (5 mL). After evaporation of solvents, the crude product was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 1 to 2 %) to give **7** as a purple solid in 91 % (397 mg).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 2.65 (s, 12H, H_1), 2.79-2.82 (m, 8H, H_2), 3.01-3.04 (m, 8H, H_3), 3.36-3.39 (m, 8H, H_4), 3.52-3.56 (m, 8H, H_5), 3.74-3.77 (m, 8H, H_6), 4.18-4.21 (m, 8H, H_7), 6.82 (t, 2H, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, H_p), 7.36 (d, 4H, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, H_o), 8.95 (d, 4H, $^3J = 4.7 \text{ Hz}$, py2), 9.65 (d, 4H, $^3J = 4.7 \text{ Hz}$, py1).

UV-Visible (DCM): $\lambda_{\text{max}} = 428, 561, 602 \text{ nm}$.

Zn(II) porphyrin **8** ¹⁹⁰

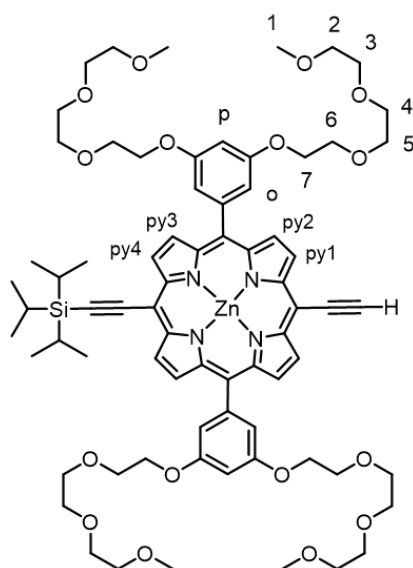


A mixture of porphyrin **7** (658 mg, 0.494 mmol, 1 eq), PdCl₂(PPh₃)₂ (86.7 mg, 0.123 mmol, 0.25 eq) and CuI (23.5 mg, 0.123 mmol, 0.25 eq) in distilled THF (35 mL) and NEt₃ (7 mL) under argon was degassed by three freeze-thaw cycles. Triisopropylsilylacetylene (332 μL, 1.48 mmol, 3 eq) was then added and the reaction mixture was stirred for 2 h at 40 °C. After evaporation of the solvents, the crude product was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 1.5 %) to give **8** as a green solid in 89 % yield (676 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = 1.41-1.50 (m, 42H, (iPr)₃-Si), 2.66 (s, 12H, H₁), 2.81-2.84 (m, 8H, H₂), 3.05-3.09 (m, 8H, H₃), 3.43-3.46 (m, 8H, H₄), 3.60-3.63 (m, 8H, H₅), 3.82-3.85 (m, 8H, H₆), 4.26-4.29 (m, 8H, H₇), 6.87 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, H_p), 7.41 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 8.97 (d, 4H, ³J = 4.6 Hz, py2), 9.70 (d, 4H, ³J = 4.6 Hz, py1).

UV-Visible (DCM): λ_{max} = 440, 580, 631 nm.

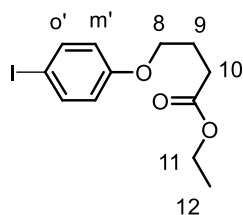
Zn(II) porphyrin **9** ¹⁹⁰



To a solution of porphyrin **8** (621 mg, 0.404 mmol, 1 eq) in THF (110 mL) under argon degassed by three freeze-thaw cycles was added a solution of TBAF·3H₂O (44.7 mg, 0.141 mmol, 0.35 eq) in THF (1 mL). The reaction mixture was stirred for 12 min at room temperature and quenched with CaCl₂ (224 mg, 2.02 mmol, 5 eq). The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 1.5 %) to give **9** as a green solid in 34 % yield (190 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = 1.42-1.47 (m, 21H, (iPr)₃-Si), 2.65 (s, 12H, H₁), 2.80-2.83 (m, 8H, H₂), 3.04-3.08 (m, 8H, H₃), 3.44-3.47 (m, 8H, H₄), 3.61-3.64 (m, 8H, H₅), 3.83-3.86 (m, 8H, H₆), 4.16 (s, 1H, H_{alkyne}) 4.27-4.31 (m, 8H, H₇), 6.88 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, H_p), 7.43 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 8.97 (d, 4H, ³J = 4.6 Hz, py2 and py3), 9.68 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4) 9.71 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4).

Iodo-linker **10**²⁰⁷



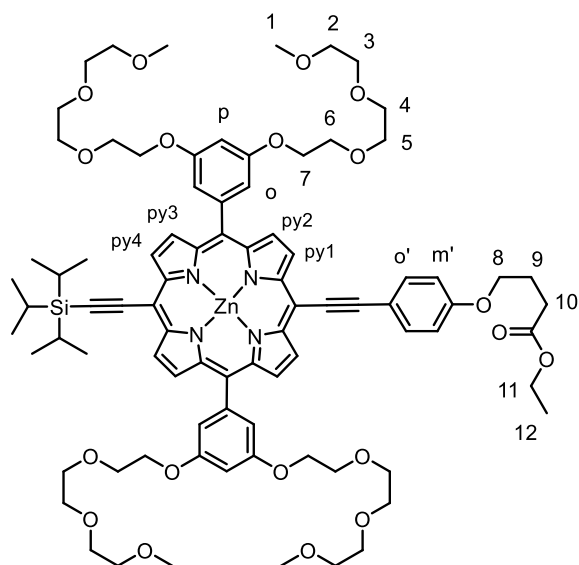
To a mixture of 4-iodophenol (830 mg, 3.77 mmol, 1 eq) and K₂CO₃ (1.04 g, 7.52 mmol, 2 eq) in acetone (15 mL) was added ethyl 4-bromobutyrate (882 mg, 4.52 mmol, 1.2 eq) and the reaction mixture was stirred at 55 °C for 24 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated and the product was extracted with ethyl acetate (15 mL). The organic phase was washed with water (5 x 15 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash silica column chromatography (PE/ DCM, 0 to 40 %) to give **10** as a colorless oil in 95 % yield (1.20 g).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 1.25 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, H₁₂), 2.09 (tt, 2H, ³J = 6.1 Hz, ³J = 7.3 Hz, H₉), 2.49 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₈), 3.96 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, H₁₀), 4.14 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, H₁₁), 6.66 (d, 2H, ³J = 9 Hz, H_{m'}), 7.54 (d, 2H, ³J = 9 Hz, H_{o'}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.37, 24.62, 30.82, 60.63, 66.93, 82.86, 117.00, 138.32, 158.81, 173.27.

HR ESI-MS: *m/z* 356.9973 [M + Na]⁺, (calcd 356.9958 for [C₁₂H₁₅N₄O₁₉I NaO₃]⁺).

Zn(II) porphyrin **11**



Mono-deprotected porphyrin **9** (153 mg, 111 μmol , 1 eq), **10** (40.8 mg, 122 μmol , 1.1 eq), CuI (2.1 mg, 11.1 μmol , 0.1 eq) and Pd(PPh₃)₄ (12.8 mg, 11.1 μmol , 0.1 eq) were dried under vacuum at 40 °C for 30 min and then flushed with argon. A solution of distilled THF (10 mL) and (*i*Pr)₂NH (2 mL) degassed by three freeze-thaw cycles was then transferred *via canula* and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 1.5 %) to give **11** as a green solid in 70 % yield (123 mg).

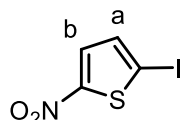
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, H₁₂), 1.42-1.47 (m, 21H, (iPr)₃-Si), 2.17 (tt, 2H, ³J = 6.1 Hz, ³J = 7.2 Hz, H₉), 2.57 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, H₈) 2.68 (s, 12H, H₁), 2.84-2.87 (m, 8H, H₂), 3.07-3.11 (m, 8H, H₃), 3.46-3.49 (m, 8H, H₄) 3.62-3.65 (m, 8H, H₅), 3.84-3.87 (m, 8H, H₆), 4.12 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, H₁₀), 4.15 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, H₁₁) 4.28-4.31 (m, 8H, H₇), 6.89 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, H_p), 7.05 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{m'}), 7.44 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 7.94 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{o'}), 8.95 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 8.96 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 9.67 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4), 9.71 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 12.01, 14.37, 19.25, 24.67, 30.86, 58.50, 60.64, 66.99, 68.08, 69.97, 70.53, 70.80, 71.20, 91.69, 96.72, 98.04, 101.13, 101.65, 102.24, 109.79, 114.86, 114.97, 116.47, 122.28, 131.00, 131.09, 132.57, 132.86, 133.23, 144.30, 149.75, 149.82, 151.90, 152.64, 157.98, 159.22, 173.32.

HR ESI-MS: m/z 1605.6713 $[M + Na]^+$, (calcd 1605.6717 for $[C_{85}H_{110}N_4O_{19}SiZnNa]^+$).

UV-Visible (DCM): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 449 (5.37), 589 sh, 644 (4.49) nm.

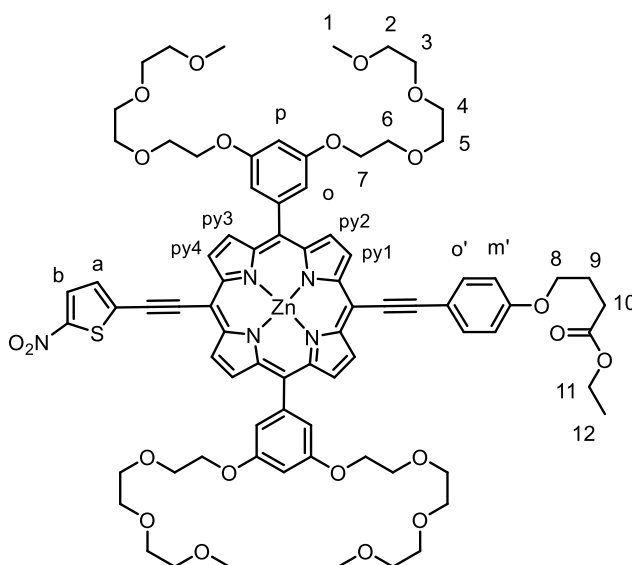
2-iodo-5-nitro-thiophene **12** ¹⁹⁵



To a solution of acetic anhydride (2 mL) and nitric acid 70 % (422 μ L, 9.51 mmol, 2 eq) cooled at -5 °C was added a solution of 2-iodothiophene (1 g, 4.76 mmol, 1 eq) in acetic anhydride (1 mL). The solution was stirred at -5 °C for 2 h 30 and the reaction was quenched with cold water (3 mL). After filtration the precipitate was washed with cold water (5 mL) and then recrystallised in MeOH (5 mL). The product **12** was obtained as a beige solid in 73 % yield (882 mg).

¹H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, 298 K): δ (ppm) = 7.57 (d, 1H, $^3J = 4.0$ Hz, H_a), 7.82 (d, 1H, $^3J = 4.0$ Hz, H_b).

Zn(II) porphyrin **13**



To a three freeze-thaw cycles degassed solution of **11** (116 mg, 73.2 μ mol, 1 eq) in THF (21 mL) was added a solution of TBAF \cdot 3H₂O (23.1 mg, 73.2 μ mol, 1 eq) in THF (1 mL). The solution was stirred at room temperature for 30 min and then quenched with anhydrous calcium chloride (40.6 mg,

366 μmol , 5 eq). The solvent was evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 3 %) to give a green solid (104 mg). Due to its instability, the deprotected compound was used without delay for the next reaction.

The deprotected porphyrin (104 mg, 72.8 μmol , 1 eq), 2-iodo-5-nitrothiophene **12** (27.8 mg, 109 μmol , 1.5 eq), CuI (1.39 mg, 7.28 μmol , 0.1 eq) and Pd(PPh₃)₄ (8.41 mg, 7.28 μmol , 0.1 eq) were dried under vacuum at 40 °C for 30 min and then flushed with argon. A solution of distilled THF (7.5 mL) and (*i*Pr)₂NH (1.5 mL) under argon degassed by three freeze-thaw cycles was then transferred *via canula* and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 1.5 %) to give **13** as a khaki solid in 94 % yield (106 mg).

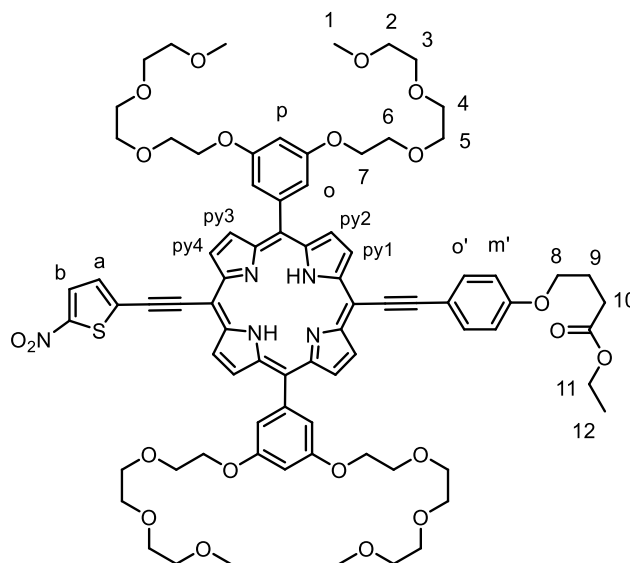
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, H₁₂), 2.16 (tt, 2H, ³J = 6.1 Hz, ³J = 7.2 Hz, H₉), 2.56 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, H₈), 2.61 (s, 12H, H₁), 2.77-2.80 (m, 8H, H₂), 3.02-3.05 (m, 8H, H₃), 3.43-3.46 (m, 8H, H₄), 3.60-3.63 (m, 8H, H₅), 3.83-3.86 (m, 8H, H₆), 4.09 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, H₁₀), 4.16 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, H₁₁), 4.28-4.31 (m, 8H, H₇), 6.90 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, H_p), 7.03 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{m'}), 7.41 (d, 1H, ³J = 4.3 Hz, H_a), 7.45 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 7.90 (d, 1H, ³J = 4.3 Hz, H_b), 7.92 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{o'}), 8.94 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 8.97 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 9.48 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4), 9.69 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.40, 24.70, 30.88, 58.46, 60.67, 67.03, 68.21, 69.92, 70.10, 70.58, 70.84, 71.12, 88.14, 91.52, 97.49, 97.58, 101.89, 103.08, 103.84, 114.97, 114.98, 116.18, 123.14, 129.20, 130.22, 130.38, 131.35, 132.31, 132.72, 133.29, 133.43, 144.00, 149.77, 150.22, 151.90, 152.06, 158.10, 159.38, 173.33.

