

Université de Limoges

ED 614 - Chimie , Environnement, Géosciences, Agrosciences (CEGA)

EA 7500 – Laboratoire PEIRENE

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Spécialité : Chimie organique

Présentée et soutenue par

Soukaina Bouramtane

Le 3 décembre 2019

Vectorisation cellulaire et adressage mitochondrial de photosensibilisateurs par des nanoparticules formées de xylane de bois de feuillus : nouvelle voie de valorisation d'hémicellulose pour une application en PDT

Thèse dirigée par Pr. Vincent CHALEIX et Dr. Frédérique BREGIER

JURY :

Rapporteurs

Mme Laurence MOTTE, Professeur des Universités, Laboratoire LVTS – SMBH, INSERM U1148, Université Paris XIII, Sorbonne Paris Cité.

Mr Jean-Olivier DURAND, Directeur de Recherche CNRS, Ingénierie Moléculaire et Nano-Objet, UMR 5253, Institut Charles Gerhardt, Université de Montpellier.

Examineurs

Mr Stéphane GRELIER, Professeur des universités, Laboratoire de Chimie des Polymère Organiques, ENSCBP, Université de Bordeaux.

Mr Nicolas DESBOIS, Maître de Conférences, Institut de Chimie Moléculaire, Université de Bourgogne.

Mr David Yannick LEGER, Maître de Conférences, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges.

Mr Vincent SOL, Professeur des universités, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges.

Mme Frédérique BREGIER, Maître de Conférences, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges.

Mr Vincent CHALEIX, Professeur des universités, Laboratoire PEIRENE, Université de Limoges.

Dédicace

À mon père et ma mère

À Abdelhamid, Othmane et Ziyad

Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver

Pierre Dac

Remerciements

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse sont le fruit de trois ans de travail de recherche au sein du laboratoire PEIRENE. Ce travail a été réalisé grâce au soutien d'un grand nombre de personnes toujours ouvert à la discussion et au partage de leurs connaissances. Je souhaiterais, à travers ces quelques lignes, vous faire part de ma plus grande gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Laurence Motte et M. Jean-Olivier Durand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie également M. Stéphane Grelier, M. Nicolas Debois et M. David Yannick Leger d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Vincent Sol de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous suis très reconnaissante pour l'aide que vous m'avez apportée depuis ma première année de Master et durant ces trois années de doctorat. Même avec vos occupations quotidiennes en tant que directeur du laboratoire, vous étiez toujours présent avec vos précieux conseils scientifiques et professionnels. Je vous remercie également d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour accomplir mon travail de recherche, et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À mes deux encadrants de thèse, sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Tout d'abord, je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au professeur Vincent Chaleix. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ce projet et depuis mon Master 2. Je vous remercie également de m'avoir accompagné le long de ces travaux et de m'avoir transmis votre savoir-faire. J'ai beaucoup appris de vos réflexions toujours pertinentes, de votre esprit critique et votre rigueur. Je vous en suis très reconnaissante. Merci au docteur Frédérique Brégier pour avoir codirigé cette thèse. Je te remercie d'avoir suivi mes travaux au quotidien, merci pour ta gentillesse, ton soutien et tes conseils qui m'ont toujours aidé à franchir les obstacles. Frédérique, Vincent, un grand merci pour votre aide lors des manipulations ainsi que pendant la rédaction du manuscrit. Il est difficile de vous remercier en quelques lignes, je veux juste vous dire que c'était un plaisir de travailler avec vous, et soyez assuré, de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Je tiens à remercier vivement le professeur Bertrand Liagre de m'avoir donné la chance de découvrir le monde de la biologie au sein de son équipe. Un grand Merci pour votre accueil et votre gentillesse. Un immense Merci à Aline Pinon de m'avoir formé à la culture cellulaire

et merci d'avoir travaillé sur mes produits. Bien sûr, je ne peux pas oublier le futur Docteur Ludovic Bretin. Un grand Merci pour la réalisation des tests biologiques, merci de m'avoir fait découvrir les tests in vivo =D, c'était une expérience inoubliable. Je te remercie également pour ton soutien moral lors des moments difficiles, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse, c'était un plaisir de travailler avec toi et surtout je te souhaite bonne chance dans tes projets futurs !

J'adresse également mes remerciements à Céline Frochot, directrice de recherche au LRGP, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je vous remercie également pour votre grande gentillesse. Merci à Philippe Arnoux pour la réalisation des analyses physico-chimiques, merci pour votre aide et votre gentillesse. Je pense également aux autres membres du LRGP (Ludivine, Amirah, Ludovic, Albert...), merci pour votre accueil et votre aide au cours des manipulations.

Un remerciement tout particulier à Monsieur Yann Launay pour les observations au microscope, sans vous je n'aurai jamais vu mes petites particules ! Merci pour le temps que vous avez consacré à l'analyse de mes produits, merci d'avoir été patient devant la délicatesse de mes produits, et surtout merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci infiniment Yann !

Je remercie également Monsieur Pierre Carles pour les observations MET ainsi que Monsieur Yves Champavier pour les analyses RMN.

Je tiens également à remercier mes collègues, doctorants du laboratoire PEIRENE. À toi ma Véronica merci pour ta bonne humeur et la joie de vivre que tu partages avec les gens qui t'entour. Jeremy, merci pour ton soutien moral lors des moments difficiles et surtout pour les délicieux plats que tu partages avec nous. Guillaume, merci pour ta gentillesse, tes conseils et ton aide lors des manipulations. Merci à tous les autres doctorants que j'ai pu croiser durant ces trois années, Idelette, Amaury, Florent, Nidia, Mark-Arthur, Emma, Maya, Florian, Tom, Olivier, Salim, Holm, Mohammad ...

J'adresse mes remerciements à tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse, leur sympathie et leur bonne humeur. Je pense à Dorothée (merci pour l'aide lors des TP), Sylvie, Michelle, Cristelle, Odile, Anaïs, Véronique, Stéphanie, Thierry...

Ma reconnaissance va aussi envers tous mes enseignants de chimie organique, M. Nicolas Villandier, Mme Rachida Zerrouki, Mme Stéphanie Lhez, M. Robert Granet... Merci pour votre aide et pour les échanges enrichissants, sur le plan scientifique que personnel.

À mes stagiaires, Victor, Nicolas, Alexis, Monia, Khadija, Othmane, Youssou, Valentin, je vous remercie d'avoir contribué à ce travail et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un merci tout particulier à toi Zineb, ma grande sœur. Je te remercie pour ton soutien durant ces trois années, ton encouragement et surtout ton aide dans les enseignements. Je te souhaite une bonne chance et une grande réussite pour tes projets futurs !

Et bien sûr, Abdechakour, les mots ne suffiront jamais pour te remercier, merci pour tout.

Pensée à toi Anass, j'aurai aimé que tu sois là !

Enfin, mes derniers remerciements sont dédiés à mes parents, merci de m'avoir fait confiance, d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours supporté, je ne vous remercierai jamais assez pour cela. Je pense également à mes petits frères, merci de m'avoir encouragé et poussé à aller de l'avant. Je vous souhaite tout le bonheur du monde !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction générale.....	1
Partie I. État de l'art.....	5
Chapitre I : Le cancer	5
I. Généralités	5
II. Statistiques sur le cancer	5
III. La cancérogenèse	7
IV. Les différences entre la cellule normale et la cellule cancéreuse	8
V. Les traitements du cancer.....	10
V.1. La chirurgie	10
V.2. La chimiothérapie.....	10
V.3. La radiothérapie.....	11
Chapitre II : La thérapie photodynamique.....	11
I. Principe de la photothérapie dynamique antitumorale	12
II. Historique de la PDT.....	13
III. Mécanisme photochimique	15
III.1. Les réactions de type I.....	17
III.2. Les réactions de type II	18
IV. Les mécanismes de destruction tumorale après thérapie photodynamique	19
IV.1. Les effets directs	19
IV.2. Les effets indirects	20
V. Les photosensibilisateurs	21
V.1. Structure des porphyrines, chlorines et bactérochlorines.....	21
V.2. Les méthodes de synthèse des porphyrines	23
V.3. Les propriétés photophysiques	26
V.4. Biodistribution et pharmacocinétique des photosensibilisateurs.....	28
V.5. Photosensibilisateur idéal	29

V.6. Les diverses générations de photosensibilisateurs	30
V.6.1. Les photosensibilisateurs de 1 ^{ère} génération	30
V.6.2. Les photosensibilisateurs de 2 ^{ème} génération	31
V.6.3. Les photosensibilisateurs de 3 ^{ème} génération	32
VI. Stratégies de ciblage.....	33
VI.1. Ciblage passif	33
VI.2. Ciblage actif	35
VI.2.1. Ciblage actif indirect	35
VI.2.2. Ciblage actif direct	36
VII. Adressage subcellulaire	37
VII.1. Structure des mitochondries.....	37
VII.2. Les fonctions de la mitochondrie.....	38
VII.2.1. Apoptose	38
VII.3. Les méthodes de ciblage mitochondrial.....	39
Chapitre III : Les nanoparticules, un outil pour la vectorisation en PDT.....	43
I. Les nanoparticules inorganiques	46
I.1. Les nanoparticules d'or.....	46
I.2. Les nanoparticules magnétiques	46
I.3. Les nanoparticules de silice	47
I.3.1. Méthodes de synthèse.....	47
I.3.2. Les nanoparticules de silice comme vecteur de PS	49
II. Les nanoparticules organiques	53
II.1. Les liposomes	53
II.2. Les micelles	54
II.3. Les dendrimères.....	55
II.4. Les nanoparticules polymériques	56
Chapitre IV : Les nanoparticules formées de polysaccharides en PDT	57

I. Les méthodes de synthèse de NPs à partir de polysaccharides	57
II. Quelques exemples de nanoparticules formées à partir du chitosane pour une application en PDT	60
Objectif du travail.....	63
Partie II. Résultats et discussions.....	69
Chapitre I : Préparation de nanoparticules hybrides inorganiques/organiques pour la vectorisation de porphyrine	69
I. Introduction	69
II. Stratégie de synthèse	69
III. Synthèse de nanoparticules de silice (SNPs)	70
IV. Modification de nanoparticules de silice par le 3-aminopropyltriéthoxysilane.....	72
V. Structure et caractérisation du xylane étudié	73
V.1. Les différentes hémicelluloses	73
V.2. Structure des xylanes.....	74
V.3. Caractérisation du 4- <i>O</i> -méthyl-glucuronoxylane du bois de hêtre.....	75
VI. Fonctionnalisation du xylane de hêtre par la monohydroxyphénylporphyrine	77
VI.1. Synthèse de la monohydroxyphénylporphyrine.....	77
VI.2. Alkylation de la monohydroxyphénylporphyrine par le 4-bromobutyrate d'éthyle	78
VI.3. Saponification de la porphyrine (2).....	78
VI.4. Greffage par estérification de la TPPOH sur le xylane.....	80
VI.5. Plan d'expériences	83
VI.6. Enrobage de nanoparticules de silice par le conjugué xylane-TPPOH (XP).....	87
VI.7. Analyses UV-visible du nano-objet XP-SNPs.....	88
VII. Nanoparticules hybrides pour le ciblage mitochondrial.....	90
VII.1. Synthèse de la 5,15-hydroxyphényl-10,20-phénylporphyrine (<i>trans</i> -TPP(OH) ₂)	91
VII.1.1. Synthèse selon Lindsey	91
VII.1.2. Méthode des aldéhydes mixtes.....	96

VII.2. Fonctionnalisation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂	98
VII.2.1. Alkylation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ par le 4-bromobutyrate d'éthyle	98
VII.2.2. Alkylation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ par le cation TPP	99
VII.2.2.1. Fixation du 1,4 dibromobutane.....	99
VII.2.2.2. Substitution nucléophile par la triphénylphosphine	100
VII.2.3. Saponification de l'ester.....	101
VII.2.4. Hydrolyse acide de l'ester	102
VII.2.5. Synthèse du bras tertibutyle	103
VII.2.6. Alkylation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ avec le 4-bromobutanoate de tertibutyle.	103
VII.2.7. Hydrolyse acide du tertibutyle	104
VII.3. Fonctionnalisation du xylane de hêtre par la porphyrine (16)	106
VII.4. Fixation du conjugué XP-TPP sur les NPs de silice et analyses UV-Visible... 108	
VIII. Analyses physico-chimiques des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs.....	109
VIII.1. Spectroscopie d'émission de fluorescence	109
VIII.2. Mesures de production d'oxygène singulet.....	110
IX. Évaluation de l'activité biologique des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs	111
X. Conclusion	113
Chapitre II : Nanoparticules organiques formées par autoassemblage de xylane	115
I. Introduction	115
II. Préparation de nanoparticules de xylane portant des PS liés de façon covalente	116
II.1. Préparation des nanoparticules à partir des échantillons de conjugués xylane- porphyrines issus du plan d'expériences	116
II.2. Préparation de nanoparticules à partir de xylane portant des porphyrines après acétylation	118
II.2.1. Acétylation du xylane S5	118
II.2.2. Préparation des nanoparticules à partir du xylane acétylé S5-Ac.....	119
II.3. Préparation de nanoparticules à partir du xylane après acétylation suivie du greffage de porphyrines.....	121

II.3.1. Acétylation du xylane de hêtre.....	121
II.3.2. Évaluation de la formation de nanoparticules de xylanes acétylés.....	123
II.3.3. Fonctionnalisation des xylanes acétylés par la TPPOH.....	124
II.3.4. Mise en forme de nanoparticules par dialyse.....	126
II.4. Préparation de nanoparticules organiques avec cation TPP	128
II.4.1. Fixation de la porphyrine (16) sur le xylane acétylé.....	128
II.4.2. Mise en forme de nanoparticules par dialyse.....	130
III. Caractérisation et évaluation biologique des nanoparticules de xylane portant des PS liés de façon covalente	131
III.1. Détermination de la quantité de photosensibilisateurs dans les nanoparticules .	131
III.2. Caractérisation des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16) par spectroscopie d'émission de fluorescence	133
III.3. Mesures de la production d'oxygène singulet des nanoparticules S5-Ac, Xyl- Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16).....	134
III.4. Évaluation de l'activité biologique des nanoparticules organiques	135
IV. Encapsulation de PS dans les nanoparticules organiques de xylane	136
IV.1. Préparation des nanoparticules.....	137
IV.2. Détermination de la quantité de photosensibilisateurs encapsulés	138
IV.3. Caractérisation des nanoparticules TMPC-TPP par spectroscopie d'émission de fluorescence.....	139
IV.4. Mesures de la production d'oxygène singulet des nanoparticules TMPC-TPP .	140
V. Conclusion	140
Chapitre III : Préparation de nanoparticules organiques naturelles pour une application en PDT.....	142
I. Extraction des xylanes du bois de châtaignier.....	142
I.1. Le xylane de châtaignier, un sous-produit à fort potentiel.....	143
I.2. Extraction et caractérisation des xylanes du bois de châtaignier	143
I.2.1. Les différentes méthodes d'extraction des xylanes.....	143
I.2.2. Extraction des xylanes de châtaignier au DMSO.....	145

I.2.2.1. Extraction séquentielle de l'holocellulose	145
I.2.2.2. Extraction au DMSO	145
I.2.3. Caractérisation du xylane extrait	146
I.2.3.1. Analyses infrarouges	146
I.2.3.2. Analyses RMN	147
II. Extraction du phéophorbide a	148
II.1. Extraction et hémisynthèse du phéophorbide a	149
II.2. Caractérisation du phéophorbide a	150
III. Greffage du phéophorbide a sur le xylane Xyl _{DMSO}	151
IV. Mise en forme des nanoparticules par dialyse	153
V. Détermination de la quantité de phéophorbides a dans les nanoparticules organiques Xyl _{DMSO} -ph.....	154
VI. Conclusion	155
Conclusion et perspectives	159
Partie III. Matériels et méthodes.....	165
I. Matériels	165
I.1. Réactifs et solvants.....	165
I.2. Chromatographie.....	165
I.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative	165
I.2.2. Chromatographie sur couche mince analytique	165
I.2.3. Chromatographie flash	165
I.3. Spectroscopie	166
I.3.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	166
I.3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	166
I.3.3. Spectroscopie de Masse	166
I.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-Visible.....	166
I.3.5. Spectroscopie d'émission de fluorescence et production d'oxygène singulet	166

I.3.6. Spectroscopie DLS	167
I.4. Microscopie.....	167
I.4.1. Microscope Electronique à Transmission (MET)	167
I.4.2. Microscope Electronique à Balayage (MEB).....	167
I.5. Four micro-ondes	168
I.6. Tests biologiques.....	168
II. Synthèses	169
II.1. Préparation des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine	169
II.1.1. Nanoparticules de silice (SNPs).....	169
II.1.1.1. Synthèse de nanoparticules de silice de 80 nm	169
II.1.1.2. Modification de la surface des nanoparticules de silice avec l'APTES. 169	
II.1.2. Préparation du conjugué xylane-TPPOH.....	170
II.1.2.1. Synthèse de la 5-(4-hydroxyphényl) -10, 15, 20-triphénylporphyrine (1)	170
II.1.2.2. Synthèse de 5-(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -10,15,20- triphénylporphyrine (2).....	171
II.1.2.3. Synthèse de 5-(4-[3-carboxypropyloxy] phényl) -10,15,20- triphénylporphyrine (3).....	172
II.1.2.4. Greffage par estérification de la TPPOH sur le xylane de hêtre	173
II.1.2.4.1. Solubilisation du xylane	173
II.1.2.4.2. Greffage de la TPPOH sur le xylane de hêtre (XP).....	173
II.1.3. Préparation du conjugué xylane-porphyrine (16)	174
II.1.3.1. Synthèse de la 5,15-di(p-hydroxyphényl)-10,15-diphénylporphyrine (<i>trans</i> -TPP(OH) ₂) (6)	174
II.1.3.1.1. Par la méthode des dypyrrométhanes	175
II.1.3.1.1.1. Synthèse du 5-phényl dipyrrométhane (4).....	175
II.1.3.1.1.2. Synthèse du 5-(p-hydroxyphényl)dipyrrométhane (5)	176
II.1.3.1.2. Par déprotection de 5,15-di(p-méthoxyphényl)-10,15- diphénylporphyrine (7).....	176

II.1.3.1.2.1. Synthèse de la 5,15-di(p-méthoxyphényl)-10,15-diphénylporphyrine (7)	177
II.1.3.1.3. Par la méthode des aldéhydes mixtes	177
II.1.3.2. Fonctionnalisation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂	178
II.1.3.2.1. Synthèse de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -15-(p-hydroxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine (8)	178
II.1.3.2.2. Synthèse de la 5--(4-[4-bromobutoxy] phényl) -15-(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -10,20-diphénylporphyrine (9)	179
II.1.3.2.3. Synthèse de la Bromure de 5--(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -15-(4-[4-(triphénylphosphonium) butoxy]phényl)-10,20-diphénylporphyrine (10).....	180
II.1.3.2.4. Synthèse de 4-bromobutanoate de tertiobutyle (12).....	181
II.1.3.2.5. Synthèse de la 5-(2-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy] phényl) -15-(p-hydroxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine (13)	182
II.1.3.2.6. Synthèse de la 5--(4-[4-bromobutoxy] phényl) -15-(4-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy] phényl)-10,20-diphénylporphyrine (14).....	183
II.1.3.2.7. Synthèse de la bromure de 5--(4-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy] phényl)-15-(4-[4-(triphénylphosphonium)butoxy]phényl)-10,20-diphénylporphyrine (15).....	184
II.1.3.2.8. Synthèse de la bromure de 5--(4-[3-carboxypropyloxy] phényl) -15-(4-[4-(triphénylphosphonium) butoxy] phényl) -10,20-diphénylporphyrine (16)	184
II.1.3.3. Greffage de la porphyrine (16) sur le xylane de hêtre (XP-TPP).....	186
II.1.4. Enrobage de nanoparticules de silice par le xylane modifié.....	186
II.2. Préparation des nanoparticules organiques.....	187
II.2.1. Acétylation du xylane de hêtre.....	187
II.2.1.1. Acétylation du xylane de hêtre avant greffage des porphyrines	187
II.2.1.2. Acétylation du xylane de hêtre après greffage des porphyrines.....	188
II.2.2. Fonctionnalisation des xylandes acétylés par la TPPOH.....	188
II.2.2.1. Fonctionnalisation des xylandes acétylés par la porphyrine (16).....	189
II.2.3. Préparation de nanoparticules de xylane organiques portant des photosensibilisateurs liés de façon covalente	189

II.2.4. Encapsulation de photosensibilisateurs dans les nanoparticules organiques de xylane.....	190
II.3. Préparation des nanoparticules 100% naturelles	190
II.3.1. Extraction des xylanes	190
II.3.1.1. Extraction à l'éthanol	190
II.3.1.2. Extraction des pectines	190
II.3.1.3. Délignification.....	191
II.3.1.4. Extraction au DMSO des xylanes	191
II.3.2. Extraction du phéophorbide a	191
II.3.2.1. Extraction de la chlorophylle a.....	191
II.3.2.2. Préparation du phéophytine a.....	192
II.3.2.3. Préparation du phéophorbide a.....	192
II.3.3. Fixation du phéophorbide a sur le xylane de châtaignier.....	193
II.3.4. Préparation des nanoparticules de xylane-phéophorbide a.....	194
Références bibliographiques	197
Publications Scientifiques	216

Table des illustrations

Figure 1 : Les tendances mondiales [4].	6
Figure 2 : Le nombre de décès dû au cancer dans le monde, en 2018 (pour les deux sexes et tout âge) [6].	6
Figure 3: Les six caractéristiques anormales des cellules cancéreuses (modifié de la référence [10]).	8
Figure 4 : Représentation schématique du principe de la PDT.	12
Figure 5: Dihématoporphyrine ester et éther.	15
Figure 6 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique	16
Figure 7: Structure de la porphine (à gauche), représentation du système de 18 électrons π aromatiques (à droite).	22
Figure 8: Porphyrine métallée.	22
Figure 9: Nomenclature du noyau porphyrinique.	22
Figure 10: Différences entre une porphyrine, une chlorine, une bactériochlorine et une isobactériochlorine.	23
Figure 11: Méthode de Rothmund appliquée à la synthèse de la <i>méso</i> -tétraphénylporphyrine.	24
Figure 12: Méthode des aldéhydes mixtes.	24
Figure 13: Méthode de Lindsey.	25
Figure 14: Condensation [2+2] de MacDonald.	26
Figure 15: Spectres d'absorbance d'une porphyrine base libre (rouge) et d'une métalloporphyrine (violet) [68].	27
Figure 16: Spectres d'absorption des photosensibilisateurs tétrapyrroliques [69].	27
Figure 17: Spectres d'absorption des principales molécules biologiques (à gauche) et la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus humains en fonction de la longueur d'onde (à droite).	29
Figure 18 : Schéma illustrant l'effet EPR.	34
Figure 19: Représentation schématique d'une mitochondrie.	38
Figure 20 : Accumulation mitochondriale du cation TPP induite par le potentiel membranaire (modifié de 111).	40
Figure 21: les agents de ciblage mitochondrial [113].	41
Figure 22 : Gamme des tailles des principales structures chimiques et biologiques.	43
Figure 23: Schéma décrivant la synthèse et la purification de nanoparticules dopées de HPPH par microémulsion [140].	50

Figure 24: stratégie de synthèse des NPs de silice creuses encapsulées de ZnPC, (F108 est le surfactant) [142].	51
Figure 25: nanoparticules de silice incorporant l'octahydroxyphénylporphyrine [143].	52
Figure 26: Procédure utilisée pour obtenir des nanoparticules de silice mésoporeuses fonctionnalisées par la vertéporfine [144].	52
Figure 27: Structure chimique de la THPP.	54
Figure 28: Structure chimique de la protoporphyrine zinc (a), et structure chimique de la chlorine e6 (b).	55
Figure 29 : Représentation des principales stratégies de vectorisation de PS par des dendrimères utilisées en PDT.	56
Figure 30: Illustrations schématiques des différentes stratégies utilisées pour préparer des nanoparticules à base de polysaccharides (a) réticulation de polysaccharides en utilisant de petits agents de réticulation moléculaire (b) complexation entre des polysaccharides de charges opposés (c) autoassemblage de polysaccharides modifiés avec des groupes hydrophobes.	57
Figure 31: Structure de la chitine.	60
Figure 32: Structure du chitosane.	60
Figure 33: Illustrations schématiques de la formation de nanoparticules de ChitoCe6 [161].	61
Figure 34: Procédure de préparation des NPs HGC-Ce6 et GC-Ce6 [162].	61
Figure 35: Les NPs hybrides à base de xylane-PS.	64
Figure 36: Autoassemblage du conjugué xylane-PS en NPs.	64
Figure 37: Encapsulation de PS dans des NPs de xylane acétylé.	64
Figure 38: Stratégie de synthèse des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine.	70
Figure 39: Stratégie de synthèse des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine-TPP.	70
Figure 40: Images MET des SNPs.	72
Figure 41: Fonctionnalisation des nanoparticules de silice par l'APTES.	72
Figure 42: Image MET des SNPs-APTES.	73
Figure 43: Structure de 4-O-méthyle-D-glucurono-xylanes (MeGX).	75
Figure 44: Spectre RMN ¹ H du xylane de hêtre natif (dans D ₂ O).	76
Figure 45: Synthèse de la monohydroxyphénylporphyrine (1) par la méthode des aldéhydes mixtes.	77
Figure 46: étherification de la monohydroxyphénylporphyrine par le 4-bromobutyrate d'éthyle.	78
Figure 47: Réaction de saponification de la porphyrine 2 .	79
Figure 48: Spectre RMN ¹ H de la TPPOH dans CDCl ₃ /TFA.	79

Figure 49 : Greffage de la TPPOH sur le xylane en présence de CDI.	81
Figure 50: Spectres IR du xylane de hêtre natif (a) et modifié par la TPPOH (b).	81
Figure 51: Spectre RMN du xylane de hêtre modifié (dans DMSO).....	82
Figure 52 : Grille de dépouillement pour le DS.	86
Figure 53: Tracé des effets moyens des facteurs pour le DS moyen 86	86
Figure 54: Tracé des effets moyens des facteurs pour le GP moyen 87	87
Figure 55: Changement de couleur des nanoparticules de silice après revêtement avec les xylanes-TPPOH.....	88
Figure 56: les spectres UV-Visible de la TPPOH, SNPs, et XP-SNPs.....	88
Figure 57: Droite d'étalonnage XP dans l'eau distillée.....	89
Figure 58: Voies de synthèse de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ par le dipyrrométhane.	91
Figure 59: Synthèse des dipyrrométhanes (4) et (5).....	92
Figure 60: Synthèse de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂	93
Figure 61: Mécanisme du phénomène de "scrambling".....	94
Figure 62: Préparation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ par déprotection de la méthoxy-porphyrine (8).	95
Figure 63: Synthèse de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ selon Little.....	96
Figure 64: Spectres RMN ¹ H des porphyrines <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ (a), et <i>cis</i> -TPP(OH) ₂ (b).	97
Figure 65: Alkylation de la <i>trans</i> -TPP(OH) ₂ par le 4-bromobutyrate d'éthyle.	98
Figure 66: Fixation du 1,4 dibromobutane sur la porphyrine (8).....	100
Figure 67: Fixation de la triphénylphosphine sur la porphyrine 10	101
Figure 68 : Saponification de la porphyrine (10).	101
Figure 69: Hydrolyse acide de l'ester.	102
Figure 70: Estérification de l'acide 4-bromobutoïque par le tertiobutanol.	103
Figure 71: Synthèse de la porphyrine (15).	104
Figure 72 : Hydrolyse acide du tertiobutyle.....	105
Figure 73: Spectre RMN ¹ H de la porphyrine (16) dans CDCl ₃ /TFA.	106
Figure 74 : Fonctionnalisation du xylane par la porphyrine (16).....	107
Figure 75: Droite d'étalonnage XP-TPP dans l'eau distillée.	108
Figure 76: Spectres d'émission de fluorescence de XP-SNPs et XP-TPP SNPs excitées à 422 nm dans l'éthanol.	109
Figure 77: Spectres d'émission de luminescence d'oxygène singulet de XP-SNPs et XP-TPP SNPs dans l'éthanol.	110

Figure 78 : Analyse MET des cellules HCT116 (a) cellule de contrôle (irradiée) (b) XP-SNPs (non irradiée) (c) XP-SNPs (irradiée).	112
Figure 79: Stratégies de synthèse des nanoparticules de xylane par autoassemblage.	115
Figure 80: Schéma de dialyse adapté de la référence [193].	116
Figure 81: Images MEB des particules obtenues à partir des échantillons S5 (A) et S7 (B). 117	
Figure 82: Acétylation du xylane S5.	118
Figure 83: Spectre RMN ¹ H du produit S5-Ac dans le DMSO.	119
Figure 84: Distribution de taille des nanoparticules S5-Ac obtenues à partir du xylane S5 acétylé par dialyse.	120
Figure 85: Images MEB des nanoparticules S5-Ac.	120
Figure 86: Acétylation du xylane de hêtre.	121
Figure 87: Spectre RMN ¹ H du Xyl-Ac2 dans le DMSO.	122
Figure 88: Analyse infrarouge des xylanes acétylés Xyl-Ac1, Xyl-Ac2, Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, Xyl-Ac5, Xyl-Ac6, Xyl-Ac7.	122
Figure 89: Distribution de taille des nanoparticules (A) Xyl-Ac5, (B) Xyl-Ac6, (C) Xyl-Ac7.	123
Figure 90: clichés MEB des nanoparticules (A) Xyl-Ac5, (B) Xyl-Ac6, et (C) Xyl-Ac7.	124
Figure 91: Fixation de la TPPOH sur les xylanes acétylés.	125
Figure 92: Distribution de taille des nanoparticules (A) Xyl-Ac3-TPPOH, (B) Xyl-Ac4-TPPOH, et (C) Xyl-Ac5-TPPOH.	126
Figure 93: clichés MEB des nanoparticules (A) Xyl-Ac3-TPPOH, (B) Xyl-Ac4-TPPOH, et (C) Xyl-Ac5-TPPOH.	127
Figure 94: Fixation de la porphyrine (16) sur le xylane acétylé xyl-Ac4.	129
Figure 95: Distribution de taille des nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (16).	130
Figure 96: Clichés MEB des nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (16).	130
Figure 97: Spectres d'absorption des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16) dans le DMSO.	132
Figure 98: Spectres d'émission de fluorescence des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16) excitées à 422 nm dans le D ₂ O.	133
Figure 99: Spectres d'émission de luminescence d'oxygène singulet des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16) dans le D ₂ O.	134
Figure 100: Encapsulation de PS dans des nanoparticules de xylane.	136
Figure 101: Structure chimique de la TMPP et la TMPC-TPP.	136
Figure 102: Distribution de taille des nanoparticules (A) TMPC-TPP et (B) TMPP.	137

Figure 103: Images MEB des nanoparticules (A) TMPC-TPP et (B) TMPP.	137
Figure 104: Spectres d'absorption des nanoparticules TMPC-TPP et TMPP dans le DMSO.	138
Figure 105: Spectre d'émission de fluorescence des nanoparticules excitées à 422 nm dans le D ₂ O.	139
Figure 106: Spectre d'émission de luminescence d'oxygène singulet des nanoparticules TMPC-TPP dans le D ₂ O.	140
Figure 107 : Stratégie de synthèse des nanoparticules 100% naturelles.	142
Figure 108: Arrangement spatial de la cellulose, hémicellulose et lignine dans la paroi cellulaire végétale.	143
Figure 109: Spectre infrarouge du xylane Xyl _{DMSO}	146
Figure 110: Spectre RMN ¹ H du xylane Xyl _{DMSO}	147
Figure 111: Structure chimique des différentes chlorophylles.	148
Figure 112: Extraction et hémisynthèse du phéophorbide a.	150
Figure 113: Spectre RMN ¹ H du phéophorbide a dans l'acétone.	150
Figure 114: Spectre UV-visible du phéophorbide a dans DMSO.	151
Figure 115: Estérification du xylane, Xyl _{DMSO} avec le phéophorbide a.	152
Figure 116: Distribution de taille des nanoparticules Xyl _{DMSO} -ph.	153
Figure 117; Image MEB des nanoparticules Xyl _{DMSO} -ph.	154
Figure 118: Spectre d'absorption des nanoparticules Xyl _{DMSO} -ph dans le DMSO.	155

Table des tableaux

Tableau 1: Liste des photosensibilisateurs ayant obtenu une AMM.....	31
Tableau 2 : Analyse DLS des nanoparticules de silice	71
Tableau 3 : potentiel zêta des SNPs après greffage de l'APTES	73
Tableau 4 : Définition des facteurs et des modalités.....	83
Tableau 5: Plan d'expérimentations	84
Tableau 6: Résultats d'expériences	85
Tableau 7 : Phototoxicité <i>in vitro</i> des XP-SNPs dans les cellules de cancer colorectal humain.	111
Tableau 8: Phototoxicité <i>in vitro</i> des XP-TPP SNPs dans les cellules de cancer colorectal humain.....	112
Tableau 9 : Échantillons de xylane-porphyrine du plan d'expériences non soluble dans l'eau.	117
Tableau 10: Rendements massiques et DS des xylandes acétylés.	121
Tableau 11: Degrés de substitution calculés après fixation de la TPPOH sur les xylandes Xyl- Ac3, Xyl-Ac4, et Xyl-Ac5.	125
Tableau 12 : Les concentrations massiques des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl- Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16).....	131
Tableau 13: Concentrations de PS greffé sur les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl- Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (16).	133
Tableau 14: Phototoxicité <i>in vitro</i> des S5-Ac et Xyl-Ac4-porphyrine (16) dans les cellules de cancer colorectal humain HCT116 et HT-29.	135
Tableau 15 : Les concentrations massiques en nanoparticules TMPC-TPP et TMPP.....	138
Tableau 16 : Concentrations de PS encapsulées dans les nanoparticules TMPC-TPP et TMPP.	139
Tableau 17: Structure des différentes chlorophylles.	149
Tableau 18 : Dosage UV-visible de la quantité de phéophorbides a fixé sur le xylane, Xyl _{DMSO}	152
Tableau 19 : Les conditions opératoires du plan d'expériences.....	174
Tableau 20 : Conditions opératoires de l'acétylation du xylane.	188
Tableau 21: Masses et rendements massiques des xylandes Xyl-Ac3-TPPOH, Xyl-Ac4- TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH.	189

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	DP : Degré de polymérisation
AGX : Arabinoglucuronoxylanes	DS : Degré de substitution
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	EPR : Enhanced Permeability and Retention
APTES : (3-Aminopropyl) triethoxysilane	éq. : Equivalent
Ar : Argon	EtOH : Ethanol
ATP : Adénosine-Triphosphate	eV : Electron-Volt
AuNPs : Nanoparticules d'or	FDA : Food and Drug Administration
AX : Arabinoxylanes	Fe₃O₄ : Nanoparticules magnétiques
CCM : Chromatographie sur couche mince	GA : Acide α -D-glucuronique
CDI : N, N'-carbonyldiimidazole	GAX : Glucuronoarabinoxylanes
Ce6 : Chlorine e6	GP : Gain de poids
CI : Conversion Interne	GX : Glucuronoxylanes
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer	Hp : Hématoporphyrine
CIS : Conversion Inter-Système	HpD : Hematoporphyrin Derivative
DCM : Dichlorométhane	IDL : Intervalle-Drogue Lumière
DHE : Ddihématoporphyrine ester	IR : Infrarouge
DLS : Diffusion dynamique de la lumière	LDL : Low Density Lipoproteins
DMAc : N, N-Diméthylacétamide	MEB : Microscope Electronique à Balayage
DMF : N, N-Diméthylformamide	MeGA : 4-O-méthyl-D-glucuronique
DMSO : Diméthylsulfoxyde	MET : Microscope Electronique à Transmittance

MS : Spectrométrie de masse

MSN : Nanoparticules de silice
mésoporeuses

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-
diphényl tétrazolium bromide

N.D : Non déterminé

NMI : N-méthylimidazole

NPs : Nanoparticules

OMS : Organisation mondiale de la santé

PDI : Indice de Polydispersion

PDT : Photothérapie dynamique

PEG : Polyéthylène Glycol

PS : Photosensibilisateur

Rf : rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

RSE : Système Réticulo-Endothélial

SNPs : Nanoparticules de silice

Ta : Température ambiante

TEOS : Orthosilicate de tétraéthyle

TFA: Acide trifluoroacétique

TPP : Triphénylphosphonium

UV-visible : Spectre d'absorbance des
ultraviolets et de la lumière visible

Xyl : Xylane

$\Delta\Psi$: Potentiel membranaire

Φ_f : Rendement quantique de fluorescence

Φ_{Δ} : Rendements quantiques de production
d'oxygène singulet

Introduction générale

Introduction générale

Le cancer est actuellement la deuxième cause de mortalité dans le monde et la lutte contre cette maladie est devenue une priorité de santé publique. Derrière le terme cancer se cache une multitude de maladies, puisque le cancer peut se développer dans n'importe quelle cellule du corps. De ce fait, plusieurs traitements sont proposés pour traiter cette maladie. Les plus classiques sont la chimiothérapie la chirurgie et la radiothérapie. Ces traitements sont souvent combinés ou associés avec d'autres thérapies (hormonothérapie, immunothérapie...) afin de maximiser les effets thérapeutiques chez les patients. Ils permettent actuellement de guérir un cancer sur deux, mais ils sont invasifs, moins sélectifs et génèrent de nombreux effets secondaires indésirables chez les patients traités. Depuis quelques années et grâce aux progrès de la recherche scientifique sur le cancer, de nouvelles thérapies dites innovantes ont vu le jour. Il s'agit de l'hormonothérapie, l'immunothérapie, la photothérapie dynamique. Ces thérapies ouvrent la voie à une médecine personnalisée plus efficace, et de plus en plus adaptée au patient et aux caractéristiques de sa tumeur.

La photothérapie dynamique des cancers est une technique thérapeutique utilisant de manière combinée une molécule photosensible et une source de lumière. Sous l'action de cette dernière, le photosensibilisateur devient toxique, en produisant des espèces réactives de l'oxygène, qui entraînent la mort cellulaire. Les photosensibilisateurs les plus utilisés dans la PDT sont les porphyrines et leurs dérivés. Cependant, ces composés souffrent souvent d'une faible solubilité dans les milieux physiologiques et d'un manque de sélectivité envers les cellules cancéreuses, ce qui limite leurs utilisations cliniques. L'utilisation des nanoparticules comme vecteurs de photosensibilisateurs constitue une des stratégies les plus prometteuses pour surmonter ces problèmes. Plusieurs types de nanoparticules ont été étudiées pour la délivrance ciblée de photosensibilisateurs. Cependant, peu d'entre elles sont approuvées pour le traitement clinique des cancers. Un des principaux obstacles à l'utilisation clinique des nanoparticules est la toxicité potentielle des composés utilisés dans leur formulation. C'est notamment le cas des nanoparticules métalliques qui sont difficilement éliminées de l'organisme. Ce problème peut être contourné en utilisant des matières biodégradables. Typiquement, les biopolymères naturels sont biocompatibles et biodégradables et un grand nombre d'entre eux présente l'avantage d'être non toxique *in vivo*. Parmi ceux-ci, les polysaccharides constituent une classe de macromolécules naturelles très attractive. Le laboratoire PEIRENE s'intéresse depuis maintenant plusieurs années à la valorisation des polysaccharides issus de la biomasse végétale

et tout particulièrement aux hémicelluloses des fibres ligno-cellulosiques qui constituent, après la cellulose, la famille de polysaccharides la plus abondante. Dans ce domaine, les travaux du laboratoire s'inscrivent pleinement dans la dynamique de la filière bois de la Nouvelle-Aquitaine qui est un élément majeur de l'économie régionale et s'intéresse particulièrement aux essences forestières peuplant le territoire du Limousin, principalement des bois de feuillus, et notamment le châtaignier, espèce emblématique de la région. Les principales hémicelluloses constitutives du bois de châtaignier, objets des études du laboratoire, sont des xylanes. Ce polysaccharide reste actuellement peu exploité comparé à la cellulose. Sa principale voie de valorisation repose sur son hydrolyse en molécules plateforme utilisées dans l'industrie chimique. Plusieurs recherches scientifiques sont actuellement menées pour valoriser davantage ce polysaccharide. Une des voies de valorisation prometteuse des xylanes semble être le développement de nano-objets pour la délivrance de principes actifs.

Dans ce contexte et en s'appuyant sur le savoir-faire du laboratoire PEIRENE, tant en matière de valorisation des agroressources que la synthèse et l'évaluation biologique de photosensibilisateurs pour des applications en PDT, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nanoparticules à base de xylane, pour la vectorisation de photosensibilisateurs. Pour ce faire, nous avons développé deux types de nanoparticules, hybrides et organiques, sur lesquelles des photosensibilisateurs sont liés par liaisons covalentes ou ioniques. Ces photosensibilisateurs sont fonctionnalisés avec le cation triphénylphosphonium dans le but de cibler les mitochondries afin d'accroître l'efficacité du PS et d'initier une mort cellulaire par apoptose.

Ce manuscrit s'articule en trois parties : la première partie est consacrée à une présentation de l'état de l'art relatif d'une part à la photothérapie dynamique des cancers et d'autre part aux nanoparticules et leur utilisation pour la délivrance de photosensibilisateurs. Après avoir détaillé les objectifs du travail, nous discuterons dans une seconde partie les différents travaux menés au cours de cette thèse sous la forme de trois chapitres. Le premier d'entre eux est dédié à la préparation de nanoparticules hybrides (organiques/inorganiques), dans lequel nous détaillons la structure et la caractérisation du xylane utilisé. Le second chapitre porte sur la préparation de nanoparticules de xylanes organiques et le troisième présente des nanoparticules organiques 100% naturelles, préparées à partir de matière première végétale. Enfin, la troisième partie détaillera le volet expérimental de ce travail.

État de l'art

Chapitre I : Le cancer

I. Généralités

Le cancer est l'une des maladies les plus redoutées, il est la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires [1]. Le cancer regroupe toutes les maladies caractérisées par le développement anarchique et incontrôlé de cellules. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses qui se développent en envahissant puis détruisant les zones qui les entourent (organes). Elles peuvent également s'infiltrer à distance d'un organe pour former une nouvelle tumeur ou circuler sous forme libre (métastase). Le cancer peut commencer presque n'importe où dans le corps humain. Il existe plus de 100 types de cancer, nommés généralement en fonction des organes ou des tissus où ils se sont formés. Les cancers peuvent également être décrits par le type de cellule qui les a formés. Par exemple, le lymphome pour désigner le cancer des lymphocytes (globules blancs).

II. Statistiques sur le cancer

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), estime à 14.1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer et à 8.2 millions le nombre de décès liés à cette maladie survenus en 2012, par rapport à 12.7 millions et 7.6 millions respectivement en 2008 [2]. Malgré les progrès incessants faits tant en matière de traitement que de détection et de prévention, ces chiffres continuent d'augmenter de plus en plus. En 2018, 18.1 millions de nouveaux cas de cancer ont été enregistrés et 9.6 millions de personnes sont décédées à cause de cette maladie. Pour les années à venir, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) prévoit une hausse importante du nombre de nouveaux cas de cancer à 29.5 millions en 2040. Ceci est dû à plusieurs facteurs notamment à la croissance démographique et au vieillissement de la population mondiale, ainsi qu'au changement du mode de vie lié au développement social et économique des pays. Les tendances mondiales (figure 1) montrent que pour les deux sexes, près de la moitié des nouveaux cas et plus de la moitié des décès par cancer dans le monde, en 2018, surviennent en Asie. L'Europe, quant à elle, concentre 23,4 % du total des cas de cancer dans le monde et 20,3 % des décès dus au cancer [3].

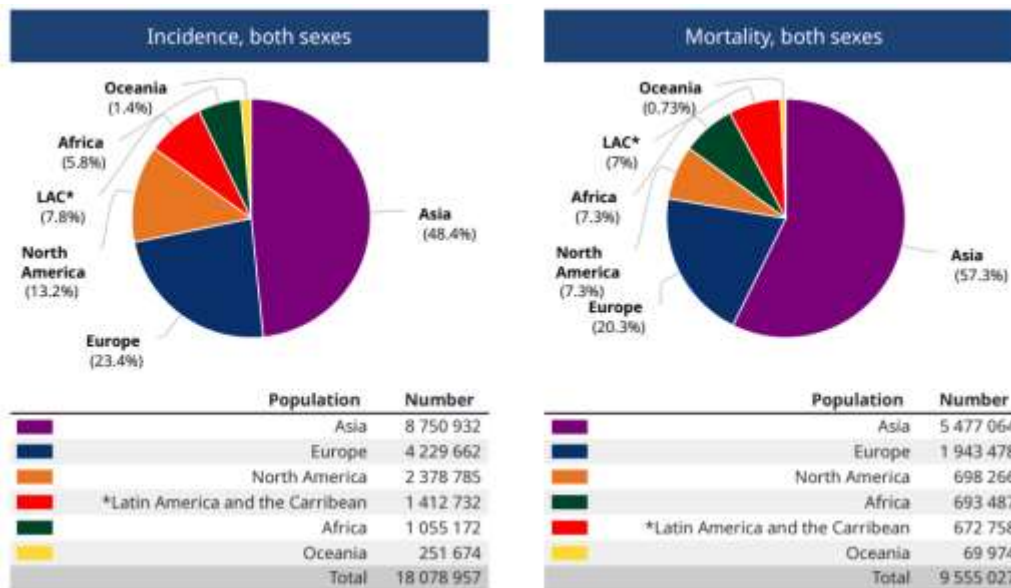


Figure 1 : Les tendances mondiales [4].

Selon les nouvelles estimations établies par le CIRC sur 36 cancers dans 185 pays (figure 2), le cancer du poumon est le cancer le plus diagnostiqué et le plus meurtrier avec 18,4% du total des décès. Il devance le cancer colorectal (9,2%), le cancer de l'estomac (8,2%) et le cancer du foie (8,2%). Des atteintes différentes sont observées selon le sexe. Les hommes sont particulièrement touchés par le cancer du poumon, suivi du cancer du foie et de l'estomac. Les femmes, quant à elles, sont essentiellement touchées par le cancer du sein, suivis du cancer du poumon et du cancer colorectal [5].

Estimated number of deaths in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

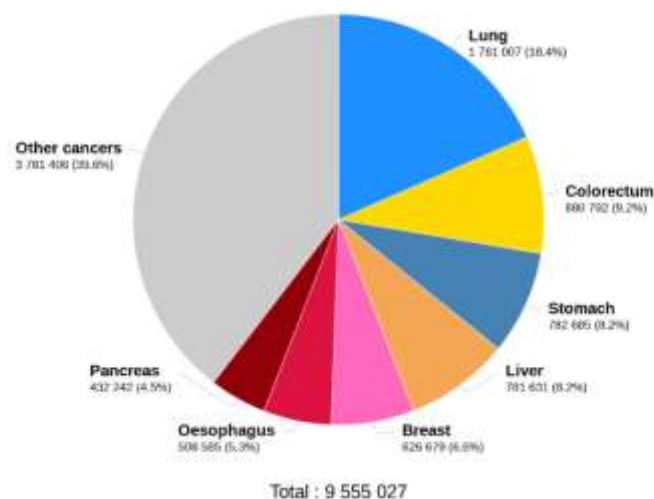


Figure 2 : Le nombre de décès dû au cancer dans le monde, en 2018 (pour les deux sexes et tout âge) [6].

III. La cancérogenèse

Le cancer est une maladie génétique, c'est-à-dire qu'elle est causée par des modifications de gènes (mutation) qui contrôlent le fonctionnement de nos cellules, en particulier leur croissance et leur division. En effet, ces mutations peuvent inciter la cellule à se développer de façon désordonnée ou à ne pas mourir alors qu'elle le devrait.

Habituellement, les cellules possèdent des mécanismes pour réparer les gènes défectueux. Lorsque l'altération est grave, les cellules peuvent se suicider ou bien émettre des signaux pour être reconnues et éliminées par le système immunitaire. Cependant, certaines mutations parviennent à échapper aux mécanismes de réparation de l'ADN. L'accumulation de plusieurs mutations dans une cellule entraîne sa transformation de cellule normale en cellule tumorale. Cette transformation est un processus long nécessitant des années chez l'Homme. Trois phases sont distinguées dans le processus de cancérogenèse [7] :

- **Initiation** : il s'agit d'une étape ponctuelle correspondant à l'altération du génome d'une cellule normale lui conférant la propriété d'échapper aux régulations cellulaires.
- **Promotion** : c'est la phase de prolifération des cellules initiées, stimulée par des agents promoteurs exogènes ou endogènes (hormones, substances toxiques, infections...). Cette prolifération favorise l'apparition d'autres mutations qui vont s'accumuler et donner naissance à des clones cellulaires transformés.
- **Progression** : (phase clinique) elle est caractérisée par l'accumulation des propriétés des cellules cancéreuses (immortalité, angiogenèse, invasion...).

Les mutations génétiques peuvent être héritées des parents si la mutation est présente dans les cellules germinales. Elles peuvent également survenir, de façon accidentelle, lors de la réplication de l'ADN durant la division cellulaire. Elles apparaissent aussi lorsque les gènes s'usent à cause du vieillissement, ou bien après une exposition à des substances cancérogènes endommageant l'ADN comme la fumée de tabac, l'alcool ou les rayons ultraviolets du soleil.

Les changements génétiques qui contribuent à l'apparition du cancer ont tendance à affecter trois principaux types de gènes : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, et les gènes de réparation de l'ADN.

- Les proto-oncogènes : ce sont des gènes qui stimulent la croissance cellulaire en favorisant la multiplication des cellules. Une modification dans ces gènes (en oncogènes) les rend hyperactifs ce qui entraîne une prolifération cellulaire anormale.

- Les gènes suppresseurs de tumeurs : ils ont pour rôle de freiner la division cellulaire. Une mutation dans ces gènes signifie qu'une cellule ne comprend plus l'instruction d'arrêter de croître, ce qui aboutit aussi à une multiplication cellulaire incontrôlable.
- Les gènes de réparation de l'ADN : les cellules contiennent des protéines dont le rôle consiste à réparer l'ADN endommagé, lorsque les dommages de l'ADN surviennent dans les gènes qui codent pour fabriquer ces protéines, la cellule a moins de capacité à se réparer elle-même. Ainsi les mutations s'accumulent et peuvent provoquer le cancer [8].

IV. Les différences entre la cellule normale et la cellule cancéreuse

Les tumeurs se forment parce que les cellules subissent une transformation maligne, c'est-à-dire qu'elles passent d'un état normal à un état tumoral. Selon Hanahan et Weinberg [9], les cellules deviennent cancéreuses parce qu'elles acquièrent six caractéristiques anormales (figure 3).

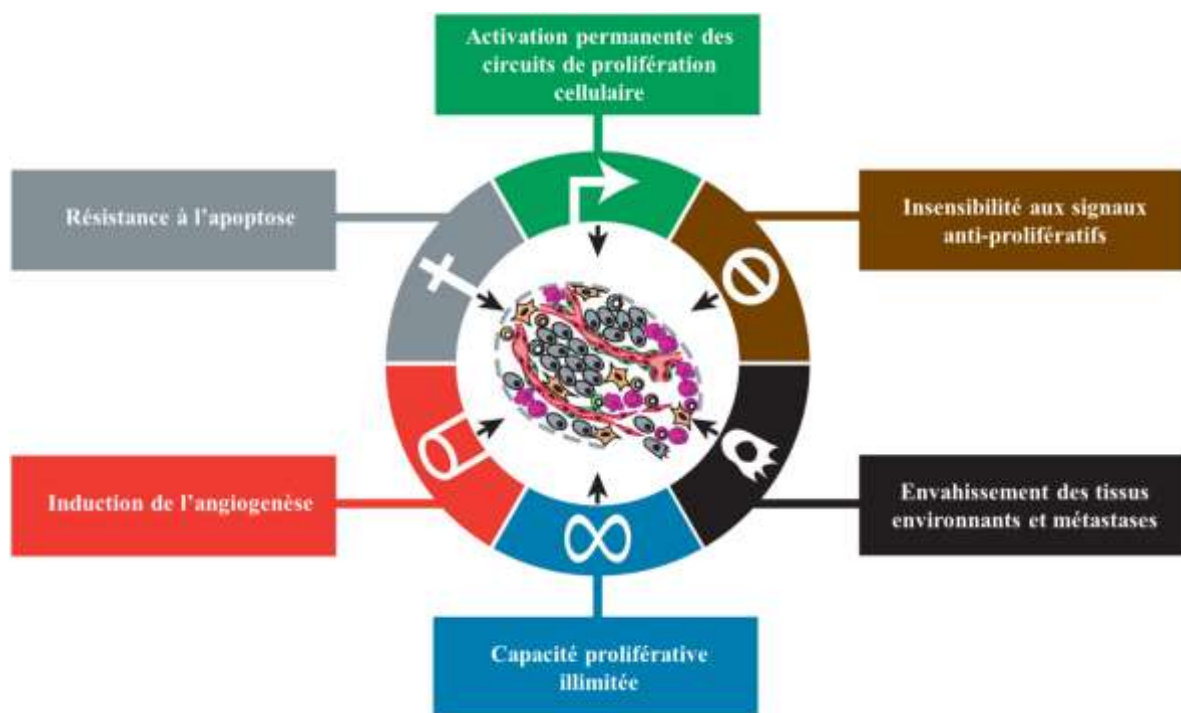


Figure 3: Les six caractéristiques anormales des cellules cancéreuses (modifié de la référence [10]).

- Activation permanente des circuits de prolifération cellulaire : la cellule normale ne se divise que lorsqu'elle reçoit des signaux de prolifération, appelés facteurs de croissance, provenant de son micro-environnement. Contrairement à la cellule normale, la cellule tumorale acquiert, selon un mécanisme de stimulation autocrine, la capacité de

synthétiser elle-même des facteurs de croissance qui activent ses propres récepteurs membranaires. Elle réduit ainsi sa dépendance vis-à-vis des signaux provenant des autres cellules, qui régulent l'équilibre du tissu dont elle fait partie.

- Une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs : les signaux anti-prolifératifs sont donnés par des gènes suppresseurs de tumeurs. L'un d'entre eux est le gène du rétinoblastome (Rb) qui commande le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Une altération de la voie de signalisation impliquant le Rb et les protéines qui lui sont associées peut induire la suppression de l'inhibition qui apparaît normalement lorsque les circonstances l'exigent [11].
- Une capacité proliférative illimitée : la cellule tumorale échappe au phénomène de sénescence par surexpression des télomérases.
- Résistance à l'apoptose : l'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus génétiquement programmé par lequel les cellules endommagées déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. La résistance à l'apoptose peut être le résultat d'une inactivation de gènes inducteurs de l'apoptose tel que le gène P53, de la surexpression des gènes à effet anti-apoptotique tels que BCL-2, ou encore la perte d'expression des protéines proapoptotiques tels que BAX [11].
- Induction de l'angiogenèse : l'angiogenèse est le processus de création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Au cours de la croissance tumorale, les nouvelles cellules générées s'éloignent progressivement des vaisseaux sanguins à cause de l'augmentation de l'épaisseur du tissu, ce qui conduit la tumeur dans un état hypoxique. Les cellules tumorales sécrètent alors une cascade de facteurs angiogéniques qui activent la prolifération des cellules endothéliales pour vasculariser la tumeur, tout en diminuant l'activité des inhibiteurs de l'angiogenèse [11].
- Envahissement des tissus environnants et métastases : la modification au niveau des molécules d'adhérence cellulaire (cadhérines et intégrines) et la surexpression de protéases dégradant la matrice extracellulaire (métalloprotéase MMP) conduisent au détachement de certaines cellules malignes de la masse tumorale, et leur migration vers des nouveaux sites de l'organisme pour y fonder un nouveau foyer tumoral [12].

Ces caractéristiques sont acquises dans différents types de tumeurs via des mécanismes distincts et à différents moments au cours de la cancérogenèse. Leur acquisition est rendue

possible par deux caractéristiques habilitantes. La plus importante est le développement d'une instabilité génomique qui se traduit par une augmentation des taux de mutation génétiques dans les cellules cancéreuses. La deuxième concerne l'activation de l'état inflammatoire dans le but de faciliter le recrutement des macrophages qui inhibent la réponse immunitaire antitumorale et aident à faire progresser l'oncogénèse.

V. Les traitements du cancer

Le traitement du cancer commence par la détection de celui-ci. Comme les symptômes de la maladie apparaissent après plusieurs années de développement, la détection se fait souvent lorsque la maladie est avancée dans l'organisme. Une fois les examens médicaux effectués pour déterminer la nature de la tumeur, son stade de développement et son potentiel métastatique, un traitement adapté est proposé au patient. Il existe plusieurs modalités de traitement de cancer. Les plus classiques sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

V.1. La chirurgie

La chirurgie est un traitement local du cancer qui a pour but l'exérèse de la masse tumorale ainsi que les ganglions lymphatiques locorégionaux susceptibles de contenir des cellules cancéreuses. L'ablation chirurgicale est dite complète (chirurgie curative) quand tout le tissu tumoral est retiré et que les marges opératoires sont saines. Dans certains cas, lorsqu'il n'est pas possible de retirer la totalité de la tumeur, la chirurgie est indiquée pour réduire la masse tumorale, afin de faciliter l'éradication ultérieure de la tumeur par d'autres thérapies, on parle de chirurgie palliative.

V.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement médicamenteux systémique. Elle consiste à administrer des médicaments destinés à tuer les cellules à prolifération rapide caractéristiques du cancer. La chimiothérapie peut être utilisée seule, ou en association avec d'autres thérapies. Dans ce cas, deux approches sont possibles : soit la chimiothérapie est réalisée avant le traitement principal afin de réduire le volume tumoral et faciliter le traitement (chimiothérapie néo-adjuvante), soit elle est réalisée après le traitement principal dans le but d'éliminer les éventuelles cellules cancéreuses restantes (chimiothérapie adjuvante).

V.3. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les radiations utilisées sont des rayons X, des rayons gamma ou encore des particules ionisées. Selon la source du rayonnement, on distingue deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe, la plus fréquemment utilisée, et la curiethérapie. Au cours de la radiothérapie externe, les rayonnements sont produits par un accélérateur de particules placé à distance du patient. Dans ce cas, le faisceau traverse la peau du patient pour atteindre la tumeur. La curiethérapie, quant à elle, est un traitement plus ciblé. La source radioactive est implantée directement à l'intérieur du corps du patient au contact de la tumeur, et est laissée sur place, selon le type du cancer, de quelques minutes à quelques jours. Durant la curiethérapie, l'irradiation peut atteindre la surface du corps, ce qui nécessite l'hospitalisation du patient en chambre isolée.

Ces traitements classiques fonctionnent bien et permettent actuellement de guérir un cancer sur deux, mais ils sont invasifs, et génèrent de nombreux effets secondaires indésirables chez les patients traités. De plus, ces méthodes manquent de sélectivité, ce qui est particulièrement le cas de la chimiothérapie, car elle s'attaque aux cellules malignes comme aux cellules saines. Depuis quelques années et grâce aux progrès de la recherche scientifique sur le cancer, et à la meilleure compréhension des mécanismes biologiques jouant un rôle important dans le développement du cancer, de nouvelles thérapies ont vu le jour. Il s'agit de l'hormonothérapie, l'immunothérapie, les thérapies ciblées, la thermothérapie, et la photothérapie dynamique [13]. Ces thérapies peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec les traitements conventionnels, afin d'améliorer l'efficacité du traitement. Dans ce travail, nous allons nous intéresser à la photothérapie dynamique antitumorale, une thérapie actuellement peu connue du grand public, mais pourtant utilisée cliniquement pour traiter certains types de cancers.

Chapitre II : La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique ou PDT pour PhotoDynamic Therapy est une technique de traitement de cancer non invasive. Ce traitement, en plein essor, est basé sur l'action d'une molécule photoactivable, le photosensibilisateur (PS), qui va induire un stress oxydatif létal pour les cellules cancéreuses sous l'effet d'une irradiation lumineuse. Elle est à distinguer de la photochimiothérapie qui n'implique pas l'oxygène, et de la photothérapie qui utilise uniquement les effets intrinsèques de la lumière [14]. La PDT peut être utilisée seule ou en traitement complémentaire des traitements conventionnels. Elle est préconisée dans le

traitement de certaines maladies, notamment dans les domaines de la dermatologie, de l'ophtalmologie et de la cancérologie [15]. Elle est également utilisée pour la lutte antimicrobienne dans des pathologies impliquant des bactéries, ainsi que dans la décontamination environnementale [16,17]. Cependant, le potentiel antitumoral de la PDT reste l'axe principal de recherche, car la plupart des photosensibilisateurs montrent une affinité relative envers les tissus néoplasiques.

I. Principe de la photothérapie dynamique antitumorale

Le principe de base de la PDT antitumorale repose sur la destruction sélective des cellules cibles à l'aide d'un photosensibilisateur rendu cytotoxique par activation lumineuse, en présence d'oxygène. La figure 4 schématise le principe général de la photothérapie dynamique.

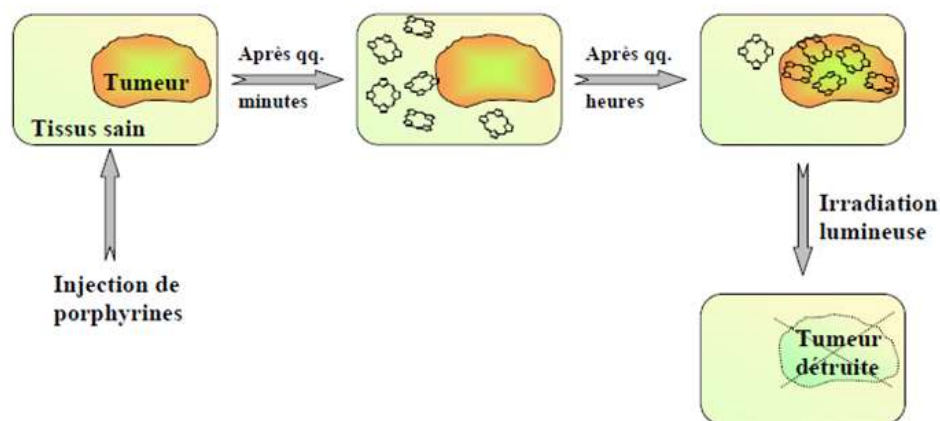
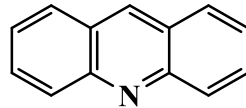


Figure 4 : Représentation schématique du principe de la PDT.

Dans un premier temps, le PS est administré soit par voie intraveineuse ou topique. Une fois dans le sang, le PS va interagir, en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, avec certaines protéines plasmatiques (lipoprotéine, albumine, globuline) qui vont l'acheminer préférentiellement vers les tissus tumoraux. Un délai de temps est requis pour que le PS intègre les cellules cancéreuses. Ce délai, appelé Intervalle-Drogue Lumière (IDL) est variable de quelques minutes à quelques jours et est fonction de la pharmacocinétique du PS. La zone tumorale est ensuite irradiée localement avec une lumière visible monochromatique adaptée au spectre d'absorption du PS. L'irradiation du PS, en présence de l'oxygène, provoque sa photoactivation. Celle-ci implique une cascade de réactions photochimiques conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont l'oxygène singulet (1O_2), principal agent responsable de la destruction des cellules cibles.

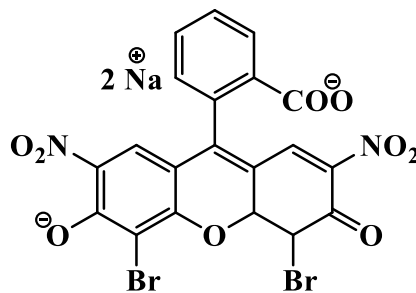
II. Historique de la PDT

L'utilisation de la lumière comme agent thérapeutique est connue depuis l'Antiquité. Les Égyptiens, les Indiens et les Chinois l'utilisaient déjà combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau [18]. Cependant, ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que le concept de photosensibilisation est apparu lorsque Oscar Raab a observé pour la première fois la toxicité d'un colorant, l'acridine, en présence de lumière sur des paramécies [19].



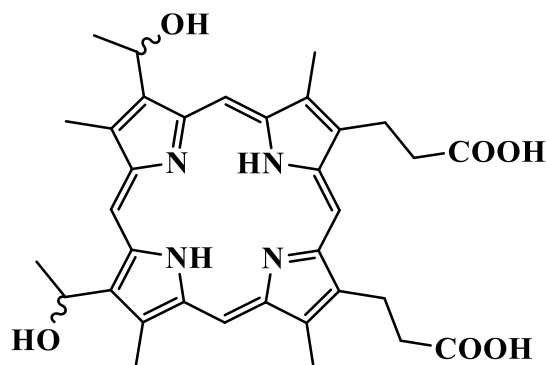
Acridine

Trois ans plus tard -en 1903- les médecins allemands Tappeiner et Jesionek traitent un cancer de la peau par l'action combinée de l'éosine et de la lumière solaire [20]. En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique » [21].



Éosine Y

En 1908, Haussmann a montré que des souris deviennent photosensibles après une injection d'hématoporphyrine (un dérivé de l'hème) suivie d'une exposition à la lumière, et que cette sensibilité est fonction de la quantité de photosensibilisateur et de lumière [22].



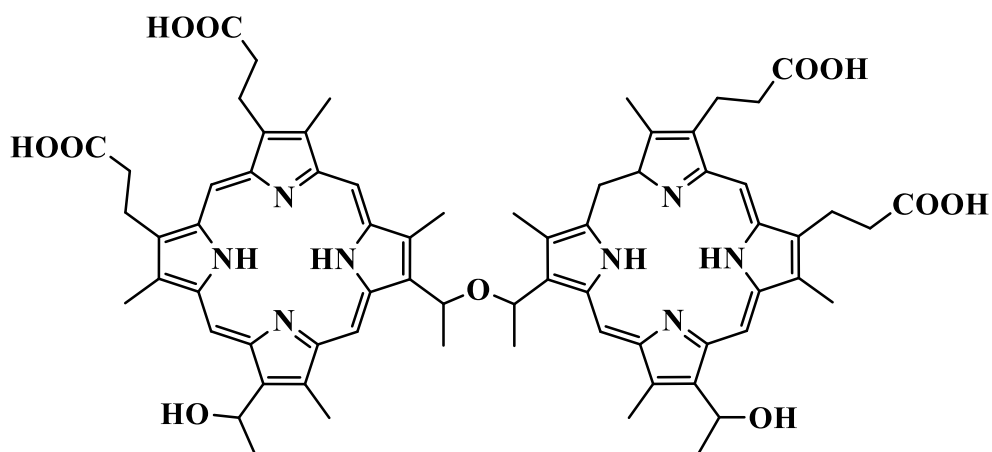
Hématoporphyrine (Hp)

Cinq ans plus tard, Meyer-Betz a réalisé le premier essai de ce produit sur l'Homme, en s'injectant lui-même 200 mg d'hématoporphyrine. Seulement après exposition à la lumière du soleil, il a observé une photosensibilisation qui s'est traduite par une hyperpigmentation de la peau et un œdème généralisé, dont il souffrira pendant deux mois [23].

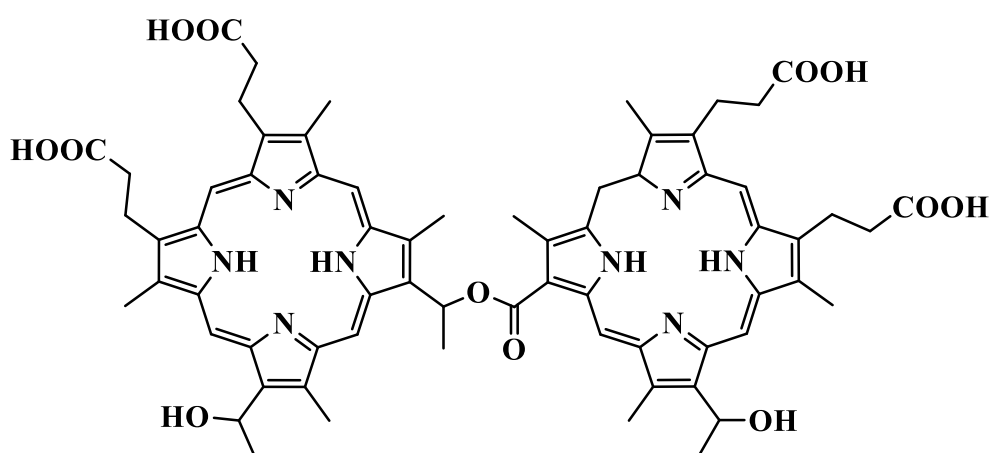
En 1924, Policard a mis en évidence la fluorescence spontanée de tumeurs exposées à la lumière ultraviolette, phénomène interprété comme étant dû à l'accumulation de l'Hp endogène (biosynthétisée par le corps) dans les cellules tumorales [24]. L'accumulation préférentielle de l'Hp dans les tissus tumoraux a été décrite pour la première fois par Auler et Banzer en 1942 sur un modèle tumoral de rat [25]. En 1948, Figge a confirmé cette affinité en utilisant la fluorescence intrinsèque de l'Hp, et a suggéré la possibilité de l'utiliser pour localiser les zones tumorales chez l'homme [26].

En 1955, une série d'expériences réalisées par Schwartz prouve que l'hématoporphyrine commerciale n'est pas un produit pur. Il constate que le produit pur qu'il a isolé est moins sélectif au niveau tumoral que le produit commercial [27]. En 1961, Lipson propose de purifier l'Hp par action d'un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique suivi d'une hydrolyse alcaline. Le produit obtenu, appelé Hematoporphyrin Derivative (HpD) sera utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs cancéreuses du poumon [28].

Au cours des années soixante-dix, la photothérapie dynamique a connu un véritable progrès, à la fois au niveau expérimental et au niveau clinique, grâce aux travaux de Thomas Dougherty. En effet, en 1975, il démontre l'éradication totale de tumeurs mammaires implantées chez la souris par l'action de l'HpD et de la lumière rouge d'une lampe à Xénon [29]. Puis en 1978, il réalise les premiers essais cliniques chez l'Homme qui donnent des résultats encourageants [30]. Parallèlement à ces travaux, Weishaupt montre que la photocytotoxicité de l'HpD est due à la production intracellulaire d'oxygène singulet après absorption de l'énergie lumineuse [31]. Entre 1983 et 1985, Dougherty remplace la lampe à arc par un laser permettant une plus grande pénétration de la lumière dans les tissus. Il identifie également la fraction active de l'HpD responsable des propriétés photosensibilisantes de ce mélange complexe. Il s'agit de l'éther ou l'ester de dihématoporphyrine (DHE) [32] (figure 5). Cette fraction active est commercialisée sous l'appellation de Photofrin® et est actuellement utilisée en clinique. Elle reçoit l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1996 en France, pour le traitement des cancers du poumon et de l'œsophage [18, 33].



Dihématoporphyrine éther



Dihématoporphyrine ester

Figure 5: Dihématoporphyrine ester et éther.

III. Mécanisme photochimique

L'activité photodynamique est basée sur l'interaction entre la lumière d'excitation et le photosensibilisateur, et les différents processus photophysiques et photochimiques qui en résultent. Ces processus sont schématisés par le diagramme de Jablonski (figure 6).

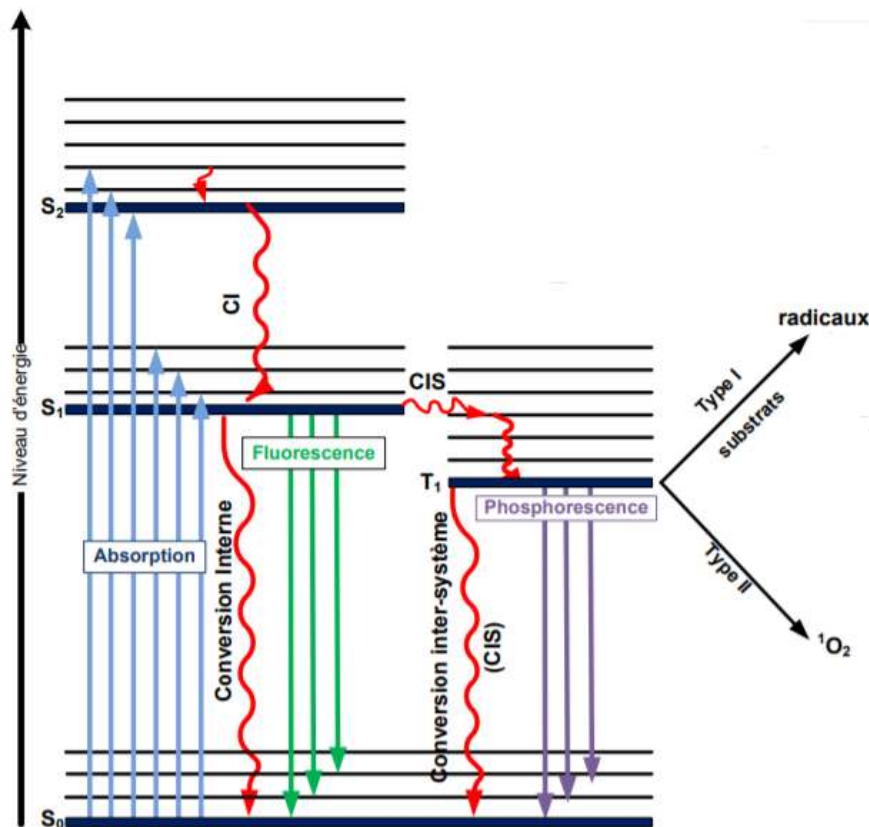


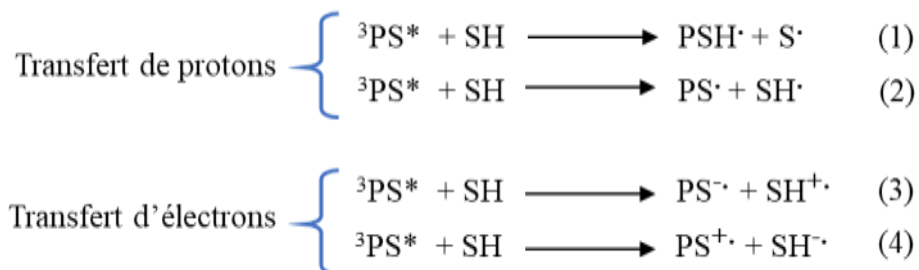
Figure 6 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique

Le photosensibilisateur est initialement dans son état fondamental, qui est un état singulet (S_0). À cet état, l'absorption de l'énergie d'un photon provenant d'une source de lumière de longueur d'onde appropriée le fait passer à un état électronique excité ($S_1, S_2, S_3 \dots S_n$). La durée de vie de l'état excité étant courte, le PS revient à son état électronique excité de plus bas niveau d'énergie S_1 , par un processus de conversion interne (CI) comme des relaxations vibrationnelles. À partir de cet état S_1 (de courte durée de vie de quelques nanosecondes), le retour à l'état fondamental S_0 peut s'effectuer par plusieurs voies : par relaxation non radiative (CI), par relaxation radiative conduisant à l'émission d'un photon (fluorescence), ou par passage à l'état excité triplet T_1 par conversion intersystème (CIS). Cette dernière voie de désexcitation est une transition non radiative théoriquement interdite, car elle se fait entre deux niveaux vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicités différentes. De ce fait, elle nécessite que le PS à l'état singulet S_1 ait une durée de vie suffisamment longue (ce qui est le cas de la majorité des PS) afin d'augmenter la probabilité d'inversion de spin électronique. À ce stade, le retour à l'état fondamental à partir de l'état triplet T_1 peut s'effectuer de façon radiative par émission de phosphorescence ou non radiative par conversion intersystème 2, notée TS. Cependant, la durée de vie de cet état triplet est relativement longue,

de l'ordre de la milliseconde (il s'agit à nouveau d'une transition dite interdite) permettant ainsi au PS de réagir avec d'autres molécules environnantes. Deux types de réactions sont possibles :

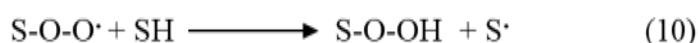
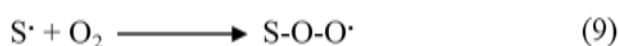
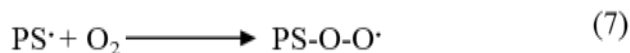
III.1. Les réactions de type I

Les réactions de type I impliquent un transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène entre le PS à l'état excité triplet ($^3\text{PS}^*$) et des substrats biologiques (SH) conduisant à la formation des radicaux et des ions radicaux selon les équations suivantes :

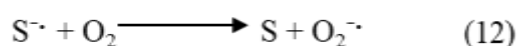
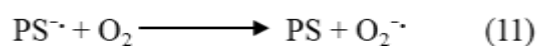


Le transfert peut se produire dans les deux sens, mais le plus souvent, le PS excité agit comme un oxydant [34].