HR ESI-MS: m/z 1576.5067 [M + Na]⁺, (calcd 1576.5111 for [C₈₀H₉₁N₅O₂₁SZnNa]⁺).

UV-Visible (DCM): λ_{max} (log ϵ) = 457 (5.31), 593 sh, 667 (4.81) nm.

Photosensitizer PS₁



To a solution of **13** (81 mg, 52.1 μmol , 1 eq) in DCM (10 mL) was added TFA (500 μL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The solution was washed with a saturated NaHCO_3 solution (2 x 10 mL), followed by water (2 x 10 mL). The resulting organic phase was dried over Na_2SO_4 and the solvent was evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 1.5 %) to give **PS₁** as a green solid in 99 % yield (77 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = -1.95 (s, 2H, NH), 1.31 (t, 3H, $^3J = 7.2$ Hz, H_{12}), 2.21 (tt, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, H_9), 2.60 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, H_8), 3.33 (s, 12H, H_1), 3.50-3.52 (m, 8H, H_2), 3.63-3.65 (m, 8H, H_3), 3.70-3.72 (m, 8H, H_4), 3.78-3.80 (m, 8H, H_5), 3.95-3.97 (m, 8H, H_6), 4.14-4.23 (m, 4H, H_{10} , H_{11}), 4.32-4.34 (m, 8H, H_7), 6.98 (t, 2H, $^4J = 2.3$ Hz, H_p), 7.07 (d, 2H, $^3J = 8.8$ Hz, $\text{H}_{m'}$), 7.38 (d, 4H, $^4J = 2.3$ Hz, H_o), 7.50 (d, 1H, $^3J = 4.2$ Hz, H_a), 7.94-7.97 (m, 3H, H_b , $\text{H}_{o'}$), 8.89 (d, 2H, $^3J = 4.8$ Hz, py2 or py3), 8.93 (d, 2H, $^3J = 4.8$ Hz, py2 or py3), 9.47 (d, 2H, $^3J = 4.8$ Hz, py1 or py4), 9.64 (d, 2H, $^3J = 4.8$ Hz, py1 or py4).

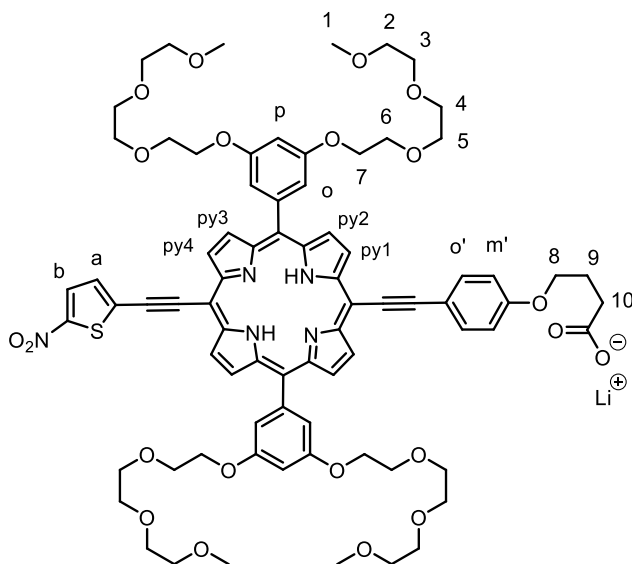
¹³C NMR (126 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 14.42, 24.73, 30.91, 59.17, 60.70, 67.09, 67.97, 69.95, 70.71, 70.81, 71.03, 72.03, 88.67, 90.71, 97.51, 98.57, 101.59, 103.66, 114.68, 115.06, 115.82, 122.24, 129.15, 130.91, 131.75, 133.47, 142.91, 150.78, 158.32, 159.67, 173.34.

HR ESI-MS: m/z 1492.6130 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, (calcd 1492.6157 for [$\text{C}_{80}\text{H}_{94}\text{N}_5\text{O}_{21}\text{S}$]⁺).

UV-Visible (DCM): λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 457 (5.34), 618 (4.78), 702 (4.70) nm.

UV-Visible (DMSO): λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 459 (5.32), 619 (4.78), 702 (4.71) nm.

Free-base porphyrin **14**



To a solution of **PS**₁ (52 mg, 34.8 μ mol, 1 eq) in THF (3 mL) was added an aqueous solution of LiOH 0.5 M (700 μ L, 351 μ mol, 10 eq) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvents were evaporated and the product was dissolved in DCM (5 mL) and washed with H₂O (3 x 5 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvents were evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 1.5 to 3 %) to give **14** as a green salt in 86 % yield (44 mg).

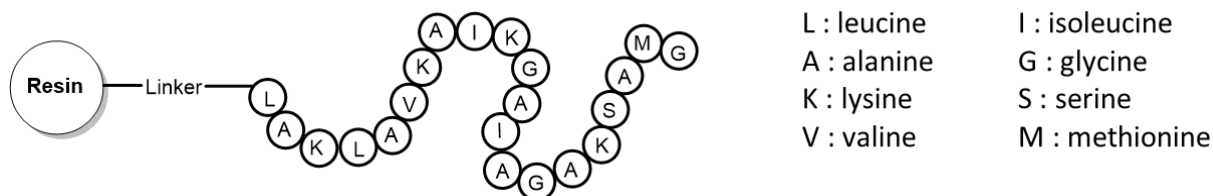
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = -1.97 (s, 2H, NH), 2.19 (tt, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, H₉), 2.64 (t, 2H, $^3J = 7.1$ Hz, H₈), 3.32 (s, 12H, H₁), 3.49-3.52 (m, 8H, H₂), 3.63-3.65 (m, 8H, H₃), 3.69-3.72 (m, 8H, H₄), 3.78-3.80 (m, 8H, H₅), 3.95-3.97 (m, 8H, H₆), 4.08 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, H₁₀), 4.32-4.35 (m, 8H, H₇), 6.95-6.99 (m, 4H, m', H_p), 7.36 (d, 1H, $^3J = 4.3$ Hz, H_a), 7.39 (d, 4H, $^4J = 2.2$ Hz, H_o), 7.82-7.83 (m, 3H, H_{o'}, H_b), 8.89 (d, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, py2 or py3), 8.93 (d, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, py2 or py3), 9.44 (d, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, py1 or py4), 9.62 (d, 2H, $^3J = 4.7$ Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.21, 24.48, 30.35, 59.14, 66.81, 67.97, 69.95, 70.69, 70.80, 71.02, 72.01, 88.63, 90.73, 97.53, 98.52, 101.53, 101.61, 103.64, 114.71, 114.91, 115.77, 122.22, 128.98, 130.73, 131.58, 133.32, 142.93, 150.62, 158.34, 159.45, 177.22.

HR ESI-MS: m/z 732.7979 [M + 2H]²⁺/2, (calcd 732.7958 for [C₇₈H₉₁N₅O₂₁S]²⁺/2).

UV-Visible (DCM): λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 455 (5.25), 618 (4.63), 702 (4.52) nm.

PGLa on resin



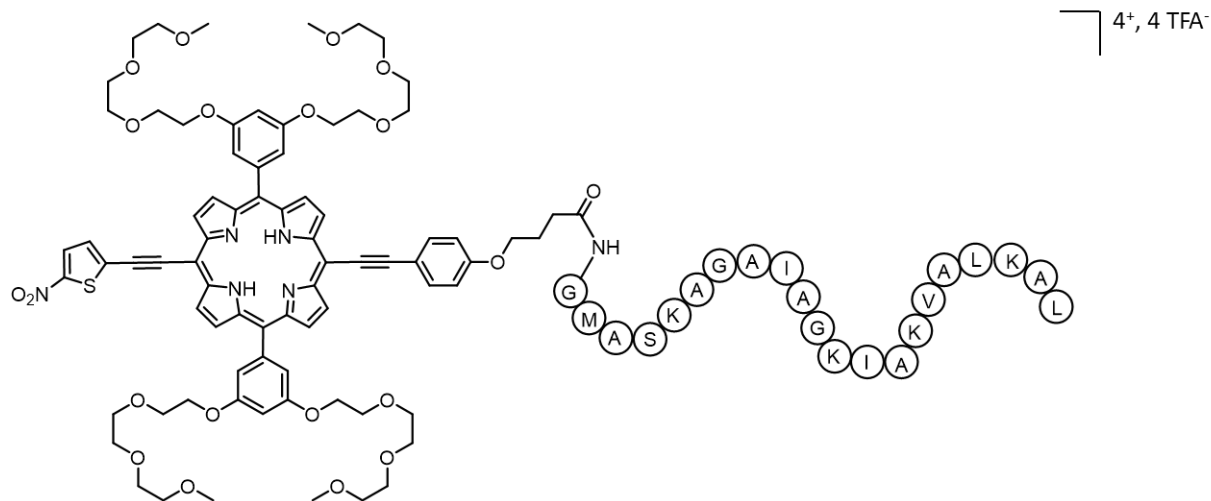
The peptide was synthesized on an automated peptide synthesizer starting from Fmoc-Leu-OH (NovaSyn[®]TG Sieber resin substitution: 0.140 mmol/g). Twenty commercial amino acids with Fmoc protected amino function were successively added to reach the desired peptide sequence. The amino function of the coupled lysine side chain is protected by a Mmt group and the alcohol function of the coupled serine side chain is protected by a Trt group.

The coupling of each amino acid started with the deprotection of Fmoc group with a solution of DMF/piperidine (80 : 20) for 20 min then the coupling reaction was carried out with excess of HBTU (20 eq) and DIPEA (40 eq) with 4 eq of the Fmoc amino acid to graft (reaction time per cycle involving deprotection, coupling reaction and washing: 1 h 27). After the synthesis was completed, the resin was washed with DMF and EtOH.

In order to obtain **PGLa** as a reference compound, a small fraction of PGLa on resin was engaged in the next step. Cleavage and deprotection were performed in one step with 5 mL of a solution of TFA/H₂O/EDT/TIS (94 : 2.5 : 2.5 : 1) for 2 h at room temperature then the resin was filtrated and washed with TFA (3 x 2 mL). The filtrate was poured in diethyl ether and centrifuged three times, then the residual solid was dissolved in H₂O and lyophilized. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/MeCN 90 : 10 with 0.1 % TFA and MeCN with 0.1 % TFA, with a linear gradient from 80/20 to 70/30 in 20 min) and the fractions containing **PGLa** as a pure compound were lyophilized to give a white TFA salt.

MS (MALDI-TOF): 1968.961 [M], (calcd 1968.487 for [C₈₈H₁₆₂N₂₆O₂₂S]).

Cofonjugate PS₁-PGLa ¹⁸²



To a solution of **14** (11 mg, 7.48 μmol , 1 eq) in DMF (1 mL) was added TBTU (7.2 mg, 22.4 μmol , 3 eq) and DIPEA (13 μL , 75 μmol , 10 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. In parallel, the PGLa grafted on the resin (285 mg, 37.1 μmol , 5 eq) was swelled in DMF for 1 h. The solution of porphyrin activated, TBTU and DIPEA was then added to the PGLa on resin and the reaction mixture was gently stirred for 72 h. After filtration, the grafted resin was washed with DMF (2 x 5 mL). Cleavage and deprotection were performed using 5 mL of a solution of HFIP/TFA (99 : 1) for 2 h at room temperature. Then the resin was filtrated and washed with HFIP (3 x 2 mL) and the filtrate was poured into diethyl ether and centrifuged three times. The resulting solid was dissolved in H₂O and lyophilized. The crude product was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/MeCN 90 : 10 with 0.1 % TFA and MeCN with 0.1 % TFA, with a linear gradient from 45/55 to 20/80 in 25 min) and the fractions containing the pure compound were lyophilized to lead to the conjugate **PS₁-PGLa** as a green TFA salt in 40 % yield (11.6 mg).

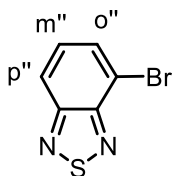
HPLC t_R = 20.76 min

HR ESI-MS: m/z 1143.9333 [$M + 3 H$]³⁺/3, (calcd 1143.9303 for [$C_{166}H_{252}N_{31}O_{43}S_2$]³⁺/3).

UV-Visible (DMSO): λ_{max} (log ϵ) = 459 (5.26), 619 (4.67), 702 (4.58) nm.

UV-Visible (H₂O): λ_{max} (log ϵ) = 455 (4.74), 636 (4.34), 720 (4.32) nm.

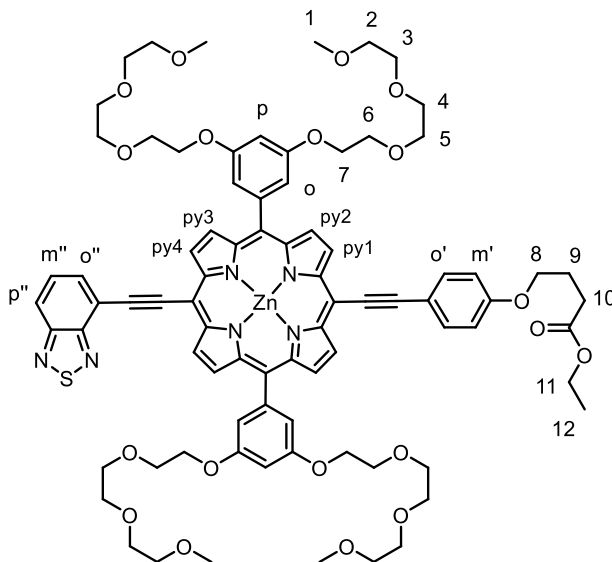
4-Bromo-BTD **15** ²⁰⁹



To a solution of 2,1,3-benzothiadiazole (500 mg, 3.67 mmol, 1 eq) in sulfuric acid 95 % (2.5 mL) was added dropwise a solution of N-bromosuccinimide (654 mg, 3.67 mmol, 1 eq) in sulfuric acid 95 % (2.5 mL) and the reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h. The mixture was cooled to room temperature and then quenched with water (30 mL) and the crude organic phase was extracted with DCM (5 x 25 mL), dried over Na₂SO₄ and evaporated. The crude product was recrystallized in EtOH several times (5 mL) to give **18** as a white solid in 35 % yield (276 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 7.47 (dd, 1H, ³J = 8.8 Hz, ³J = 8.8 Hz, H_{m''}), 7.82 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, H_{p''}), 7.95 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, H_{o''})

Zn(II) porphyrin **16**



The same reaction conditions than for the synthesis of **13** were used to obtain **16**.

The following quantities were used: **11** (87 mg, 54.9 μmol, 1 eq), TBAF·3H₂O (17.4 mg, 54.9 μmol, 1 eq), CaCl₂ (30.5 mg, 274 μmol, 5 eq), THF (17 mL) then **15** (17.6 mg, 81.9 μmol, 1.5 eq), CuI (1.04 mg, 5.46 μmol, 0.1 eq) and Pd(PPh₃)₄ (6.31 mg, 5.46 μmol, 0.1 eq), THF (5 mL), (*i*Pr)₂NH (1 mL).

The porphyrin **16** was obtained as a green solid in 66 % yield (56 mg).

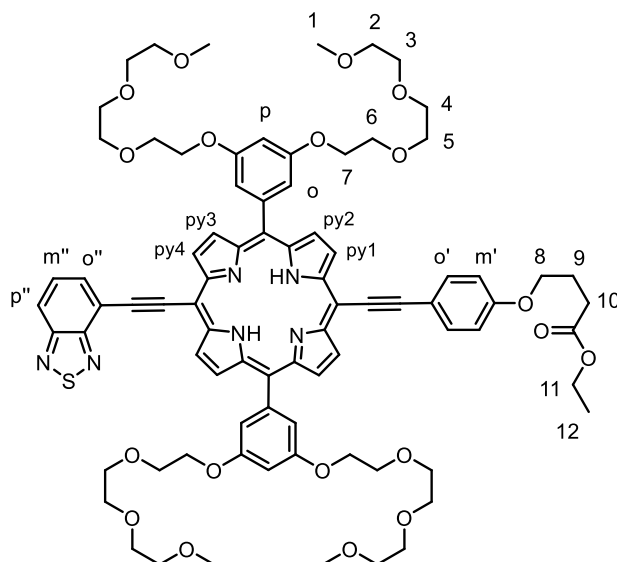
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz, H₁₂), 2.16 (tt, 2H, ³J = 6.1 Hz, ³J = 7.2 Hz, H₉), 2.56 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, H₈), 2.72 (s, 12H, H₁), 2.88-2.90 (m, 8H, H₂), 3.12-3.14 (m, 8H, H₃), 3.46-3.49 (m, 8H, H₄) 3.63-3.65 (m, 8H, H₅), 3.85-3.88 (m, 8H, H₆), 4.10 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, H₁₀), 4.16 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz, H₁₁), 4.29-4.32 (m, 8H, H₇), 6.92 (t, 2H, ⁴J = 2.1 Hz, H_p), 7.04 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{m'}), 7.35 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, H_{p''}), 7.46 (d, 4H, ⁴J = 2.1 Hz, H_o), 7.55 (dd, 1H, ³J = 8.8 Hz, ³J = 8.8 Hz, H_{m''}), 7.90-7.92 (m, 3H, H_{o'}, H_{o''}), 8.94 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 8.99 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 9.67 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4), 9.83 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.39, 24.72, 30.90, 58.55, 60.65, 67.03, 68.15, 70.06, 70.61, 70.87, 71.27, 91.66, 92.32, 97.00, 99.85, 100.18, 101.73, 102.85, 114.90, 114.98, 116.38, 117.94, 120.63, 122.68, 129.65, 131.09, 131.16, 132.57, 133.19, 133.24, 144.27, 149.83, 149.93, 151.85, 152.48, 154.05, 155.08, 158.07, 159.29, 173.32.

UV-Visible (DCM): λ_{\max} (log ϵ) = 460 (5.43), 615 sh, 658 (4.79) nm.

HR ESI-MS: m/z 1560.5420 [M + H]⁺, (calcd 1560.5424 for [C₈₂H₉₃N₆O₁₉SZn]⁺).

Photosensitizer PS₂



The same reaction conditions than for the synthesis of **PS₁** were used to obtain **PS₂**.

The following quantities were used: **16** (42 mg, 26.9 μ mol), DCM (5 mL), TFA (250 μ L).

The photosensitizer **PS₂** was obtained as a green solid in 90 % yield (36 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = -1.94 (s, 2H, NH), 1.31 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, H₁₂), 2.21 (tt, 2H, ³J = 6.2 Hz, ³J = 7.3 Hz, H₉), 2.60 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H₈), 3.32 (s, 12H, H₁), 3.50-3.52 (m, 8H, H₂), 3.64-3.65 (m, 8H, H₃), 3.71-3.72 (m, 8H, H₄) 3.79-3.81 (m, 8H, H₅), 3.96-3.98 (m, 8H, H₆), 4.15 (t, 2H, ³J = 6.2 Hz, H₁₀), 4.20 (q, 2H, ³J = 7.2 Hz, H₁₁), 4.33-4.35 (m, 8H, H₇), 6.97 (t, 2H, ⁴J = 2.3 Hz, H_p), 7.08 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{m'}), 7.41 (d, 4H, ⁴J = 2.3 Hz, H_o), 7.72 (dd, 1H, ³J = 6.9 Hz, ³J = 8.7 Hz, H_{m''}), 7.95 (d, 2H, ³J = 8.8 Hz, H_{o'}), 8.05 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz, H_{p''}), 8.15 (d, 1H, ³J = 6.9 Hz, H_{o''}), 8.90 (d, 2H, ³J = 4.7 Hz, py2 or py3), 8.98 (d, 2H, ³J = 4.7 Hz, py2 or py3), 9.65 (d, 2H, ³J = 4.7 Hz, py1 or py4), 9.95 (d, 2H, ³J = 4.7 Hz, py1 or py4).

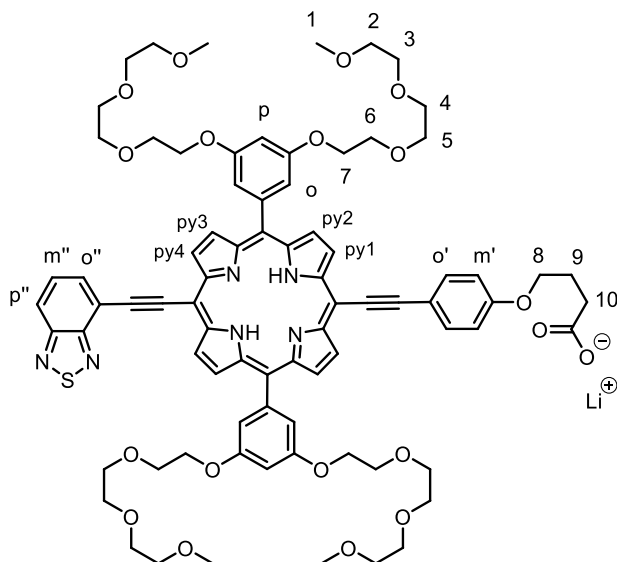
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.41, 24.74, 30.92, 59.16, 60.69, 67.06, 67.97, 69.96, 70.70, 70.80, 71.02, 72.02, 90.84, 93.30, 97.98, 99.16, 99.93, 101.56, 102.64, 114.68, 115.03, 116.01, 117.93, 121.75, 121.79, 129.60, 131.72, 133.40, 143.19, 154.94, 155.40, 158.30, 159.54, 173.35.

UV-Visible (DCM): λ_{\max} (log ϵ) = 455 (5.25), 612 (4.55), 695 (4.39) nm.

UV-Visible (DMSO): λ_{\max} (log ϵ) = 456 (5.28), 613 (4.58), 697 (4.40) nm.

HR ESI-MS: m/z 1499.6359 [M + H]⁺, (calcd 1499.6367 for [C₈₂H₉₅N₆O₁₉S]⁺).

Free-base porphyrin **17**



The same reaction conditions than for the synthesis of **14** were used to obtain **17**.

The following quantities were used: **PS₂** (28 mg, 18.7 μ mol, 1 eq), LiOH_{aq} 0.5 M (375 μ L, 188 μ mol,

10 eq), THF (1.5 mL).

The porphyrin **17** was obtained as a green salt in 84 % yield (23 mg).

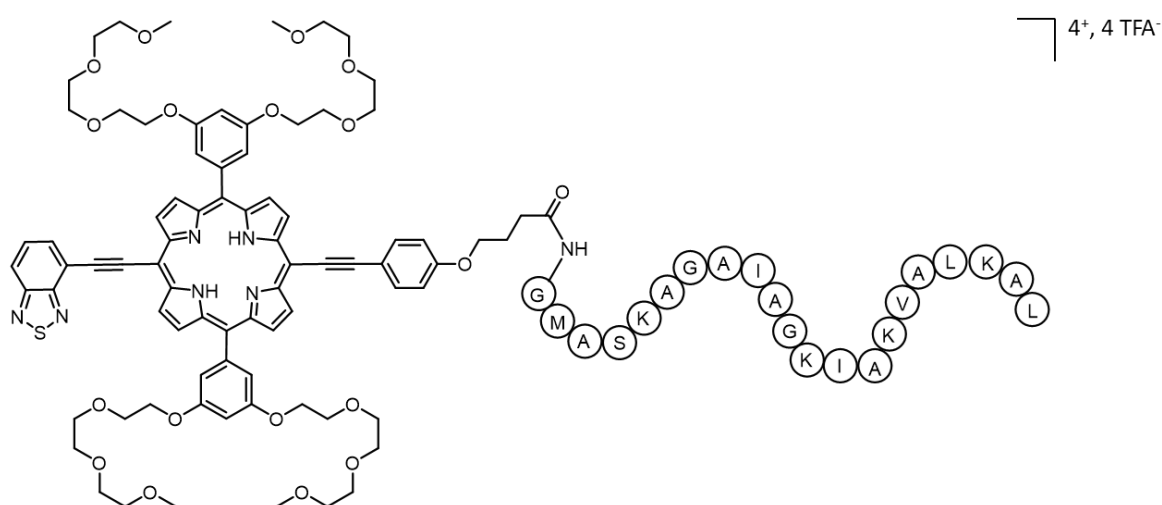
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = -1.96 (s, 2H, NH), 2.18 (tt, 2H, ³J = 6.4 Hz, ³J = 7.0 Hz, H₉), 2.64 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, H₈), 3.32 (s, 12H, H₁), 3.49-3.51 (m, 8H, H₂), 3.63-3.65 (m, 8H, H₃), 3.70-3.72 (m, 8H, H₄), 3.78-3.80 (m, 8H, H₅), 3.95-3.97 (m, 8H, H₆), 4.08 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz, H₁₀), 4.33-4.34 (m, 8H, H₇), 6.97-7.00 (m, 4H, H_p, H_{m'}), 7.41 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 7.70 (dd, 1H, ³J = 8.6 Hz, ³J = 8.6 Hz, H_{m''}), 7.87 (d, 2H, ³J = 8.7 Hz, H_{o'}), 8.03 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, H_{p''}), 8.13 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz, H_{o''}), 8.90 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 8.97 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py2 or py3), 9.62 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4), 9.94 (d, 2H, ³J = 4.6 Hz, py1 or py4).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 14.21, 24.49, 30.34, 59.14, 66.82, 69.96, 70.68, 70.80, 71.02, 72.01, 90.86, 93.30, 97.96, 99.15, 99.94, 101.58, 102.64, 114.71, 114.94, 116.01, 117.90, 121.70, 121.78, 129.56, 131.67, 133.31, 143.20, 154.90, 155.36, 158.31, 159.37, 177.11.

UV-Visible (DCM): λ_{\max} (log ϵ) = 455 (5.28), 612 (4.59), 698 (4.37) nm.

HR ESI-MS: m/z 736.3111 [M + 2H]²⁺/2, (calcd 736.3063 for [C₈₀H₉₂N₆O₁₉S]²⁺/2).