Les radicaux libres formés peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire à l'état fondamental triplet ($^3\text{O}_2$) pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation (équation 7 à 10).

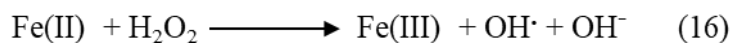
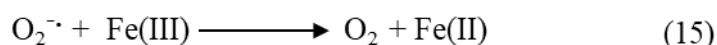
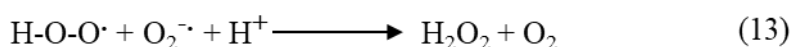
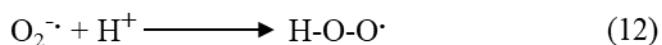


Les anions radicaux formés peuvent également réagir de manière efficace avec l'oxygène du milieu conduisant à la formation de l'anion radical superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ et la régénération du photosensibilisateur (équation 11 et 12).



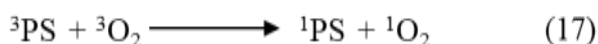
Une fois formé, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène, notamment le peroxyde

d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle OH[•]. En conditions physiologiques, H₂O₂ est produit par dismutation de O₂^{•-}, qui repose sur la protonation de O₂^{•-} pour former son acide conjugué HO₂[•] (équation 12), suivie par la réaction de HO₂[•] avec O₂^{•-} (équation 13). Le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec les anions superoxydes pour former le radical hydroxyle très réactif (avec un potentiel redox de E₀ = 1,35 V) selon la réaction de Haber Weiss (équation 14). En présence d'ions métalliques tels que le fer ou le cuivre, des radicaux hydroxyles peuvent également être produits par la réaction de Fenton [35,36] (équation 15 et 16).



III.2. Les réactions de type II

Les réactions de type II, quant à elles, reposent sur un transfert de l'énergie d'excitation depuis le photosensibilisateur à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental. Ce processus conduit à la production de l'oxygène singulet (¹O₂), et la régénération du PS dans son état fondamental singulet comme indiqué par la réaction ci-dessous.



À son état fondamental, le dioxygène est caractérisé par une multiplicité triple, car il possède deux électrons célibataires dans sa couche externe (HOMO). Ceci rend possible le transfert d'énergie entre le ³PS et ³O₂, car ils ont tous les deux des états de même multiplicité. Cependant, la réaction présentée dans l'équation (17) n'est possible que si la différence d'énergie entre l'état triplet et l'état singulet du PS est supérieure à l'énergie nécessaire à l'oxygène pour passer à l'état singulet, soit 94 kJ/mol [37].

L'oxygène singulet ¹O₂, possède une durée de vie très courte et dépendante du solvant : elle varie d'environ 4 μsec dans l'eau et 25 à 100 μsec dans des milieux organiques non polaires, qui sont des modèles pour les régions lipidiques de la cellule [38]. Cependant, il est extrêmement réactif et peut réagir avec un grand nombre de substrats cellulaires, tels que les protéines, les acides gras membranaires, et les nucléosides. Il peut également réagir avec le PS

et le dégrader en photoproduits qui, eux-mêmes, peuvent être cytotoxiques. Ce phénomène est appelé photoblanchiment [39,40]. De plus, l'oxygène singulet peut revenir à son état fondamental par émission de luminescence (onde située à 1270 nm). Du fait de sa courte durée de vie, et sa faible constante de diffusion dans les cellules ($1,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) [41], la réactivité de l'oxygène singulet est délimitée par un rayon de 30 nm autour de son point de production [42]. Par conséquent, l'activité photodynamique dépendra de la localisation intracellulaire du PS.

La compétition entre les deux types de réactions dépend de plusieurs paramètres, les plus importants étant la nature du photosensibilisateur utilisé et la concentration en oxygène. Pour la plupart des PS utilisés dans la PDT, les réactions photochimiques de type II sont prédominantes. Enfin, les ROS produits (oxygène singulet et espèces radicalaires) vont induire l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, ce qui va entraîner la mort de la cellule.

IV. Les mécanismes de destruction tumorale après thérapie photodynamique

Une fois générées, les espèces réactives d'oxygène vont induire la mort cellulaire de manière :

- Directe en provoquant une destruction tumorale irréversible par apoptose, nécrose ou autophagie.
- Indirecte en provoquant des dommages vasculaires et immunitaires.

Ces deux mécanismes peuvent interagir entre eux. L'importance relative de chacun pour la réponse globale de la tumeur reste à définir. Cependant, il est clair que la combinaison de tous ces mécanismes est nécessaire pour un traitement optimal à long terme des tumeurs [43].

IV.1. Les effets directs

Ils regroupent trois processus très différents : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. Le mode de mortalité cellulaire dépend du PS (concentration, propriétés physico-chimiques, localisation subcellulaire), de la concentration en oxygène, de la lumière appliquée et du type de tumeur [44].

- La nécrose est une mort cellulaire non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. Elle se traduit par le gonflement du cytoplasme, la dégradation de la membrane plasmique et la libération du contenu cellulaire entraînant une réaction inflammatoire [45].

- L'apoptose ou mort cellulaire programmée de type I est la voie de mort prédominante lors d'un traitement par PDT [46]. C'est un processus physiologique par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Elle est génétiquement programmée et est en équilibre avec la prolifération cellulaire. Lorsqu'une cellule entre en apoptose, elle se rétracte et se fragmente en corps apoptotiques, vésicules membranaires contenant le cytoplasme et les organites dégradés. Les corps apoptotiques formés sont ensuite éliminés par les macrophages qui sont des cellules du système immunitaire chargées de l'élimination des déchets dans les tissus. La formation de vésicules apoptotiques avec membrane plasmique prévient le relargage du contenu de la cellule dans le milieu environnant et empêche ainsi toute réaction inflammatoire. L'apoptose est gouvernée par deux voies principales : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque mitochondriale [47].
- L'autophagie, appelée également mort cellulaire programmée de type II est un processus d'autodigestion caractérisé par la formation de vacuoles autophagiques à double membrane appelée autophagosomes. La fusion de ces dernières avec les lysosomes forme des autophagolysosomes dont le contenu est dégradé par les enzymes lysosomales. L'autophagie a de nombreuses fonctions physiologiques. Elle peut avoir un rôle cytoprotecteur ou promoteur de la mort cellulaire. En PDT, l'autophagie peut être indépendante de l'apoptose, l'inhiber ou être nécessaire à son induction [48,49,50].

En raison de la propagation limitée et la courte durée de vie de l'oxygène singulet, c'est la localisation subcellulaire du PS qui déterminera le site de l'activité photodynamique et éventuellement le mode de mort cellulaire. Des études menées par Manoto et al. [51] montrent que les PS à localisation membranaire sont susceptibles d'induire une mort cellulaire par nécrose, tandis que les PS qui se localisent dans les lysosomes, l'appareil de Golgi et les mitochondries favorisent l'apoptose. De plus, une forte concentration du photosensibilisateur, ou encore une dose élevée de lumière sont des facteurs qui favorisent la nécrose. En revanche, un traitement PDT à faible dose induit une mort cellulaire apoptotique [52].

IV.2. Les effets indirects

La PDT peut agir indirectement sur la tumeur en influençant son environnement. Cela est suggéré par l'altération de la vascularisation tumorale et l'induction d'une réponse immunitaire et inflammatoire.

- Effets anti-vasculaires

Le flux sanguin est le moyen d'apporter aux tumeurs l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur survie. La PDT peut induire une destruction du réseau vasculaire qui alimente la tumeur, et ainsi l'éradication de la tumeur par ischémie [53]. L'effet anti-vasculaire commence par une altération des cellules endothéliales conduisant à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin et hémorragie [54,55].

- Réponse immunitaire et inflammatoire

En plus de l'effet cellulaire direct et l'effet anti-vasculaire, la PDT engendre des effets pro-inflammatoires capables d'induire une réponse immunitaire antitumorale à long terme [56]. En effet, l'altération des membranes cellulaires par la PDT provoque une réaction inflammatoire locale. Cette dernière s'accompagne d'un afflux de cellules immunitaires innées, dont certaines participeront à l'activation de l'immunité adaptative par la présentation d'antigènes tumoraux [57,58].

V. Les photosensibilisateurs

En plus de la lumière et l'oxygène, l'un des trois éléments essentiels de la PDT est les photosensibilisateurs. Ce sont des substances capables d'être excitées par irradiation lumineuse et de transférer leur énergie à un composé accepteur. Il existe des centaines de photosensibilisateurs pouvant être utilisés en PDT. Ils sont classés en deux grandes catégories : les PS tétrapyrroliques et les PS non tétrapyrroliques. Les photosensibilisateurs les plus utilisés en PDT anticancéreuse sont des molécules tétrapyrroliques, principalement des porphyrines, chlorines, bactériochlorine ou phtalocyanines.

V.1. Structure des porphyrines, chlorines et bactériochlorines

Les porphyrines sont des molécules aromatiques dérivées de la porphine (figure 7). Cette dernière est un macrocycle composé de quatre unités pyrroles, liées par des ponts méthines entre les positions α de chaque pyrrole. Le squelette de base de ces composés est constitué d'un système conjugué aromatique à 18 électrons π . Cette conjugaison est à l'origine de la stabilité et la forte coloration de ces molécules.

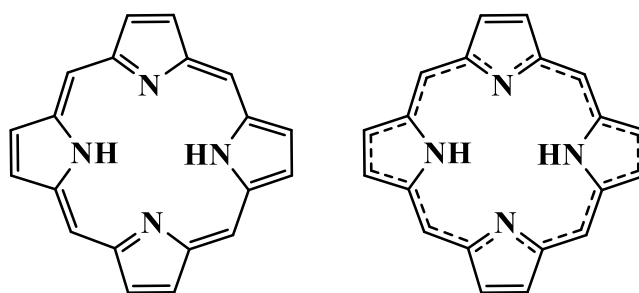


Figure 7: Structure de la porphine (à gauche), représentation du système de 18 électrons π aromatiques (à droite). En fonction du pH, ces macrocycles se comportent comme des diacides ou des dibases. De plus, la présence de quatre azotes à l'intérieur du macrocycle leur confère un caractère chélate : elles peuvent être métallées par presque tous les métaux (figure 8).

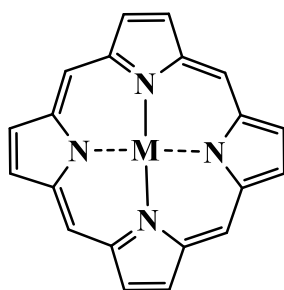


Figure 8: Porphyrine métallée.

Le noyau porphyrinique est caractérisé par trois types d'atomes de carbone numérotés selon la nomenclature de l'IUPAC [59] de 1 à 20 : les carbones α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 et 19), les carbones β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 et 18) et les positions *méso* (5, 10, 15 et 20). Les atomes d'azote centraux portent les numéros 21, 22, 23 et 24 (figure 9).

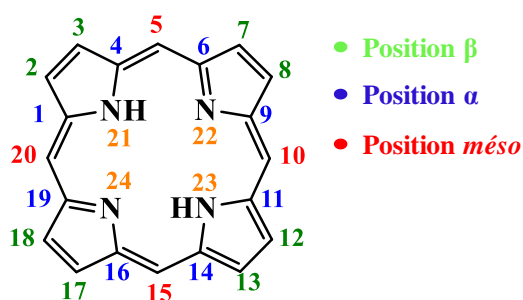


Figure 9: Nomenclature du noyau porphyrinique.

Les chlorines et les bactérochlorines sont des dérivés de la porphine. Elles ont la même structure de base que les porphyrines, cependant elles se distinguent par la réduction d'une ou deux doubles liaisons respectivement. La bactérochlorine peut aussi se trouver sous la forme d'isobactérochlorine selon l'emplacement relatif des deux doubles liaisons réduites (figure 10).

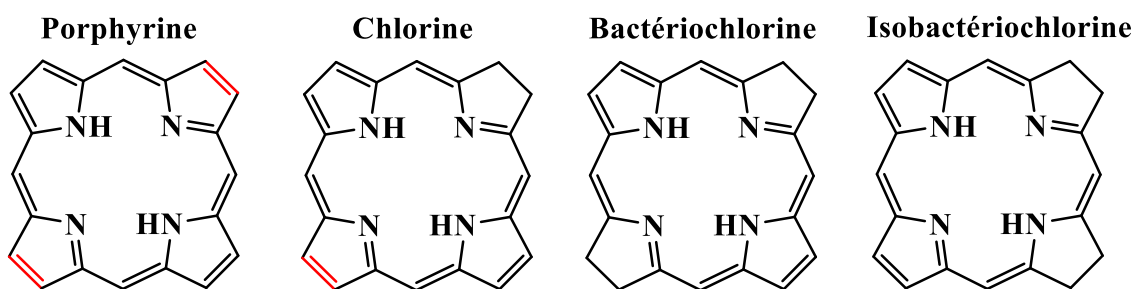


Figure 10: Différences entre une porphyrine, une chlorine, une bactérochlorine et une isobactérochlorine.

Les macrocycles tétrapyrroliques sont très représentés dans les milieux vivants. Nous pouvons citer comme exemple l'hème de l'hémoglobine, une protéine dont le groupe prosthétique est une porphyrine métallée avec le Fer. Ces pigments sont présents également dans le monde végétal. Le plus connu est la chlorophylle qui est une chlorine métallée au magnésium. Ces molécules assurent des fonctions physiologiques fondamentales : photosynthèse pour les plantes, transport de l'oxygène dans le sang pour les animaux et l'homme, et bien d'autres fonctions. De plus, le macrocycle tétrapyrrolique possède 12 positions fonctionnalisables (8 positions β -pyrroliques et 4 positions *méso*) et un cœur coordinant faisant de lui une entité intéressante à partir de laquelle d'autres molécules d'intérêt sont conçues et utilisées dans plusieurs domaines comme la catalyse chimique, l'optoélectronique moléculaire (le domaine des capteurs), ou le domaine médical.

V.2. Les méthodes de synthèse des porphyrines

Comme nous l'avons mentionné précédemment les porphyrines sont des molécules connues depuis le début du XXème siècle, dès lors, l'intérêt pour ces macrocycles ne cesse d'augmenter et de nombreuses méthodes de synthèse donnant accès aux porphyrines ont été développées. Deux grands types de porphyrines ont été développés : les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, qui s'apparentent aux porphyrines naturelles et des porphyrines substituées sur les positions *méso*. Dans ce paragraphe, nous détaillerons plus particulièrement les méthodes de préparations de *méso*-arylporphyrines.

La première synthèse de porphyrine a été décrite en 1935 par Rothemund [60]. Il a obtenu la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement de 5% en faisant réagir un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde avec la pyridine dans un réacteur scellé et chauffé à haute température (figure 11).

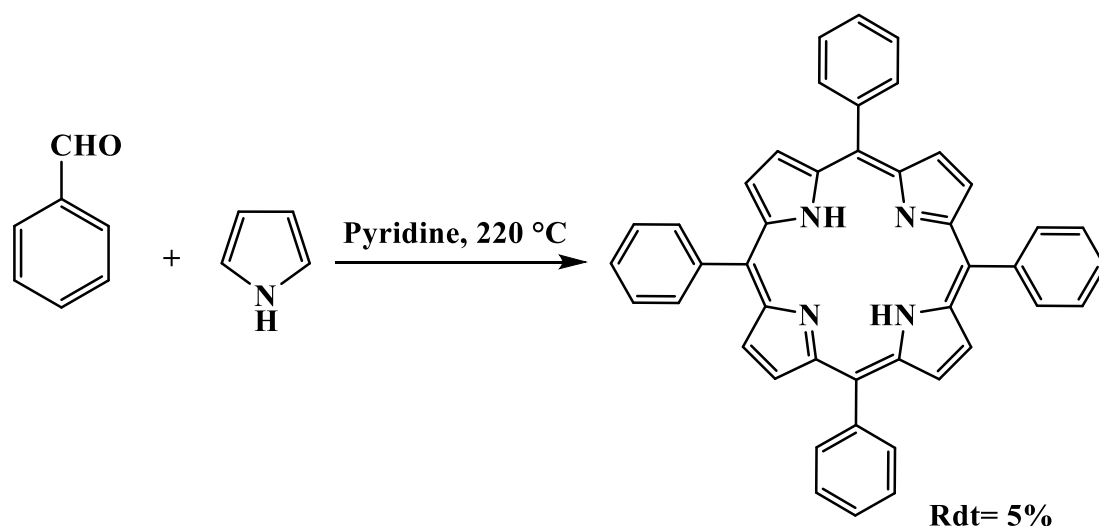


Figure 11: Méthode de Rothemund appliquée à la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine.

En 1967, Adler et Longo [61] ont amélioré significativement la méthode précédente. En effet, en condensant le benzaldéhyde et le pyrrole dans l'acide propionique à reflux dans un réacteur ouvert à l'air libre, ils obtiennent la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20%. Du fait de ces conditions plus douces, la méthode de Adler et Longo a permis d'utiliser un large éventail d'aldéhydes, et par conséquent, la synthèse d'une grande variété de *méso*-tétraarylporphyrines symétriques.

Les *méso*-arylporphyrines non symétriques ont été synthétisées par Little [62] dans les années 1975. En se basant sur le travail d'Alder-Longo, Little a formé un mélange de *méso*-porphyrines substituées par un, deux, trois et quatre groupements identiques, en condensant deux aldéhydes différents avec du pyrrole sous reflux dans l'acide propionique (figure 12).

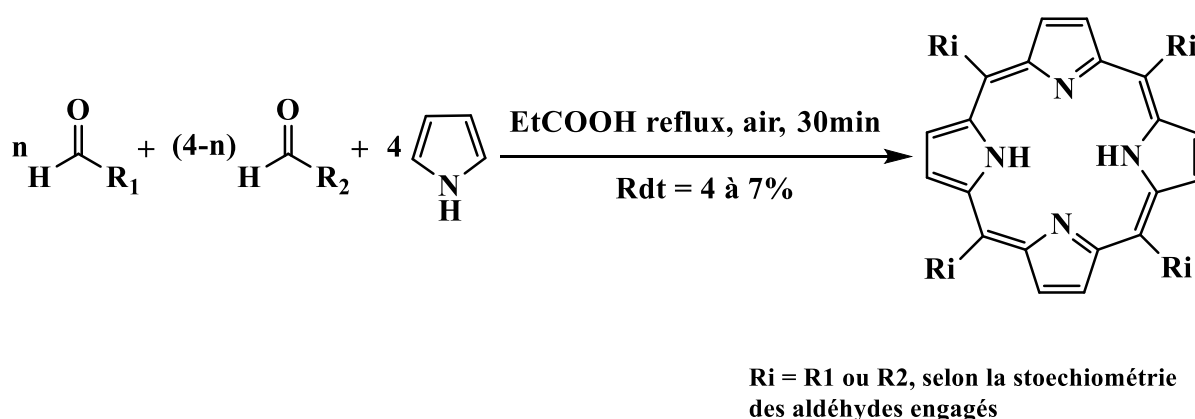


Figure 12: Méthode des aldéhydes mixtes.

Selon cette méthode, appelée également la méthode des aldéhydes mixtes, la formation préférentielle d'une *méso*-porphyrine non symétrique est contrôlée par les quantités

stoechiométriques de réactifs employés. Par exemple, la condensation sur le pyrrole de deux aldéhydes A et B dans les proportions 3 :1 conduit à la formation de six *méso*-porphyrines :

- La porphyrine A₄ : formée à partir de quatre molécules de A,
- La porphyrine A₃B : formée à partir de trois molécules de A et une molécule de B,
- La porphyrine A₂B₂ : les deux isomères *cis* et *trans* sont obtenus, et formés de deux unités de A et deux unités de B,
- La porphyrine AB₃ : formée d'une unité de A et trois unités de B,
- Et enfin, la porphyrine B₄ formée de quatre unités de B.

Les rendements de réaction obtenus par cette méthode restent modestes (4 à 7 %) et s'expliquent par la formation concomitante des autres *méso*-porphyrines substituées et, surtout, par les réactions de polymérisation du pyrrole au cours de toutes ces synthèses. Néanmoins, la méthode de Little reste la plus utilisée pour la préparation des *méso*-porphyrines mono-substituées qui peuvent être facilement isolées par cristallisation.

En 1985, Gonsalves et coll. [63] ont montré qu'un mélange de pyrrole et d'alkylaldéhyde en présence d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique conduisait à un porphyrinogène (un cycle tétrapyrrolique non conjugué) pouvant être oxydé en *méso*-tétraalkylporphyrine avec un bon rendement. En s'inspirant de cette méthode, Lindsey [64] a synthétisé un grand nombre de *méso*-tétraarylporphyrines. Il a mis en place un protocole en deux étapes, la première consiste à former le porphyrinogène par condensation, en milieu anhydre, du benzaldéhyde sur le pyrrole en présence d'une quantité catalytique d'acide de Lewis (acide trifluoroacétique ou de l'étherate de BF₃). La deuxième étape est l'oxydation du porphyrinogène en porphyrine avec le *para*-chloranil ou le dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ). Il a ainsi obtenu la tétraphénylporphyrine avec un rendement de 46% (figure 13).

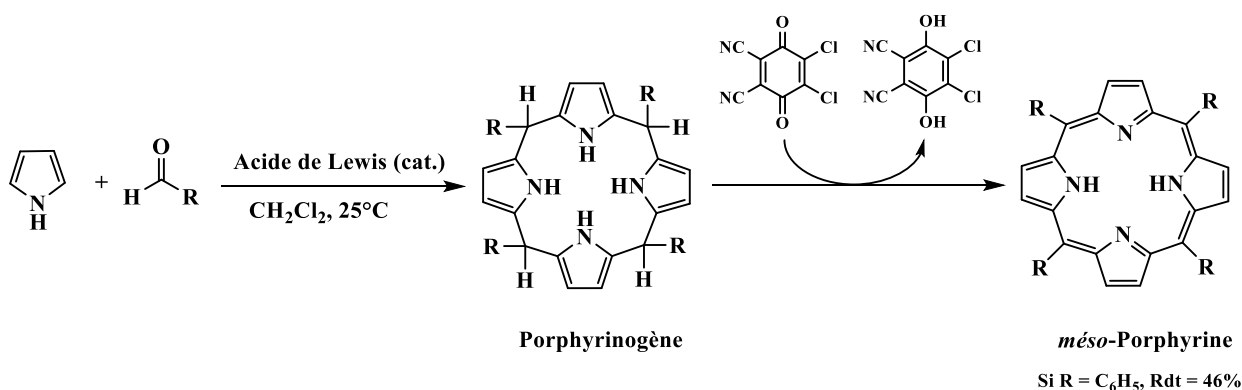


Figure 13: Méthode de Lindsey.

Les rendements de cette méthode peuvent varier selon les conditions réactionnelles et l'aldéhyde utilisé. En effet, les rendements optimaux ont été obtenus en milieu dilué (10^{-2} M) et en utilisant des benzaldéhydes moins encombrés. Cette méthode a ensuite été adaptée à la synthèse de *méso*-arylporphyrines non symétriques par Lindsey [65] et Momenteau [66]. Pour cela, ils ont augmenté la dilution des réactifs (10^{-3} M) et la durée de la réaction.

Une autre approche permettant de préparer des porphyrines avec différents substituants en *méso* consiste à utiliser comme précurseur le dipyrrométhane au lieu du pyrrole. On parle dans ce cas de condensation [2+2] de MacDonald [67], qui dans un premier temps conduit à la formation d'un porphyrinogène qui est, dans un second temps, oxydé par une quinone (figure 14). Cette stratégie a été très largement étudiée et appliquée à la synthèse de *méso*-porphyrines *trans* disubstituées.

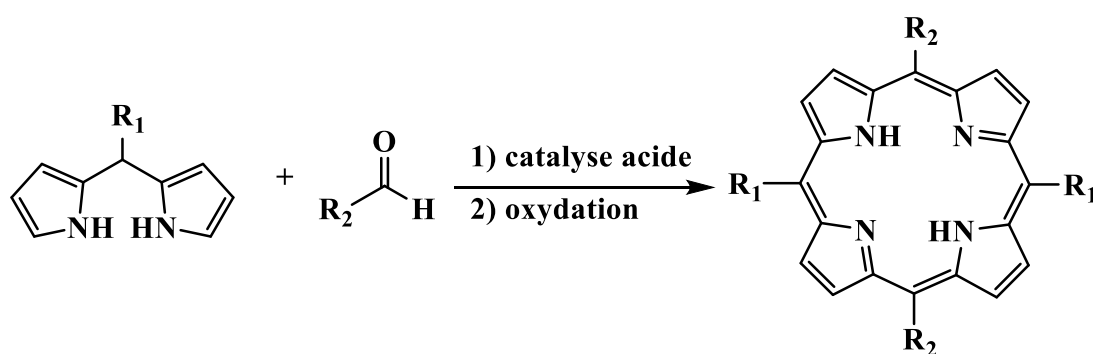


Figure 14: Condensation [2+2] de MacDonald.

V.3. Les propriétés photophysiques

Le terme porphyrine provient du grec « porphura » qui signifie violet (pourpre). Les porphyrines sont nommées ainsi par référence à leur coloration intense. Du fait de leur forte conjugaison, ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Il comporte une bande très intense située entre 390 et 420 nm (proche ultraviolet) appelée bande de Soret ou bande B et quatre bandes sur la plage 480-700 nm (visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées bandes Q. Ces dernières sont numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses. L'intensité des bandes Q varie en fonction de la nature et de la position des substituants du macrocycle. Lorsque la porphyrine est métallée le nombre de bandes Q passe de 4 à 2 en raison d'une augmentation de la symétrie en comparaison avec les porphyrines base libre (figure 15).

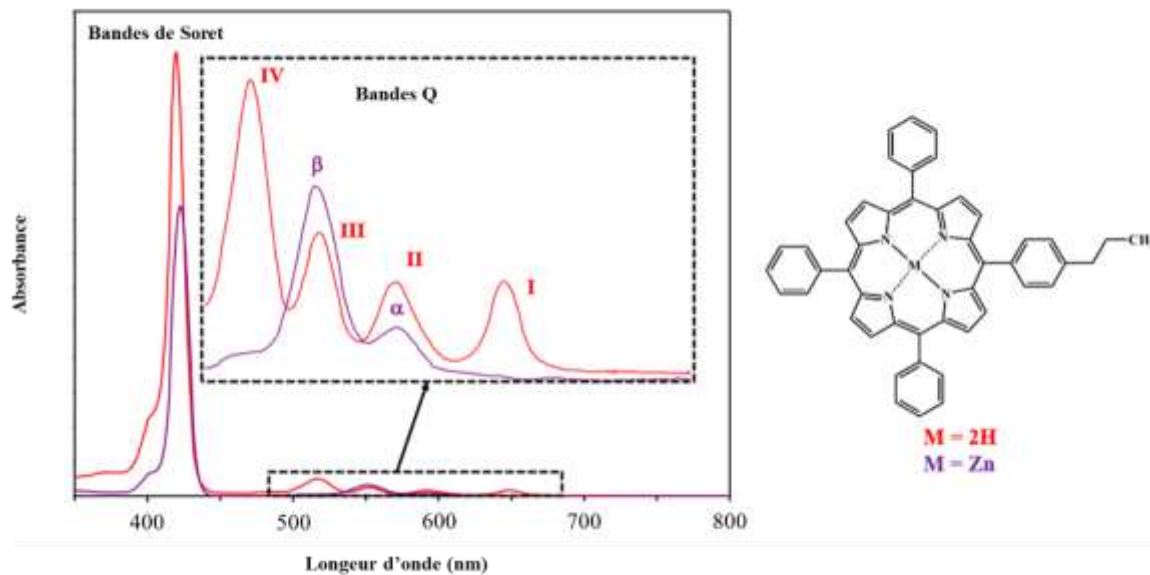


Figure 15: Spectres d'absorbance d'une porphyrine base libre (rouge) et d'une métalloporphyrine (violet) [68].

La réduction des porphyrines entraîne des changements dans le spectre d'absorption de cette molécule, notamment au niveau des bandes Q. En effet, pour les chlorines la bande QI est décalée vers le rouge et se situe entre 650 et 700 nm. De plus, elle est 10 fois plus intense que pour les porphyrines. Il en est de même pour les bactériochlorines qui présentent une bande QI intense se situant entre 750 et 800 nm (figure 16).

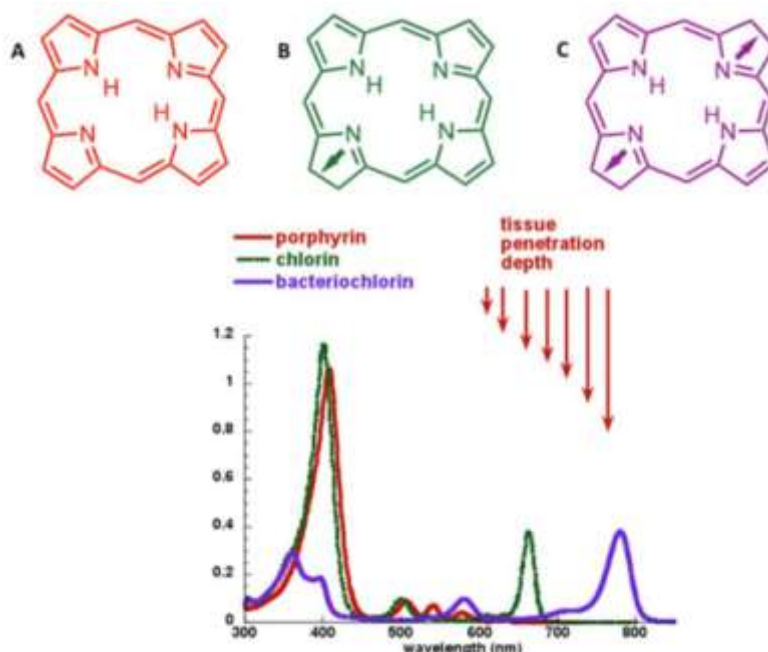


Figure 16: Spectres d'absorption des photosensibilisateurs tétrapyrroliques [69].

Ces molécules présentent une forte absorption dans le rouge recouvrant la région de pénétration maximale de la lumière dans les tissus, ce qui en fait des bons candidats pour les applications en photothérapie dynamique.

V.4. Biodistribution et pharmacocinétique des photosensibilisateurs

Après son administration intraveineuse, le devenir du PS dépend de ses propriétés intrinsèques. Dans un premier temps, le PS est réparti entre les différents constituants du sang. Cela implique l'association du PS avec les protéines de transport du plasma, en particulier l'albumine et les lipoprotéines, et les cellules sanguines circulantes. Ensuite, le PS va se lier aux parois des vaisseaux sanguins. Cette étape est gouvernée par les caractéristiques des vaisseaux sanguins qui sont différentes selon les organes. À partir de là, le PS peut diffuser dans le milieu extracellulaire du tissu ou de l'organe ciblé, et pénétrer dans les cellules tumorales [70]. La localisation intracellulaire du photosensibilisateur dépend de plusieurs facteurs, notamment son hydrophobicité/hydrophilie, ainsi que la charge et l'asymétrie de sa structure [71]. Les PS relativement hydrophiles, possédant des sites chargés ou polaires, sont trop polaires pour diffuser dans les membranes biologiques et sont internalisés par endocytose. En revanche, les PS hydrophobes portant peu ou pas de groupements polaires peuvent diffuser à travers les membranes plasmiques et se distribuer librement dans les membranes des différents organites cellulaires [70]. Enfin, le PS est éliminé de l'organisme par excrétion. Ce processus est principalement réalisé par la voie urinaire et/ou la voie biliaire.

La sélectivité et la rétention tumorale des PS sont favorisées par deux caractéristiques des tissus tumoraux [72]. La première concerne la surexpression des récepteurs aux lipoprotéines de basse-densité (LDL, « Low Density Lipoproteins ») au niveau des cellules tumorales. En effet, le catabolisme accru du cholestérol au sein des tissus en prolifération conduit à une surexpression des récepteurs LDL [73]. Du fait de leur composition lipidique, ces molécules sont de bons transporteurs de molécules hydrophobes. Elles ont pour rôle de fournir aux tissus le cholestérol nécessaire pour créer les membranes lors de la division cellulaire. Ainsi, les LDL peuvent assurer l'acheminement des PS hydrophobes vers les tissus néoplasiques [74].

La seconde caractéristique qui favorise la rétention tumorale des PS est la diminution du pH dans le microenvironnement tumoral. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. De ce fait, le glucose est métabolisé partiellement par une voie anaérobie avec formation d'acide lactique qui est rejeté par les cellules. Ainsi, le liquide interstitiel des tumeurs est plus acide que celui des tissus

normaux [75]. Ce pH acide peut modifier les propriétés physico-chimiques des PS, en particulier leur charge, et ainsi faciliter leur incorporation par les cellules cancéreuses [76]. Par exemple, la protonation des groupes acides carboxylique de l'hématoporphyrine augmente son caractère lipophile favorisant son incorporation dans les cellules tumorales par simple diffusion à travers la membrane plasmique [75]. De plus, la répartition des PS entre l'albumine et les LDL dépend du pH. Il a été montré que l'environnement tumoral acide favorise l'association des PS avec les LDL, propice à la sélectivité et à l'accumulation tumorale du PS [77].

V.5. Photosensibilisateur idéal

Un photosensibilisateur idéal devra posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques suivantes [78] (figure 17) :

- Pur chimiquement, ou s'il s'agit d'un mélange, il doit être bien défini,
- non toxique à l'obscurité,
- Une grande sélective vis-à-vis des cellules cancéreuses,
- Une forte absorption dans la région du rouge du spectre de la lumière visible, entre 600 et 800 nm (fenêtre thérapeutique), pour permettre une pénétration tissulaire maximale et une absorption de lumière optimale. L'absorption de la lumière à une longueur d'onde supérieure à 800 nm ne fournit pas assez d'énergie pour exciter le PS. De plus, les bandes d'absorption du PS ne doivent pas chevaucher celles d'autres substances présentes dans le corps, par exemple l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine et l'eau.

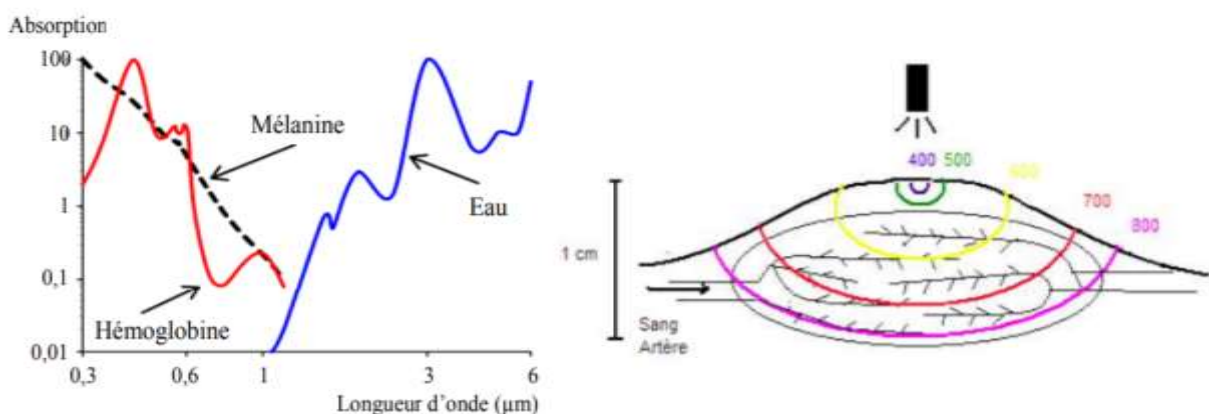


Figure 17: Spectres d'absorption des principales molécules biologiques (à gauche) et la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus humains en fonction de la longueur d'onde (à droite).

- Une durée de vie à l'état triplet suffisamment longue, et un rendement quantique en oxygène singulet élevé,
- Une clairance rapide pour éviter les problèmes de photosensibilisation après traitement,
- Une solubilité dans les milieux physiologiques,
- Une synthèse peu coûteuse et simple.

V.6. Les diverses générations de photosensibilisateurs

V.6.1. Les photosensibilisateurs de 1^{ère} génération

La première génération regroupe l'hématoporphyrine (Hp) et ses dérivés. Historiquement, l'hématoporphyrine dérivée (HpD) est le premier PS à avoir été utilisée en clinique humaine. Ces molécules ne sont pas pures chimiquement. Elles contiennent un mélange complexe de plusieurs oligomères d'hématoporphyrine, d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine ou encore de protoporphyrine, liés par des ponts éthers, esters ou carbone-carbone. La purification partielle de l'HpD, par chromatographie, a permis d'isoler uniquement la fraction qui présente une activité antitumorale. Cette fraction est identifiée comme étant constituée de dimères et trimères d'hématoporphyrine (DHE) éther ou ester.

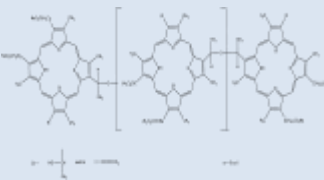
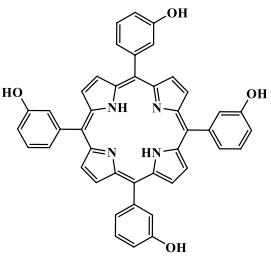
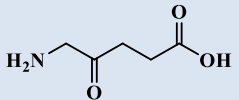
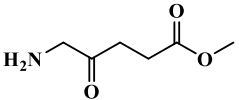
Ce produit a été le premier PS à obtenir l'autorisation de mise sur le marché en PDT anticancéreuse, et est commercialisé sous la dénomination de Photofrin®. Connue également sous le nom de porfimère sodique ou dihématoporphyrine éther, le Photofrin® a été le PS le plus utilisé en clinique. Il a prouvé une photocytotoxicité efficace pour le traitement de nombreux cancers solides, tels que les cancers cutanés, du poumon, de l'œsophage et de la vessie. Cependant, ce photosensibilisateur a été retiré du marché en 2012, car il présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ce composé n'est pas pur, et est composé d'un mélange complexe de porphyrine mal défini et difficile à reproduire. Le Photofrin® présente également une faible absorbance dans le rouge, ce qui limite son utilisation aux tumeurs superficielles. De plus, son manque de sélectivité pour les cellules cancéreuses, associée à une faible clairance, entraîne une photosensibilisation cutanée des patients après traitement.

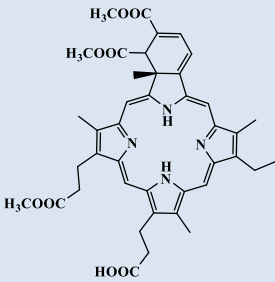
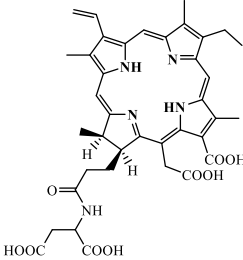
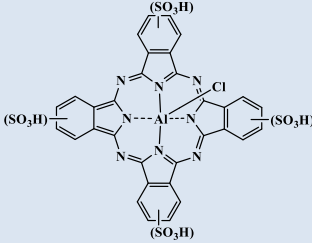
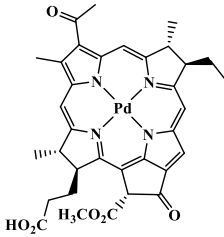
Afin de pallier les inconvénients des photosensibilisateurs de première génération, et se rapprocher le plus possible des caractéristiques du PS idéal, des nouveaux PS, dits de 2^{ème} génération, ont été développés.

V.6.2. Les photosensibilisateurs de 2^{ème} génération

Ce sont des composés purs, de structure chimique bien définie. La plupart sont activés par des longueurs d'onde entre 600 et 800 nm, et possèdent un rendement quantique en oxygène singulet élevé. De plus, ces molécules sont plus rapidement éliminées de l'organisme, limitant la période de photosensibilisation cutanée. Ces PS sont principalement des dérivés de porphyrine, chlorine ou phtalocyanine. Les principaux PS utilisés en PDT ayant obtenu une AMM [79] sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Liste des photosensibilisateurs ayant obtenu une AMM.

Photosensibilisateur	Nom commercial	Structure chimique	λ exc (nm)	Cancers traités
Porfimère sodique	Photofrin®		632	Canada (1993) -la vessie, USA (1995) - œsophage, USA (1998) -poumon, USA (2003) -œsophage de Barrett, Japon-cerveau, Europe, Canada, Japon, USA et Royaume-Uni : cancer endobronchique
Tétra- (méta hydroxyphényl) chlorine (mTHPC) ou Témoporfine	Foscan®		652	Europe (2001) -Cancers de la tête et du cou
Acide 5-amino-lévulinique (5-ALA). Un précurseur de biosynthèse de la protoporphyrine IX (PpIX)	Levulan®		632	USA (1999) -Kératose actinique
Méthyl aminolevulinate	Metvixia®		635	USA (2004) -Kératose actinique

Dérivé monoacide de la benzoporphyrine / Verteporfin	Visudyne®		689	USA (1999) -Dégénérescence maculaire liée à l'âge
Mono-L-aspartyl chlorine e6 / Talaporfin	Laserphyrin®		664	Japan (2003) -Cancer des poumons
Phthalocyanine d'aluminium sulfonaté	Photosense®		676	Russie (2001) -Cancers de l'estomac, peau, lèvre, cavité buccale, langue et sein
Bactériophéophorbide de palladium	TOOKAD®		763	Islande, Liechtenstein, Norvège (2017) [80] Cancer de la prostate [81].

Bien qu'ils présentent de meilleures propriétés photodynamiques par rapport aux PS de première génération, les PS de 2^{ème} génération manquent encore de sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ceci a conduit à l'élaboration des PS de 3^{ème} génération, conçus pour cibler sélectivement les cellules cancéreuses, générant ainsi moins d'effets secondaires.

V.6.3. Les photosensibilisateurs de 3^{ème} génération

Les PS de 3^{ème} génération sont actuellement en voie de développement. Ils sont synthétisés à partir des PS de 2^{ème} génération de façon à améliorer leur accumulation tumorale. Deux approches sont envisageables : la première consiste à greffer sur ces derniers des molécules capables d'être reconnues spécifiquement par les cellules cancéreuses (anticorps, acide aminés,

sucres, polyamines...) visant à effectuer un ciblage actif. La deuxième approche permet grâce à un ciblage passif de transporter les PS directement vers les cellules cancéreuses en les associant avec des nanovecteurs.

VI. Stratégies de ciblages

Grâce aux progrès de la recherche scientifique et à la meilleure connaissance des mécanismes biologiques agissant sur le développement du cancer, une thérapie photodynamique dite ciblée est en voie de développement. Ce concept a pour but de surmonter les problèmes de sélectivité rencontrés avec la plupart des PS actuels. Le ciblage tumoral peut être assuré par des molécules reconnaissant des anomalies caractéristiques des cellules tumorales ou de leur environnement. Ainsi ces molécules permettent de transporter et concentrer sélectivement les PS dans leur site thérapeutique [82].

VI.1. Ciblage passif

La majorité des PS présentent une sélectivité relative envers les tissus tumoraux. Des facteurs liés à la nature de la tumeur, incluant la vascularisation perméable, le faible drainage lymphatique, le pH acide de l'environnement tumoral, ou encore l'activité proliférative accrue des cellules néoplasiques peuvent expliquer cette sélectivité. Les propriétés physico-chimiques du PS peuvent également jouer un rôle important. La charge, la taille et surtout l'hydrophobicité influencent les interactions qu'il peut y avoir entre le PS et le milieu tumoral [83]. En effet, les PS les plus hydrophiles se lient principalement aux protéines sériques telles que l'albumine et ont tendance à rester longtemps dans la circulation sanguine. En revanche, les PS hydrophobes montrent une forte accumulation tumorale due aux interactions avec les lipoprotéines basse densité (LDL). Ces molécules transportent les PS hydrophobes au sein d'agrégats et assurent leur internalisation cellulaire par endocytose par l'intermédiaire des récepteurs LDL surexprimés au niveau des cellules tumorales [84]. Par ailleurs, la lipophilie des PS peut être modifiée par le pH de l'environnement tumoral. Les tumeurs ont en général un pH nettement plus bas que les tissus normaux. Ainsi, pour des PS possédant des groupements sensibles aux variations de pH, si la lipophilie du PS augmente avec la baisse de pH son accumulation tumorale sera augmentée [85].

En plus de ces propriétés, les tumeurs solides présentent un système vasculaire complètement différent de celui des tissus normaux. L'endothélium vasculaire est discontinu et présente des fenestrations dont le diamètre varie de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, en fonction de la taille et du type de la tumeur. Cette architecture défectueuse permet

l'extravasation des macromolécules de la circulation sanguine vers le tissu tumoral (figure 18). En outre, le système vasculaire tumoral est caractérisé par un faible drainage lymphatique qui empêche l'élimination des molécules extravasées, ce qui entraîne leur accumulation dans le tissu tumoral. Matsumura et Maeda [86] ont été les premiers à montrer l'accumulation préférentielle de certaines protéines plasmatiques radiomarquées, dans le tissu tumoral à travers la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce phénomène a ensuite été nommé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) et a ouvert la voie au ciblage passif des tumeurs.

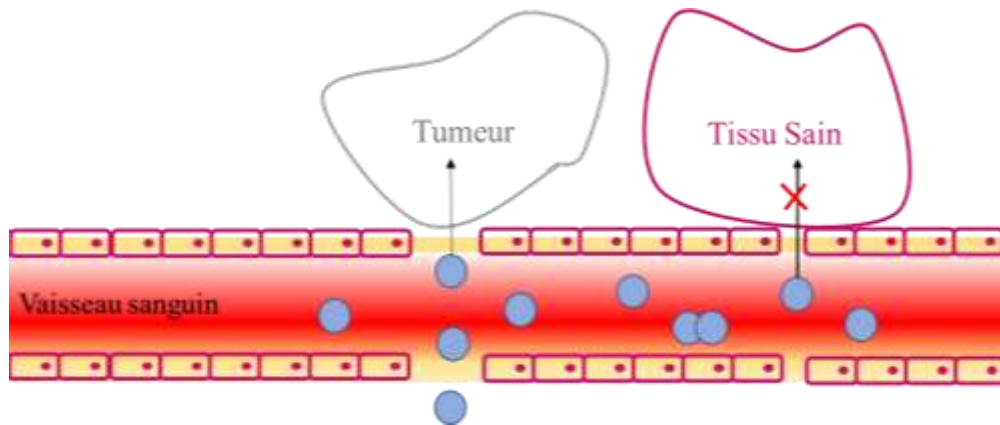


Figure 18 : Schéma illustrant l'effet EPR.

Depuis la découverte de l'effet EPR, de nombreux efforts sont déployés pour mieux comprendre et exploiter ce phénomène. L'utilisation de nanoparticules comme vecteurs de PS émerge comme étant une approche prometteuse. En utilisant des nanoparticules dont la taille correspond au diamètre des fenestrations vasculaires tumorales, il est possible de rendre les PS capables de s'accumuler sélectivement dans les tissus tumoraux. De nombreuses nanoparticules ont montré leur efficacité comme agent de vectorisation sur plusieurs modèles de cancer. Doxil® et Abraxan® représentent deux nanomatériaux utilisant le ciblage passif et ayant obtenu l'autorisation de la FDA (Food and Drug Administration). Doxil® est la formulation lyposomale PEGylée de la doxorubicine utilisée pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein [87]. Abraxane®, quant à lui, est composé de nanoparticules de paclitaxel liée à l'albumine, et indiqué dans le traitement du cancer de sein [88] et d'autres tumeurs solides [89].

En plus de l'accumulation passive, un ciblage actif des tumeurs peut être réalisé afin d'agir le plus efficacement possible sur la tumeur et limiter les effets secondaires liés à l'incorporation des PS par les tissus sains.

VI.2. Ciblage actif

Les cellules tumorales expriment un profil de récepteurs de surface différent des cellules normales. En effet, la prolifération accélérée des cellules cancéreuses entraîne une surexpression de certains récepteurs membranaires qui habituellement sont peu ou pas présents à la surface des cellules. Le ciblage actif s'appuie sur ces changements biologiques pour améliorer la sélectivité des PS vis-à-vis des cellules tumorales. L'idée est donc de greffer sur les PS des ligands ou des biomolécules capables d'être reconnus spécifiquement par des récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses (ciblage actif direct) ou sur les vaisseaux tumoraux (ciblage actif indirect). Une large gamme de ligands a été utilisée à ces fins, notamment des anticorps monoclonaux, des peptides ou protéines (transferrine), des acides nucléiques (aptamères), des polymères (acide hyaluronique), et des petites molécules telles que l'acide folique et les glucides.

VI.2.1. Ciblage actif indirect

Dans le cadre d'un ciblage actif indirect, les principales cibles angiogéniques explorées sont les récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). En effet, le stress oxydatif induit par la PDT provoque une hypoxie dans le tissu tumoral qui déclenche la libération de facteurs de croissance angiogéniques, notamment le VEGF. Ce facteur proangiogénique facilite la prolifération et la migration des cellules endothéliales, amorçant ainsi l'angiogenèse et la croissance tumorale. Le ciblage de ce facteur s'est révélé efficace pour augmenter l'efficacité de la PDT. Une étude réalisée sur un PS, 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-chlorine (CTP) couplé à un heptapeptide spécifique du récepteur du VEGF via un espaceur, l'acide 6-aminohexanoïque montre que le conjugué s'accumule 25 fois plus dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine que la CTP seule sur une période de 24h, présentant ainsi une activité photodynamique *in vitro* 10 fois supérieure à celle de la CTP seule [90].

Une autre possibilité pour cibler les vaisseaux tumoraux consiste à exploiter les intégrines $\alpha_v\beta_3$. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, est une glycoprotéine transmembranaire surexprimée dans les vaisseaux sanguins des tumeurs et dans certaines lignées de cellules cancéreuses, telles que les cellules HT-29 du cancer colorectal. Le petit tripeptide avec la séquence d'arginine-glycine-acide aspartique (RGD) présente une haute affinité pour ces récepteurs. La conjugaison d'une phtalocyanine de silicium (IV) avec deux motifs RGD augmente son accumulation tumorale

principalement par endocytose médiée par le récepteur RGD. De plus, des études *in vivo* montre que le conjugué phtalocyanine-RGD permet d'avoir 75% d'inhibition tumorale [91].

VI.2.2. Ciblage actif direct

L'utilisation d'**anticorps** est une autre approche permettant d'améliorer la sélectivité de la PDT. Cette stratégie consiste à lier le PS à des anticorps monoclonaux (MoA) dirigés contre des antigènes spécifiques des cellules malignes. Le greffage direct d'anticorps monoclonaux aux PS est facilement réalisable, mais peut diminuer l'activité du PS ou la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène. L'utilisation de bras espaceurs est recommandée pour diminuer l'encombrement stérique et pouvoir fixer plusieurs MoA sur le PS [92]. La conjugaison d'un PS et d'un anticorps a été étudiée pour la première fois par Mew *et al.* Ils ont lié directement l'hématoporphyrine à un anticorps monoclonal dirigé contre un myosarcome M1 de souris (anti M1). Ces travaux ont montré que le PS conjugué induisait sélectivement l'inhibition de la croissance tumorale à une concentration dix fois plus faible que l'hématoporphyrine seule [93]. Dès lors, plusieurs MoA ont été étudiés, et certains sont approuvés pour une utilisation clinique dans les thérapies du cancer. Nous pouvons citer comme exemple le trastuzumab et le panitumumab, dirigés respectivement contre le récepteur HER2 et HER1 du facteur de croissance épidermique (EGF). La conjugaison de ces anticorps avec une phtalocyanine IR700 a montré des résultats intéressants. Les études *in vitro* ont montré que le conjugué MoA-IR700 induisent la mort cellulaire uniquement dans les cellules qui expriment le récepteur EGF. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vivo* sur des souris xénotreffées avec des tumeurs présentant ou pas le récepteur EGF [94]. La taille importante de l'anticorps de l'ordre de 150 kDa peut entraîner des problèmes de pénétration dans les tissus tumoraux. Des molécules de cette taille peuvent stimuler le système immunitaire, et provoquer leur élimination prématurée. De ce fait, l'utilisation de fragments d'anticorps s'est avérée prometteuse en raison de leur petite taille (25 KDa) leur permettant d'avoir une meilleure diffusion et une faible immunogénicité [95].

Le ciblage par adjonction de **sucres** est basé sur le phénomène de Warburg, décrit précédemment [96]. Les cellules cancéreuses se caractérisent par une glycolyse élevée. Elles consomment de trois à vingt fois plus de glucose par rapport aux cellules normales [97]. L'incorporation du glucose est assurée par des glycoprotéines transmembranaires appelées transporteurs de glucose. Ces transporteurs sont surexprimés au niveau des cellules tumorales, pour assurer l'assimilation de grande quantité de glucose. De nombreuses études ont montré que la glycoconjugaison des PS augmente leur absorption et leur effet antitumoral [98,99,100].

L'acide folique est l'une des petites molécules de ciblage les plus étudiées pour l'administration sélective des PS. Connue également sous le nom de vitamine B9, elle joue un rôle important dans la réplication de l'ADN. C'est le précurseur essentiel de la synthèse des acides nucléiques et de certains acides aminés. De ce fait, l'acide folique est consommé en grande quantité par les cellules cancéreuses. Le récepteur de l'acide folique (FR pour folate receptor) est surexprimé dans de nombreux cancers, notamment le cancer des ovaires, du cerveau, des reins, du sein et des poumons [101]. L'équipe de Schneider et coll. a montré pour la première fois que la conjugaison de la 4-carboxyphénylporphyrine avec l'acide folique améliorait la sélectivité et l'efficacité photodynamique *in vitro*. L'étude a été réalisée sur une lignée cellulaire de cancer de l'oropharynx (KB), surexprimant les récepteurs de l'acide folique. Il a été constaté qu'après 24 h d'incubation, l'incorporation cellulaire du conjugué était en moyenne 7 fois plus élevée que celle de la tétraphénylporphyrine (TPP) utilisée comme référence [102]. Dans une seconde étude, la fonctionnalisation du pyrophéophorbide avec l'acide folique a montré des résultats intéressants sur un modèle de souris xénotransplantées avec des cellules de cancer de la bouche [103].

VII. Adressage subcellulaire

En raison de sa courte durée de vie, l'oxygène singulet ne peut pas diffuser loin de son lieu de production. L'activité phototoxique est par conséquent limitée à l'emplacement subcellulaire du PS. De ce fait, l'adressage subcellulaire est un facteur important pour augmenter l'efficacité thérapeutique des PS [104]. En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, les PS peuvent avoir plusieurs cibles subcellulaires, telles que les mitochondries, les lysosomes, la membrane plasmique, etc. [105].

La mitochondrie est une cible particulièrement prometteuse pour la PDT, car elle joue un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires, notamment l'apoptose et la production de l'énergie cellulaire [106]. Une telle variété de fonctions est couplée à une structure bien définie, qui évolue en permanence en fonction des besoins de la cellule.

VII.1. Structure des mitochondries

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques que l'on retrouve en grand nombre dans la plupart des cellules eucaryotes. Elles présentent une grande diversité de taille, de forme et de nombre en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Cependant, leur ultrastructure reste identique. Les mitochondries sont composées d'une double membrane (une externe et une membrane interne) qui délimite l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La

membrane interne présente de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales [107] (figure 19).

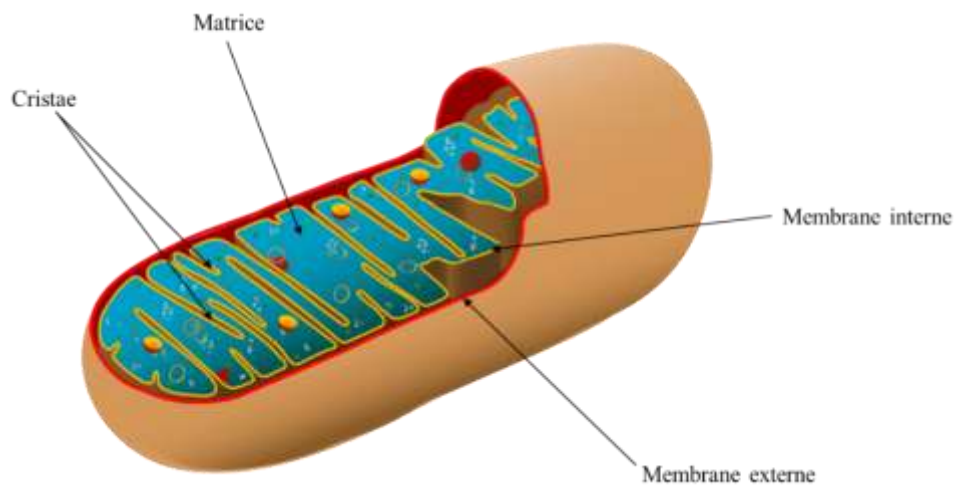


Figure 19: Représentation schématique d'une mitochondrie.

Les mitochondries sont des organites très dynamiques. Elles se déplacent dans la cellule, fusionnent et se fragmentent en permanence. C'est l'équilibre entre ces deux phénomènes qui détermine la morphologie des mitochondries. Elles apparaissent comme un réseau de filaments interconnectés quand la force de fusion prédomine, ou comme des structures individuelles isolées quand la force de fission prévaut [108].

VII.2. Les fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries jouent un rôle crucial dans de nombreux processus cellulaires. Une des principales fonctions des mitochondries est de fournir à la cellule l'énergie (ATP) dont elle a besoin pour vivre et accomplir ces différentes fonctions. En effet, l'énergie contenue dans les nutriments est transformée en ATP par des réactions de phosphorylation oxydative au niveau de la membrane interne mitochondriale. Une deuxième fonction primordiale des mitochondries est leur participation à la mort cellulaire par apoptose.

VII.2.1. Apoptose

Découverte en 1972, l'apoptose est une forme physiologique de mort cellulaire fortement régulée et indispensable à l'homéostasie cellulaire. L'apoptose peut être déclenchée soit par des signaux internes à la cellule (voie intrinsèque), soit par des signaux externes (voie extrinsèque). Les deux voies intrinsèques et extrinsèques diffèrent par le type du stimulus initiateur, mais convergent pour l'activation d'une cascade d'enzymes protéolytiques, les caspases, qui déclenchent la mort cellulaire en dégradant les substrats cellulaires.

La voie de signalisation extrinsèque est déclenchée par la liaison de ligands extracellulaires et leurs récepteurs correspondants ancrés au niveau de la membrane plasmique. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de mort. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs tumor necrosis factor (TNF), dont l'activation dépend de deux ligands majeurs : le TNF et le Fas. Lorsque les récepteurs de mort sont activés par leurs ligands, des changements conformationnels des récepteurs de mort se produisent et un tripolymère est formé. De plus, les récepteurs activés recrutent des molécules adaptatrices cytoplasmiques qui se lient ensuite aux molécules de signalisation de l'apoptose pour former un complexe DISC (death-inducing signalling complex). Le DISC conduit à l'activation de la caspase-8 qui active à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7 pour induire l'apoptose [109].

La voie intrinsèque de l'apoptose est généralement induite en réponse à un stress cellulaire. Cette voie est régulée par la famille de protéines BCL-2 présente au niveau des mitochondries. Cette famille comprend des protéines proapoptotiques comme BAX, BAK et BOK ou des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-xL, A1, MCL-1 et BCL-w. Suite à l'activation par certaines protéines, BAX et BAK oligomérisent et s'insèrent de manière stable dans la membrane mitochondriale externe entraînant ainsi sa perméabilisation et la libération de protéines intermembranaires, notamment le cytochrome c. Ce dernier va se lier avec Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor 1), l'ATP et la procaspase 9 pour former l'apoptosome responsable de l'activation des caspases 3 et 7. Ces derniers dégradent les substrats cellulaires entraînant ainsi le processus apoptotique [110].

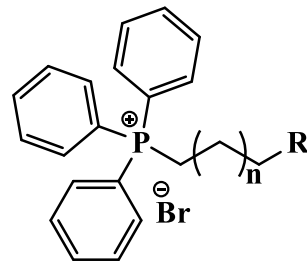
En plus de ces deux rôles majeurs, les mitochondries sont impliquées dans d'autres fonctions physiologiques telles que la signalisation calcique, la synthèse des hormones stéroïdiennes, et la défense antioxydante.

Depuis que les mitochondries ont été reconnues comme une cible pharmacologique émergente, un certain nombre de stratégies de ciblage de ces organites ont été proposées.

VII.3. Les méthodes de ciblage mitochondrial

Les stratégies courantes de ciblage des mitochondries tirent parti de la nature hydrophobe et le potentiel négatif de la membrane mitochondriale interne. Elles reposent sur l'utilisation de cations lipophiles comme agents d'adressage mitochondriaux. L'exemple le plus notable de cation lipophile utilisé pour le ciblage mitochondrial est le cation triphénylphosphonium (TPP). Cette molécule contient une seule charge positive stabilisée par trois groupes phényles. De plus,

son caractère lipophile facilite son passage à travers la bicouche lipidique de la membrane mitochondriale interne.



Cation triphénylphosphonium (TPP)

Pour atteindre la mitochondrie, l'agent d'adressage mitochondrial doit traverser à la fois la membrane plasmique et la membrane mitochondriale, qui ont toutes les deux un potentiel membranaire ($\Delta\Psi$) négatif. Ce potentiel est décrit par l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi \text{ (mV)} = 61,5 \times \log_{10} (C_{in} / C_{out})$$

L'accumulation sélective de cations TPP dans la mitochondrie est favorisée par le potentiel négatif de la membrane plasmique et mitochondriale. En effet, le potentiel membranaire plasmatique de -30 à -60 mV entraîne une augmentation de 5 à 10 fois la concentration du cation dans le cytoplasme par rapport au milieu extracellulaire. Le potentiel de la membrane mitochondriale de -150 à -180 mV augmente encore la concentration du cation lipophile dans la matrice mitochondriale d'un facteur de 100 à 500 [111] (figure 20).

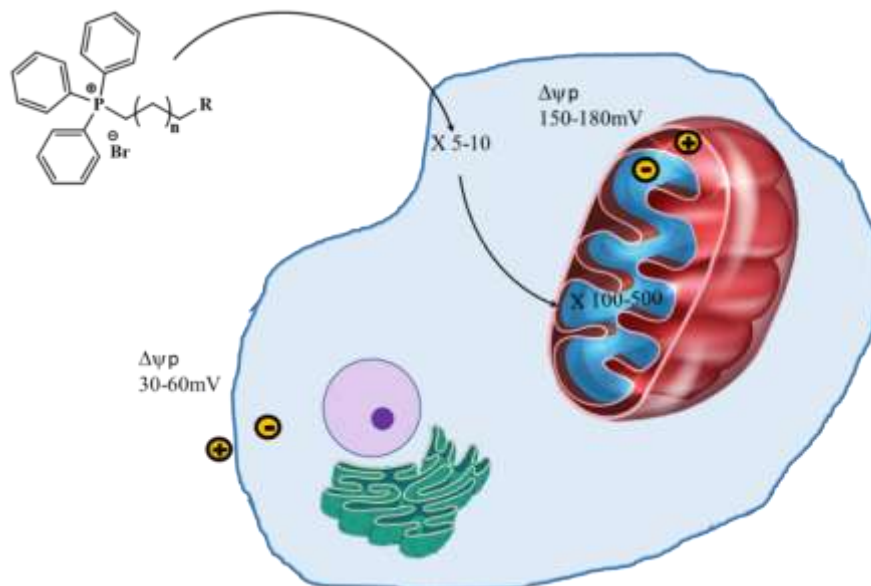
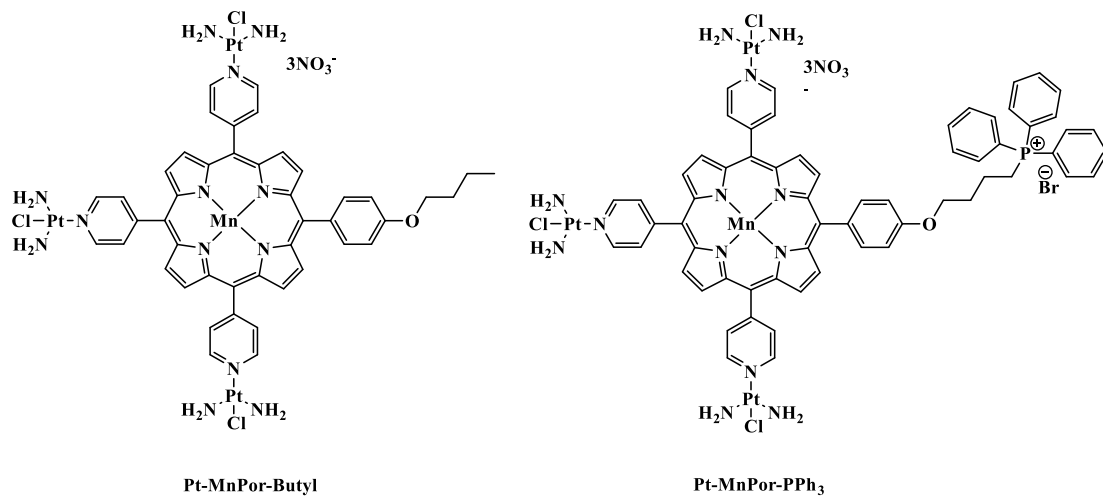


Figure 20 : Accumulation mitochondriale du cation TPP induite par le potentiel membranaire (modifié de 111).

Une grande variété de photosensibilisateurs ont été conjugués à des cations TPP pour cibler sélectivement les mitochondries. Par exemple, Yang et coll. [112] ont synthétisé un nouveau photosensibilisateur à base de porphyrine, Pt-MnPor-PPh₃, qui intègre l'imagerie par résonance magnétique (IRM), le diagnostic par fluorescence et la thérapie photodynamique ciblant les mitochondries.



Ce PS a montré une localisation mitochondriale comparée à son homologue sans cation TPP (Pt-MnPor-Butyl) qui a montré une localisation lysosomale.

D'autres cations lipophiles, tels que les ammoniums quaternaires, le dequalinium, la guanidine, la (E)-4-(1H-indol-3-ylvinyl) -N-méthylpyridinium iodure (F16), la rhodamine, ainsi que des peptides de courtes séquences comme le térapeptide Szeto–Schiller (SS-01) ont également été utilisées pour la délivrance de molécules actives vers la mitochondrie [113] (figure 21).

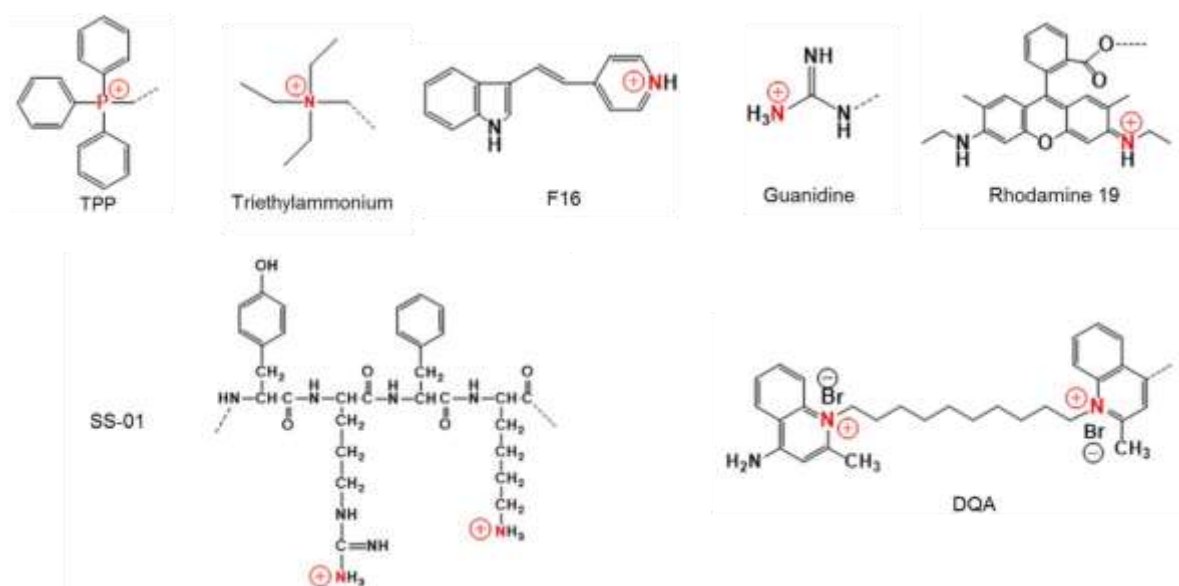
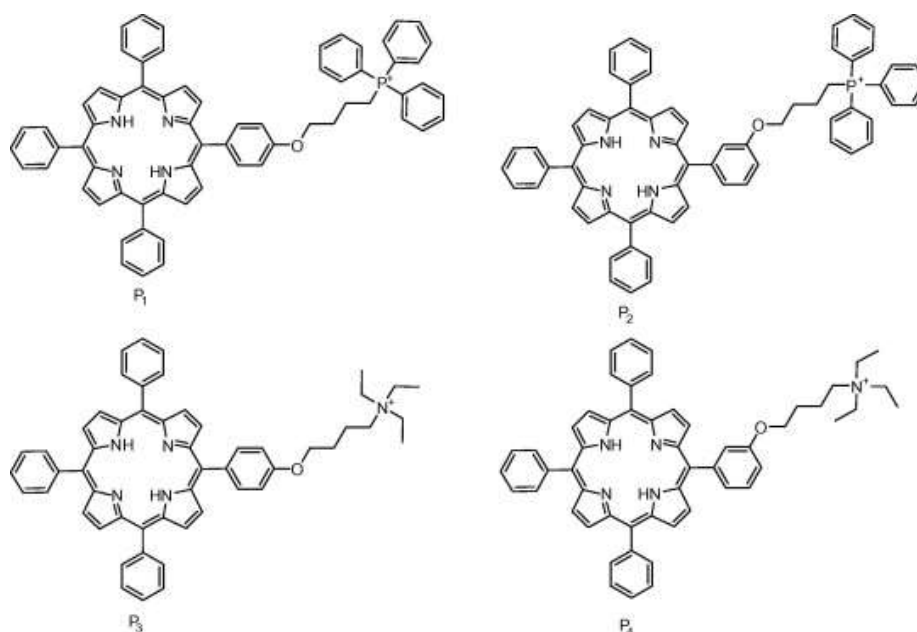


Figure 21: les agents de ciblage mitochondrial [113].

Lei et coll. [114] ont par exemple synthétisé quatre dérivés de *méso*-tétraphénylporphyrine portant soit un cation TPP (P1 et P2) ou triéthylammonium (P3 et P4) sur les positions *para* (P1 et P3) ou *mé*ta (P2 et P4).



Les auteurs ont montré que la fonctionnalisation de la *méso*-tétraphénylporphyrine avec le cation TPP ou le triéthylammonium n'affecte pas ses propriétés physico-chimiques. De plus, l'étude de la localisation subcellulaire par microscopie confocal a montré que les quatre produits sont localisés au niveau de la mitochondrie. Cependant, une absorption cellulaire plus rapide a été observée pour le produit P, attribuée à son caractère lipophile supérieur, qui facilite sa pénétration dans la membrane cellulaire.

L'adressage mitochondrial a également été effectué par des nanoparticules porteuses à la fois de PS et d'agents d'adressage mitochondrial. Par exemple, Yang et coll. [115] ont montré que le greffage covalent de la chlorure e6 sur des NPs augmente son efficacité thérapeutique vis-à-vis des cellules 4T1 du cancer de sein. De plus, l'activité photodynamique du nano-objet a été améliorée par ciblage mitochondrial avec le cation TPP.

Chapitre III : Les nanoparticules, un outil pour la vectorisation en PDT

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la vectorisation de PS avec des nanoparticules peut améliorer l'efficacité de la photothérapie dynamique. Par rapport à l'administration directe du PS seul, la conjugaison avec des nanoparticules présente de nombreux avantages : elle permet en plus de cibler les tissus tumoraux par effet EPR, d'améliorer la solubilité des PS hydrophobes, de les protéger contre la dégradation dans le sang et d'augmenter leur biodisponibilité [116].

Une nanoparticule est définie par la norme ISO TS/27687 comme étant un objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est compris entre 1 et 100 nm. Une autre définition, plus large, définit de « nanoparticule » un assemblage d'atomes dont au moins une des dimensions se situe à l'échelle nanométrique. Comparées aux dimensions des principales structures chimiques et biologiques (figure 22), les nanoparticules se situent dans la gamme de tailles des protéines [117].

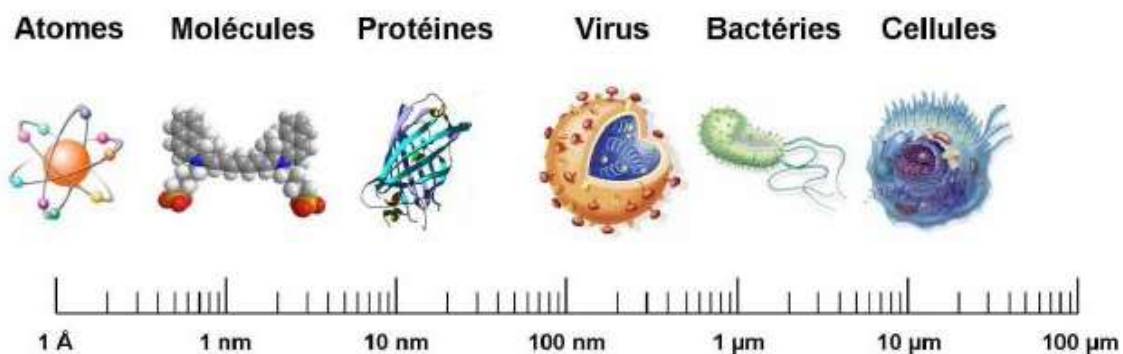


Figure 22 : Gamme des tailles des principales structures chimiques et biologiques.

Une nanoparticule est également définie comme étant un objet ayant un diamètre suffisamment petit pour que ses propriétés physico-chimiques soient différentes de celles des matériaux massifs de composition similaire [118]. Il n'existe donc pas une seule définition réglementaire du terme « nanoparticule ». Plusieurs particules étudiées pour la vectorisation de principe actif possèdent une taille supérieure à 100 nm, elles sont qualifiées de particules submicroniques. Cependant, dans le domaine scientifique, ces particules sont également appelées « nanoparticules ». Les particules submicroniques possèdent une taille comprise entre 100 nm et 1 µm. Ces structures se situent donc entre l'échelle du virus (≈ 100 nm) et l'échelle de la bactérie 1 µm.

En raison de leur petite taille, les nanoparticules présentent des propriétés biologiques et physico-chimiques uniques, ainsi qu'un grand rapport surface/volume, qui leur permettent d'être largement utilisées dans l'administration de PS.

Pour une efficacité thérapeutique, les nanoparticules doivent atteindre leur site d'action. Elles doivent donc traverser les barrières biologiques et éviter d'être métabolisées ou éliminées par l'organisme. Ces barrières peuvent être classées en trois catégories : les barrières externes (peau et muqueuse), la barrière sanguine et la barrière cellulaire [119]. Les NPs sont généralement administrées par voie intraveineuse, ce qui permet d'éviter les barrières externes. Néanmoins, avec ce type d'administration, les nanoparticules risquent d'être éliminées par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial (RSE). Ce système participe à une réponse immunitaire non spécifique, par reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme. Les cellules phagocytaires du RSE sont capables d'internaliser les nanoparticules et ensuite de les dégrader et de les éliminer de l'organisme. Le processus de phagocytose est précédé par une étape d'opsonisation au cours de laquelle les nanoparticules vont être recouvertes, via des interactions non spécifiques, par des opsonines (protéines plasmatiques). Cette adsorption d'opsonines permet au macrophage, qui sont principalement des cellules de Küpffer, d'identifier les NPs et induire ainsi leur phagocytose. Les NPs sont ensuite concentrées dans les organes de séquestration, en vue de leur élimination ultérieure [120].

La distribution des nanoparticules dans l'organisme est influencée par les caractéristiques physiques des nanoparticules, notamment leur taille et leur chimie de surface.

- **Influence de la taille**

Les nanoparticules de taille inférieure à 10 nm sont rapidement éliminées du sang par filtration rénale (« cutoff » rénal : ~ 10 nm en diamètre et ~ 48 kDa en masse moléculaire). Les macromolécules dissociées des nanoparticules ayant une masse moléculaire inférieure à 48 kDa peuvent également être éliminées par voie rénale [119]. Les nanoparticules dont le diamètre est supérieur à 200 nm présentent généralement une vitesse de clairance plus rapide que les particules dont le rayon est inférieur. Elles sont généralement opsonisées et piégées dans le foie et la rate. Les nanoparticules de taille intermédiaire (20 à 100 nm) présentent le plus fort potentiel pour les applications *in vivo*, en raison de leur capacité à circuler dans le sang pendant de longues périodes, lorsqu'elles sont conçues de manière appropriée. Ces nanoparticules sont suffisamment grosses pour éviter la clairance rénale et lymphatique et assez petites pour éviter l'opsonisation. De plus, les NPs de cette taille semblent être facilement intégrées par les

cellules, par rapport aux particules plus petites ou plus grosses. En outre, ces NPs sont capables de s'accumuler dans les tissus présentant une perméabilité vasculaire élevée, tels que les tumeurs (par effet EPR) et les sites inflammatoires [119].