Conjugate PS₂-PGLa



The same reaction conditions than for the synthesis of PS₁-PGLa were used to PS₂-PGLa.

The following quantities were used: **17** (10 mg, 6.79 μ mol, 1 eq), TBTU (6.6 mg, 20.6 μ mol, 3 eq),

DIPEA (12 μ L, 69.4 μ mol, 10 eq), DMF (1 mL), PGLa on resin (261 mg, 34 μ mol, 5 eq).

The conjugate **PS₂-PGLa** was obtained as a green TFA salt in 43 % yield (11.3 mg).

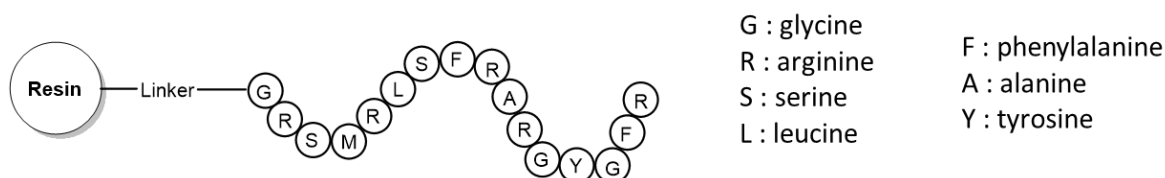
HPLC t_R = 21.12 min

HR ESI-MS: m/z 859.9560 $[M + 4 H]^4$, (calcd 859.9548 for $[C_{168}H_{254}N_{32}O_{41}S_2]^4$).

UV-Visible (DMSO): λ_{max} (log ϵ) = 456 (5.27), 614 (4.62), 697 (4.45) nm.

UV-Visible (H₂O): λ_{max} (log ϵ) = 457 (4.82), 625 (4.40), 709 (4.30) nm.

Gly-D-Ctl on resin



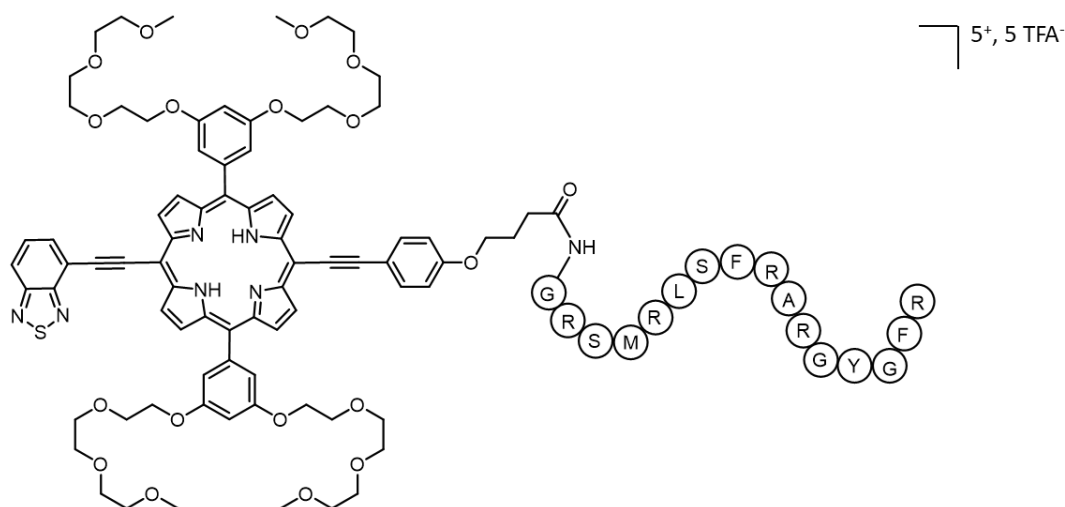
The peptide was synthesized on an automated peptide synthesizer starting from Fmoc-Arg-OH (Sieber resin substitution: 0.220 mmol/g). Fifteen commercial amino acids with Fmoc protected amino function were successively added to reach the desired peptide sequence. The guanidino group of the coupled arginine side chain is protected by a Pbf group and the alcohol function of the coupled serine and tyrosine side chain is protected by a tBu group.

The same reaction conditions than for **PGLa** were used.

The crude product was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/MeCN 90 : 10 with 0.1 % TFA / MeCN with 0.1 % TFA, with a linear gradient from 90/10 to 60/40 in 20 min) and the fractions containing **Gly-D-Ctl** as a pure compound were lyophilized to give the peptide as a white TFA salt.

MS (MALDI-TOF): 1932.913 [M], (calcd 1932.000 for $[C_{83}H_{133}N_{31}O_{21}S]$).

Conjugate PS₂-Gly-D-Ctl



The same reaction conditions than for **PS₁-PGLa** were used to obtain **PS₂-Gly-D-Ctl**, excepted for the cleavage and deprotection. It was performed using 5 mL of a solution of TFA/H₂O/EDT/TIS (94 : 2.5 : 2.5 : 1) for 2 h at room temperature.

The following quantities were used: **17** (11 mg, 7.37 μmol, 1 eq), TBTU (7.2 mg, 22.4 μmol, 3 eq), DIPEA (13 μL, 75 μmol, 10 eq), DMF (1 mL), Gly-D-Ctl on resin (168 mg, 37.1 μmol, 5 eq).

The crude product was purified by reverse-phase HPLC (H₂O/MeCN 90 : 10 with 0.1 % TFA / MeCN with 0.1 % TFA, with a linear gradient from 50/50 to 30/70 in 20 min) and the fractions containing the pure compound were lyophilized to lead to the conjugate **PS₂-Gly-D-Ctl** as a green TFA salt in 34 % yield (10.1 mg).

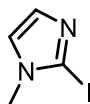
HPLC t_R = 18.94 min

HR ESI-MS: m/z 1128.8722 [M + 3H]³⁺/3, (calcd 1128.8676 for [C₁₆₃H₂₂₅N₃₈O₃₈S₂]³⁺/3).

UV-Visible (H₂O): λ_{max} = 459, 627, 710 nm.

Chapitre IV

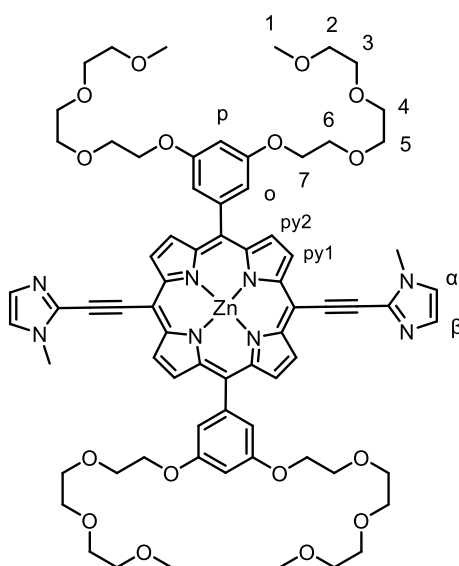
2-Iodo-1-méthyl-1*H*-imidazole **18** ²³¹



To a three freeze-thaw cycles degassed solution of 1-methyl-1*H*-imidazole (718 mg, 8.74 mmol, 1 eq) in THF (40 mL) at -78 °C was added dropwise *n*-BuLi (2.5 M in THF, 9.62 mmol, 1.1 eq). The resulting solution was stirred for 2h then a solution of I₂ (2.66 g, 10.5 mmol, 1.2 eq) in degassed THF (10 mL) was added dropwise and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h. After the addition of aqueous saturated Na₂S₂O₃ (3 mL) the solvent was evaporated and the product was dissolved in CHCl₃ (10 mL) and washed with saturated Na₂S₂O_{3aq} (2 x 10 mL) then H₂O (2 x 10 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvents were evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 2 %) to give **18** as a white solid in 88 % yield (1.61 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 6.97 (m, 2H), 3.54 (s, 3H).

Zn(II) porphyrin **19**



To a three freeze-thaw cycles degassed solution of the TIPS protected Zn(II)porphyrin **8** (88 mg, 57.3 μmol, 1 eq) in THF (15 mL) was added a solution of TBAF.3H₂O (36.2 mg, 115 μmol, 2 eq) in THF (1

mL). The solution was stirred at room temperature for 20 min and the reaction was quenched with anhydrous calcium chloride (31.8 mg, 287 μmol , 5 eq). The solvent was evaporated and the crude product was rapidly purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 3 %) to give a green solid (70 mg). Due to its instability, the fully deprotected compound obtained as a green solid was used without delay for the next reaction.

The deprotected porphyrin (70 mg, 57.3 μmol , 1 eq), 2-Iodo-1-méthyl-1*H*-imidazole **18** (35.7 mg, 172 μmol , 3 eq), CuI (2.2 mg, 11.4 μmol , 0.2 eq) and Pd(PPh₃)₄ (13.2 mg, 11.4 μmol , 0.2 eq) were dried under vacuum at 40 °C for 30 min and then flushed with argon. A solution of distilled THF (5 mL) and (*i*Pr)₂NH (1 mL) under argon degassed by three freeze-thaw cycles was then transferred *via canula* and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 1 h. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 4 %) to give **19** as a green solid in 78 % yield (62 mg).

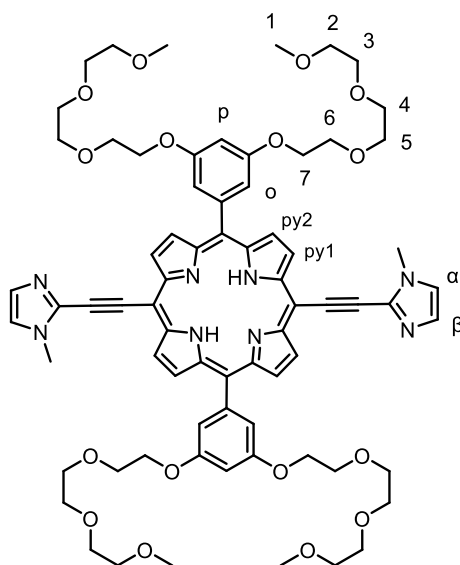
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + pyridine-d₅, 298 K): δ (ppm) = 3.21 (s, 12H, H₁), 3.39-3.41 (m, 8H, H₂), 3.52-3.55 (m, 8H, H₃), 3.58-3.61 (m, 8H, H₄), 3.67-3.69 (m, 8H, H₅), 3.83-3.86 (m, 8H, H₆), 4.07 (4, 6H, N-CH₃), 4.21-4.23 (m, 8H, H₇), 6.86 (t, 2H, ⁴*J* = 2.3 Hz, H _{ρ}), 7.03 (m, 2H, H _{α} or H _{β}), 7.14 (m, 2H, H _{α} or H _{β}), 7.27 (d, 4H, ⁴*J* = 2.3 Hz, H _{σ}), 8.86 (d, 4H, ³*J* = 4.6 Hz, py2), 9.59 (d, 4H, ³*J* = 4.6 Hz, py1).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃ + pyridine-d₅, 298 K): δ (ppm) = 33.71, 58.58, 67.43, 69.47, 70.19, 70.30, 70.51, 71.54, 84.92, 96.12, 99.06, 100.63, 114.40, 121.64, 122.34, 129.78, 143.93, 149.69, 151.6, 157.59.

HR ESI-MS: *m/z* 691.2719 [M+ 2H]²⁺/2, (calcd 691.2721 for [C₇₂H₈₆N₈O₁₆Zn]²⁺/2).

UV-Visible (DCM + 1 % pyridine): λ_{max} (log ϵ) = 455 (5.49), 606 br, 661 (4.61) nm.

Free-base porphyrin **20**



To a solution of porphyrin **19** (20 mg, 14.5 μmol , 1 eq) in DCM (5 mL) was added TFA (250 μL) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was washed with a saturated NaHCO_3 solution (2 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated. The crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 2 to 2.5 %) to give **20** as a green solid in 99 % yield (19 mg).

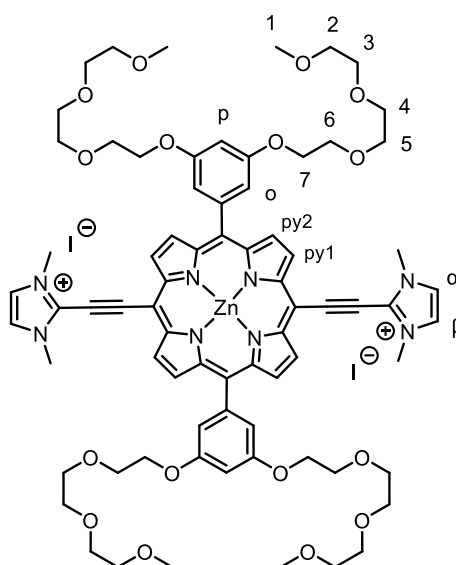
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = -2.08 (s, 2H, NH), 3.32(s, 12H, H_1), 3.48-3.52 (m, 8H, H_2), 3.62-3.65 (m, 8H, H_3), 3.68-3.72 (m, 8H, H_4), 3.77-3.81 (m, 8H, H_5), 3.94-3.97 (m, 8H, H_6), 4.23 (d, 6H, N- CH_3), 4.30-4.34 (m, 8H, H_7), 6.96 (t, 2H, $^4J = 2.3$ Hz, H_p), 7.18 (d, 2H, $^3J = 1.2$ Hz, H_α or H_β), 7.33 (d, 2H, $^3J = 1.2$ Hz, H_α or H_β), 7.36 (d, 4H, $^4J = 2.3$ Hz, H_o), 8.92 (d, 4H, $^3J = 4.9$ Hz, py2), 9.66 (d, 4H, $^3J = 4.9$ Hz, py1).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 34.33, 59.16, 67.97, 69.95, 70.70, 70.81, 71.03, 72.03, 86.42, 95.13, 99.73, 101.62, 114.66, 122.09, 122.33, 130.59, 133.29, 142.91, 158.31.

HR ESI-MS: m/z 660.3153 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}/2$, (calcd 660.3154 for $[\text{C}_{72}\text{H}_{88}\text{N}_8\text{O}_{16}]^{2+}/2$).

UV-Visible (DCM): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 448 (5.41), 601 (4.52), 690 (4.30) nm.

Photosensitizer PZn-imi



To a solution of porphyrin **19** (25 mg, 18.1 μmol , 1 eq) in dry DMF (500 μL) was added MeI (100 μL , 1.61 mmol, 89 eq) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into diethyl ether and centrifuged, then the residual solid was dissolved in H_2O and lyophilized to give **PZn-imi** as a green iodide salt in 76 % yield (19 mg).

^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 298 K): δ (ppm) = 3.18 (s, 12H, H_1), 3.38-3.40 (m, 8H, H_2), 3.50-3.52 (m, 8H, H_3), 3.55-3.57 (m, 8H, H_4), 3.63-3.65 (m, 8H, H_5), 3.84-3.86 (m, 8H, H_6), 4.34-4.35 (m, 20H, N- CH_3 , H_7), 7.08 (t, 2H, $^4J = 2.2$ Hz, H_p), 7.35 (d, 4H, $^4J = 2.2$ Hz, H_o), 8.08 (s, 4H, H_α and H_β), 8.99 (d, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, py2), 9.66 (d, 4H, $^3J = 4.6$ Hz, py1).

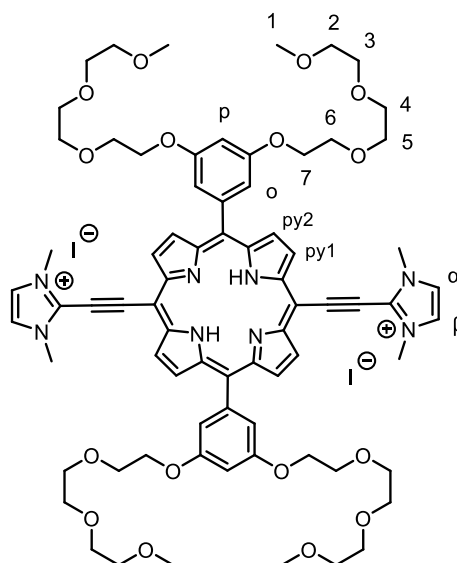
^{13}C NMR (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 298 K): δ (ppm) = 36.49, 58.00, 67.69, 69.06, 69.59, 69.82, 70.01, 71.24, 77.11, 95.81, 100.84, 114.45, 123.86, 124.45, 129.99, 143.02, 150.20, 151.12, 157.88.

HR ESI-MS: m/z 705.2908 $[\text{M}]^{2+}/2$, (calcd 705.2878 for $[\text{C}_{74}\text{H}_{90}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{Zn}]^{2+}/2$).

UV-Visible (DMSO): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 455 (5.44), 664 (4.58) nm.

UV-Visible (H_2O , pH = 7.4): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 452 (5.26), 664 (4.59) nm.

Photosensitizer PH₂-imi



To a solution of porphyrin **20** (18 mg, 7.58 μmol , 1 eq) in dry DMF (500 μL) was added MeI (100 μL , 1.61 mmol, 212 eq) and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into diethyl ether and centrifuged, then the residual solid was dissolved in H₂O and lyophilized to give **PH₂-imi** as a green iodide salt in 84 % yield (15 mg).

¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO, 298 K): δ (ppm) = -2.29 (s, 2H, NH), 3.16 (s, 12H, H₁), 3.36-3.38 (m, 8H, H₂), 3.49-3.51 (m, 8H, H₃), 3.55-3.57 (m, 8H, H₄), 3.63-3.65 (m, 8H, H₅), 3.84-3.86 (m, 8H, H₆), 4.34-4.35 (m, 20H, N-CH₃, H₇), 7.11 (t, 2H, ⁴J = 2.3 Hz, H_p), 7.44 (d, 4H, ⁴J = 2.3 Hz, H_o), 8.11 (s, 4H, H _{α} and H _{β}), 9.07 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py2), 9.75 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py1).

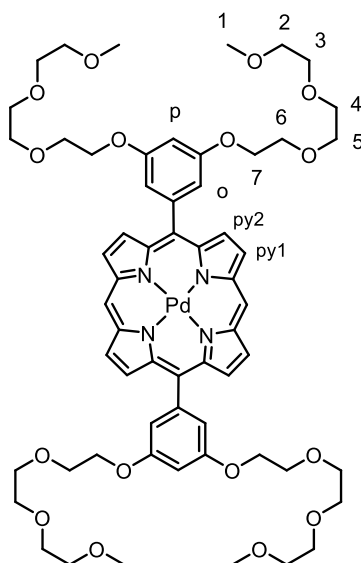
¹³C NMR (126 MHz, (CD₃)₂SO, 298 K): δ (ppm) = 36.58, 57.98, 67.75, 69.04, 69.58, 69.82, 70.01, 71.23, 77.91, 96.17, 101.42, 114.58, 123.35, 124.77, 129.60, 141.44, 158.16.

HR ESI-MS: m/z 674.3334 [M]²⁺/2, (calcd 674.3310 for [C₇₄H₉₂N₈O₁₆]²⁺/2).

UV-Visible (DMSO): λ_{max} (log ϵ) = 445 (5.37), 598 (4.46), 689 (4.28) nm.

UV-Visible (H₂O, pH = 7.4): λ_{max} (log ϵ) = 440 (4.26), 608 (4.15), 701 nm.

Pd(II) porphyrin **21** ²³³



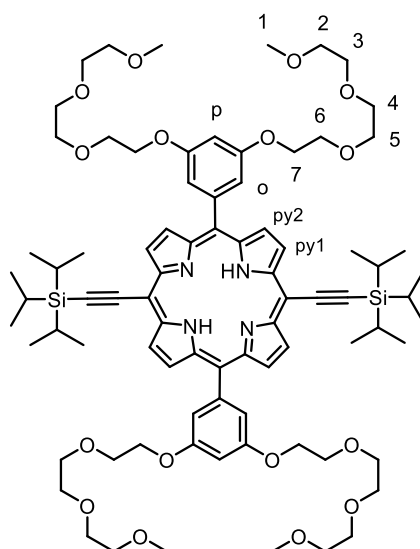
To a three freeze-thaw cycles degassed solution of porphyrin **5** (20 mg, 18.0 μmol) in PhCN (3 mL) and DMF (1 mL) was added NaOAc (7.4 mg, 90.2 μmol , 5 eq) and PdCl₂ (9.6 mg, 54.1 μmol , 3 eq). The reaction mixture was stirred at 150 °C for 4 h then the solvents were evaporated. The crude product was purified by silica column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 1 %) to afford **21** as a pink solid in quantitative yield (22 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = 3.31 (s, 12H, H₁), 3.48-3.51 (m, 8H, H₂), 3.61-3.64 (m, 8H, H₃), 3.67-3.71 (m, 8H, H₄), 3.76-3.79 (m, 8H, H₅), 3.92-3.95 (m, 8H, H₆), 4.29-4.32 (m, 8H, H₇), 6.96 (t, 2H, ⁴J = 2.3 Hz, H_p), 7.40 (d, 4H, ⁴J = 2.3 Hz, H_o), 9.08 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py2), 9.26 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py1), 10.24 (s, 2H, H_{meso}).

HR ESI-MS: m/z 630.2059 [M+ 2Na]²⁺/2, (calcd 630.2047 for [C₆₀H₇₆Na₂N₄O₁₆Pd]²⁺/2).

UV-Visible (DCM): λ_{max} = 408, 516, 546 nm.

Free-base porphyrin **22**



The same reaction conditions than for the synthesis of **PS₁** were used to obtain **22**.

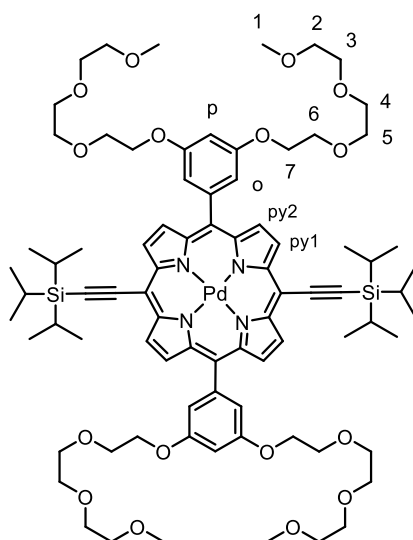
The following quantities were used: **8** (73 mg, 47.5 μmol), DCM (10 mL), TFA (500 μL).

The porphyrin **22** was obtained as a green solid in quantitative yield (70 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = -2.17 (s, 2H, NH), 1.42-1.49 (m, 42H, (iPr)₃-Si), 3.32 (s, 12H, H₁), 3.49-3.52 (m, 8H, H₂), 3.63-3.66 (m, 8H, H₃), 3.70-3.73 (m, 8H, H₄), 3.78-3.82 (m, 8H, H₅), 3.95-3.98 (m, 8H, H₆), 4.31-4.35 (m, 8H, H₇), 6.96 (t, 2H, ⁴J = 2.3 Hz, H_p), 7.39 (d, 4H, ⁴J = 2.3 Hz, H_o), 8.94 (d, 4H, ³J = 4.8 Hz, py2), 9.66 (d, 4H, ³J = 4.8 Hz, py1).

UV-Visible (DCM): λ_{max} = 436, 543, 585, 619, 680 nm.

Pd(II) porphyrin **23** ²³³



The same reaction conditions than for the synthesis of **21** were used to obtain **23**.

The following quantities were used: **22** (70 mg, 47.5 μmol , 1 eq), PdCl₂ (25 mg, 143 μmol , 3 eq), NaOAc (19.5 mg, 238 μmol , 5 eq), PhCN (9 mL), DMF (3 mL).

The porphyrin **23** was obtained as a light green solid in 80 % yield (60 mg).

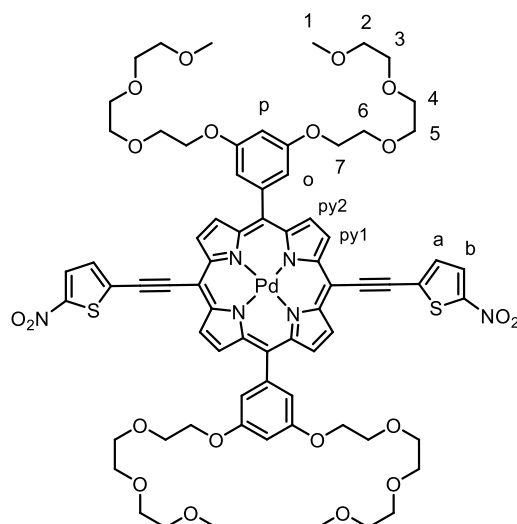
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) = 1.40-1.48 (m, 42H, (iPr)₃-Si), 3.32 (s, 12H, H₁), 3.48-3.51 (m, 8H, H₂), 3.62-3.65 (m, 8H, H₃), 3.68-3.72 (m, 8H, H₄), 3.77-3.80 (m, 8H, H₅), 3.92-3.96 (m, 8H, H₆), 4.28-4.31 (m, 8H, H₇), 6.93 (t, 2H, ⁴J = 2.2 Hz, H_p), 7.32 (d, 4H, ⁴J = 2.2 Hz, H_o), 8.90 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py2), 9.61 (d, 4H, ³J = 4.9 Hz, py1).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) = 11.93, 19.20, 59.13, 67.96, 69.93, 70.69, 70.80, 71.02, 72.02, 99.48, 101.69, 103.20, 107.77, 114.19, 122.84, 130.60, 132.06, 141.50, 142.93, 144.06, 158.27.

HR ESI-MS: m/z 1575.7045 [M+ H]⁺, (calcd 1575.7032 for [C₈₂H₁₇₇N₄O₁₆PdSi₂]⁺).

UV-Visible (DCM): λ_{max} = 436 (5.45), 550 (4.20), 587 (4.54) nm.

Pd(II) porphyrin **25**



To a degassed solution of **23** (22 mg, 14.0 μmol , 1 eq) in THF (5 mL) was added a solution of TBAF \cdot 3H $_2$ O (4.2 mg, 14.0 μmol , 1 eq) in THF (1 mL). The solution was stirred at room temperature for 30 min, the formation of **24** was monitored by TLC and then the reaction was quenched with anhydrous calcium chloride (4.7 mg, 43.4 μmol , 3 eq). The solvent was partially evaporated and due to its instability, the deprotected compound **24** was used without delay for the next reaction. After the addition of (*i*Pr) $_2$ NH (0.5 mL) to the mixture containing **24**, the reaction medium under argon was degassed by three freeze-thaw cycles. Then, 2-iodo-5-nitrothiophene **12** (10.9 mg, 42.7 μmol , 3 eq), CuI (0.54 mg, 2.85 μmol , 0.2 eq) and Pd(PPh $_3$) $_4$ (3.3 mg, 2.85 μmol , 0.2 eq) were added. The reaction mixture was stirred at 40 $^\circ\text{C}$ for 2 h. The solvents were evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH, 0 to 2.5 %) to give **25** as a green solid in 89 % yield (19 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl $_3$, 298 K) : δ (ppm) = 3.32 (s, 12H, H $_1$), 3.50-3.53 (m, 8H, H $_2$), 3.63-3.66 (m, 8H, H $_3$), 3.69-3.73 (m, 8H, H $_4$), 3.78-3.82 (m, 8H, H $_5$), 3.95-3.98 (m, 8H, H $_6$), 4.31-4.34f (m, 8H, H $_7$), 6.98 (t, 2H, $^4J = 2.2$ Hz, H $_p$), 7.34 (d, 4H, $^4J = 2.2$ Hz, H $_o$), 7.38 (d, 1H, $^3J = 4.2$ Hz, H $_a$), 7.87 (d, 1H, $^3J = 4.2$ Hz, H $_b$), 8.90 (d, 4H, $^3J = 4.9$ Hz, py2), 9.36 (d, 4H, $^3J = 4.9$ Hz, py1).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl $_3$, 298 K): δ (ppm) = 59.16, 68.01, 69.96, 70.72, 70.82, 71.04, 72.04, 88.68, 99.74, 101.01, 101.73, 114.32, 123.87, 128.80, 130.00, 130.83, 130.99, 132.62, 141.80, 142.35, 143.24, 150.89, 158.42.