- **Influence de la chimie de surface**

La chimie de surface des NPs est un paramètre important qui influence leurs interactions avec les milieux biologiques. L'hydrophilie et la charge de surface modifient leur stabilité dans la circulation sanguine, et leur interaction avec les membranes cellulaires. En général, les nanoparticules de charge positive présentent un taux d'internalisation cellulaire élevé et une demi-vie de circulation sanguine courte. En effet, elles sont rapidement éliminées par les cellules du RES, à cause des interactions avec les protéines plasmatiques. De plus, les nanoparticules cationiques se fixent plus facilement à la surface des cellules, grâce à leur capacité à interagir avec les protéines et les phospholipides anioniques présents à la surface des membranes cellulaires [121]. Cela se traduit de façon générale par une endocytose plus rapide et plus importante des nanoparticules cationiques par rapport aux nanoparticules anioniques et neutres [122].

L'opsonisation est également influencée par le caractère hydrophile/hydrophobe des NPs. En effet, les NPs hydrophobes sont opsonisées plus rapidement que les particules hydrophiles, ce qui est dû aux interactions hydrophobes favorisées entre les NPs hydrophobes et les protéines plasmatiques [123].

Le phénomène d'opsonisation peut être limité par greffage ou adsorption de polymère hydrophile et neutre, capable de bloquer les interactions hydrophobes et électrostatiques favorisant l'adsorption des opsonines à la surface des NPs. De ce fait, les NPs modifiées ne sont plus reconnues par le SRE et sont alors dites « furtives ». La furtivité des NPs est généralement apportée par le greffage de polyéthylène glycol (PEG) [124]. L'usage de polysaccharides tel que le dextran, et l'héparine ont également été décrites dans la littérature [125]. Ainsi, par leur durée de vie plasmatique augmentée, les NPs accroissent leur chance d'atteindre les tissus tumoraux de manière plus efficace.

L'ajout de ligands à la surface des nanoparticules permettrait, quant à lui, de reconnaître des récepteurs cellulaires spécifiques afin de pouvoir délivrer les PS à l'intérieur de la cellule cancéreuse. Des agents d'imagerie peuvent également être fixés sur les nanoparticules permettant ainsi un diagnostic et un traitement simultané, une approche appelée théranostique.

À ce jour, une bibliothèque impressionnante de diverses nanoparticules a été développée avec des tailles, des architectures et des propriétés physico-chimiques différentes. Les nanoparticules utilisées en PDT peuvent être classées en trois grandes catégories : les nanoparticules organiques, les nanoparticules inorganiques et les nanoparticules hybrides [126].

I. Les nanoparticules inorganiques

Cette catégorie regroupe des NPs rigides possédant des propriétés fluorescentes, magnétiques ou optiques particulières, qui les rendent intéressantes pour des applications de diagnostic et traitement de cancer. Elles ont des tailles et formes variables : sphère, bâtonnet, triangle, tube... Ce type de NPs est biocompatible, mais non biodégradable. De nombreuses nanoparticules inorganiques ont été exploitées en tant qu'agents thérapeutiques en PDT. Les plus courantes sont les nanoparticules de silice, les nanoparticules magnétiques et les nanoparticules d'or.

I.1. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont constituées d'un assemblage de 40 à 30 millions d'atomes d'or. Elles présentent une taille généralement comprise entre 1 et 100 nm, et une géométrie variable de forme sphérique, bâtonnet, cage ou encore sous forme d'étoiles. Elles sont caractérisées par un phénomène physique appelé résonance plasmon qui correspond à l'oscillation collective des électrons de conduction du métal lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse. Ce phénomène permet aux AuNPs de transformer une partie de l'énergie absorbée en chaleur. Cette propriété a ouvert la voie à l'utilisation des AuNPs pour la thérapie photothermique (PTT). De ce fait, les AuNPs sont généralement utilisées à la fois pour transporter les PS et avoir un effet de synergie entre la PDT et la PTT. À titre d'exemple, Wang et coll. [127] ont mis en évidence une amélioration de l'efficacité thérapeutique de nanoétoiles d'or par greffage en surface d'un photosensibilisateur, la chlorine e6, montrant ainsi une synergie d'effet entre la PDT et la PTT.

I.2. Les nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques les plus couramment rencontrées sont des oxydes de Fer, de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite (Fe_2O_3) [128]. En raison de leurs caractéristiques superparamagnétiques, les nanoparticules magnétiques sont utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) appliquée au diagnostic du cancer [129]. Elles sont également étudiées en tant qu'agents thérapeutiques hyperthermiques, car elles sont capables de chauffer localement le tissu cible sous l'effet d'un champ magnétique externe

[130]. Au cours des dernières années, plusieurs PS ont été immobilisés sur des nanoparticules magnétiques comme des porphyrines [131] et des bactériochlorines [132].

I.3. Les nanoparticules de silice

La silice, forme naturelle du dioxyde de silicium SiO_2 est l'un des matériaux les plus abondants de l'écorce terrestre. Elle existe généralement sous forme cristalline ou amorphe et à l'état combiné sous forme de silicate. Les principales variétés cristallines de la silice sont le quartz, la cristobalite et la tridymite. Les silices amorphes, quant à elles, sont généralement d'origine synthétique et peuvent être élaborées sous forme de poudre dont les grains sont de taille microniques ou nanométriques. Le dioxyde de silicium et ses silicates (E551...559) sont impliqués dans la composition de nombreux produits comme les cosmétiques, les médicaments, les dentifrices, les peintures, etc.

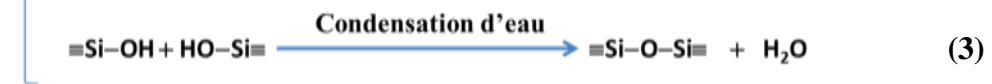
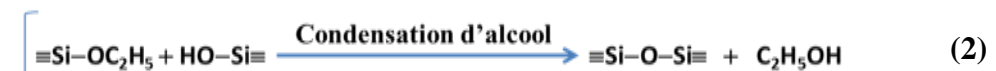
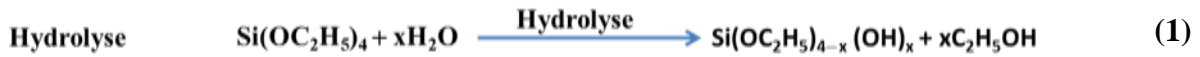
Dans le domaine médical, les nanoparticules de silice amorphe ont suscité un intérêt croissant en raison de leur grande biocompatibilité, biodégradabilité, stabilité au stockage, facilité de synthèse avec une taille, une forme et une charge de surface contrôlable, ainsi qu'une surface spécifique élevée permettant la fonctionnalisation avec diverses molécules d'intérêt.

I.3.1. Méthodes de synthèse

Les nanoparticules de silice sont préparées via différentes voies de synthèse. Celles-ci peuvent être classées en deux grandes catégories : la voie de synthèse en phase liquide et la voie de synthèse en phase gazeuse. Les méthodes de synthèse en phase liquide comportent le processus sol-gel, la précipitation chimique, la microémulsion, la synthèse hydrothermale, la carbonatation sous pression, etc. Le procédé de synthèse en phase vapeur, quant à lui, permet d'obtenir de la silice pyrogénée (silice fumée), par pyrolyse à haute température de tétrachlorure de silicium (SiCl_4) ou de tétraéthoxysilane (TEOS) en utilisant de l'oxyhydrogène [133] (un mélange d'hydrogène et d'oxygène en proportions 2 :1).

Dans le domaine de la recherche scientifique, les nanoparticules de silice sont généralement préparées par la voie sol-gel. Ce procédé implique l'hydrolyse et la condensation d'un alcoxysilane tel que le tétraéthoxysilane (TEOS) ou des sels minéraux tels que le silicate de sodium (Na_2SiO_3), en présence d'un acide ou d'une base comme catalyseur. D'abord, le TEOS $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ subit une hydrolyse partielle ou totale pour former successivement des groupements silanols $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3\text{OH}$ ou l'acide silicique ($\text{Si}(\text{OH})_4$) (Eq.1). Les monomères de silice hydrolysés formés se condensent ensuite selon une réaction de substitution nucléophile

de type SN2, pour former des ponts siloxanes (Si–O–Si) qui constituent la structure des nanoparticules de silice. La formation de ces ponts siloxanes est incomplète et la silice présente aussi des groupements silanols Si-OH, notamment à sa surface. La condensation peut avoir lieu selon deux cas de figure : le groupement hydroxyle de l'intermédiaire [Si-(OC₂H₅)_{4-x}(OH)_x] réagit soit avec le groupement éthoxy d'un autre TEOS « condensation d'alcool » (Eq.2) soit avec le groupement hydroxyle d'un autre intermédiaire « condensation d'eau » (Eq.3).



Le procédé sol-gel peut-être mis en place soit en milieu homogène « procédé Stöber » soit hétérogène « procédé microémulsion ».

En 1968, Stöber, Fink et Bohn [134] ont mis au point un protocole de synthèse de silice colloïdale en milieux homogène, qui est bien connu depuis sous le nom de « procédé Stöber ». Il s'agit du premier procédé réellement efficace, permettant de synthétiser des nanoparticules de silice sphériques de taille uniforme et contrôlée. Il s'agit d'une réaction d'hydrolyse-condensation de tétraalkoxysilanes dans une solution alcoolique, en présence d'eau et d'ammoniaque, ce dernier jouant le rôle de catalyseur. En faisant varier les concentrations des réactifs, le solvant alcoolique ou encore le précurseur de silice, Stöber et al. ont réussi à synthétiser des particules monodisperses et de taille contrôlée allant de 50 nm à 2 µm.

Depuis cette étude, qui est souvent prise comme référence, d'autres méthodes connues sous le nom de « Stöber modifié » ont été développées. Ces méthodes utilisent le même principe de base de la méthode de Stöber, mais avec modification des paramètres expérimentaux. Par exemple Rao et al. ont développé une méthode de synthèse des nanoparticules de silice qui repose sur une addition séquentielle de réactifs dans un bain à ultrason [135].

De nombreuses études ont été menées pour étudier les mécanismes de formation et de croissance des nanoparticules de silice et plusieurs modèles, parfois contradictoires, ont été proposés pour décrire ces mécanismes. Généralement, le modèle de LaMer [136] est utilisé comme modèle de base. Ce modèle a été énoncé la première fois pour expliquer les résultats

obtenus pour la synthèse de particules de soufre à partir de solutions de thiosulfate. Il distingue trois étapes : une étape de prénucléation, une étape de nucléation et une étape de croissance. Lors de la première étape, la formation de monomères de silice hydrolysés entraîne une augmentation de la concentration de ces espèces dans le milieu. Une fois que la concentration dépasse la limite de solubilité et atteint la concentration de sursaturation, la nucléation spontanée débute permettant la formation de nucléi primaires (étape 2). Pendant la nucléation, la concentration en monomères tend à diminuer en dessous du seuil de sursaturation, stoppant ainsi la nucléation. Dans la littérature, il y a un consensus sur le fait que les premières étapes de formation des nanoparticules de silice suivent le modèle de LaMer. Cependant, c'est le mécanisme de croissance des nanoparticules à partir des nucléi primaires qui fait débat. Deux principaux modèles ont émergé : la croissance se fait soit par diffusion et condensation de monomères à la surface des nucléi primaires générés pendant la deuxième étape, soit par coalescence des nucléi primaires, qui sont dans ce cas générés en continu, jusqu'à former une particule de taille suffisamment importante pour être stable. D'autres modèles où les deux mécanismes précédents sont impliqués ont été proposés. Ils suggèrent que la formation des nanoparticules de silice commence par l'agrégation de nucléi primaires jusqu'à atteindre une taille de particule stable, suivit d'une croissance par addition de monomères de silice [137].

I.3.2. Les nanoparticules de silice comme vecteur de PS

Différents types de nanoparticules de silice ont été étudiées pour vectoriser des PS. Elles sont classées en deux grands groupes : les nanoparticules poreuses et les non poreuses. Dans la famille des NPs poreuses, on peut citer les NPs mésoporeuses (MSN) et les NPs creuses [138]. Les NPs mésoporeuses sont caractérisées par la présence de pores de taille variables organisés en réseau hexagonal, tandis que les nanoparticules creuses possèdent un grand creux central.



NPs creuses



NPs non-poreuses



NPs mésoporeuses

Lorsque les NPs de silice sont préparées à partir d'un mélange d'alkoxysilane et d'organoalkoxysilanes, on parle de NPs organosiliciées (ORMOSIL). On parle de NPs organosiliciées périodiques quand elles sont préparées uniquement à partir

d'organoalkoxysilanes [139]. Les PS peuvent être intégrés aux NPs de silice de différentes manières :

- **Par encapsulation dans la matrice de silice** : les travaux pionniers sur l'encapsulation de photosensibilisateurs dans la matrice de silice ont été réalisés par les groupes Kopelman et Prasad en 2003. Le groupe de Kopelman [140] a intégré la méta-tétra (hydroxyphényl) chlorine (mTHPC, ou Foscan) dans des nanoparticules de silice par un procédé de Stöber modifié, au cours duquel le 3-aminopropyl triéthoxysilane est introduit pour permettre d'encapsuler plus de photosensibilisateurs par interactions ioniques avec la matrice de silice. Le deuxième groupe a piégé le 2-dévinyl-2- (1-hexyloxyéthyl) pyrophéorbide (HPPH), un photosensibilisateur insoluble dans l'eau, dans des NPs organosiliciées de 30 nm, préparées par la technique de microémulsion (figure 23).

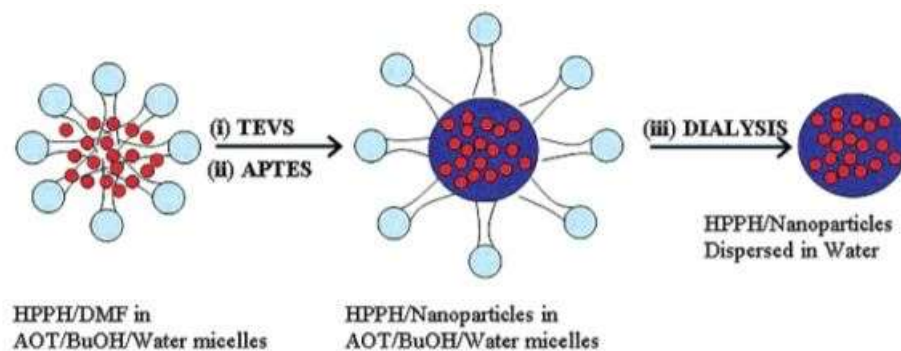


Figure 23: Schéma décrivant la synthèse et la purification de nanoparticules dopées de HPPH par microémulsion [140].

Ce groupe a également étudié l'internalisation de ces NPs par les cellules cancéreuses, ainsi que leur action photodynamique. Ces NPs tuent les cellules cancéreuses HeLa et UCI-107 de manière très efficace après une irradiation à 650 nm [141].

- **Par encapsulation dans les pores des NPs** : Dam et coll. [142] ont élaboré des nanosphères de silice creuses dans lesquelles sont encapsulées des phtalocyanines de zinc (ZnPC). Ces nanoparticules ont été fonctionnalisées avec l'acide folique pour cibler sélectivement les cellules du carcinome épidermoïde (figure 24).

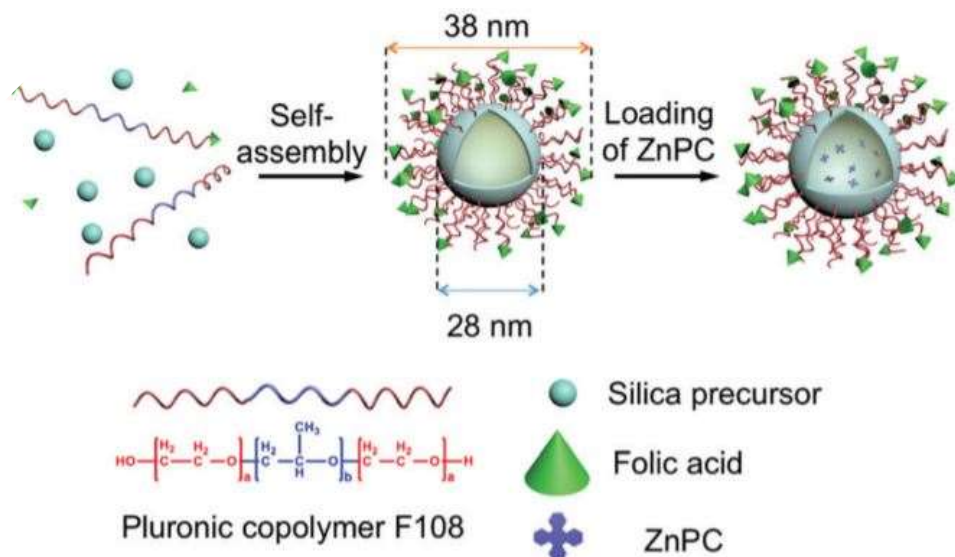


Figure 24: stratégie de synthèse des NPs de silice creuses encapsulées de ZnPC, (F108 est le surfactant) [142].

Le nano-objet obtenu a montré une capacité 5 à 6 fois supérieure à s'accumuler préférentiellement dans les cellules du cancer épidermoïde, comparée aux cellules normales. Après deux heures d'irradiation à 671 nm, plus de 90 % de mort cellulaire a été atteinte avec 4 mg/mL de nanoparticules (40 µg/mg de ZnPC).

- **Par greffage covalent dans la matrice de silice :** récemment, Jimenez et coll. [143] ont utilisé une porphyrine octaéthoxysililée pour préparer des NPs mésoporeuses organosiliciées périodiques, incorporant ainsi la porphyrine dans la matrice de silice. Ces NPs ont été fonctionnalisées avec l'APTES (figure 25).

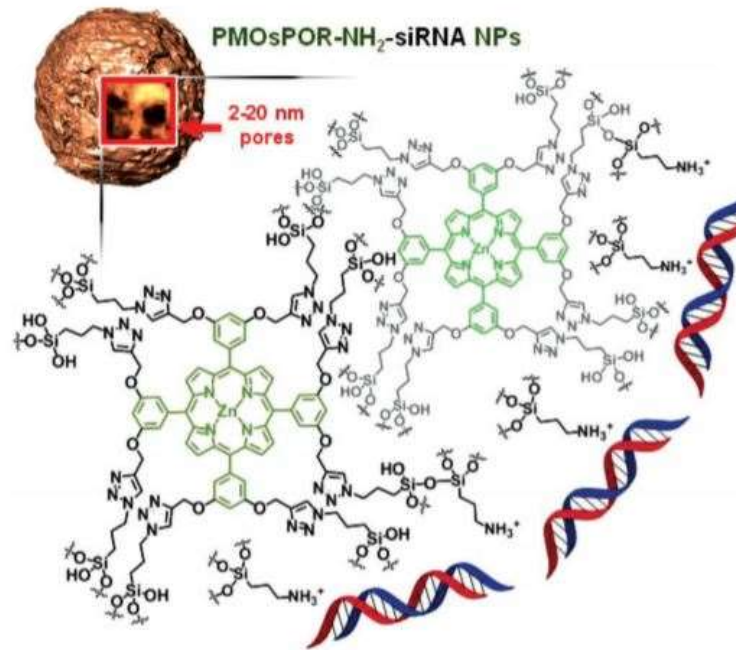


Figure 25: nanoparticules de silice incorporant l'octahydroxyphénylporphyrine [143].

Ces NPs ont montré une activité anticancéreuse *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 du cancer de sein. Après irradiation à 800 nm, environ 73% de mort cellulaire a été observée avec une concentration de 40 µg/mL de NPs.

- **Par greffage covalent dans les pores des NPs :** le groupe de Clemente et coll. [144] ont greffé la vertéporfine par liaisons amides dans les pores des nanoparticules mésoporeuses préalablement fonctionnalisés avec l'APTES (figure 26).

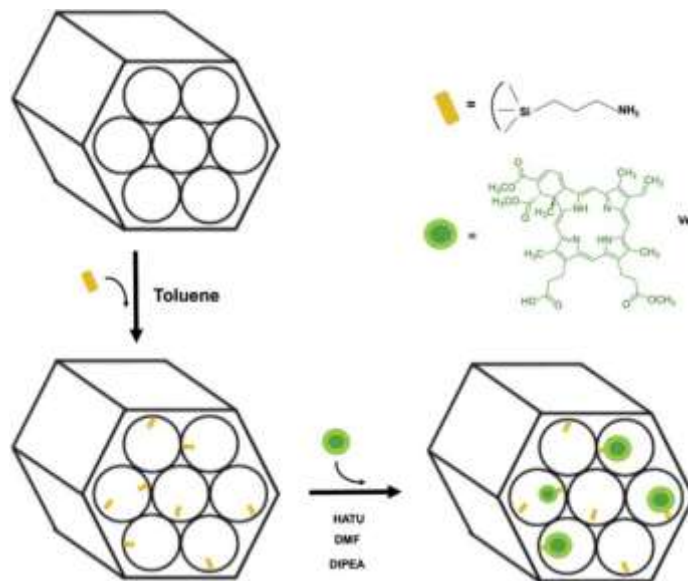


Figure 26: Procédure utilisée pour obtenir des nanoparticules de silice mésoporeuses fonctionnalisées par la vertéporfine [144].

Des expériences *in vitro* effectuées sur des cellules de mélanome ont montré que l'irradiation de ces NPs à 693 nm induit 67% de mort cellulaire avec une concentration de 10 µg/mL de NPs. Les expériences *in vivo* ont montré que ces NPs, stimulées par la lumière rouge quatre fois en 16 jours, ont pu réduire la masse tumorale de 50% par rapport aux souris non traitées avec une concentration de 5 µg/mL.

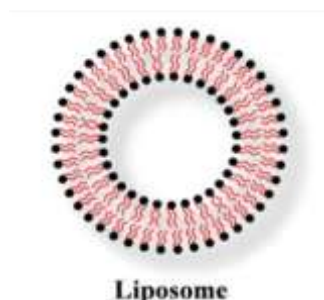
Des nanoparticules de silice sensibles à des stimuli ont également été rapportées dans la littérature. Par exemple, Vivero-Escoto et coll. [145] ont récemment publié la synthèse des NPs de silice non poreuse, sur lesquelles ils ont greffé la protoporphyrine IX (RR-PpIX-SiNP), via une liaison disulfure qui est scindée lorsque la NP atteint les cellules cancéreuses en raison de l'environnement tumoral réducteur. Ils ont comparé le comportement en milieu physiologique des nanoparticules RR-PpIX-SiNP avec des NPs témoins (PpIX-SiNP) dans lesquelles le lien entre la PpIX et les NPs est un ligand silane (APTES). La production d'oxygène singulet des deux NPs RR-PpIX-SiNP et PpIX-SiNP était plus faible par rapport à la PpIX seule en solution, probablement en raison de l'agrégation de la PpIX dans les NPs. Cependant, lorsque le dithiothréitol était utilisé comme agent réducteur en solution, RR-PpIXSiNP libérait 90% de PpIX après 6 jours d'incubation, alors que seulement 25% de PpIX était libéré par PpIX-SiNP après 10 jours d'incubation. Une meilleure phototoxicité a été observée pour RR-PpIX-SiNP que pour PpIX-SiNP sur la lignée cellulaire cancéreuse HeLa du cancer du col de l'utérus.

II. Les nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques sont généralement composées des lipides, des sucres ou des polymères synthétiques ou naturels.

II.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques lipidiques constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques concentriques. Ils ont à la fois une région hydrophile (noyau aqueux) et une région hydrophobe (la bicouche lipidique), permettant ainsi l'encapsulation et le transport de PS hydrophile et hydrophobe [146].



Plusieurs études ont démontré une accumulation sélective et rapide des photosensibilisateurs liposomaux par rapport aux non-liposomaux dans les tumeurs [147]. Par exemple, la PDT utilisant le photofrin encapsulé dans des liposomes s'est révélée nettement plus sélective et plus efficace contre les cellules U87 de glioblastome (tumeur cérébrale) par rapport au photofrin seul [148].

Les liposomes classiques présentent souvent une demi-vie plasmatique courte (de l'ordre de quelques minutes) à cause de l'élimination rapide par les macrophages du système réticulo-endothélial et la désintégration provoquée par l'échange lipidique avec les lipoprotéines de haute densité. Des modifications de surface ont été explorées pour produire des liposomes à longue circulation plasmatique, notamment par greffage de poly (éthylène glycol) (PEG) [146]. Nawalany et al. [149] ont rapporté l'utilisation de liposomes pégylés encapsulés de tétrakis (4-hydroxyphényl) porphyrine (p-THPP) sur les lignées cellulaires du cancer de la prostate DU-145 et du côlon HCT-116 (figure 27). Une accumulation sélective de la p-THPP dans les cellules cancéreuses et une efficacité accrue de la PDT ont été observées.

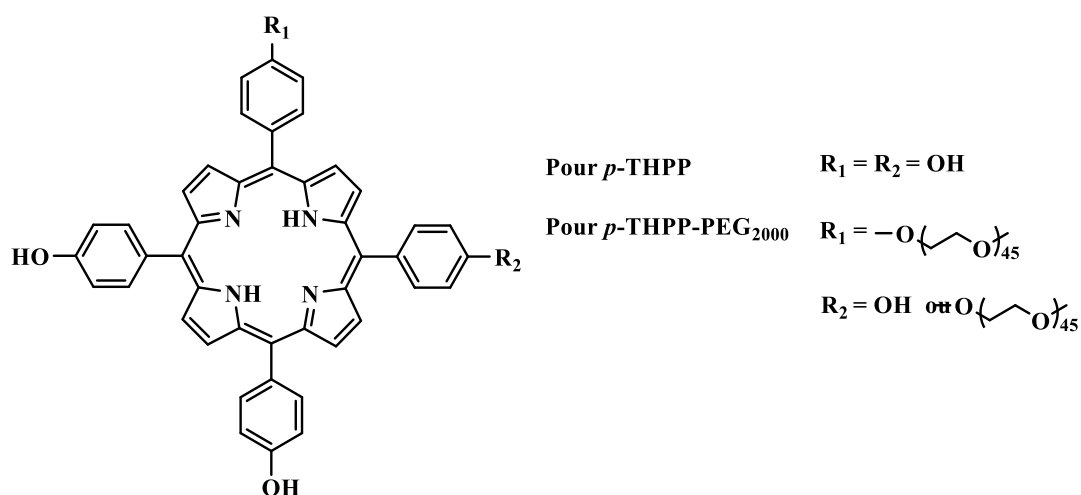
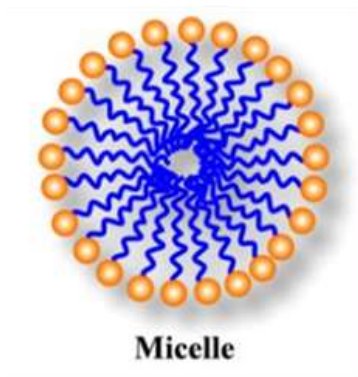


Figure 27: Structure chimique de la THPP.

II.2. Les micelles

Les micelles sont des systèmes colloïdaux sphériques ou globulaires formés par autoassemblage de composés amphiphiles dans une solution aqueuse, donnant lieu à un noyau hydrophobe et une coque hydrophile. Elles peuvent se former spontanément à certaines concentrations (concentration micellaire critique ; CMC) et à certaines températures. Le noyau hydrophobe sert de réservoir pour les PS hydrophobes, tandis que l'enveloppe hydrophile stabilise le noyau et rend les PS hydrophobes solubles dans l'eau.



Les PS sont incorporés dans les micelles par le biais d'interactions physiques, chimiques ou électrostatiques. Des micelles formées de polyéthylène glycol (PEG) chargé de protoporphyrine de zinc (figure 28-(a)) ont été étudiés par Iyer et coll. [150]. Ces micelles ont montré une sélectivité élevée basée sur l'effet EPR et une activité antitumorale remarquable *in vivo* sur le cancer de l'œsophage.

Hu et coll. ont montré que la chlorine e6 (figure 28-(b)) encapsulée dans des micelles formées d'oligosaccharide de chitosane greffé à l'acide stéarique est absorbée plus significativement par les cellules A1549 du cancer de poumon que la chlorine e6 libre [151].

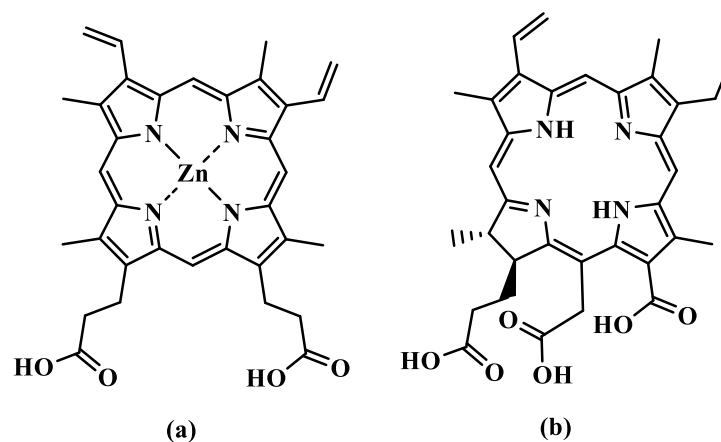


Figure 28: Structure chimique de la protoporphyrine zinc (a), et structure chimique de la chlorine e6 (b).

II.3. Les dendrimères

Le terme dendrimère est dérivé du mot grec "Dendron" qui signifie "arbre". Ce sont des macromolécules caractérisées par une architecture tridimensionnelle hautement ramifiée. Les PS peuvent être encapsulés dans les cavités internes formées par les ramifications du dendrimère (figure 29-a), intégrés au niveau des points de jonction (figure 29-b) ou du cœur (figure 29-c), ou liés de manière covalente aux groupements périphériques du dendrimère (figure 29-d) [152].

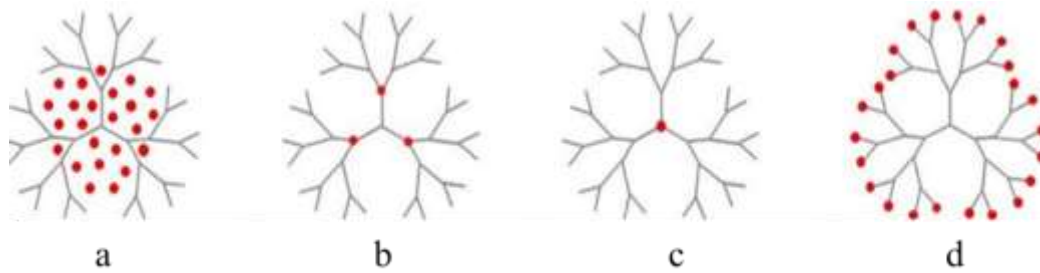


Figure 29 : Représentation des principales stratégies de vectorisation de PS par des dendrimères utilisées en PDT Narsireddy et coll. ont préparé des dendrimères pour délivrer la THPP. Ces molécules ont été fonctionnalisées avec l'acide nitrilotriacétique pour cibler le facteur de croissance épidermique humaine HER2. Les tests *in vitro* et *in vivo* réalisés sur les cellules SK-OV-3 du cancer ovarien ont montré que les composés PS-dendrimère sont plus efficace que les PS utilisés seuls [153].

II.4. Les nanoparticules polymériques

Ce sont des assemblages de polymère naturels ou synthétiques biodégradables. Parmi les polymères synthétiques les plus utilisés, on peut citer les polyesters, notamment le poly-(acide lactique) (PLA), le poly-(acide glycolique) (PGA) et leur copolymère le poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA). Ces polymères sont biocompatibles et biodégradables et leur utilisation dans le domaine médical est autorisée par l'agence américaine Foods and Drug Administration. Les polymères naturels, quant à eux, peuvent être produits par les règnes animal, végétal ou bactérien. Selon la nature et la structure des polymères et le mode de mise en forme, il est possible d'obtenir soit des nanosphères (composées d'un cœur matriciel) ou des nanocapsules (composées d'une coque polymère renfermant un cœur huileux ou aqueux) [154].

Nous aborderons dans ce manuscrit uniquement les nanoparticules polymériques formées à partir de polysaccharides, leur caractéristique et leurs modes d'action dans le contexte de la thérapie photodynamique.

Chapitre IV : Les nanoparticules formées de polysaccharides en PDT

Pour une application en PDT, les nanoparticules doivent répondre à plusieurs exigences. En effet, les matériaux utilisés pour concevoir ces nanoparticules doivent être biodégradables et biocompatibles. Ils doivent pouvoir être éliminés par l'organisme et ne pas induire de réactions toxiques et/ou inflammatoires. Ils doivent également assurer l'encapsulation de PS et leur transport vers les cellules cancéreuses. Les NPs formées de polysaccharides ont toutes les caractéristiques requises et pourraient constituer de bons candidats. L'intérêt pour les polysaccharides repose, en plus de leur biocompatibilité et biodégradabilité, sur leur faible coût, leur abondance et leur potentiel pour une multitude de modifications chimiques.

I. Les méthodes de synthèse de NPs à partir de polysaccharides

Les NPs de polysaccharides peuvent être préparées par réticulation (ionique ou covalente), par complexation de polysaccharides chargés, ou par autoassemblage de polysaccharides modifiés par des groupements hydrophobes (figure 30) [155].

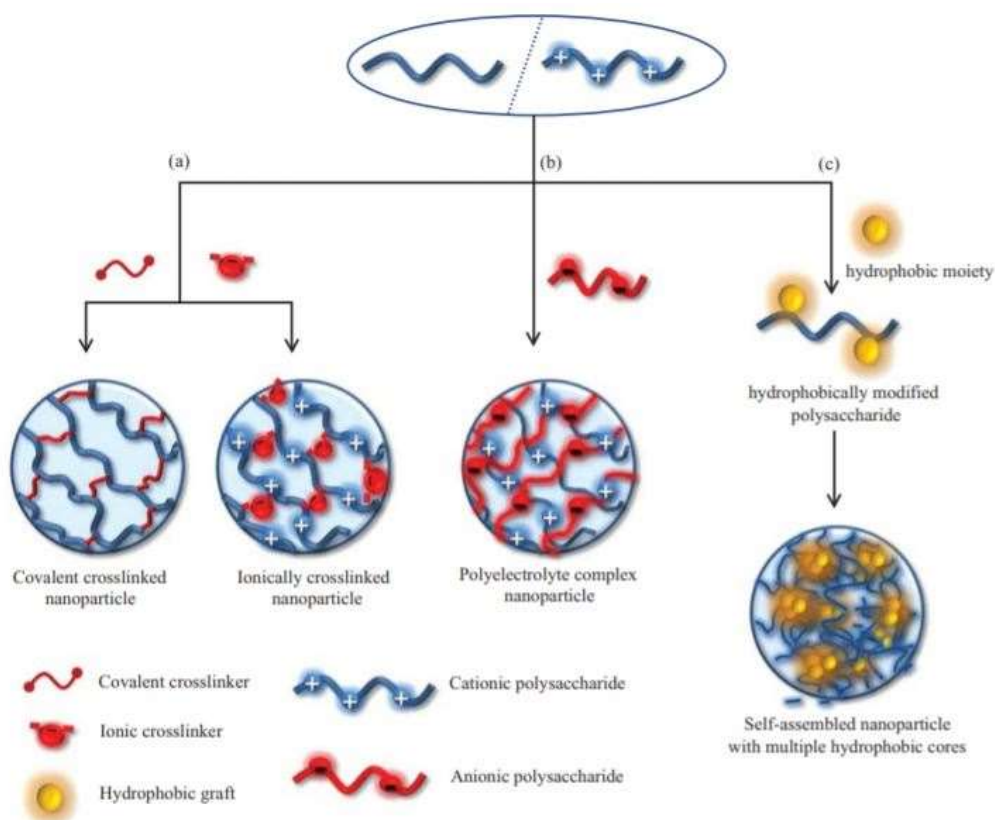


Figure 30: Illustrations schématiques des différentes stratégies utilisées pour préparer des nanoparticules à base de polysaccharides (a) réticulation de polysaccharides en utilisant de petits agents de réticulation moléculaire (b) complexation entre des polysaccharides de charges opposées (c) autoassemblage de polysaccharides modifiés avec des groupes hydrophobes.

Le choix d'une de ces méthodes dépend principalement du polymère et de ses propriétés physico-chimiques, mais également des caractéristiques physico-chimiques du PS, notamment de sa nature hydrophile ou hydrophobe.

- **Préparation de NP par complexation de polysaccharides chargés**

Cette méthode permet de complexer un polysaccharide, en solution aqueuse, avec un autre possédant une charge opposée, pour former des complexes polyélectrolytes (PECs) par interactions électrostatiques. Les PECs sont préparés sans utilisation d'agents de réticulation ce qui en fait de bons candidats pour des applications pharmaceutiques. Il existe plusieurs polysaccharides chargés positivement ou négativement pouvant être utilisés pour préparer les PECs. De plus, la complexation peut se faire également avec des polypeptides ou avec des polynucléotides.

- **Préparation de NP par réticulation**

La réticulation permet d'obtenir un réseau 3D par voie chimique ou physique. Dans le premier cas, la réticulation repose sur la création de liaisons covalentes entre un agent réticulant et le polymère. Dans le deuxième cas, la réticulation se fait par des interactions ioniques avec des réticulants ioniques. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. Par exemple, la méthode de réticulation ionique est plus facile à mettre en œuvre que le procédé de réticulation covalente ; toutefois, la première méthode est limitée aux polysaccharides chargés. En revanche, la deuxième peut être appliquée aux polysaccharides neutres, mais nécessite une chimie de conjugaison complexe et des conditions de réaction vigoureuses. De plus, les agents de réticulation covalents les plus couramment utilisés, tels que le glutaraldéhyde, présentent souvent des effets toxiques chez les humains. Les agents de réticulation ioniques couramment utilisés, tels que les ions calcium et le tripolyphosphate sont, quant à eux, non toxiques.