HR ESI-MS: m/z 1517.3852 [M+ H] $^+$, (calcd 1517.3842 for [C $_{72}$ H $_{79}$ N $_6$ O $_{20}$ Pd S $_2$] $^+$).

UV-Visible (DCM): λ_{max} = 461 (5.31), 567 br, 626 (4.83) nm.

Publication et Communications

Publication

“Antimicrobial photodynamic therapy in the near infra-red using a targeting peptide connected to a π -extended porphyrin”

Charly Gourlot, Alexis Gosset, Christopher Aisenbrey, Elise Glattard, Vincent Sol, Tan-Sothea Ouk, Christophe Gourlaouen, Philippe Lavalley, Barbara Ventura, Burkhard Bechinger, Valérie Heitz

Soumise

Communications

Orales :

Titre : aPDT sensitizer combined with an antimicrobial peptide : towards a molecular targeted antibacterial agent

2ème Journée Française sur la PDT, Lille, 28 novembre 2019

Titre : aPDT sensitizer combined with an antimicrobial peptide : towards a molecular targeted antibacterial agent

Journée des doctorants, Strasbourg, 9 décembre 2019

Titre : Near-infrared Porphyrin Photosensitizers Combined with a Cationic Peptide for Targeted Antimicrobial PDT

Journées scientifiques de l'UMR 7177, online (Strasbourg), 14-15 avril 2021

Par affiches :

Titre : Photodynamic inactivation of pathogens : synthesis and study of a photosensitizer linked to an antimicrobial peptide

The World Congress on Light and Life, Barcelone, 25-30 août 2019

Titre : Near-infrared porphyrin photosensitizer combined with a cationic peptide for targeted antimicrobial PDT

PDT-PTT Congress, online (Nancy-Munich), 5-6 novembre 2020

Références

- (1) Davies, J., Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74* (3), 417–433.
- (2) Coates, A. R., Halls, G., Hu, Y. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163* (1), 184–194.
- (3) Karmakar, P., Gaitonde, V. *Medicines* **2019**, *6* (1), 21.
- (4) Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., Pompliano, D. L. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6* (1), 29–40.
- (5) Wenzel, R. P. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (6), 523–526.
- (6) Theuretzbacher, U. J. *Glob. Antimicrob. Resist.* **2013**, *1* (2), 63–69.
- (7) Abraham, E., Chain, E. *Nature* **1940**, *3713*, 837.
- (8) Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18* (3), 268–281.
- (9) Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, M. J., Suetens, C., Monnet, D. L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I. N., Dobрева, E. G., Tambic Andrašević, A., Soplek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G. L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K. G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M. A., de Greeff, S. C., Monen, J. C., Koek, M. B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P. J., Fernandes, P. A., Manageiro, V., Popescu, G. A., Serban, R. I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J. S., Johnson, A., Hopkins, S. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19* (1), 56–66.
- (10) Vidal, F., Lancement d'un programme prioritaire de recherche de 40 millions d'euros pour lutter contre la résistance aux antibiotiques, **2018**.
- (11) de Kraker, M. E. A., Davey, P. G., Grundmann, H. *PLoS Med* **2011**, *8* (10), e1001104.
- (12) Smith, R., Coast, J. *BMJ* **2013**, *34*, 1493–1493.
- (13) Regiel-Futyra, A., Dąbrowski, J. M., Mazuryk, O., Śpiewak, K., Kyzioł, A., Pucelik, B., Brindell, M., Stochel, G. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *351*, 76–117.
- (14) Pechovsky, R., Traykovska, M. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (6), 631–650.
- (15) D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., Wright, G. D. *Nature* **2011**, *477* (7365), 457–461.
- (16) Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., Wright, G. D. *PLoS ONE* **2012**, *7* (4), e34953.
- (17) Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G., Desai, M. M. *PLoS ONE* **2015**, *10* (3), e0069533.
- (18) Kashuba, E., Dmitriev, A. A., Kamal, S. M., Melefors, O., Griva, G., Römling, U., Ernberg, I., Kashuba, V., Brouckov, A. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2017**, *28* (1), 1345574.
- (19) Surette, M. D., Wright, G. D. *Annu. Rev. Microbiol.* **2017**, *71* (1), 309–329.
- (20) Peterson, E., Kaur, P. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2928.
- (21) Site internet : <https://apps.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/infographics/en/index.html> (visité le 10/04/2020)

- (22) Marshall, B. M., Levy, S. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24* (4), 718–733.
- (23) Witte, W. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 19–24.
- (24) Nordstrom, L., Liu, C. M., Price, L. B. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 29.
- (25) Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z. A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G. D., Brown, E. D., Cars, O. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13* (12), 1057–1098.
- (26) Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., Otten, W., Thomas, C. M., Williams, A. P. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13* (2), 155–165.
- (27) Wang, Y., Zhang, R., Li, J., Wu, Z., Yin, W., Schwarz, S., Tyrrell, J. M., Zheng, Y., Wang, S., Shen, Z., Liu, Z., Liu, J., Lei, L., Li, M., Zhang, Q., Wu, C., Zhang, Q., Wu, Y., Walsh, T. R., Shen, J. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2* (4), 16260.
- (28) Zhang, Y., Sallach, J. B., Hodges, L., Snow, D. D., Bartelt-Hunt, S. L., Eskridge, K. M., Li, X. *Environ. Pollut.* **2016**, *208*, 523–531.
- (29) Onwugamba, F. C., Fitzgerald, J. R., Rochon, K., Guardabassi, L., Alabi, A., Kühne, S., Grobusch, M. P., Schaumburg, F. *Travel Med. Infect. Dis.* **2018**, *22*, 8–17.
- (30) Collignon, P., Athukorala, P., Senanayake, S., Khan, F. *PLoS ONE* **2015**, *10* (3), e0116746.
- (31) Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M., Woodford, N. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 597–602.
- (32) Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K. M. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43* (5), 490–516.
- (33) Lettieri, T., Loos, R., Marinov, D., Navarro Cuenca, A., Sanseverino, I., European Commission, Joint Research Centre. *State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance.*, **2018**.
- (34) Alanis, A. J. *Arch. Med. Res.* **2005**, *36* (6), 697–705.
- (35) Li, F., Collins, J. G., Keene, F. R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (8), 2529–2542.
- (36) Goering, R., Dockrell, H., Zuckerman, M., Chiodini P., *Medical Microbiology and Immunology*, 6th edition, Elsevier, **2019**.
- (37) Goldman, E., Green, L. H., *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd edition, **2009**.
- (38) Site internet : <https://www.physiol.uzh.ch/en/Glycosylation> (visité le 10/04/2020)
- (39) Malanovic, N., Lohner, K. *BBA-Biomembranes* **2016**, *1858* (5), 936–946.
- (40) Romaniuk, J. A. H., Cegelski, L. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370* (1679), 20150024.
- (41) Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I. R. *Microbes Infect.* **2002**, *4* (8), 837–851.
- (42) Snyder, D. S., McIntosh, T. J. *Biochemistry* **2000**, *39* (38), 11777–11787.
- (43) Alexander, C., Rietschel, E. T. *J. Endotoxin Res.* **2001**, *7* (3), 167–202.
- (44) Tortora, G., Funke, B., Case C., *Microbiology : an introduction*, 13th edition, **2019**.
- (45) Alekshun, M. N., Levy, S. B. *Cell* **2007**, *128* (6), 1037–1050.
- (46) Penchovsky, R. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (22), e98.
- (47) Piddock, L. J. V. *CMR* **2006**, *19* (2), 382–402.
- (48) Hancock, R. E. W. *Front. Biosci.* **2003**, *8* (6), 472–483.
- (49) Fritsche, T. R., Castanheira, M., Miller, G. H., Jones, R. N., Armstrong, E. S. *AAC* **2008**, *52* (5), 1843–1845.

- (50) Simanski, M., Gläser, R., Köten, B., Meyer-Hoffert, U., Wanner, S., Weidenmaier, C., Peschel, A., Harder, J. *Exp. Dermatol.* **2013**, *22* (4), 294–296.
- (51) Nuri, R., Shprung, T., Shai, Y. *BBA-Biomembranes* **2015**, *1848* (11), 3089–3100.
- (52) Wright, G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (10), 1451–1470.
- (53) Sabnis, A., Ledger, E. V. K., Pader, V., Edwards, A. M. *PLoS Pathog.* **2018**, *14* (4), e1006924.
- (54) Nikaido, H. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 119–146.
- (55) Tremblay, Y., Hathroubi, S., Jacques, M. *Can. J. Vet. Res.* **2014**, *78* (2), 110–116.
- (56) Cieplik, F., Späth, A., Regensburger, J., Gollmer, A., Tabenski, L., Hiller, K.-A., Bäuml, W., Maisch, T., Schmalz, G. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 477–487.
- (57) Lewis, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 999–1007.
- (58) Borens, O., Nussbaumer, F., Baalbaki, R., Trampuz, A. *Rev. med. suisse* **2009**, *5*, 2563–2568.
- (59) Mah, T.-F. C., O’Toole, G. A. *Trends Microbiol.* **2001**, *9* (1), 34–39.
- (60) Donlan, R. M. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8* (9), 881–890.
- (61) Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C.-T., McFeters, G. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (10), 4035–4039.
- (62) Wood, T. K., Knabel, S. J., Kwan, B. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79* (23), 7116–7121.
- (63) France, M. T., Cornea, A., Kehlet-Delgado, H., Forney, L. J. *Evol. Appl.* **2019**, *12* (3), 498–507.
- (64) Okeke, I. N., Peeling, R. W., Goossens, H., Auckenthaler, R., Olmsted, S. S., de Lavison, J.-F., Zimmer, B. L., Perkins, M. D., Nordqvist, K. *Drug Resist. Updat.* **2011**, *14* (2), 95–106.
- (65) The Lewin Group, Inc., The Value of Diagnostics Innovation, Adoption and Diffusion into Health Care, **2005**.
- (66) Bergstrom, C. T., Lo, M., Lipsitch, M. *PNAS*, **2004**, *36*, 13285–13290.
- (67) Masterton, R. G. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55* (1), 1–5.
- (68) Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., Laxminarayan, R. *Lancet Planet. Health* **2018**, *2* (9), 398–405.
- (69) Drawz, S. M., Bonomo, R. A. *CMR* **2010**, *23* (1), 160–201.
- (70) Manganelli, G., Masullo, U., Filosa, S. *Stem. Cell Rev. and Rep.* **2014**, *10* (6), 802–819.
- (71) Azegrouz, H., Karemore, G., Torres, A., Alaíz, C. M., Gonzalez, A. M., Nevado, P., Salmerón, A., Pellinen, T., del Pozo, M. A., Dorransoro, J. R., Montoya, M. C. *J. Biomol. Screen* **2013**, *18* (10), 1270–1283.
- (72) Mansson, M., Nielsen, A., Kjærulff, L., Gotfredsen, C. H., Wietz, M., Ingmer, H., Gram, L., Larsen, T. O. *Mar. Drugs* **2011**, *9* (12), 2537–2552.
- (73) De Leon, G. P., Elowe, N. H., Koteva, K. P., Valvano, M. A., Wright, G. D. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (4), 437–441.
- (74) Czaplowski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., Foster, S., Gilmore, B. F., Hancock, R. E. W., Harper, D., Henderson, I. R., Hilpert, K., Jones, B. V., Kadioglu, A., Knowles, D., Ólafsdóttir, S., Payne, D., Projan, S., Shaunak, S., Silverman, J., Thomas, C. M., Trust, T. J., Warn, P., Rex, J. H. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16* (2), 239–251.
- (75) Bai, H., Xue, X., Hou, Z., Zhou, Y., Meng, J., Luo, X. *CDDT* **2010**, *7* (2), 76–85.
- (76) McFarland, L. V. *Am. J. Gastroenterol.* **2006**, *101* (4), 812–822.
- (77) Loc-Carrillo, C., Abedon, S. T. *Bacteriophage* **2011**, *1* (2), 111–114.
- (78) Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., Mahmoudi, M. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30* (10), 499–511.
- (79) Saha, B., Bhattacharya, J., Mukherjee, A., Ghosh, A., Santra, C., Dasgupta, A. K., Karmakar, P. *Nanoscale Res. Lett.* **2007**, *2* (12), 614–622.

- (80) Lakes, A. L., Peyyala, R., Ebersole, J. L., Puleo, David. A., Hilt, J. Z., Dziubla, T. D. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (8), 3009–3018.
- (81) Fong, J., Wood, F. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1* (4), 441–449.
- (82) Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. *RSC Adv.* **2014**, *4* (8), 3974–3983.
- (83) Talebian, N., Amininezhad, S. M., Doudi, M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2013**, *120*, 66–73.
- (84) Daima, H. K., Selvakannan, P. R., Shukla, R., Bhargava, S. K., Bansal, V. *PLoS ONE* **2013**, *8* (10), e79676.
- (85) Segura, D. F., Netto, A. V. G., Frem, R. C. G., Mauro, A. E., da Silva, P. B., Fernandes, J. A., Paz, F. A. A., Dias, A. L. T., Silva, N. C., de Almeida, E. T., Marques, M. J., de Almeida, L., Alves, K. F., Pavan, F. R., de Souza, P. C., de Barros, H. B., Leite, C. Q. F. *Polyhedron* **2014**, *79*, 197–206.
- (86) Gorle, A. K., Feterl, M., Warner, J. M., Primrose, S., Constantinoiu, C. C., Keene, F. R., Collins, J. G. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10472–10481.
- (87) Starosta, R., Stokowa, K., Florek, M., Król, J., Chwiłkowska, A., Kulbacka, J., Saczko, J., Skąła, J., Jeżowska-Bojczuk, M. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (8), 1102–1108.
- (88) Abd-El-Aziz, A. S., Agatemor, C., Etkin, N., Overy, D. P., Kerr, R. G. *RSC Adv.* **2015**, *5* (105), 86421–86427.
- (89) Banin, E., Lozinski, A., Brady, K. M., Berenshtein, E., Butterfield, P. W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E. P., Banin, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (43), 16761–16766.
- (90) Karpin, G. W., Morris, D. M., Ngo, M. T., Merola, J. S., Falkinham III, J. O. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6* (8), 1471–1478.
- (91) Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., Maisch, T. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44* (5), 571–589.
- (92) Raab, O., *Z. Biol.* **1904**, *39*, 524–546.
- (93) Von Tappeiner H., Jodlbauer, A. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **1904**, *80*, 427–487.
- (94) Jiang, L., Gan, C. R. R., Gao, J., Loh, X. J. *Small* **2016**, *12* (27), 3609–3644.
- (95) Martinez De Pinillos Bayona, A., Mroz, P., Thunshelle, C., Hamblin, M. R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89* (2), 192–206.
- (96) Almeida, A., Faustino, M. A., Tomé, J. P. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (10), 1221–1224.
- (97) Hatz, S., Lambert, J. D. C., Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6* (10), 1106–1116.
- (98) Ogilby, P. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3181–3209.
- (99) Agnez-Lima, L. F., Melo, J. T. A., Silva, A. E., Oliveira, A. H. S., Timoteo, A. R. S., Lima-Bessa, K. M., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Galhardo, R. S., Menck, C. F. M. *Mutat. Res. - Rev. Mutat.* **2012**, *751* (1), 15–28.
- (100) Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., Hamblin, M. R. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17* (2), 49–55.
- (101) Hamblin, M. R., Hasan, T. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (5), 436–450.
- (102) Bertoloni, G. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2000**, *1475* (2), 169–174.
- (103) Nitzan, Y., Ashkenazi, H. *Curr. Microbiol.* **2001**, *42* (6), 408–414.
- (104) Soncin, M., Fabris, C., Busetti, A., Dei, D., Nistri, D., Roncucci, G., Jori, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (10), 815–819.
- (105) Dai, T., Huang, Y.-Y., Hamblin, M. R. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2009**, *6* (3–4), 170–188.
- (106) Tubby, S., Wilson, M., Nair, S. P. *BMC Microbiol.* **2009**, *9* (1), 211.
- (107) Marsh, P. D. *Caries Res.* **2004**, *38* (3), 204–211.
- (108) de Melo, W. C., Avci, P., de Oliveira, M. N., Gupta, A., Vecchio, D., Sadasivam, M., Chandran, R., Huang, Y.-Y., Yin, R., Perussi, L. R., Tegos, G. P., Perussi, J. R., Dai, T., Hamblin, M. R. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11* (7), 669–693.

- (109) Stewart, P. S., William Costerton, J. *Lancet* **2001**, 358 (9276), 135–138.
- (110) Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E., Almeida, A. *Mar. Drugs* **2010**, 8 (1), 91–105.
- (111) Giuliani, F., Martinelli, M., Cocchi, A., Arbia, D., Fantetti, L., Roncucci, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (2), 637–642.
- (112) Tegos, G. P., Masago, K., Aziz, F., Higginbotham, A., Stermitz, F. R., Hamblin, M. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52 (9), 3202–3209.
- (113) Nagata, J. Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V. R., Terada, R. S. S., Graciano, A. X., Baesso, M. L., Hayacibara, M. F. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2012**, 9 (2), 122–131.
- (114) Hessling, M., Spellerberg, B., Hoenes, K. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, 364 (2), 270.
- (115) Dąbrowski, J. M., Pucelik, B., Regiel-Futyra, A., Brindell, M., Mazuryk, O., Kyzioł, A., Stochel, G., Macyk, W., Arnaut, L. G. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 325, 67–101.
- (116) Eichler, J., Knof, J., Lenz, H. *Radiat. Environ. Biophys.* **1977**, 14 (3), 239–242.
- (117) Bruls, W. A. G., Slaper, H., van der Leun, J. C., Berrens, L. *Photochem. Photobiol.* **1984**, 40 (4), 485–494.
- (118) Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P., Pandey, R. K. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (1), 340–362.
- (119) Avci, P., Gupta, A., Sadasivam, M., Pam, Z., Pam, N., Hamblin, M. R. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2013**, 32 (1), 41–52.
- (120) Nitzan, Y., Dror, R., Ladan, H., Malik, Z., Kimel, S., Gottfried, V. *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62 (2), 342–347.
- (121) Sperandio, F., Huang, Y.-Y., Hamblin, M. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2013**, 8 (2), 108–120.
- (122) Abrahamse, H., Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, 473 (4), 347–364.
- (123) Wilkinson, F., Helman, W. P., Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993**, 22 (1), 113–262.
- (124) Felgenträger, A., Maisch, T., Dobler, D., Späth, A. *Biomed Res. Int.* **2013**, 2013, 1–12.
- (125) Moreira, L., Lyon, J., Romani, A., Severino, D., Regina, M., de Oliveira, H. P. M. In *Advanced Aspects of Spectroscopy*, InTech, **2012**.
- (126) Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., Nishigaki, I. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2015**, 5 (3), 182–189.
- (127) Sayes, C. M., Fortner, J. D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A. M., Ausman, K. D., Tao, Y. J., Sitharaman, B., Wilson, L. J., Hughes, J. B., West, J. L., Colvin, V. L. *Nano Lett.* **2004**, 4 (10), 1881–1887.
- (128) Hegge, A. B., Bruzell, E., Kristensen, S., Tønnesen, H. H. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 47 (1), 65–74.
- (129) Spaeth, A., Graeler, A., Maisch, T., Plaetzer, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 159, 423–440.
- (130) Lu, Z., Dai, T., Huang, L., Kurup, D. B., Tegos, G. P., Jahnke, A., Wharton, T., Hamblin, M. R. *Nanomedicine* **2010**, 5 (10), 1525–1533.
- (131) Maisch, T., Eichner, A., Späth, A., Gollmer, A., König, B., Regensburger, J., Bäuml, W. *PLoS ONE* **2014**, 9 (12), e111792.
- (132) Zhang, Y., Lovell, J. F. *Theranostics* **2012**, 2 (9), 905–915.
- (133) Fernandez, J. M., Bilgin, M. D., Grossweiner, L. I. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 37 (1–2), 131–140.
- (134) Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villaneuva, A., Jori, G. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, 32 (3), 153–157.
- (135) Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R.-M., Lehn, N., Abels, C. *Antimicrob. Agents Chemother.*

- 2005**, 49 (4), 1542–1552.
- (136) Orlandi, V. T., Caruso, E., Tettamanti, G., Banfi, S., Barbieri, P. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2013**, 127, 123–132.
- (137) Simões, C., Gomes, M. C., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Almeida, A., Faustino, M. A. F. *Catal.* **2016**, 266, 197–204.
- (138) Alves, E., Costa, L., Carvalho, C. M., Tomé, J. P., Faustino, M. A., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Cunha, Â., Almeida, A. *BMC Microbiol.* **2009**, 9 (1), 70.
- (139) Matsumoto, J., Suemoto, Y., Kanemaru, H., Takemori, K., Shigehara, M., Miyamoto, A., Yokoi, H., Yasuda, M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2017**, 168, 124–131.
- (140) Matsumoto, J., Yasuda, M. *Med. Chem. Res.* **2018**, 27 (5), 1478–1484.
- (141) Vinagreiro, C. S., Zangirolami, A., Schaberle, F. A., Nunes, S. C. C., Blanco, K. C., Inada, N. M., da Silva, G. J., Pais, A. A. C. C., Bagnato, V. S., Arnaut, L. G., Pereira, M. M. *ACS Infect. Dis.* **2020**, 6 (6), 1517–1526.
- (142) Ringot, C., Saad, N., Brégier, F., Bressollier, P., Poli, E., Chaleix, V., Ouk, T. S., Sol, V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, 17 (11), 1780–1786.
- (143) Jin, H., Dai, X.-H., Wu, C., Pan, J.-M., Wang, X.-H., Yan, Y.-S., Liu, D.-M., Sun, L. *Eur. Polym. J.* **2015**, 66, 149–159.
- (144) Koo, H. B., Seo, J. *Pept. Sci.* **2019**, 111 (5), e24122.
- (145) Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, 6, 194.
- (146) Ageitos, J. M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., Villa, T. G. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, 133, 117–138.
- (147) Malanovic, N., Marx, L., Blondelle, S. E., Pabst, G., Semeraro, E. F. *BBA-Biomembranes* **2020**, 1862 (8), 183275.
- (148) Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., Malmsten, M. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, 32 (2), 143–171.
- (149) Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., Shan, A. *Med. Res. Rev.* **2019**, 39 (3), 831–859.
- (150) Wood, S. J., Park, Y. A., Kanneganti, N. P., Mukkisa, H. R., Crisman, L. L., Davis, S. E., Vandenbosch, J. L., Scaglione, J. B., Heyl, D. L. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, 20 (4), 519–530.
- (151) Lázár, V., Martins, A., Spohn, R., Daruka, L., Grézal, G., Fekete, G., Számel, M., Jangir, P. K., Kintsés, B., Csörgő, B., Nyerges, Á., Györkei, Á., Kincses, A., Dér, A., Walter, F. R., Deli, M. A., Urbán, E., Hegedűs, Z., Olajos, G., Méhi, O., Bálint, B., Nagy, I., Martinek, T. A., Papp, B., Pál, C. *Nat. Microbiol.* **2018**, 3 (6), 718–731.
- (152) Giacometti, A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46 (5), 807–810.
- (153) Grönberg, A., Mahlapuu, M., Ståhle, M., Whately-Smith, C., Rollman, O. *Wound Repair Regen.* **2014**, 22 (5), 613–621.
- (154) Kumar, P., Kizhakkedathu, J., Straus, S. *Biomolecules* **2018**, 8 (1), 4.
- (155) Nguyen, L. T., Haney, E. F., Vogel, H. J. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29 (9), 464–472.
- (156) Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., Sathekge, M. M. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 1–15.
- (157) Sood, R., Kinnunen, P. K. J. *BBA-Biomembranes* **2008**, 1778 (6), 1460–1466.
- (158) Brown, K. L., Hancock, R. E. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, 18 (1), 24–30.
- (159) Kosikowska, P., Lesner, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, 26 (6), 689–702.
- (160) Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z. *Peptides* **2012**, 37 (2), 207–215.
- (161) Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., Le Brun, A. P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S. A., Lakey, J. H. *Langmuir* **2015**, 31 (1), 404–412.
- (162) Bechinger, B. *J. Pept. Sci.* **2015**, 21 (5), 346–355.