- **Préparation de NP par autoassemblage**

Lorsque des chaînes de polysaccharides hydrophiles sont modifiées avec des groupements hydrophobes, des copolymères amphiphiles, avec des propriétés d'autoassemblages, sont obtenus. Le polysaccharide devenu amphiphile forme spontanément, en milieu aqueux, des structures submicrocoques « cœur-coquille ». Les segments hydrophobes forment le noyau de la nanoparticule et le polysaccharide hydrophile forme la coquille. Cette organisation est stabilisée par des interactions entre les fragments hydrophobes afin de minimiser l'énergie libre interfaciale. La taille des nanoparticules dépend principalement du degré de substitution (DS) des molécules hydrophobes. En général, la taille des particules a tendance à diminuer à mesure

que le DS augmente en raison de la formation de noyaux internes compacts résultant d'interactions hydrophobes [156]. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de greffer directement des PS lipophiles qui seront piégés dans le cœur des particules, à des taux pouvant être très élevés. Les PS ainsi encapsulés peuvent être transportés et lentement relargués dans l'organisme, via l'hydrolyse de la liaison utilisée pour le greffage.

Une grande variété de polysaccharide a été utilisée pour former des NPs organiques. Cependant, peu sont dirigés vers une application en PDT. Le polysaccharide le plus étudié pour cette application est le chitosane. Nous citerons par la suite quelques exemples de nanoparticules formées à partir de ce polysaccharide.

Quant aux xylanes issus du bois, polysaccharide de la famille des hémicelluloses et qui font l'objet de ce travail, ils n'ont jamais été étudiés pour une application dans le domaine de la PDT. Cependant, il existe quelques travaux montrant la capacité de ces polysaccharides à former des NPs. La première publication scientifique qui met en évidence la possibilité de former des nanoparticules de xylanes bien sphériques et monodisperses date de 2010 avec les travaux de Heinze et coll. [157]. Ces NPs ont été préparées par autoassemblage d'oligohomoxylane sulfatés et estérifiés avec l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien. Les auteurs suggèrent que ces NPs peuvent être utilisées dans le relargage de principe actif.

Dans une autre étude plus récente, Sauraj et coll. [158] ont préparé des NPs de xylane-curcumine sensibles aux variations de pH, pour améliorer l'efficacité thérapeutique de la curcumine dans le traitement du cancer. La curcumine a été fonctionnalisée avec l'anhydride succinique pour permettre sa fixation sur le xylane par estérification. Le conjugué xylane-curcumine obtenu forme, par autoassemblage, des NPs sphériques de taille moyenne de 253 nm. Ces NPs ont montré un effet cytotoxique plus élevé par rapport à la curcumine seule, sur les lignées cellulaires HT-29 et HCT-15 du cancer colorectal. De plus, elles présentaient une libération de médicament significativement plus rapide à un pH légèrement acide de 5 habituellement présent dans les microenvironnements tumoraux.

Peng et coll. [159] ont préparé des NPs de xylane par autoassemblage du polysaccharide amphiphile, synthétisé en incorporant de l'acide cholique au xylane. Ces NPs ont été utilisées pour l'encapsulation et le relargage contrôlé de la doxorubicine. De la même manière Fu et coll. [160] ont encapsulé la Ketoprofen dans des nanoparticules de xylane formées par autoassemblage de xylane-acide stéarique et étudié son relargage en fonction du pH.

II. Quelques exemples de nanoparticules formées à partir du chitosane pour une application en PDT

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, polymère naturel parmi les plus abondants sur la terre avec la cellulose. La chitine est principalement présente chez de nombreuses espèces animales et fongiques. Elle a été découverte en 1811 par Henri Braconnot dans la paroi cellulaire de champignons. Elle est constituée d'une chaîne d'unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liées par une liaison osidique de type β -1,4 (figure 31).

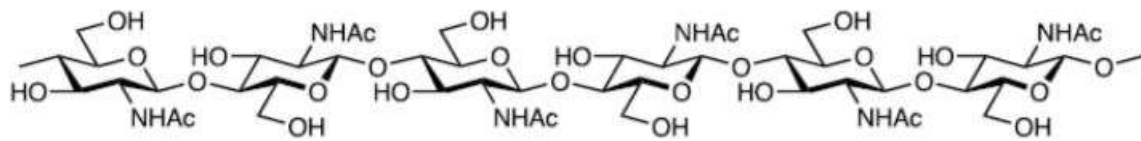


Figure 31: Structure de la chitine.

Le chitosane est un polymère obtenu par désacétylation alcaline ou enzymatique de la chitine. Il est donc constitué de glucosamine liée au β -1,4(2-amino-2-désoxy- β -D-glucose) et des petites quantités de N-acétylglucosamine (figure 32).

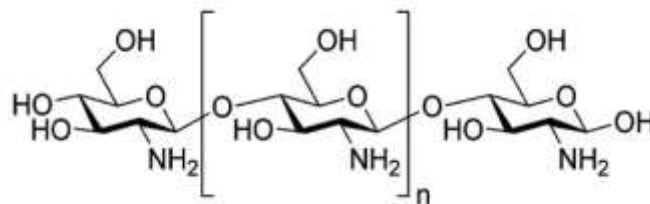


Figure 32: Structure du chitosane

La présence de groupements amines confère au chitosane un caractère cationique intéressant, lui permettant de former des complexes ioniques avec des PS anioniques. Jeong et coll. [161] ont mis en évidence la possibilité de former des nanoparticules de chitosane encapsulant la chlorure e6 (ChitoCe6) par interactions ioniques entre les acides carboxyliques de la chlorure e6 et les groupements amines du chitosane hydrosoluble (WSC). La mise en forme des NPs a été réalisée sous ultrasons, via un processus d'autoassemblage, sans avoir besoin de tensioactifs ni de solvants organiques (figure 33).

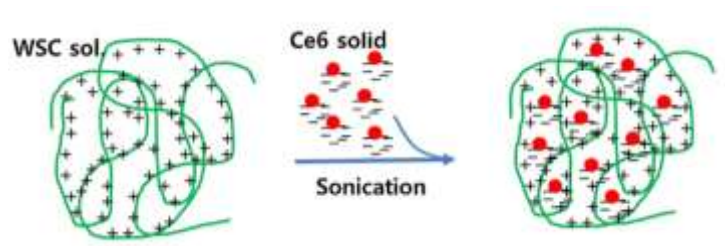


Figure 33: Illustrations schématiques de la formation de nanoparticules de ChitoCe6 [161].

Les auteurs ont obtenu des nanoparticules sphériques de 300 nm de diamètre encapsulant de la Chlorine e6. Testées sur des cellules SNU478 de cholangiocarcinome humain, ces NPs présentaient une internalisation, une production de ROS et une phototoxicité deux fois plus élevées par rapport à la chlorine e6 seule.

Dans une étude [162] comparative entre l'encapsulation et le greffage covalent de PS et son influence sur l'efficacité thérapeutique du nano-objet, Lee et coll. ont préparé des NPs de chitosane pour la vectorisation de la chlorine e6. Deux méthodes ont été étudiées : dans la première le PS hydrophobe a été encapsulé par interactions hydrophobes dans les NPs de chitosane formées par autoassemblage du polymère rendu amphiphile, par greffage de l'acide 5β-cholanique (HGC-Ce6). Dans la deuxième méthode, la chlorine e6 a été fixée par liaison amide sur le chitosane, et le polymère fonctionnalisé s'autoassemble en NPs en solution aqueuse (GC-Ce6) (figure 34).

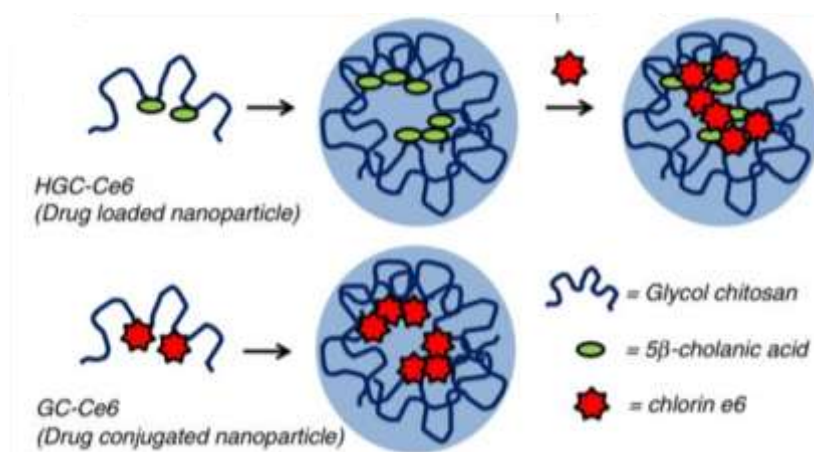


Figure 34: Procédure de préparation des NPs HGC-Ce6 et GC-Ce6 [162].

Les deux types de NPs avaient un diamètre similaire compris entre 300 et 350 nm. La teneur en chlorine e6 dans les deux types de NPs a également été ajustée à 10% en poids afin de permettre la comparaison des deux modes de fixation. Les tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que les deux types de NPs présentaient une thérapie photodynamique plus efficace par rapport à la chlorine e6 seule, ainsi qu'une production d'oxygène singulet similaire. Cependant, comparé à GC-Ce6,

HGC-Ce6 a montré une libération trop rapide des PS et par conséquent une faible accumulation dans les tissus tumoraux. GC-Ce6 a présenté un temps de circulation prolongé et s'était efficacement accumulée dans la tumeur, ce qui a permis d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique *in vivo*.

Il est possible d'apporter plusieurs fonctionnalités dans un seul nano-objet, en jouant sur la composition et l'assemblage des différents éléments de façon à obtenir un agent multifonctionnel. En effet, en adaptant la nature des groupements fonctionnels de ce type de nanoparticules, celles-ci peuvent combiner plusieurs modalités de traitement thérapeutique. De plus, en profitant des caractéristiques particulières de l'environnement des tumeurs solides, il est possible de concevoir des NPs qui vont exploiter ces paramètres pour s'activer et libérer leur contenu en réponse à des stimuli endogènes ou exogènes (modifications du pH, action d'enzymes, température, gradients redox...).

Dans une étude récente, Wang et al. [163] ont préparé des nanoparticules multifonctionnelles formées par un autoassemblage séquentiel de chitosane et d'acide hyaluronique. La doxorubicine et l'acide 5-aminolévulinique ont été chimiquement conjugués sur le nanocomplexe via une liaison imine afin de combiner la chimiothérapie et la photothérapie dynamique. La combinaison de la chimiothérapie et la PDT a amélioré de manière synergique l'efficacité thérapeutique du nano-objet vis-à-vis des cellules MCF-7 du cancer du sein. De plus, la décoration de ces NPs avec l'anticorps anti-HER2 a augmenté de manière significative leur absorption cellulaire par endocytose.

Objectif du travail

Pour une efficacité maximale, la PDT nécessite que les PS impliqués puissent être délivrés à la tumeur avec une très grande sélectivité. Comme le montrent les exemples cités dans l'étude bibliographique, l'utilisation de nanoparticules comme vecteurs de PS permet d'améliorer leur efficacité thérapeutique. En effet, la conjugaison des PS avec des nanoparticules permet en plus de cibler les tissus tumoraux par effet EPR, d'améliorer la solubilité des PS hydrophobes, de les protéger contre la dégradation dans le sang et d'augmenter leur biodisponibilité.

Plusieurs types de nanoparticules ont été étudiées. Elles sont classées en deux grandes familles les nanoparticules inorganiques et les NPs organiques. Cependant, le problème de l'utilisation de nanoparticules comme agent de vectorisation de PS est leur élimination prématurée par le système réticulo-endothélial. En effet, leur élimination est précédée par une étape d'opsonisation au cours de laquelle les nanoparticules vont être recouvertes par des protéines plasmatiques appelées opsonines. Cette adsorption d'opsonines va permettre au macrophage d'identifier les NPs et ainsi induire leur élimination. Ce problème d'opsonisation peut être limité par l'utilisation de molécules hydrophiles pour concevoir ou recouvrir les nanoparticules. Ces molécules sont généralement constituées de polymères hydrophiles à longue chaîne. Le plus utilisé est le polyéthylène glycol (PEG). Des polysaccharides tels que le chitosane et le dextran sont également décrits dans la littérature. Ces polymères créent autour des nanoparticules une couche protectrice hydrophile qui empêche l'adsorption des opsonines ce qui retarde la phagocytose et augmente la durée de vie plasmatique des NPs.

En plus d'avoir une durée de vie plasmatique élevée ces NPs doivent être non toxique pour l'organisme, biocompatible et biodégradable de manière à faciliter leur élimination de l'organisme. Pour répondre à toutes ces exigences des NPs à base de polysaccharides, semble être de bons candidats. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nanoparticules à base de polysaccharide pour la vectorisation de PS. Nous avons cherché à travers ce projet, en plus de développer des nouveaux nanovecteurs thérapeutiques, de trouver une nouvelle voie de valorisation de polysaccharide hémicellulosique de type xylane, polysaccharides actuellement peu valorisés. Nous nous sommes donc intéressés à la préparation de nanoparticules à base de xylane pour la vectorisation de PS tétrapyrrolique pour une application en PDT. Nous avons étudié deux types de nanoparticules : des NPs hybrides et des NPs 100% organiques.

Dans une première partie, notre étude s'est focalisée sur la préparation de NPs hybrides. Ces NPs sont constituées d'un cœur de silice recouvert de xylane, sur lequel des PS sont préalablement greffés de manière covalente. Le conjugué xylane-PS est fixé sur la NP de silice par des liaisons ioniques (figure 35). Le choix de la silice est basé sur sa biocompatibilité et sa facilité de synthèse avec une taille, une forme et une charge de surface contrôlables.

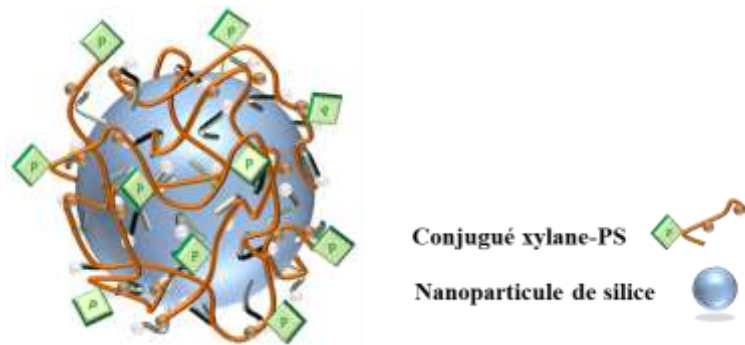


Figure 35: Les NPs hybrides à base de xylane-PS.

Nous nous sommes intéressés, dans une deuxième partie, à l'élaboration de NPs 100% organiques. Pour ce faire, nous avons envisagé deux approches :

La première est un autoassemblage du conjugué xylane-PS rendu amphiphile par greffage de groupements acétyles (figure 36).

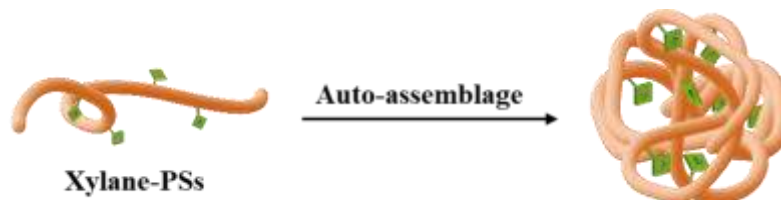


Figure 36: Autoassemblage du conjugué xylane-PS en NPs.

La deuxième méthode consiste à encapsuler des PS chargés positivement par interactions ioniques avec le xylane chargé négativement préalablement acétylé (figure 37).

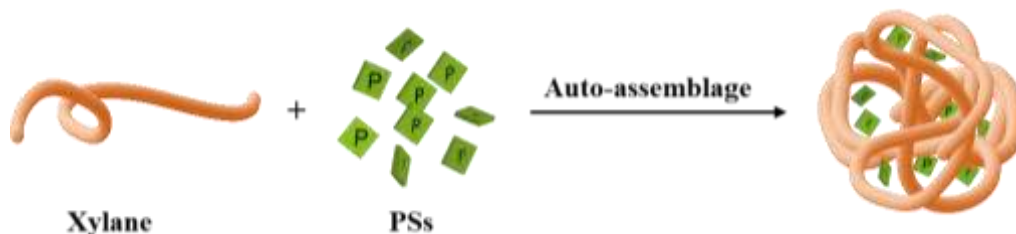


Figure 37: Encapsulation de PS dans des NPs de xylane acétylé.

Rappelons qu'il est également important que la mort cellulaire initiée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), générées par le PS suite à l'irradiation lumineuse, soit de type apoptotique.

Pour cela, les PS sont fonctionnalisés avec le cation TPP dans le but de cibler les mitochondries, organe responsable de la régulation de la mort cellulaire par apoptose.

Enfin, la cytotoxicité des PS, seuls ou liés sur les NPs, avec ou sans cation TPP, est évaluée par des tests biologiques *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses du cancer colorectal.

Résultats de discussions

Chapitre I : Préparation de nanoparticules hybrides inorganiques/organiques pour la vectorisation de porphyrine

I. Introduction

Les nanoparticules hybrides inorganiques/organiques sont généralement composées d'un cœur inorganique (or, silice, oxyde métallique...) sur lequel sont greffées des molécules organiques (polysaccharides, protéines...). La fonctionnalisation des nanoparticules inorganiques avec des polymères, notamment des polysaccharides, a été utilisée, d'une part, pour améliorer leur biocompatibilité et stabilité dans le milieu physiologique [164], et d'autre part pour concevoir des nanoparticules multifonctionnelles [165] (multiples modalités de traitements, théranostique, relargage contrôlé de principes actifs). Les polysaccharides sont fixés par liaisons covalentes ou ioniques, et les principes actifs peuvent être fixés sur la partie organique comme sur la partie inorganique [166,167,168,169].

Dans ce chapitre, notre étude s'est focalisée sur l'élaboration de nanoparticules hybrides inorganiques/organiques à base de xylane pour la vectorisation de porphyrines. Ces nanoparticules sont formées de nanoparticules de silice non poreuses enrobées de xylane. En effet, les nanoparticules de silice non poreuses présentent l'avantage d'être facilement synthétisées par la méthode de Stöber, sans utilisation des surfactants qui peuvent provoquer une cytotoxicité, s'ils ne sont pas complètement éliminés par les méthodes d'extraction classique [170]. Nous avons choisi d'utiliser un 4-*O*-méthylglucuronoxylane commercial extrait du hêtre, car sa structure est caractéristique des xylanes de bois de feuillus que nous souhaitons valoriser au travers de cette étude.

II. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse des nanoparticules hybrides comporte trois étapes. Dans un premier temps, le xylane est fonctionnalisé par des porphyrines selon une réaction d'estérification formant un conjugué xylane-porphyrine. La deuxième étape consiste à préparer des nanoparticules de silice et à modifier leur charge de surface en y greffant des groupements ammoniums. Ces derniers permettront, lors d'une troisième étape, de fixer à leur surface le xylane par interactions ioniques grâce aux résidus d'acides glucuroniques présents sur le polymère (figure 38).

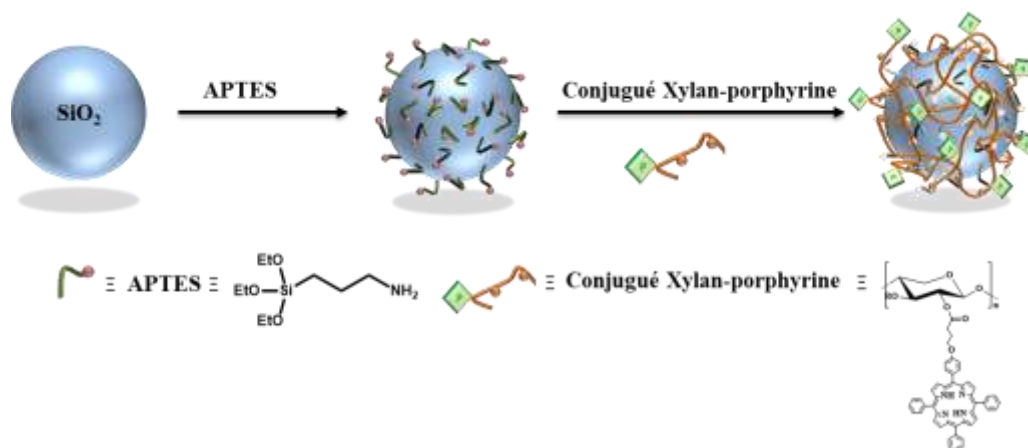


Figure 38: Stratégie de synthèse des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine.

Un deuxième type de nanoparticules hybrides portant une porphyrine fonctionnalisée avec un cation triphénylphosphonium est préparé dans le but de cibler les mitochondries afin d'accroître l'efficacité du PS et d'initier une mort cellulaire par apoptose (figure 39).

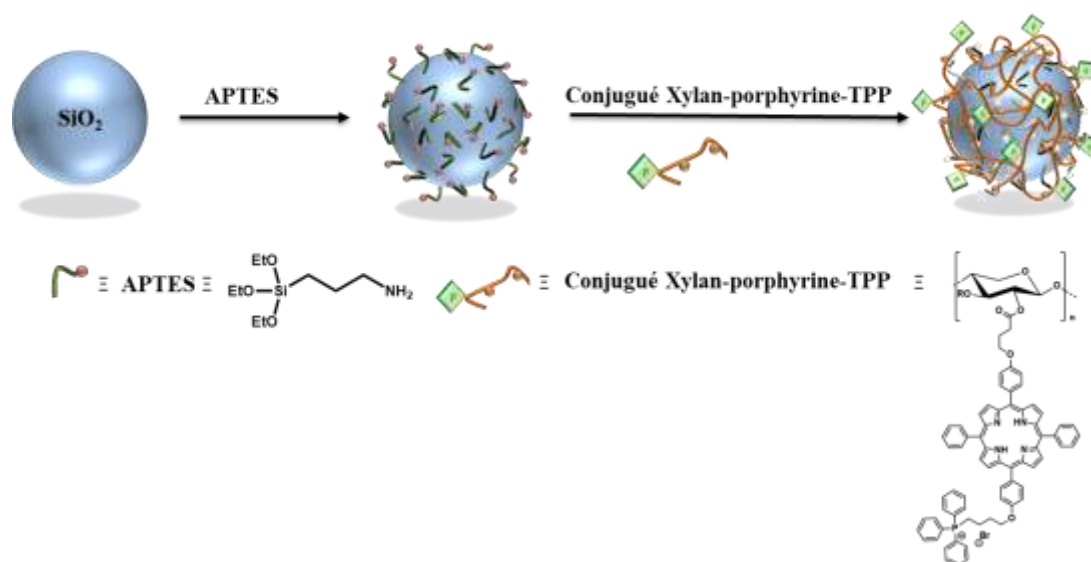


Figure 39: Stratégie de synthèse des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine-TPP.

III. Synthèse de nanoparticules de silice (SNPs)

Les nanoparticules de silice sont préparées par le procédé sol-gel selon une méthode de Stöber [134]. Rappelons que cette méthode permet de préparer des nanoparticules de silice par condensation/polymérisation d'alkoxysilane, ici l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS), en présence de l'ammoniaque comme catalyseur. En faisant varier les concentrations des réactifs et la température de réaction, nous avons réussi à synthétiser des nanoparticules monodisperses de taille 80 nm, 150 nm et 250 nm. Comme indiqué précédemment, les nanoparticules de taille comprise entre 20 et 100 nm présentent le plus fort potentiel pour les applications *in vivo*. En

effet, ces nanoparticules sont suffisamment grosses pour éviter la clairance rénale et assez petite pour éviter l'opsonisation. Nous avons donc choisi d'utiliser les nanoparticules de 80 nm dans la suite de ce travail.

Les nanoparticules de silice de 80 nm sont préparées en se basant sur une méthode de Stöber modifiée [171]. La synthèse de nanoparticules se fait en absence d'eau. En effet, pour produire de petites nanoparticules de silice, de faibles concentrations d'ammoniaque et d'eau doivent être utilisées. La taille des particules peut également être diminuée en augmentant la température de réaction [172]. Le TEOS et l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH à 28%) sont ajoutés successivement et goutte à goutte à l'éthanol absolu, puis laissés sous agitation magnétique pendant 4h à 50°C. Après plusieurs lavages à l'éthanol, les nanoparticules sont conservées en suspension dans l'éthanol.

Les nanoparticules obtenues sont caractérisées par spectroscopie DLS (Diffusion de la lumière dynamique) (tableau 2).

Tableau 2 : Analyse DLS des nanoparticules de silice

Échantillon	Taille moyenne (nm)	PDI	Potentiel zêta (mv)
SNPs	78,43±19,92	0,036	-37,5

L'analyse DLS montre que les nanoparticules présentent une taille moyenne de 80 nm. L'indice de polydispersion (PDI) est inférieur à 0,3 ce qui montre que les nanoparticules sont de tailles monodisperses. Elles présentent également une valeur moyenne du potentiel zêta de l'ordre de -37 mV. Cette valeur caractérise la présence de charges négatives à la surface des nanoparticules de silice due aux groupements silanols (Si-OH).

Ces résultats sont confirmés par des observations au microscope électronique à transmission (MET). Les images montrent que les nanoparticules obtenues sont de tailles monodisperses et de forme sphérique (figure 40).

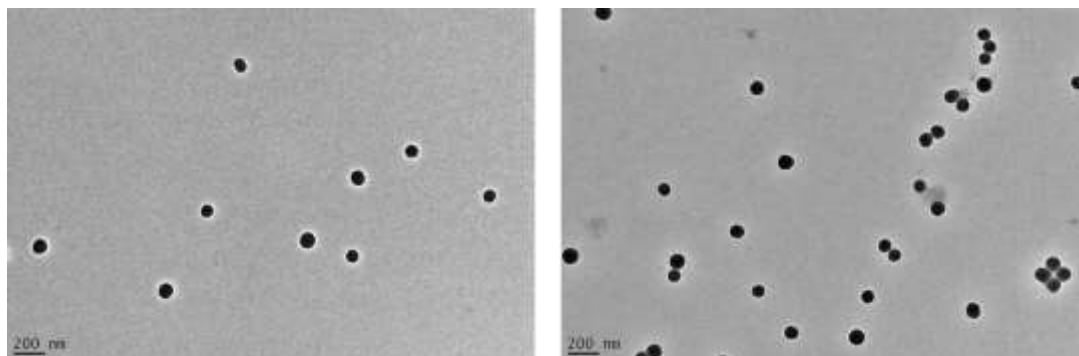


Figure 40: Images MET des SNPs.

IV. Modification de nanoparticules de silice par le 3-aminopropyltriéthoxysilane

Afin de permettre la fixation du xylane à la surface des nanoparticules de silice, ces dernières ont été fonctionnalisées par des groupements amines permettant de former des liaisons ioniques avec les acides glucuroniques du xylane. Pour cela, les nanoparticules de silice ont été fonctionnalisées par le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

La surface de la silice est constituée de deux groupements, les siloxanes (Si-O-Si) et les silanols (Si-OH). Les siloxanes ne sont pas impliqués dans les réactions de fonctionnalisation, car la liaison Si-O-Si est très forte, et demande une énergie élevée pour la rompre. En effet, seuls les groupements silanols contribuent à la modification de la surface de la silice.

La fonctionnalisation de la surface de nanoparticules de silice par l'APTES se fait selon le même mécanisme sol-gel, en faisant réagir les groupements silanols de la surface de la silice (figure 41).

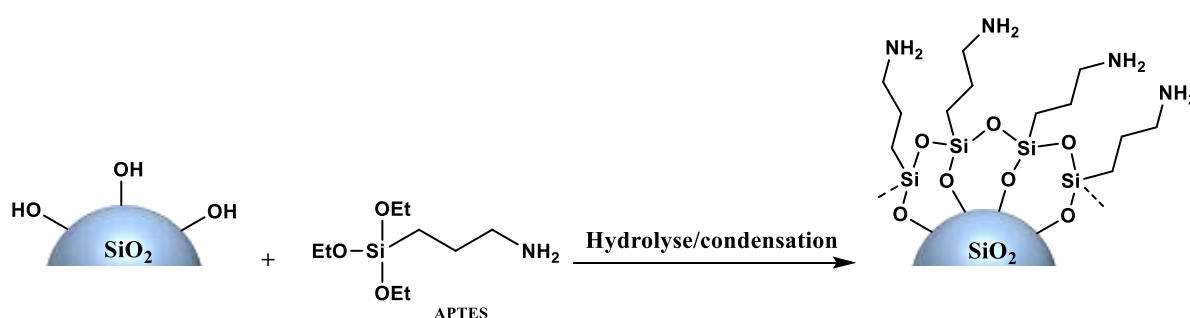


Figure 41: Fonctionnalisation des nanoparticules de silice par l'APTES.

Cette réaction est réalisée en ajoutant l'APTES goutte à goutte, sur la suspension de nanoparticules de silice dans l'éthanol à 96%. Le mélange est agité magnétiquement pendant 24 h. Les nanoparticules sont recueillies par centrifugation et lavées plusieurs fois à l'éthanol. La modification de surface des SNPs a été confirmée par mesure du potentiel zêta. Les résultats

montrent la présence de charges positives à la surface des SNPs dues aux groupes ammonium fournis par l'APTES (tableau 3).

Tableau 3 : potentiel zêta des SNPs après greffage de l'APTES

Échantillon	Taille moyenne	Potentiel zêta (mv)
SNPs-APTES	80,11±18,90	+ 35,4

Les analyses DLS et MET (figure 42) ne montrent pas de changement significatif de taille par rapport aux nanoparticules de départ.

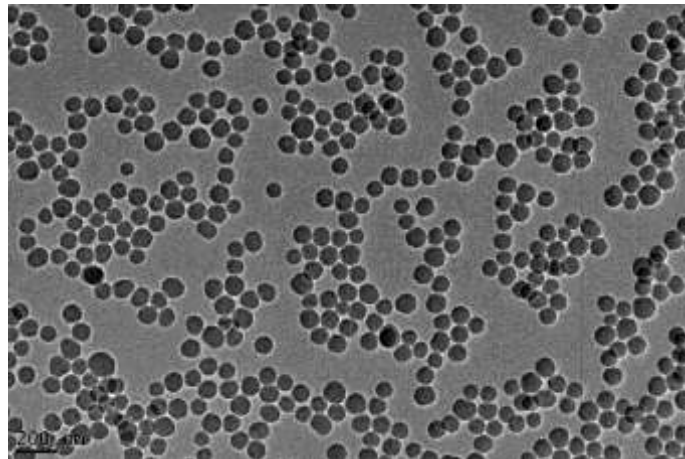


Figure 42: Image MET des SNPs-APTES.

Les SNPs-APTES seront enrobées, par la suite, avec le xylane fonctionnalisé par des porphyrines. Avant de présenter la procédure de fonctionnalisation du xylane avec les porphyrines, nous présenterons d'abord la structure et la caractérisation du xylane étudié.

V. Structure et caractérisation du xylane étudié

De manière préliminaire, afin de mieux appréhender les éléments de structure ainsi que le potentiel de modification chimique des xylanes, une classe d'hémicellulose, nous nous proposons de présenter brièvement quelques généralités sur cette famille importante de polysaccharides.

V.1. Les différentes hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent, le polysaccharide du bois le plus abondant après la cellulose. Elles regroupent tous les polysaccharides pariétaux autres que la cellulose et les pectines. Elles diffèrent de la cellulose par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique. Généralement, les hémicelluloses sont constituées de chaîne plus courte avec un degré de polymérisation souvent inférieur à 200. Elles sont généralement constituées d'un axe osidique

principal sur lequel sont greffées des chaînes latérales variables. La chaîne principale d'une hémicellulose peut être constituée d'un seul type d'ose (homopolymère) ou de plusieurs oses différents (hétéropolymère).

Les hémicelluloses possèdent une diversité structurale importante en fonction de leur origine, et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles regroupent des polysaccharides de différentes structures contenant des pentoses, des hexoses, des désoxyhexoses, ainsi que des acides glucuroniques liés entre eux par des liaisons glycosidiques variables. En fonction de leur composition en sucres, les hémicelluloses sont divisées en quatre familles : les xylanes, les mannanes, les xyloglucanes et les glucanes. De manière générale, les hémicelluloses formées d'hexoses se trouvent dans les résineux, alors que celles constituées de pentoses dans les feuillus [173]. Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires dans le bois de feuillus tandis que les galactomannanes sont les polysaccharides dominants chez les résineux.

V.2. Structure des xylanes

Les xylanes sont formés d'une chaîne linéaire d'unité D-xylopyranosyl (D-Xylp) liées par des liaisons glycosidiques β -(1→4), avec un degré de polymérisation souvent entre 100 et 200. Le squelette d'unité xyloses forme une hélice gauche à 3 unités xyloses par tour [174]. La conformation en hélice du xylane est stabilisée par une seule liaison hydrogène intramoléculaire, entre l'hydrogène du groupement hydroxyle en position 3 d'un xylose et l'oxygène en position 5 du xylose suivant [175].

Il existe plusieurs types de xylanes qui diffèrent selon la nature et la position des substituants sur la chaîne principale de xylose. Ils peuvent être regroupés en deux grandes familles : les homoxylanes, formés quasi exclusivement de xylose, et les hétéroxylanes. Dans la famille des hétéroxylanes, on distingue, les glucuronoxylanes (GX), les arabinoglucuronoxylanes (AGX), les arabinoxylanes (AX), et les glucuronoarabinoxylanes (GAX) [176].

Dans les bois de feuillus, l'hémicellulose la plus abondante est un 4-*O*-méthyl-D-glucuronoxylanes, partiellement acétylé (O-acétyl-4-*O*-méthyl-D-glucurono-xylanes) sur les carbones C2 et C3 du xylose. C'est un glucuronoxylane (GX) constitué d'une chaîne principale d'unités anhydroxyloses substituée par l'acide 4-*O*-méthyl-D-glucuronique (MeGA), lié par une liaison α -1,2 sur la chaîne de xylose (figure 43).

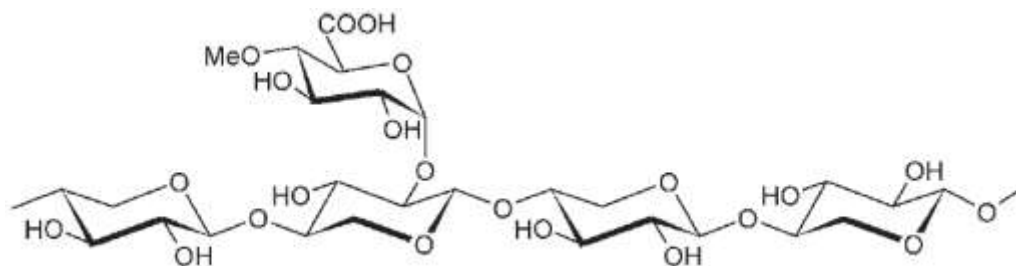


Figure 43: Structure de 4-*O*-méthyle-D-glucurono-xylanes (MeGX).

Le ratio molaire MeGA : Xylose varie entre 1:4 et 1:16, selon l'espèce végétale et les conditions d'extractions [176]. De plus, les données disponibles dans la littérature concernant la distribution des acides glucuroniques semblent indiquer que l'acide 4-*O*-méthylglucuronique est positionné de façon irrégulière et aléatoire sur la chaîne principale de xylane. En effet des oligosaccharides neutres de 18 unités xylose ont été isolés à partir du bois de bouleau, alors que le rapport MeGA/Xylose est d'environ 1/10 [177]. Par ailleurs l'analyse d'un xylane extrait de l'écorce de saule contenant en moyenne un acide glucuronique pour six résidus xylose, a révélé une structure formée d'une alternance de zones non substituées et de zones à l'intérieur desquelles les unités d'acides glucuroniques sont distribuées régulièrement [178].

V.3. Caractérisation du 4-*O*-méthyl-glucuronoxylane du bois de hêtre

Les travaux réalisés au laboratoire PEIRENE [179] sur le xylane de hêtre ont montré que ce polysaccharide présente un degré de polymérisation de 208, calculé par dosage des sucres réducteurs (en faisant le rapport entre la quantité de sucres totaux et la quantité de sucres réducteurs). La composition de ce xylane a été caractérisée par dosage colorimétrique ; il contient 92,5% d'oses neutres et 7,5% d'acides glucuroniques. Une analyse RMN effectuée sur ce xylane confirme la présence d'acides glucuroniques et permet de déterminer le DS en acides glucuroniques. La figure 44 illustre le spectre RMN ^1H du xylane modèle dans le D_2O .

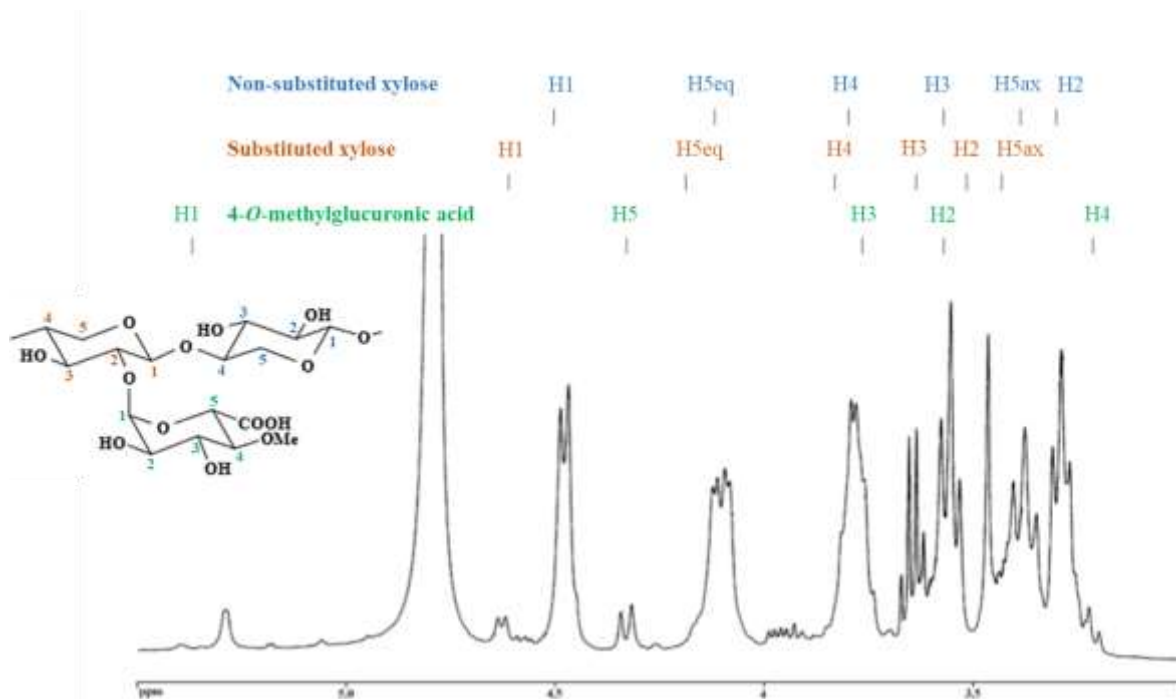


Figure 44: Spectre RMN ^1H du xylane de hêtre natif (dans D_2O)

Le spectre obtenu mis en évidence des signaux intenses correspondants aux protons des unités xylose non substituées, ainsi que des signaux attribués aux unités acides glucuroniques et aux xyloses qui les portent. Les protons anomériques des unités xylose apparaissent sous forme de doublets à 4,5 ppm pour les xyloses substituées et 4,6 ppm pour les non substitués. Ces doublets ont une constante de couplage d'environ 7 Hz caractéristique des liaisons osidiques de type β . Les protons anomériques des acides glucuroniques présentent un doublet à 5,3 ppm avec une constante de couplage d'environ 2 Hz caractéristique d'une liaison osidique de type α . Ces spectres ont permis de calculer le degré de substitution des xylanes en acide glucuronique, en faisant le rapport entre l'intégration du proton anomérique de l'acide 4-*O*-méthyl-glucuronique (H1 MeGA) et la somme des intégrations des protons anomériques des unités xyloses substituées et non substituées (équation 1).

$$(1) \quad DS = \frac{\text{H1 MeGA}}{\text{H1 xylose substitué} + \text{H1 xylose non substitué}}$$

L'analyse RMN ^1H nous a permis donc de calculer le degré de substitution du xylane de hêtre en acide glucuronique. En effet, celui-ci contient un acide glucuronique pour dix unités xyloses. Le motif de répétition du xylane de hêtre est composé donc de dix unités xylose et un acide glucuronique.

Après avoir présenté la structure des xylanes, passons maintenant à la synthèse de la porphyrine et son greffage sur le xylane.

VI. Fonctionnalisation du xylane de hêtre par la monohydroxyphénylporphyrine

VI.1. Synthèse de la monohydroxyphénylporphyrine

La première étape consiste à synthétiser la porphyrine monohydroxylée. Rappelons qu'il existe plusieurs méthodes de synthèse des mésoarylporphyrines conduisant à des porphyrines de structures et de fonctionnalisation différentes. Nous citerons la méthode de Rothemund, la méthode de Little ou encore la méthode de Lindsey. La méthode la plus adaptée à la synthèse de la monohydroxyphénylporphyrine est celle de Little ou encore appelée méthode des aldéhydes mixtes [180,181] (figure 45).

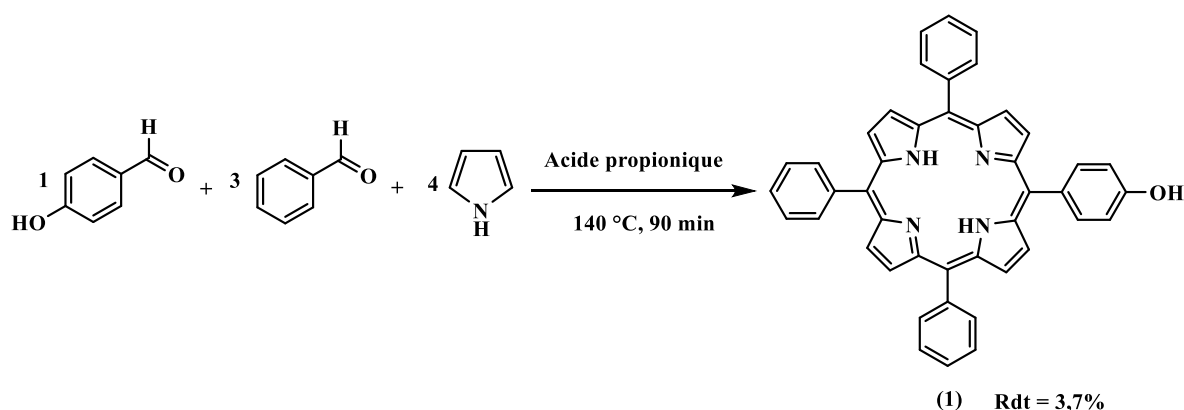


Figure 45: Synthèse de la monohydroxyphénylporphyrine (1) par la méthode des aldéhydes mixtes.

Cette méthode consiste à condenser, au reflux de l'acide propionique, le pyrrole sur un mélange de benzaldéhyde et de 4-hydroxybenzaldéhyde. Les quantités stœchiométriques employées permettent de former un mélange de mésoporphyrines : la tétraphénylporphyrine, la porphyrine monohydroxylée (1) et des petites quantités de porphyrines polyhydroxylées. Après purification sur colonne de silice, la porphyrine monohydroxylée (1) est obtenue avec un rendement molaire de 3,7%. Ce rendement est conforme à la littérature et s'explique par la formation des autres mésoporphyrines et par la réaction de polymérisation du pyrrole.

La structure de la porphyrine (1) est confirmée par spectroscopie RMN ^1H et UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H , les signaux des deux groupes de protons β -pyrroliques à 8,87 (d, 2H) et à 8,83 ppm (s, 6H) sont caractéristiques d'une porphyrine mono-substituée. De plus, la présence d'un signal à -2,00 ppm confirme que cette porphyrine est bien sous sa forme base libre. Le spectre d'absorption UV-Visible présente le profil attendu pour une porphyrine base libre avec une bande de Soret à 419 nm, ainsi que quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 647, 598, 556 et 518 nm.

VI.2. Alkylation de la monohydroxyphénylporphyrine par le 4-bromobutyrate d'éthyle

La fonctionnalisation de la monohydroxyphénylporphyrine par le 4-bromobutyrate d'éthyle est réalisée suivant le protocole décrit par Chaleix et coll. [182]. La réaction est effectuée par activation micro-onde dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) à 120°C en présence de K₂CO₃ (figure 46).

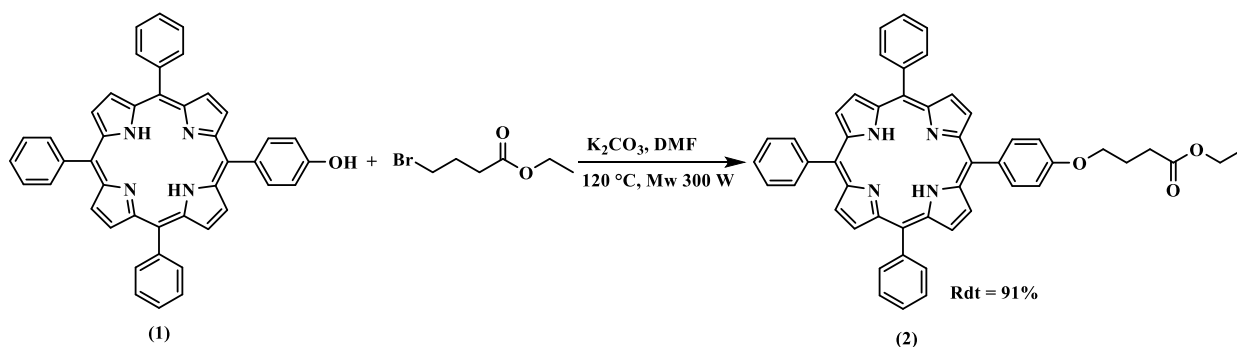


Figure 46: étherification de la monohydroxyphénylporphyrine par le 4-bromobutyrate d'éthyle.

L'étherification se fait selon la réaction de Williamson classique formant un éther-oxyde par une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2, entre le bromobutyrate et l'hydroxyle de la porphyrine. La réaction est réalisée à l'aide d'un four micro-ondes multimode de laboratoire à 300 W sous agitation magnétique, et suivi par CCM. La porphyrine de départ a disparu au bout de sept activations de cinq minutes. Après purification sur colonne de silice, le produit désiré (2) est obtenu avec un rendement molaire de 91%.

La structure de la porphyrine (2) est confirmée par spectroscopie RMN¹H et UV-Visible. Sur le spectre RMN¹H, la présence des 6 protons du bras à 4,25 ppm, 2,66 ppm et 2,27 ppm ainsi que des 5 protons du groupement ester à 4,22 ppm et 1,32 ppm confirme le greffage du bras ester. Le spectre d'absorption UV-Visible est similaire à celui de la porphyrine (1), avec une bande de Soret à 420 nm et quatre bandes Q I, II, III, et IV respectivement à 649, 591, 553 et 519 nm.

VI.3. Saponification de la porphyrine (2)

La saponification de la porphyrine (2) est réalisée dans le DMF à 100°C pendant 2 h en présence de NaOH (figure 47), selon une procédure classique. En fin de réaction, le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 12M. Ce traitement permet de protoner les ions carboxylates formés et d'éliminer le reste de NaOH sous forme de NaCl. Après purification, la porphyrine (3) est obtenue avec un rendement molaire de 96%.

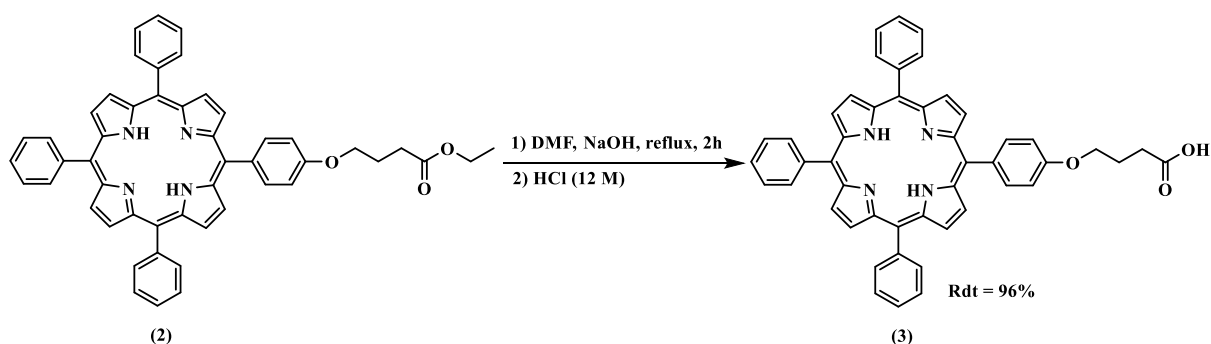


Figure 47: Réaction de saponification de la porphyrine **2**.

La structure de la porphyrine **3**, nommée par la suite TPPOH est confirmée par RMN¹H (figure 48).

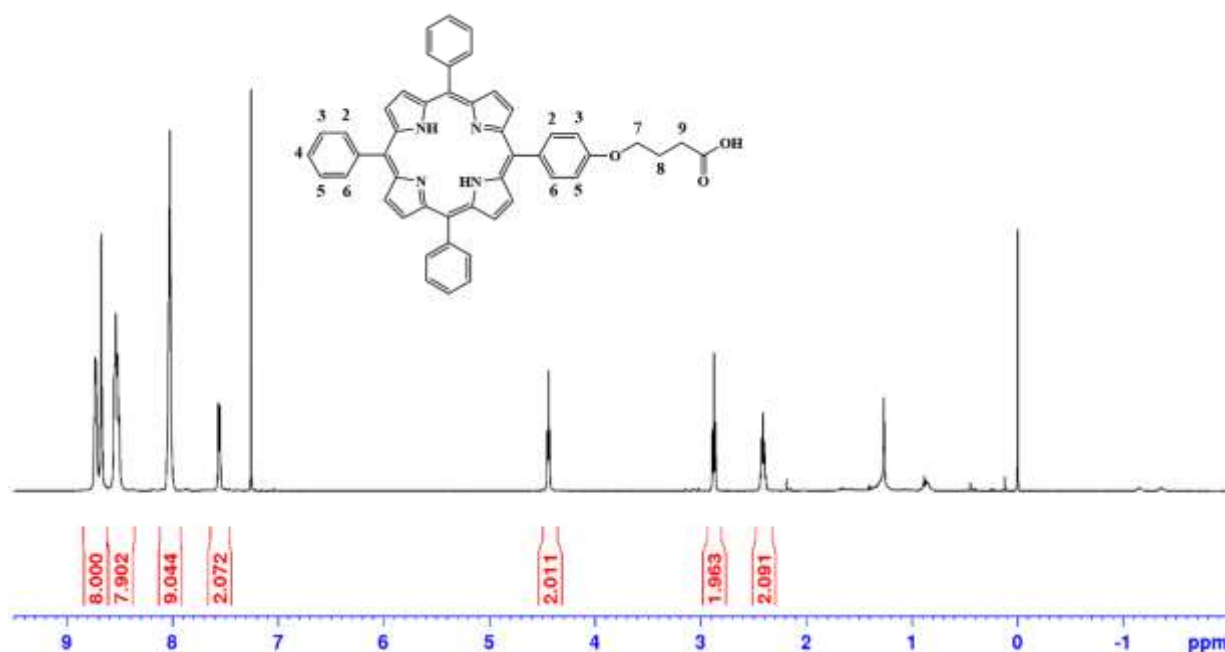


Figure 48: Spectre RMN¹H de la TPPOH dans CDCl₃/TFA.

Sur le spectre RMN¹H, on voit les signaux des 8 protons β-pyrroliques à 8,7 ppm, des 8 protons H2 et H6 des phényles et aryle à 8,53 ppm, des 9 protons H3, H4 et H5 des phényles à 8,02 ppm, des 2 protons H3 et H5 aryle à 7,56 ppm et les 6 protons H7, H8 et H9 du bras respectivement à 4,44, 2,39 et 2,87 ppm. De plus, la disparition des signaux caractéristiques de l'ester éthylique confirme le succès de la saponification. Le spectre UV-Visible, quant à lui, est proche de celui de la porphyrine (**2**), avec une bande de Soret à 420 nm et quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 647, 591, 553 et 516 nm.

VI.4. Greffage par estérification de la TPPOH sur le xylane

L'estérification des xylanes peut être effectuée par plusieurs méthodes utilisant, entre autres les chlorures d'acides, les anhydrides d'acides ou encore des agents de couplage tels que DCC, EDC/NHS, DIC, ou encore CDI qui est le plus étudié dans la littérature. De plus, l'utilisation de chlorure d'acide nécessite de travailler sous atmosphère inerte pour éviter sa dégradation. La méthode qui semble être plus douce et la plus facile à mettre en place est celle utilisant des agents de couplages.

Le protocole décrit par Heinze et al. [157] a été adopté. Ce protocole décrit l'utilisation du *N,N*-carbonyldiimidazole (CDI) comme agent de couplage pour l'estérification du xylane avec l'ibuprofène. Ainsi, nous avons adapté ce mode opératoire à l'estérification du xylane par la TPPOH.

Le xylane de hêtre n'étant pas complètement soluble dans le DMSO, une étape de solubilisation est nécessaire. Pour ce faire, 1g de xylane ont été solubilisés dans 20 mL de DMSO pendant 24h à 60 °C. Puis, la solution obtenue est filtrée afin d'éliminer la fraction insoluble. Pour déterminer la concentration de cette solution, 1 mL a été précipité avec 3 mL d'éthanol absolu, filtré puis séché sous vide. La masse de xylanes précipitée est de 45 mg. La solution de xylane dans le DMSO a une concentration de 45 mg / mL. Cette solution de xylane dans le DMSO qui sera ensuite utilisée pour la réaction d'estérification.

L'estérification du xylane de hêtre commence par une étape d'activation de la TPPOH avec 1 équivalent de CDI dans le DMSO, pendant 24h à température ambiante. Après activation de la TPPOH, l'équivalent de 100 mg de xylane dans le DMSO est ajouté au milieu réactionnel (figure 49). Pour des raisons de lisibilité, nous avons choisi une représentation schématique simplifiée du xylane, sous forme d'une unité xylose.

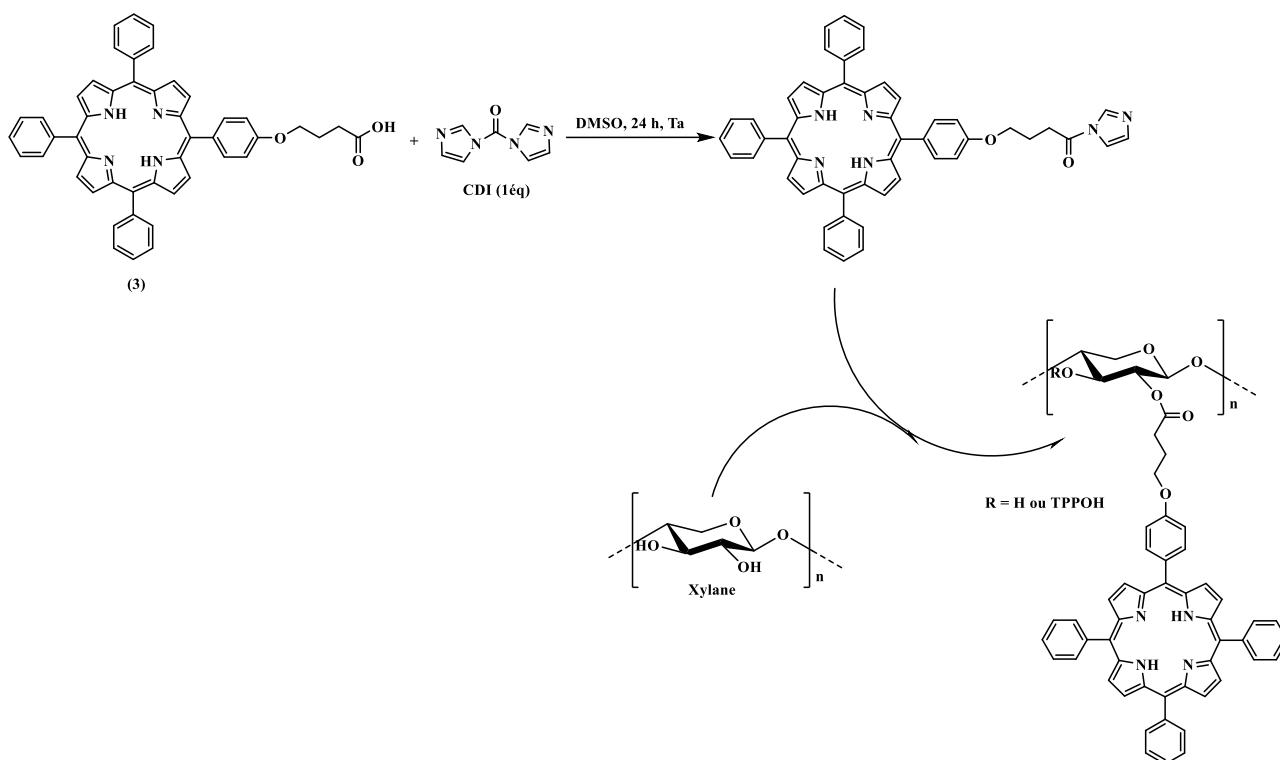


Figure 49 : Greffage de la TPPOH sur le xylane en présence de CDI.

À la fin de la réaction, le produit obtenu est précipité et lavé à l'éthanol puis au chloroforme pour éliminer la porphyrine qui n'a pas réagi, puis séché sous vide.

La fixation de la TPPOH sur le xylane de hêtre a été confirmée par analyse par spectrométrie infrarouge. La figure 50 présente les spectres correspondant au xylane de hêtre natif et modifié.

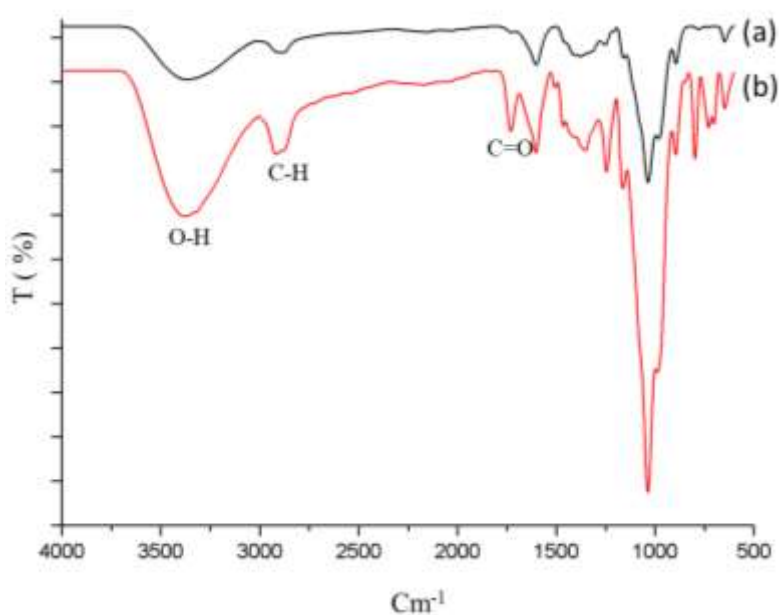


Figure 50: Spectres IR du xylane de hêtre natif (a) et modifié par la TPPOH (b).

Le spectre du xylane modifié laisse apparaître une bande intense à 1739 cm^{-1} démontrant la formation des liaisons ester, ce qui permet de conclure que la fixation de la porphyrine sur le xylane a bien été réalisé.

Les résultats de l'infrarouge ont été confirmés par une analyse RMN du proton du xylane modifié. Le spectre obtenu (figure 51) permet de distinguer deux zones principales. La première correspond aux protons du xylane qui résonnent entre 3 et 5,5 ppm, la deuxième est attribuée aux protons de la porphyrine greffée sur le xylane qui résonnent entre 7 et 9 ppm. Les deux protons portés par les azotes des pyrroles résonnent à -3 ppm.

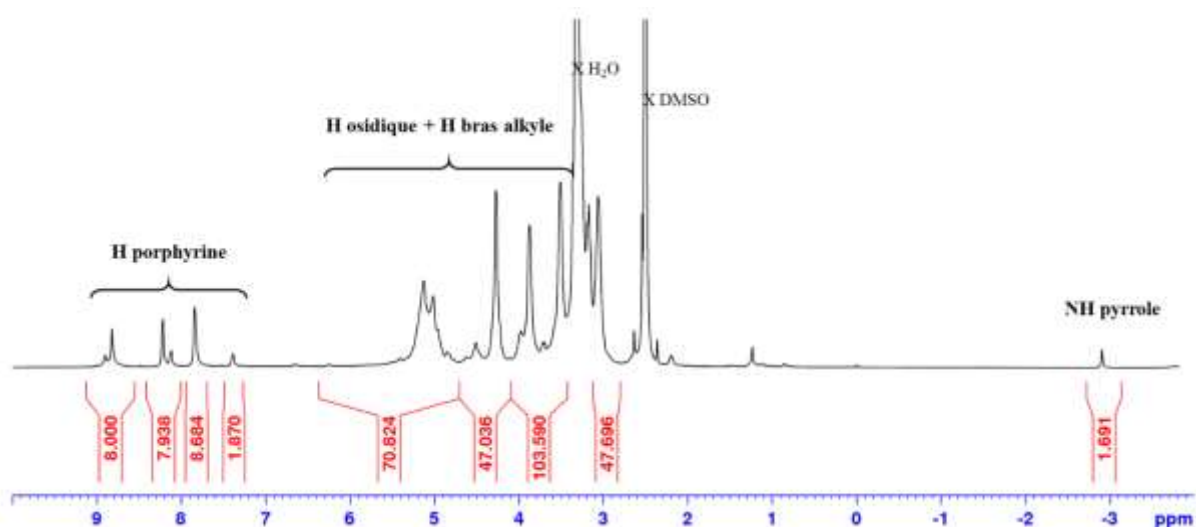


Figure 51: Spectre RMN du xylane de hêtre modifié (dans DMSO)

Le spectre RMN ^1H du xylane modifié a permis de calculer le degré de substitution du xylane en TPPOH, en faisant le rapport entre l'intégration d'un proton porphyrinique et l'intégration d'un proton d'une unité xylose. Nous avons choisi d'exprimer le DS en nombre de molécules de porphyrine par unité de répétition de xylane (10 xyloses). Il est calculé à partir de l'équation (2) :

$$(2) \quad DS = \frac{H(\text{TPPOH})/27}{H1(\text{xylane})/10}$$

H (TPPOH) correspond à la somme des intégrations des protons entre 7,26 et 9,12 ppm, et H1 (xylane) est la somme des intégrations des protons anomériques d'unités xylose substituées et non substituées à 4,12 et 4,7 ppm. La porphyrine possède 27 protons aromatiques et le motif de répétition du xylane comporte 10 unités xylose. Les déplacements chimiques des protons anomériques du xylane ont été préalablement déterminés par HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence). Cette technique de RMN bidimensionnelle permet de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié (spectre ^1H - ^{13}C).

VI.5. Plan d'expériences

Les réactions d'estérification sont principalement influencées par le temps de réaction, la température et le rapport molaire des réactifs. De plus, l'efficacité de la réaction d'estérification est exprimée par le degré de substitution (DS) et le gain de poids (GP). Afin de déterminer les conditions optimales et d'étudier les variations du degré de substitution et du gain de poids en fonction des facteurs influençant l'estérification, un plan d'expériences a été construit. Parmi les différentes approches proposées, nous avons choisi de travailler avec un plan en carré gréco-latin, en raison de sa facilité de mise en œuvre. Les facteurs choisis sont alors : la température de la réaction, la durée de la réaction, ainsi que le nombre d'équivalents en TPPOH. Pour chaque facteur, nous avons sélectionné trois modalités distinctes. Le choix des facteurs et leurs modes sont répertoriés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Définition des facteurs et des modalités.

Facteurs	Température (°C)			Temps (h)			Équivalent de TPPOH		
	Modes	20	50	80	8	24	48	0,05	0,1
Modes	20	50	80	8	24	48	0,05	0,1	0,2

L'ensemble des combinaisons réalisables des facteurs et de leurs modalités définit le domaine expérimental. Pour trois facteurs, il faudrait effectuer 27 expériences pour explorer l'ensemble du champ expérimental ($N_{\text{total}} = 3^3 = 27$). L'utilisation du carré latin permet de réduire le nombre d'expériences à réaliser tout en gardant la possibilité d'étudier tous les facteurs. De cette manière, seules neuf expériences seront réalisées en appliquant les conditions expérimentales résumées dans le tableau 5.

Tableau 5: Plan d'expérimentations

Échantillons	Temps (h)	T (°C)	TPPOH (éq./mg)
S1	8	20	0,1/50
S2	8	50	0,05/25
S3	8	80	0,2/100
S4	24	20	0,05/25
S5	24	50	0,2/100
S6	24	80	0,1/50
S7	48	20	0,2/100
S8	48	50	0,1/50
S9	48	80	0,05/25

Cet arrangement est appelé arrangement orthogonal. Il consiste à faire intervenir chacun des facteurs un même nombre de fois suivant l'ensemble de ses modalités. Aucune modalité particulière n'est privilégiée : les effets moyens des facteurs sont donc estimés avec la même incertitude.

Pour les neuf échantillons, le DS et le gain de poids ont été mesurés et les valeurs obtenues sont répertoriées dans le tableau 6.

Tableau 6: Résultats d'expériences

Échantillon	Temps (h)	T (°C)	TPPOH (éq./mg)	DS	GP
S1	8	20	0,1/50	0,034	0
S2	8	50	0,05/25	0,073	1
S3	8	80	0,2/100	0,3	26
S4	24	20	0,05/25	0,077	6
S5	24	50	0,2/100	1,11	44
S6	24	80	0,1/50	0,31	29
S7	48	20	0,2/100	0,72	16
S8	48	50	0,1/50	0,4	27
S9	48	80	0,05/25	0,2	25

L'analyse globale des résultats montre que les modifications des modalités des facteurs ont un effet non négligeable sur le DS et le GP. Les résultats d'essais sont ensuite analysés à l'aide d'une grille de dépouillement, ce qui permet une analyse rapide des résultats sans avoir besoin d'outils informatiques spécifiques.

Nous détaillons uniquement la grille de dépouillement des résultats obtenus pour le DS (figure 52). La grille de dépouillement pour l'analyse du GP est construite de la même façon. Tout d'abord, on complète les cases correspondant aux combinaisons particulières des modalités des facteurs retenus dans le plan d'expériences, par les valeurs de la réponse à analyser, ici la valeur du DS. La zone de calcul, en bas du tableau, permet d'établir la moyenne arithmétique caractérisant chacune des modalités, pour chaque facteur.

Manip	DS	température			Temps (h)			TPPOH (éq.)		
		20	50	80	8	24	48	0,05	0,1	0,2
1	0,03	0,03			0,03				0,03	
2	0,08	0,08				0,08		0,08		
3	0,72	0,72					0,72			0,72
4	0,07		0,07		0,07			0,07		
5	1,11		1,11			1,11				1,11
6	0,40		0,40				0,40		0,40	
7	0,30			0,30	0,30					0,30
8	0,31			0,31		0,31			0,31	
9	0,20			0,20			0,20	0,20		
Total	3,22	0,83	1,58	0,81	0,41	1,50	1,32	0,35	0,74	2,13
Nombre	9,00	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Moyenne	0,36	0,28	0,53	0,27	0,14	0,50	0,44	0,12	0,25	0,71

Figure 52 : Grille de dépouillement pour le DS.

Les moyennes calculées sont utilisées pour construire le tracé des effets moyens des facteurs, en fonction des modalités des facteurs, qui constitue l'analyse graphique des résultats. Les figures 53 et 54 représentent les tracés des effets moyens des facteurs respectivement pour le DS moyen et le GP moyen. L'analyse de ces résultats montre que les trois facteurs ont une influence significative sur le DS et le GP.

Comme le montre la figure 53, l'augmentation du nombre d'équivalents en TPPOH entraîne une augmentation du DS, et cela, quels que soient la température et le temps de réaction. Ce dernier ne montre aucun effet significatif au-delà de 24h. De plus, les températures dépassant les 50 °C entraînent une chute du DS.

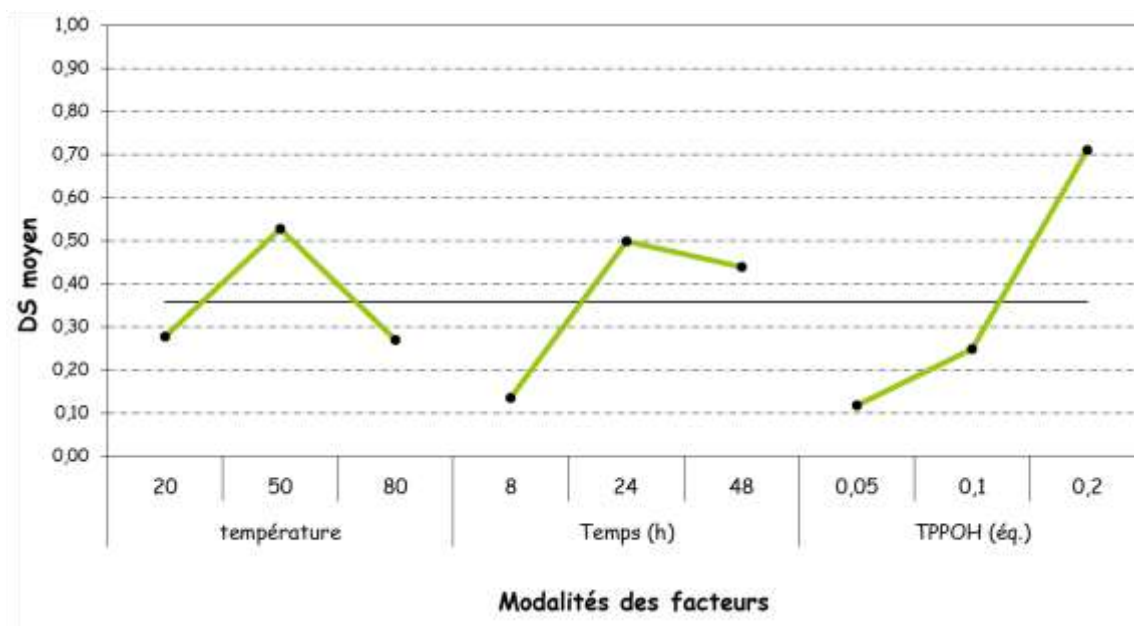


Figure 53: Tracé des effets moyens des facteurs pour le DS moyen

Par ailleurs, une augmentation de la quantité de porphyrine se traduit par une hausse du GP. Une légère augmentation du GP est observée au-delà de 24h de réaction. Cependant, des températures supérieures à 50 °C induisent une légère diminution du GP moyen, probablement dû à une dégradation du polysaccharide (figure 54).

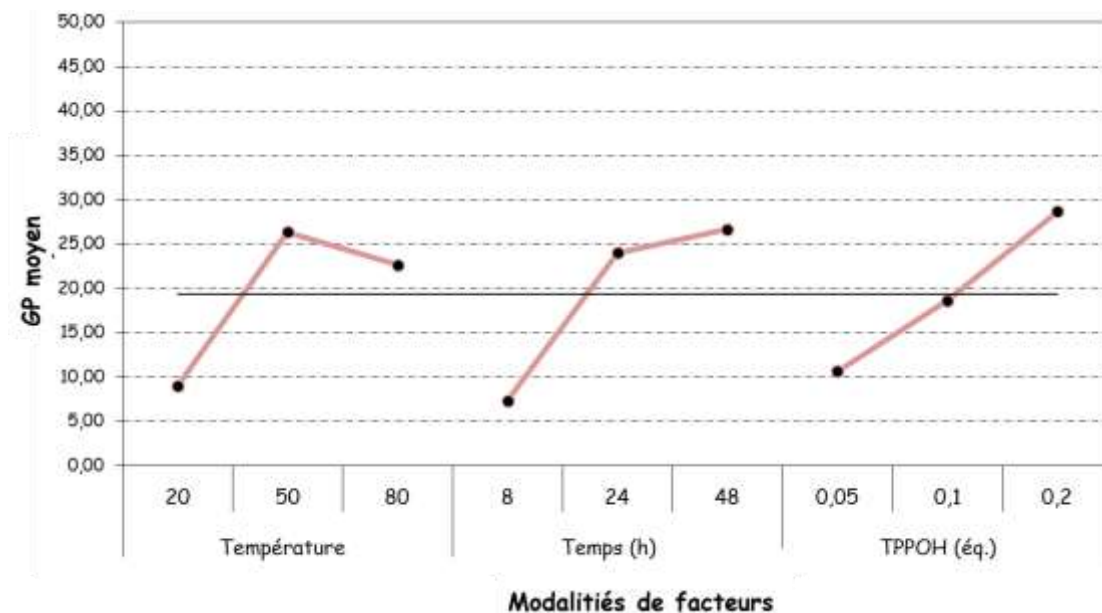


Figure 54: Tracé des effets moyens des facteurs pour le GP moyen

Neuf échantillons avec des degrés de substitution variables allant de 0,034 à 1,11 ont été obtenus à partir du plan d'expériences. Les polymères présentant un DS en porphyrine inférieur ou égale à 0,2 restent, comme le xylane natif, solubles dans l'eau. En revanche dès que le DS devient supérieur à 0,2 la solubilité dans l'eau diminue fortement. Les conjugués xyloxy-porphyrines solubles dans l'eau apparaissent comme les plus intéressants pour réaliser l'enrobage des nanoparticules de silice. (Les autres, moins solubles tireront profit de leurs structures plus riches en zones hydrophobes pour un autoassemblage en nanoparticules entièrement organiques, étudiées dans le chapitre II).

Le conjugué xylane-TPPOH sera noté XP par la suite.

VI.6. Enrobage de nanoparticules de silice par le conjugué xylane-TPPOH (XP)

Comme le montre le motif de répétition du xylane de hêtre le rapport xylose/acide méthyle-glucuronique est estimé à 10 : 1. De plus, il a été rapporté que la valeur de pKa pour les acides glucuroniques couramment présents sur les structures des xyloxy est comprise entre 3,2 et 3,7 [134]. Par conséquent, dans l'eau ultra pure (pH = 6,5), les groupes acides glucuroniques chargés négativement permettront la formation de liaisons ioniques entre le xylane et les

groupes ammoniums présents sur les nanoparticules de silice. En pratique, une suspension de nanoparticules de silice dans de l'éthanol a été ajoutée goutte à goutte à une solution de xylane-TPPOH dans de l'eau. Les nanoparticules obtenues ont été recueillies par centrifugation et le polymère non fixé a été éliminé par lavage plusieurs fois avec de l'eau. Le changement de couleur des nanoparticules de silice après revêtement avec le xylane-TPPOH est visible sur la figure 55. Les analyses MET ne montrent aucun changement significatif de la taille et de la forme des nanoparticules.

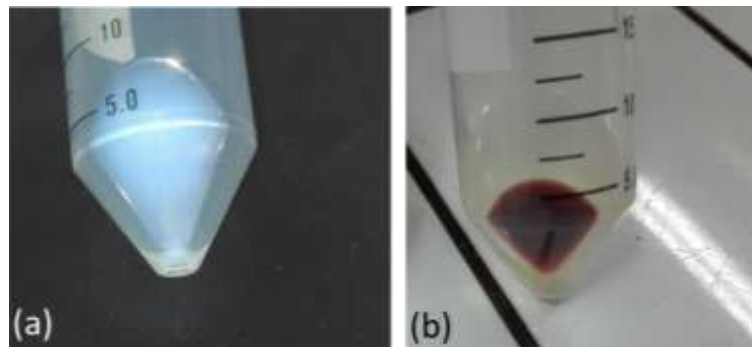


Figure 55: Changement de couleur des nanoparticules de silice après revêtement avec les xylanes-TPPOH
 (a) NPs de silice seules (b) NPs de silice-xylane-TPPOH (XP-SNPs).

VI.7. Analyses UV-visible du nano-objet XP-SNPs

La fonctionnalisation des SNPs avec XP a été confirmée par analyse UV-visible (figure 56), méthode spectroscopique qui permet également de doser la quantité de TPPOH fixée sur les nanoparticules de silice.

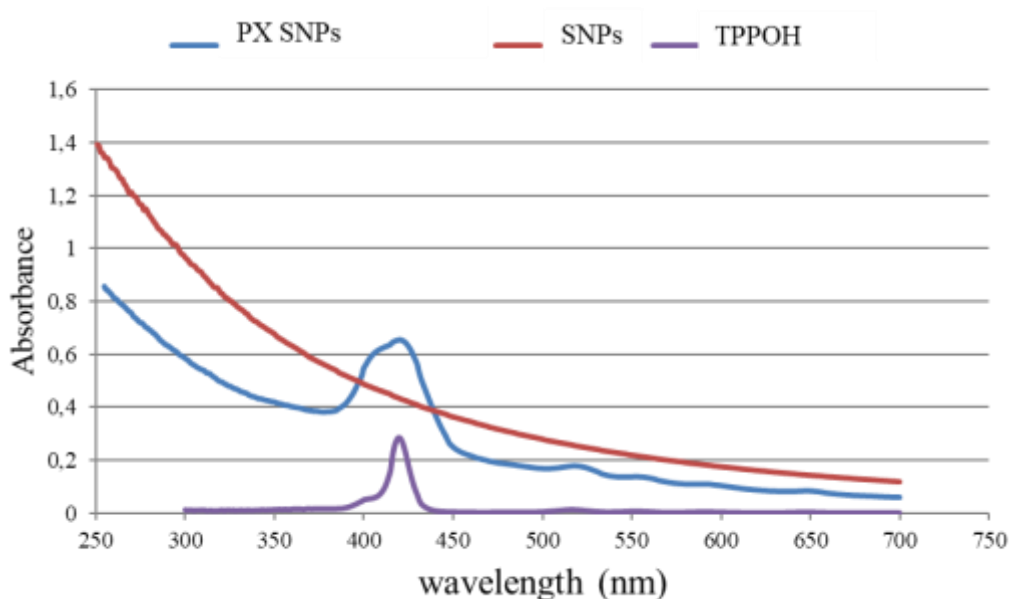


Figure 56: les spectres UV-Visible de la TPPOH, SNPs, et XP-SNPs.

Les XP-SNPs ont été dispersées dans de l'eau distillée à une concentration de 10 mg/mL et diluées à 0,5 mg/mL. L'absorbance de cet échantillon a été mesurée à 418 nm et l'absorbance des SNP a été soustraite. La quantité de XP fixé sur les SNPs a finalement été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage construite à partir des mesures d'absorbance réalisées pour le XP libre à diverses concentrations dans l'eau distillée (figure 57).

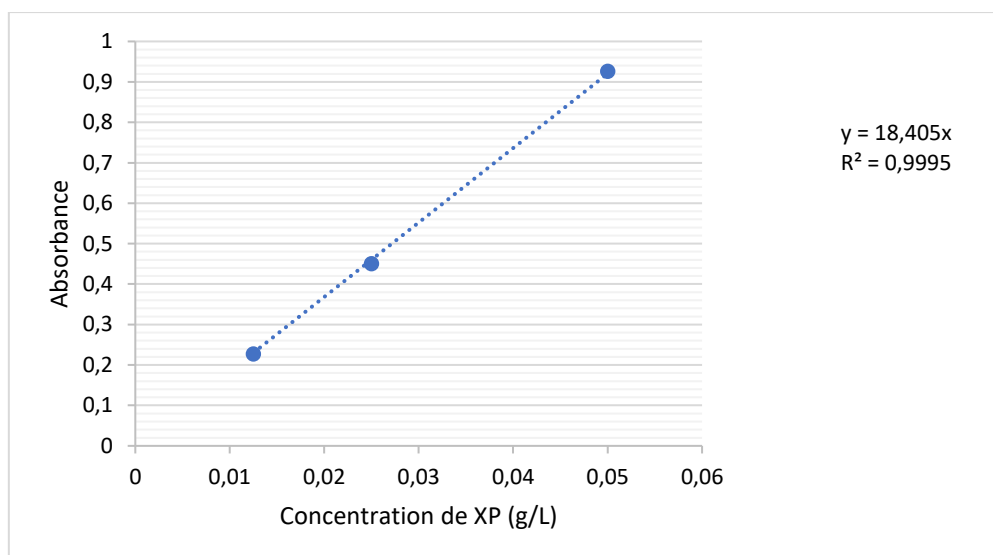


Figure 57: Droite d'étalonnage XP dans l'eau distillée.

La concentration de TPPOH en mol/L fixé sur les XP-SNPs a été calculée selon l'équation (3) :

$$(3) \quad C(\text{TPPOH}) = \frac{DSxM(\text{XP})}{M(\text{unité de répétition du xylane})+DSx(M(\text{TPPOH})-18)}$$

Où :

M(XP) = concentration de XP en g/L fixé sur les SNPs, calculée à partir de la courbe d'étalonnage.

M (unité de répétition du xylane : xylose/MeGlcA 10 :1) = 1511 g/mol.

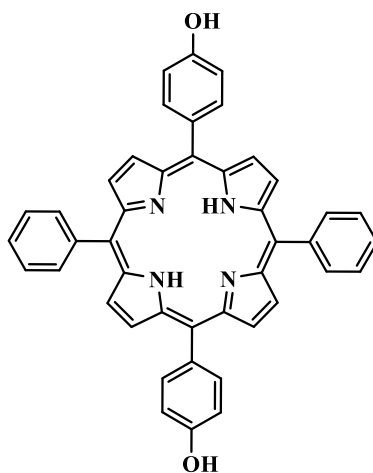
M (TPPOH)= 717.2860 g/mol.

Avec un XP présentant un DS de 0,2 nous avons 9.77×10^{-6} mol de TPPOH par gramme de silice. Cette quantité correspond, probablement au maximum que l'on peut fixer sur ces nanoparticules de silice. En effet, nous avons essayé d'augmenter la quantité de TPPOH fixée sur les nanoparticules de silice, en utilisant le xylane-TPPOH possédant un DS de 1,11 en TPPOH. Ce xylane n'étant pas soluble dans l'eau, l'enrobage a été réalisé dans le DMSO. Cependant, la quantité de TPPOH déterminée par dosage UV-Visible n'était pas plus élevée que celle trouvée pour le xylane à un DS de 0,2 en TPPOH.

Dans le but d'augmenter l'efficacité thérapeutique des PS, l'adressage subcellulaire est un facteur important. Les mitochondries sont un des organites les plus importants de la cellule, car en plus d'être le lieu de la production d'énergie essentielle à de nombreuses voies biochimiques, elles jouent également un rôle dans la mort cellulaire par apoptose. Nous souhaitons donc fixer de manière covalente, sur la TPPOH, un agent de ciblage spécifique de la mitochondrie.

VII. Nanoparticules hybrides pour le ciblage mitochondrial

Nous avons choisi de fixer le cation triphénylphosphonium (TPP) connu, rappelons-le, pour interagir avec la membrane mitochondriale en raison de son caractère lipophile et de sa charge cationique. La TPPOH précédemment étudiée étant monofonctionnelle, elle ne permet pas de fixer simplement le cation TPP. Dans le but de pouvoir comparer les effets biologiques des nanoparticules fonctionnalisées par la TPPOH et des nanoparticules portant le cation TPP, et mettre en évidence l'efficacité du ciblage mitochondrial, nous avons pensé qu'il serait souhaitable que les structures des conjugués xyloxy-porphyrine enrobant les nanoparticules de silices soient similaires. Pour cela, nous avons imaginé la synthèse d'une porphyrine bifonctionnelle, la TPP(OH)₂, permettant d'une part la fixation sur le polysaccharide et d'autre par le greffage du cation TPP.



Structure de la TPP(OH)₂.

Celle-ci nous permettra à la fois de fixer le cation TPP d'un côté, et le bras espaceur portant la fonction acide carboxylique de l'autre côté permettant ainsi la fixation covalente sur le xylane.

Les deux dipyrrométhanés (**4**) et (**5**) ont été préparés selon la procédure mise au point par Lindsey [184]. Cette méthode consiste à condenser un aldéhyde avec un excès de pyrrole préalablement distillé, en présence de TFA comme catalyseur. La réaction a été effectuée à température ambiante pendant 20 min (figure 59).

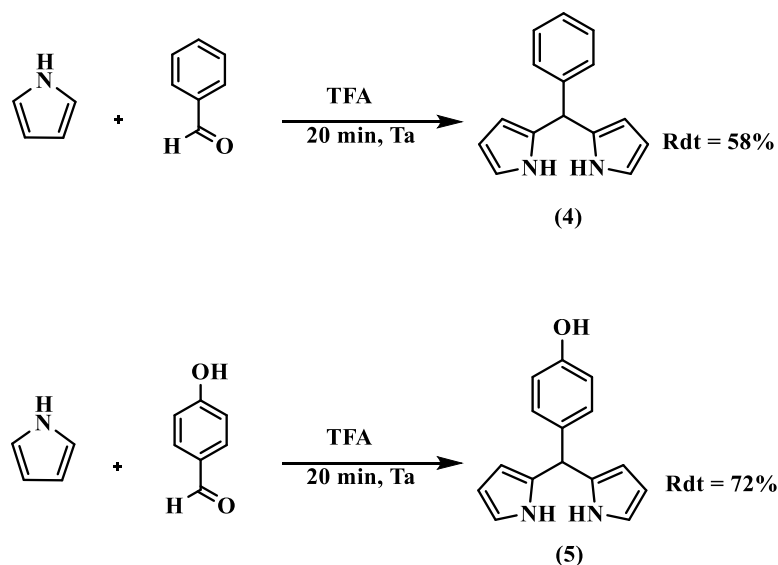


Figure 59: Synthèse des dipyrrométhanés (**4**) et (**5**).

À la fin de la réaction, l'excès de pyrrole enlevé par évaporation. Les produits ont été purifiés par chromatographie flash avec comme éluant le CH_2Cl_2 / Éther de pétrole (50/50) pour le dipyrrométhane (**4**) et CH_2Cl_2 / acétate d'éthyle (19/1) pour le dipyrrométhane (**5**). Ce dernier a été obtenu sous forme de solide de couleur rose pâle avec une masse de 2,487g soit un rendement de 72,5%. Le dipyrrométhane (**4**), quant à lui, avait une couleur blanche et est obtenu avec une masse de 7,5 g soit un rendement de 58%.

Les dipyrrométhanés obtenus ont ensuite été utilisés dans la synthèse de la *trans*-TPP(OH)₂ selon la méthode décrite par Nowak-Krol et coll. [185] qui permet de condenser un dipyrrométhane et un aldéhyde afin d'obtenir la porphyrine souhaitée. Le schéma général de synthèse de la *trans*-TPP(OH)₂ est représenté sur la figure 60.

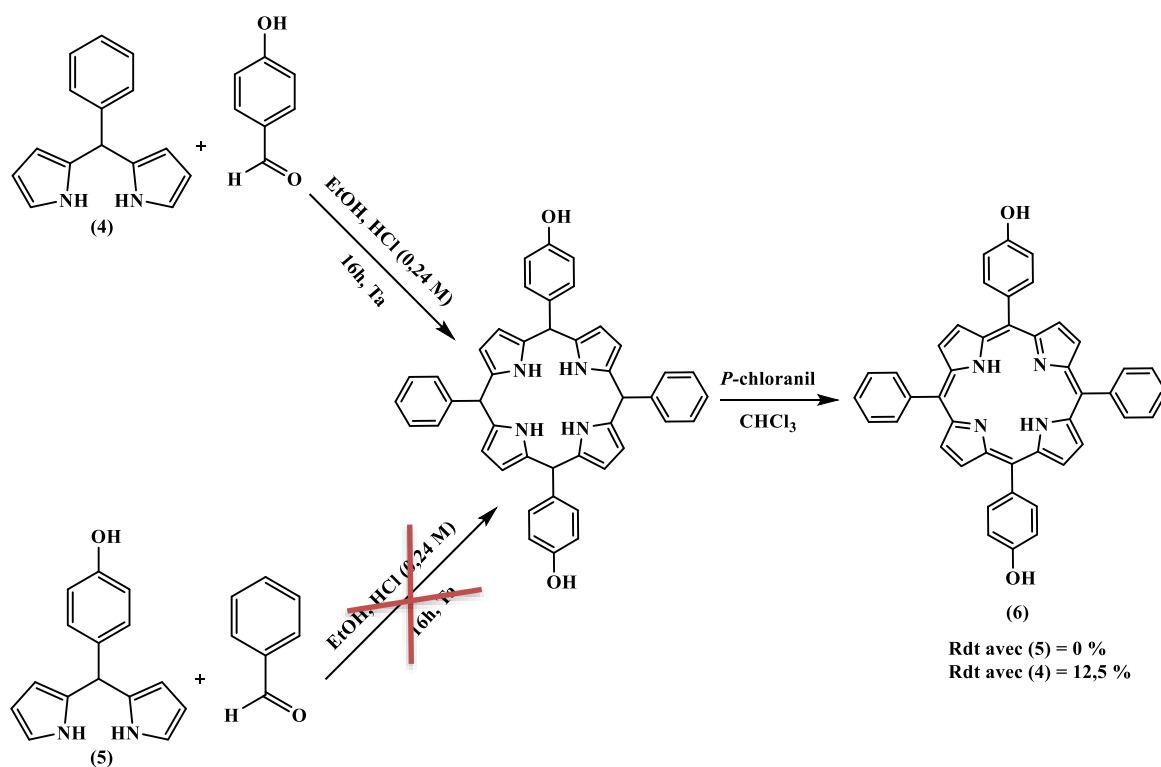


Figure 60: Synthèse de la *trans*-TPP(OH)₂

Cette méthode repose sur le même principe que la méthode de Lindsey, mais elle permet de travailler dans des conditions plus douces. En effet, la réaction en milieu dilué entre l'hydroxybenzaldéhyde et le dipyrrométhane (4) selon le rapport 2/2, catalysée par HCl à 0,24 M permet l'obtention d'un porphyrinogène intermédiaire, qui est par la suite oxydé avec le *p*-chloranil pour obtenir, après purification sur colonne, la *trans*-TPP(OH)₂ avec une masse de 80 mg, soit un rendement de 12,5 %. Ce rendement, modeste est dû à la polymérisation du dipyrrométhane et la formation d'un mélange d'isomères *cis/trans* difficilement séparables [186]. Ce mélange résulte de l'acidolyse de l'intermédiaire réactionnel, suivi de la recombinaison des fragments générés comme décrit dans la figure 61. Ce processus indésirable appelé "scrambling" est fréquemment observé lors de la condensation de polypyrranes.

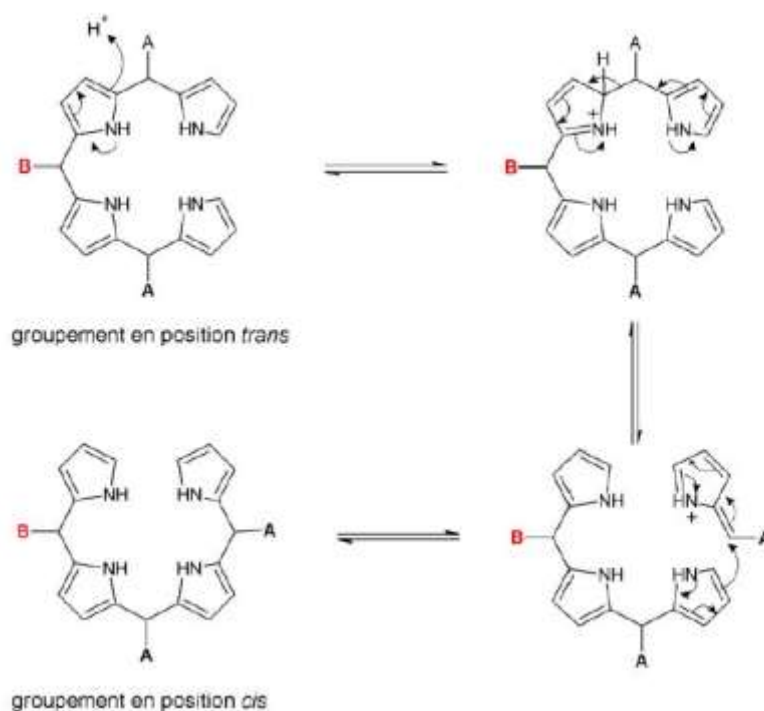


Figure 61: Mécanisme du phénomène de "scrambling".

La même procédure a été suivie pour le dipyrrométhane **6** en le faisant réagir avec le benzaldéhyde sous catalyse acide. Cependant, cette réaction ne forme pas la porphyrine souhaitée.

La protection de la fonction hydroxylée sur la porphyrine par le biais d'un groupement méthoxy est supposée réduire les problèmes de scrambling et donc d'augmenter les rendements finals de la *trans*-TPP(OH)₂. Pour cela, nous avons fait réagir le dipyrrométhane (**4**) avec le méthoxy-benzaldéhyde selon le même protocole décrit précédemment (figure 62).

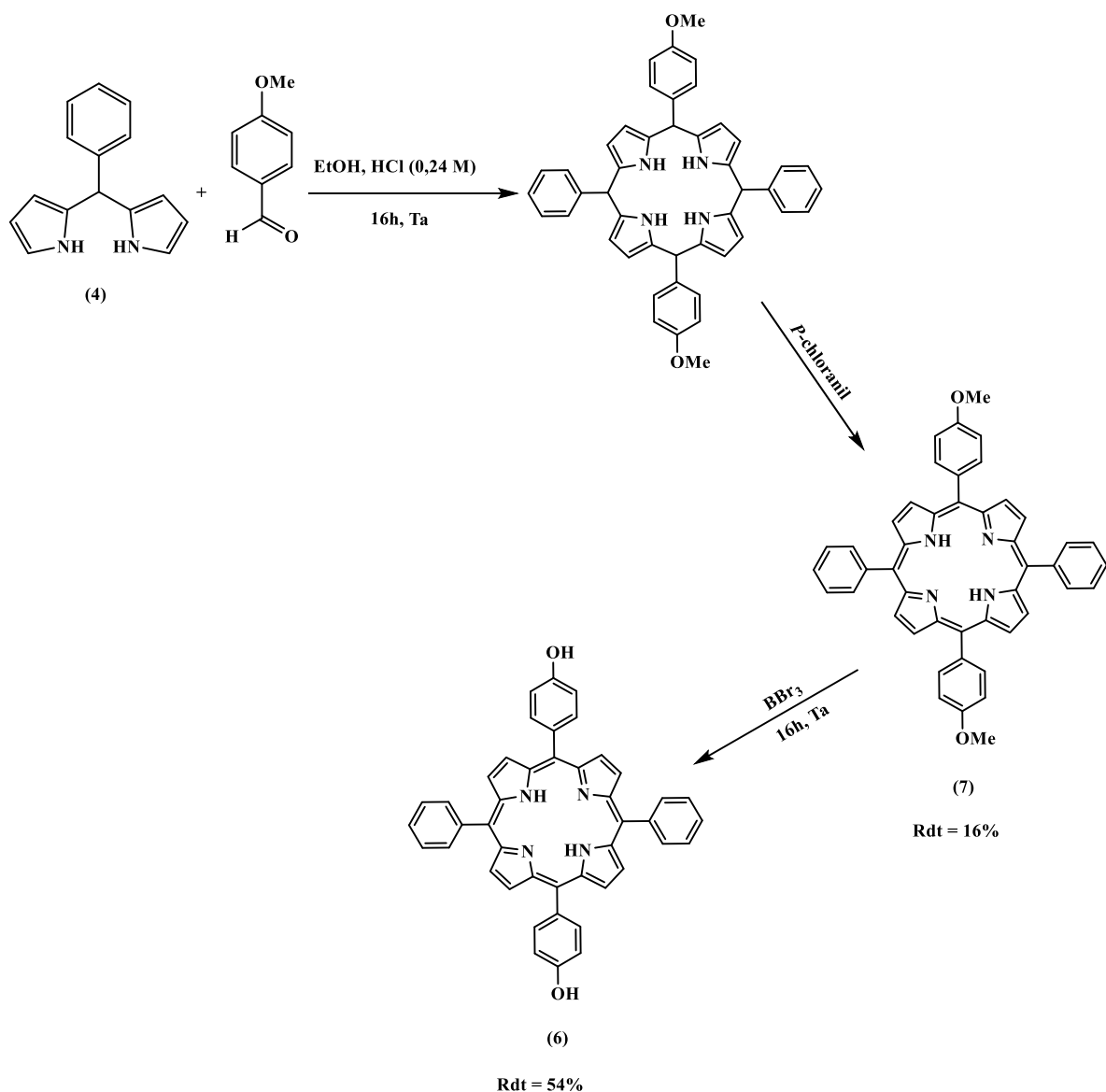


Figure 62: Préparation de la *trans*-TPP(OH)₂ par déprotection de la méthoxy-porphyrine (8).

La porphyrine protégée (7) a été obtenue avec un rendement de 16% supérieur de 3% à la synthèse précédente à ce stade. Néanmoins, la réaction de déprotection par BBr₃ n'a qu'un rendement de 54% ; autrement dit, le rendement global de la réaction est de 8,6%. Il nous semble donc inutile d'ajouter une étape de protection pour avoir un rendement finalement inférieur à celui de la synthèse précédente.

La méthode de Lindsey semble être intéressante compte tenu de la simplicité de purification due à l'absence de goudrons générés par la polymérisation du pyrrole. De plus, le fait de travailler en milieu dilué, et de partir d'un dipyrrométhane augmente indéniablement le rendement de la réaction, mais en contrepartie, cette forte dilution du milieu réactionnel implique que la quantité de la *trans*-TPP(OH)₂ récupérée reste faible et insuffisante pour

réaliser l'ensemble des réactions de fonctionnalisation. Nous avons donc cherché à améliorer les résultats obtenus en utilisant la méthode des aldéhydes mixtes.

VII.1.2. Méthode des aldéhydes mixtes

Nous avons procédé dans ce cas de la même façon que pour la synthèse de la TPPOH décrite précédemment, en changeant uniquement les coefficients stœchiométriques du benzaldéhyde et de l'hydroxybenzaldéhyde (figure 63).

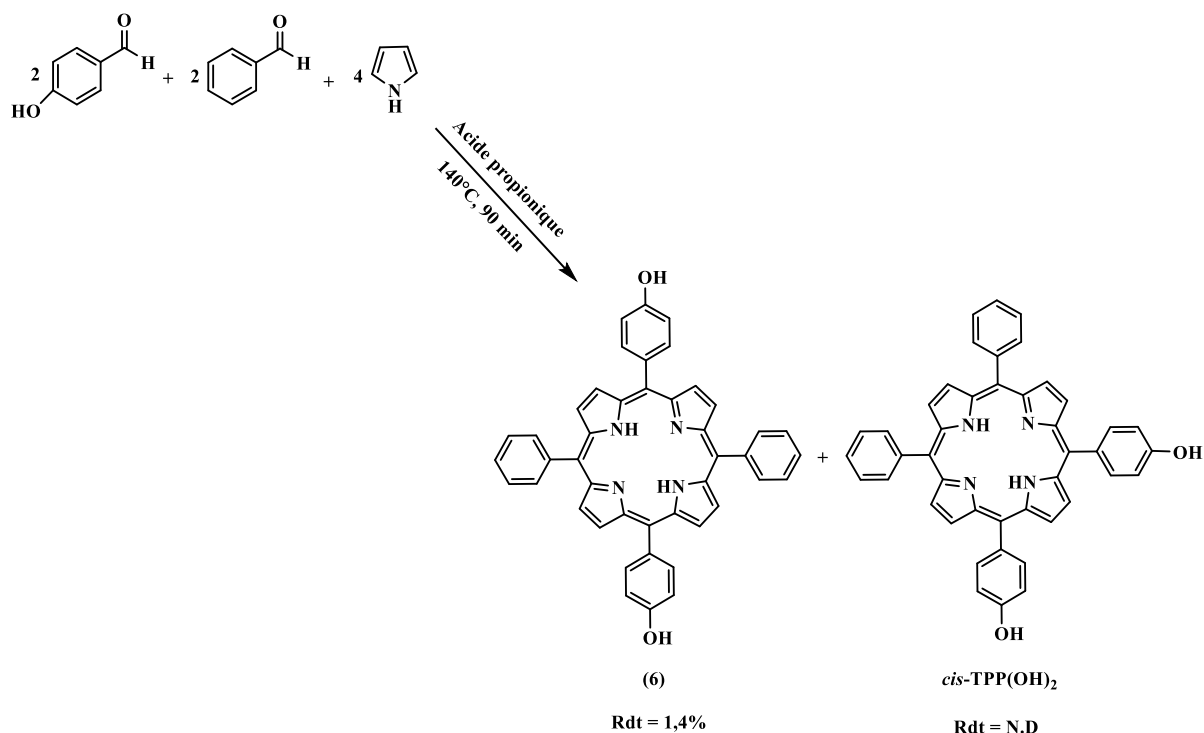


Figure 63: Synthèse de la *trans*-TPP(OH)₂ selon Little.

Le pyrrole, l'hydroxybenzaldéhyde et le benzaldéhyde sont mis à réagir selon les proportions stœchiométriques 4/2/2. Contrairement à la TPPOH, la *trans*-TPP(OH)₂ ne précipite pas dans le milieu réactionnel après ajout du méthanol et refroidissement. De ce fait, elle reste piégée dans de nombreux goudrons issus de la polymérisation du pyrrole, ce qui rend la purification fastidieuse. Après évaporation de l'acide propionique, le brut réactionnel est dans un premier temps partiellement purifié sur un plug de silice pour éliminer les goudrons. La purification est poursuivie par chromatographie sur colonne de silice pour éliminer le mélange de porphyrines (A4, A3B, AB3 et B4). Enfin, une purification sur plaques préparatives de gel de silice est nécessaire afin de séparer le mélange d'isomères *cis* et *trans*, dont les rapports frontaux sont très proches. La *trans*-TPP(OH)₂ est isolée avec une masse de 260 mg soit un rendement de

1,4%. La *trans*-TPP(OH)₂ a été caractérisée par spectrométrie de masse ($m/z = 647,2435$ [M+H]⁺).

Bien qu'elle présente l'inconvénient de former beaucoup de goudrons, qui, en plus, de la présence de l'acide propionique complique les purifications ce qui se traduit par un rendement nettement plus faible, la méthode des aldéhydes mixtes nous semble le protocole le plus adapté pour obtenir la *trans*-TPP(OH)₂ en quantité massique suffisante.

Il est à noter que la TPP(OH)₂ est également formée lors de la synthèse de la porphyrine (1) précédemment décrite et obtenue par la méthode des aldéhydes mixtes. Cependant, compte tenu des rapports stœchiométriques en réactifs engagés dans la réaction, elle est formée en très faible quantité. En effet, cette méthode donne lieu à la formation d'un mélange de porphyrines, de toutes les combinaisons possibles (A4, A3B, A2B2, AB3 et B4). De plus, la formation des deux isomères *cis* et *trans* diminue encore le rendement en *trans*-TPP(OH)₂.

La RMN du proton permet sans ambiguïté de distinguer les deux isomères *cis* et *trans* des porphyrines dihydroxylées récupérées (figure 64).

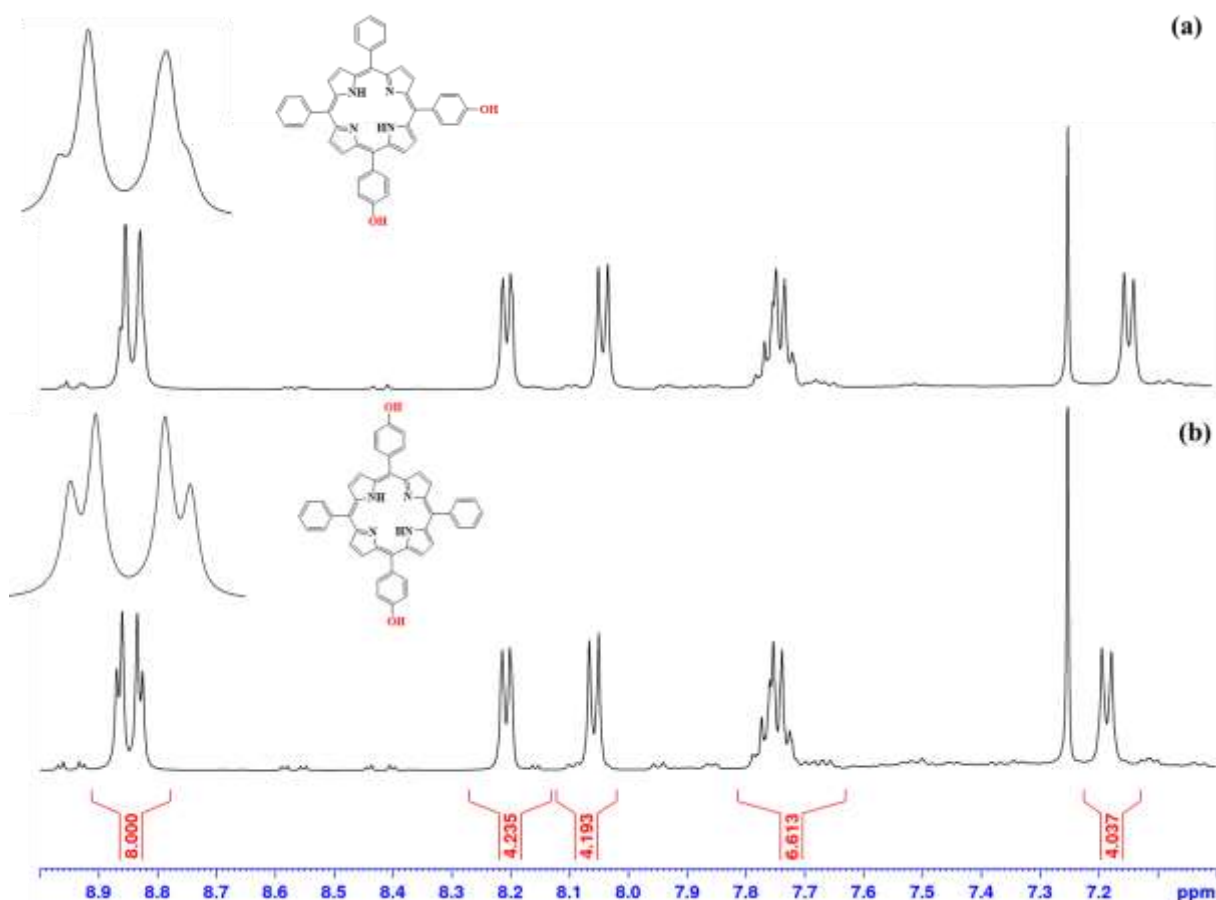


Figure 64: Spectres RMN¹H des porphyrines *trans*-TPP(OH)₂ (a), et *cis*-TPP(OH)₂ (b).

Les deux spectres RMN¹H (a) et (b) sont similaires, la seule différence apparaît au niveau du signal des protons β-pyrroliques à 8,85 ppm. En effet, sur le spectre (b), on voit deux doublets avec un effet de toit, caractéristique de la symétrie d'une porphyrine A2B2, donc ce spectre correspond bien à la *trans*-TPP(OH)₂.

En plus des protons β-pyrroliques, le spectre RMN¹H de la *trans*-TPP(OH)₂ laisse apparaître les protons H_{2,6} des phényles à 8,20 ppm, les protons H_{2,6} des protons aryles à 8,06 ppm, les protons H_{3,4,5} des phényles vers 7,75 ppm et les protons H_{3,5} des aryles à 7,19 ppm.

Ces résultats sont confirmés par spectrométrie de masse ($m/z = 647,2435 [M+H]^+$).

VII.2. Fonctionnalisation de la *trans*-TPP(OH)₂

Après avoir synthétisé la *trans*-TPP(OH)₂ nous avons poursuivi le schéma réactionnel proposé en la fonctionnalisant avec le cation TPP et le 4-bromobutyrate d'éthyle.

VII.2.1. Alkylation de la *trans*-TPP(OH)₂ par le 4-bromobutyrate d'éthyle

L'alkylation a été réalisée suivant la méthode de Williamson (figure 65).

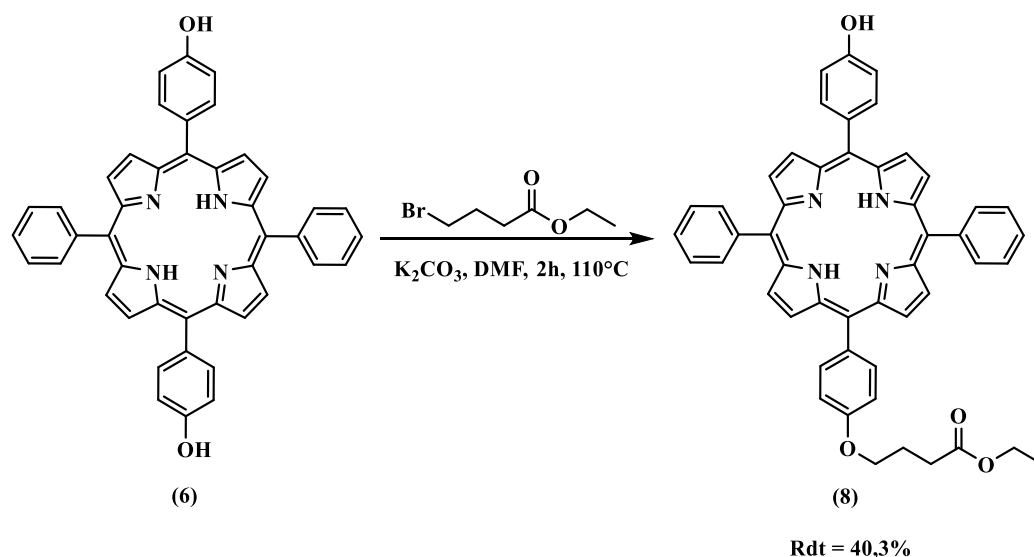


Figure 65: Alkylation de la *trans*-TPP(OH)₂ par le 4-bromobutyrate d'éthyle.

Pour cela, nous avons fait réagir le 4-bromobutyrate d'éthyle sur le groupement hydroxyle de la porphyrine dans le diméthylformamide anhydre en présence d'un large excès de carbonate de potassium. Après un traitement classique, le produit obtenu est purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice. Le rendement en *trans*-TPP(OH)₂ alkylée, obtenu après 2h à 110 °C est de 40,3%. Malgré l'utilisation d'un seul équivalent de 4-bromobutyrate d'éthyle, la porphyrine disubstituée a été également isolée avec un rendement de 18,5%.

La méthode au micro-ondes décrite précédemment n'a pas pu être appliquée dans ce cas. En effet, le rendement obtenu avec cette méthode est deux fois plus faible (20,3%) que celui obtenu dans les conditions classiques. De plus, la *trans*-TPP(OH)₂ disubstituées a été formée de façon majoritaire.

La structure de la porphyrine (**8**) est confirmée par RMN ¹H. Sur le spectre RMN ¹H, les signaux caractéristiques du bras à 4,29 ppm, 2,69 ppm et 2,31 ppm, ainsi que ceux de l'ester à 4,24 ppm et 1,34 ppm peuvent être observés. De plus, les rapports d'intégrations entre les protons de la porphyrine et les protons du bras, ainsi que la perte de la symétrie observée précédemment sur les protons β-pyrroliques, confirment la monsubstitution de la *trans*-TPP(OH)₂.

VII.2.2. Alkylation de la *trans*-TPP(OH)₂ par le cation TPP

La fixation du cation TPP sur la porphyrine (**8**) a été réalisée en deux étapes. Nous avons tout d'abord fixé sur la porphyrine (**8**) une chaîne alkyle portant en bout de chaîne un brome par réaction du phénol libre sur une courte chaîne carbonée dibromée. Le brome porté par la porphyrine ainsi obtenue est ensuite substitué par la triphénylphosphine pour conduire au macrocycle bifonctionnel souhaité.

VII.2.2.1. Fixation du 1,4 dibromobutane

La fonctionnalisation de la porphyrine (**8**) avec le 4-dibromobutane a été réalisée selon la méthode de Williamson (figure 66). La réaction a lieu en présence d'un excès de carbonate de potassium dans le DMF à 110 °C. La porphyrine (**9**) est obtenue après purification sur plaques préparatives avec un rendement de 80%.

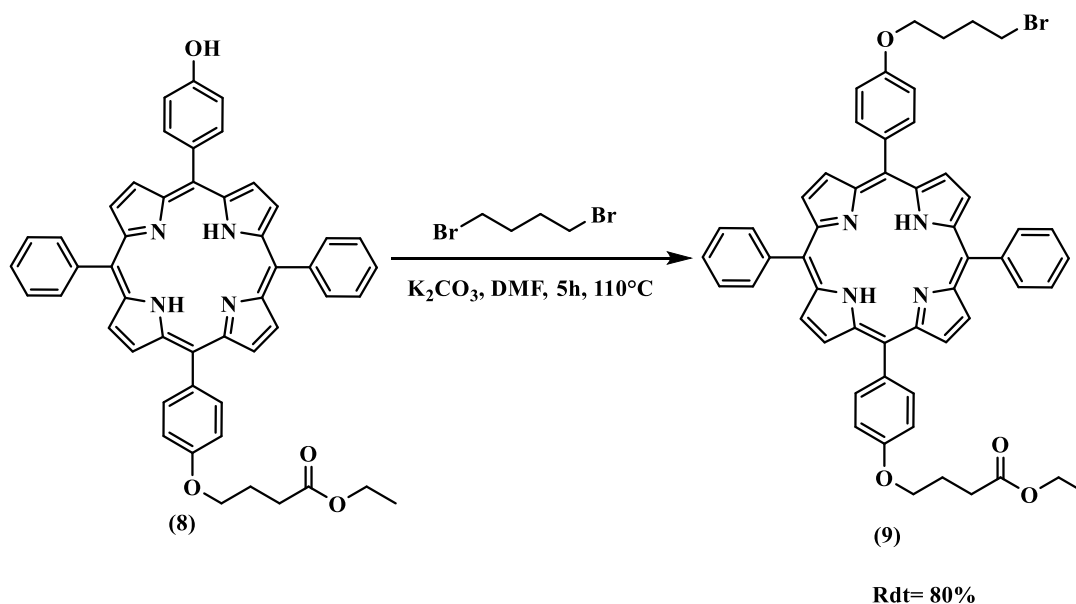


Figure 66: Fixation du 1,4 dibromobutane sur la porphyrine (8).

La structure de la porphyrine (9) est confirmée par RMN¹H. La présence des signaux à 4,25 ppm (t, 2H, J= 6,3 Hz, O-CH₂-), 3,61 ppm (t, 2H, J= 6,6 Hz, -CH₂-Br), 2,23 ppm (qt, 2H, J= 6,7 Hz, O-CH₂-CH₂-), et à 2,12 ppm (qt, 2H, J= 6,5 Hz, CH₂-CH₂-Br) sur le spectre RMN¹H de la porphyrine (9) témoigne du greffage du bras bromé.

VII.2.2.2. Substitution nucléophile par la triphénylphosphine

Au cours de cette réaction, la triphénylphosphine a été fixée sur la porphyrine (9) selon une réaction de substitution nucléophile (figure 67). Après 24h de réaction, le brut a été purifié sur plaques préparatives de silice pour obtenir la porphyrine (10) avec un rendement de 70%. Ce rendement est conforme à ceux obtenus dans la littérature [187].