- (163) Michael Henderson, J., Lee, K. Y. C. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2013**, 17 (4), 175–192.
- (164) Brogden, K. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3 (3), 238–250.
- (165) Raheem, N., Straus, S. K. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 2866.
- (166) Cheng, J. T. J., Hale, J. D., Elliott, M., Hancock, R. E. W., Straus, S. K. *BBA-Biomembranes* **2011**, 1808 (3), 622–633.
- (167) Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R., Corzo, G. *Molecules* **2016**, 21 (2), 225.
- (168) Cole, J. N., Nizet, V. *Microbiol. Spectr.* **2016**, 4 (1).
- (169) Bauer, M. E., Shafer, W. M. *BBA-Biomembranes* **2015**, 1848 (11), 3101–3111.
- (170) Bechinger, B., Gorr, S.-U. *J. Dent. Res.* **2017**, 96 (3), 254–260.
- (171) Brinckerhoff, L. H., Kalashnikov, V. V., Thompson, L. W., Yamshchikov, G. V., Pierce, R. A., Galavotti, H. S., Engelhard, V. H., Slingluff, *Int. J. Cancer.* **1999**, 83, 326–334.
- (172) Rink, R., Arkema-Meter, A., Baudoin, I., Post, E., Kuipers, A., Nelemans, S. A., Akanbi, M. H. J., Moll, G. N. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2010**, 61 (2), 210–218.
- (173) Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G., Merrifield, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, 87 (12), 4761–4765.
- (174) Hirt, H., Gorr, S.-U. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 57 (10), 4903–4910.
- (175) Syryamina, V. N., Samoilova, R. I., Tsvetkov, Y. D., Ischenko, A. V., De Zotti, M., Gobbo, M., Toniolo, C., Formaggio, F., Dzuba, S. A. *Appl. Magn. Reson.* **2016**, 47 (3), 309–320.
- (176) Chen, W.-Y., Chang, H.-Y., Lu, J.-K., Huang, Y.-C., Harroun, S. G., Tseng, Y.-T., Li, Y.-J., Huang, C.-C., Chang, H.-T. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25 (46), 7189–7199.
- (177) Chaudhari, A. A., Ashmore, D., Nath, S. deb, Kate, K., Dennis, V., Singh, S. R., Owen, D. R., Palazzo, C., Arnold, R. D., Miller, M. E., Pillai, S. R. *J. Nanobiotechnol.* **2016**, 14 (1), 58.
- (178) Silva, J. P., Gonçalves, C., Costa, C., Sousa, J., Silva-Gomes, R., Castro, A. G., Pedrosa, J., Appelberg, R., Gama, F. M. *J. Control. Release* **2016**, 235, 112–124.
- (179) Bourré, L., Giuntini, F., Eggleston, I. M., Mosse, C. A., MacRobert, A. J., Wilson, M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9 (12), 1613–1620.
- (180) Liu, F., Soh Yan Ni, A., Lim, Y., Mohanram, H., Bhattacharjya, S., Xing, B. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23 (8), 1639–1647.
- (181) Dosselli, R., Tampieri, C., Ruiz-González, R., De Munari, S., Ragàs, X., Sánchez-García, D., Agut, M., Nonell, S., Reddi, E., Gobbo, M. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (3), 1052–1063.
- (182) Dosselli, R., Ruiz-González, R., Moret, F., Agnolon, V., Compagnin, C., Mognato, M., Sella, V., Agut, M., Nonell, S., Gobbo, M., Reddi, E. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (4), 1403–1415.
- (183) Le Guern, F., Sol, V., Ouk, C., Arnoux, P., Frochot, C., Ouk, T.-S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28 (9), 2493–2506.
- (184) Le Guern, F., Ouk, T.-S., Ouk, C., Vanderesse, R., Champavier, Y., Pinault, E., Sol, V. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, 9 (1), 11–16.
- (185) Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D. F., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St. Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J., Boyce, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (12), 4971–4977.
- (186) Strandberg, E., Tiltak, D., Ieronimo, M., Kanithasen, N., Wadhvani, P., Ulrich, A. S. *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79 (4), 717–728.
- (187) Zaet, A., Darteville, P., Daouad, F., Ehlinger, C., Quilès, F., Francius, G., Boehler, C., Bergthold, C., Frisch, B., Prévost, G., Lavallo, P., Schneider, F., Haïkel, Y., Metz-Boutigue, M.-H., Marban, C. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 15199.
- (188) Khadria, A., de Coene, Y., Gawel, P., Roche, C., Clays, K., Anderson, H. L. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (4), 947–956.

- (189) Podlesný, J., Pytela, O., Klikar, M., Jelínková, V., Kityk, I. V., Ozga, K., Jedryka, J., Rudysh, M. Ya., Bureš, F. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3623–3634.
- (190) Schmitt, J., Heitz, V., Sour, A., Bolze, F., Ftouni, H., Nicoud, J.-F., Flamigni, L., Ventura, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (1), 169–173.
- (191) Schmitt, J., Heitz, V., Jenni, S., Sour, A., Bolze, F., Ventura, B. *Supramol. Chem.* **2017**, *29* (11), 769–775.
- (192) Jenni, S., Sour, A., Bolze, F., Ventura, B., Heitz, V. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 3623–3634.
- (193) Dauria, M., Mauriello, G. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60* (6), 542–545.
- (194) Pina, J., de Melo, J. S., Breusov, D., Scherf, U. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (36), 15204–15213.
- (195) Zhang, T.-G., Zhao, Y., Asselberghs, I., Persoons, A., Clays, K., Therien, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (27), 9710–9720.
- (196) Andreu, D., Aschauer, H., Kreil, G., Merrifield, R. B. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149* (3), 531–535.
- (197) Salnikov, E. S., Bechinger, B. *Biophys. J.* **2011**, *100* (6), 1473–1480.
- (198) Duan, W., Huang, J., Kowalski, J. A., Shkrob, I. A., Vijayakumar, M., Walter, E., Pan, B., Yang, Z., Milshtein, J. D., Li, B., Liao, C., Zhang, Z., Wang, W., Liu, J., Moore, J. S., Brushett, F. R., Zhang, L., Wei, X. *ACS Energy Lett.* **2017**, *2* (5), 1156–1161.
- (199) Boudreault, P.-L. T., Najari, A., Leclerc, M. *Chem. Mater.* **2011**, *23* (3), 456–469.
- (200) Bai, Y., Rawson, J., Roget, S. A., Olivier, J.-H., Lin, J., Zhang, P., Beratan, D. N., Therien, M. J. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (9), 5889–5901.
- (201) Handayani, M., Gohda, S., Tanaka, D., Ogawa, T. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (25), 7655–7664.
- (202) Susumu, K., Therien, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (29), 8550–8552.
- (203) Lupton, J. M., Hemingway, L. R., Samuel, I. D. W., Burn, P. L. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10* (4), 867–871.
- (204) Arsenault, G. P., Bullock, E., MacDonald S. F., *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384–4389.
- (205) Littler, B. J., Ciringh, Y., Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (8), 2864–2872.
- (206) Balaz, M., Collins, H. A., Dahlstedt, E., Anderson, H. L. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 874–888.
- (207) Edwards, R., de Vries, W., Westwell, A. D., Daniels, S., Wirth, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (31), 6909–6916.
- (208) Palladino, P., Stetsenko, D. A. *Org. Lett.* **2012**, *14* (24), 6346–6349.
- (209) Heiskanen, J. P., Vivo, P., Saari, N. M., Hukka, T. I., Kastinen, T., Kaunisto, K., Lemmetyinen, H. J., Hormi, O. E. O. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (4), 1535–1546.
- (210) Glaser, C. *Ann. Chem. Pharm.* **1870**, *154* (2), 137–171.
- (211) Seybold, P. G., Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1969**, *31*, 1–13.
- (212) Amat-Guerri, F., Lempe, E., Lissi, E. A., Rodriguez, F. J., Trull, F. R. *J. Photochem. Photobiol.* **1996**, *93* (1), 49–56.
- (213) Maurizot, J.-C., *Activité optique : dichroïsme circulaire, Techniques de l'ingénieur Optique Photonique*, **2009**, r6470.
- (214) Berova, N., Bari, L. D., Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (6), 914–931.
- (215) Kelly, S., Price, N. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1* (4), 349–384.
- (216) Yu, J. W., Jung, J., Choi, Y.-M., Choi, J. H., Yu, J., Lee, J. K., You, N.-H., Goh, M. *Polym. Chem.* **2016**, *7* (1), 36–43.
- (217) Oancea, S., Formaggio, F., Campestrini, S., Broxterman, Q. B., Kaptein, B., Toniolo, C. *Biopolymers* **2003**, *72* (2), 105–115.
- (218) Murzyn, K., Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M. *Biophys. J.* **2005**, *88* (2), 1091–1103.
- (219) Isidro-Llobet, A., Álvarez, M., Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.

- (220) Site internet : <https://www.oncothai.fr/fr/programmes-de-recherche/glioblastome> (visité le 15/09/2021)
- (221) Site internet : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque> (visité le 25/09/2021)
- (222) Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., Aboderin, A. O., Al-Abri, S. S., Awang Jalil, N., Benzonana, N., Bhattacharya, S., Brink, A. J., Burkert, F. R., Cars, O., Cornaglia, G., Dyar, O. J., Friedrich, A. W., Gales, A. C., Gandra, S., Giske, C. G., Goff, D. A., Goossens, H., Gottlieb, T., Guzman Blanco, M., Hryniewicz, W., Kattula, D., Jinks, T., Kanj, S. S., Kerr, L., Kieny, M.-P., Kim, Y. S., Kozlov, R. S., Labarca, J., Laxminarayan, R., Leder, K., Leibovici, L., Levy-Hara, G., Littman, J., Malhotra-Kumar, S., Manchanda, V., Moja, L., Ndoye, B., Pan, A., Paterson, D. L., Paul, M., Qiu, H., Ramon-Pardo, P., Rodríguez-Baño, J., Sanguinetti, M., Sengupta, S., Sharland, M., Si-Mehand, M., Silver, L. L., Song, W., Steinbakk, M., Thomsen, J., Thwaites, G. E., van der Meer, J. W., Van Kinh, N., Vega, S., Villegas, M. V., Wechsler-Fördös, A., Wertheim, H. F. L., Wesangula, E., Woodford, N., Yilmaz, F. O., Zorzet, A. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18* (3), 318–327.
- (223) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Barry, A. L. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, **1999**.
- (224) Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, *Croissance des bactéries*, **2014**, Université Médicale Virtuelle Francophone.
- (225) Site internet : <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/organisation-multi-echelle-du-genome-escherichia-coli> (visité le 25/09/2021)
- (226) Site internet : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli> (visité le 25/09/2021)
- (227) Banfi, S., Caruso, E., Buccafurni, L., Battini, V., Zazzaron, S., Barbieri, P., Orlandi, V. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2006**, *85* (1), 28–38.
- (228) Barbieri, J. S., Wanat, K., Seykora, J. *Pathobiology of Human Disease*, Elsevier, **2014**, 1134–1144.
- (229) Bahadoran, P., Ortonne, J.-P., Ballotti, R. *Med. Sci.* **2002**, *18* (2), 205–209.
- (230) Wang, B., Wang, M., Mikhailovsky, A., Wang, S., Bazan, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (18), 5031–5034.
- (231) Zhang, C.-P., Wang, Z.-L., Chen, Q.-Y., Zhang, C.-T., Gu, Y.-C., Xiao, J.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (8), 1896–1900.
- (232) Dąbrowski, J. M., Pucelik, B., Pereira, M. M., Arnaut, L. G., Stochel, G. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (17–18), 3116–3134.
- (233) Weber, K. T., Karikis, K., Weber, M. D., Coto, P. B., Charisiadis, A., Charitaki, D., Charalambidis, G., Angaridis, P., Coutsolelos, A. G., Costa, R. D. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (34), 13284–13288.
- (234) Cumming, G., Fidler, F., Vaux, D. L. *J. Cell Biol.* **2007**, *177* (1), 7–11.
- (235) Lamberts, J. J. M., Schumacher, D. R., Neckers, D. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (20), 5879–5883.
- (236) Ogunsipe, A., Chen, J.-Y., Nyokong, T. *New J. Chem.* **2004**, *28* (7), 822–827.

Synthèse et études d'agents antibactériens constitués d'un photosensibilisateur vectorisé par un peptide antimicrobien

Résumé

L'objectif de cette thèse a été de synthétiser, caractériser et évaluer l'activité de nouveaux agents photoactivables dans le proche-IR pour la thérapie photodynamique antibactérienne (aPDT). Ces agents sont constitués d'un photosensibilisateur (PS) porphyrinique fonctionnalisé lié de façon covalente à un peptide antimicrobien (AMP) cationique dans le but d'obtenir des traitements sélectifs vis-à-vis des bactéries.

L'association du PS avec les AMP sélectionnés, le PGLa ou un dérivé de cateslytine, a permis d'obtenir des conjugués amphiphiles solubles dans l'eau fluorescents et produisant de l'oxygène singulet. Les tests aPDT réalisés sur des bactéries à Gram positif (*S. aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*E. coli*) ont mis en évidence la forte photoactivité des conjugués à de faibles concentrations après excitation dans la fenêtre thérapeutique optique. Les porphyrines et les peptides seuls n'exercent aucune activité dans les conditions expérimentales testées, démontrant ainsi l'intérêt de lier ces deux molécules. Par ailleurs, les tests réalisés sur les kératinocytes ont montré une absence de toxicité et de phototoxicité des conjugués à 1 μM vis-à-vis de ces cellules eucaryotes épidermiques alors que la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est atteinte.

Enfin, des PS cationiques constitués d'une porphyrine liée à deux unités imidazolium ont été synthétisés et leur activité photobactéricide sur les bactéries *S. aureus* a été démontrée.

Mots clés: Porphyrine, Photosensibilisateur, aPDT, Peptide antimicrobien, PGLa, Cateslytine, Conjugué porphyrine-peptide, Bactéries à Gram positif, Bactéries à gram négatif.

Résumé en anglais

The aim of this thesis was to synthesize, characterize and evaluate the activity of new photoactivable agents in the near IR for antibacterial photodynamic therapy (aPDT). These agents are composed of a functionalized porphyrinic photosensitizer (PS) covalently linked to a cationic antimicrobial peptide (AMP) to improve the selectivity of treatments towards bacteria.

The association of the PS with the selected AMP, PGLa or a derivative of cateslytin, leads to amphiphilic conjugates soluble in water which can emit fluorescence and produce singlet oxygen. The aPDT tests performed on Gram-positive bacteria (*S. aureus*) and Gram-negative bacteria (*E. coli*) showed the strong photoactivity of the conjugates at low concentrations after excitation in the therapeutic window. The porphyrins and peptides alone display no activity in the experimental conditions which demonstrates the interest linking these two molecules. Furthermore, tests carried out on keratinocytes showed an absence of toxicity and phototoxicity of the conjugates at 1 μM towards these eucaryotic cells whereas the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) is reached.

Finally, cationic PS composed of a porphyrin linked to two imidazolium groups were synthesized and the evaluation of their biological activity has highlighted their photobactericidal activity on *S. aureus*.

Keywords: Porphyrin, Photosensitizer, aPDT, Antimicrobial peptide, PGLa, Cateslytin, Conjugate porphyrin-peptide, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria.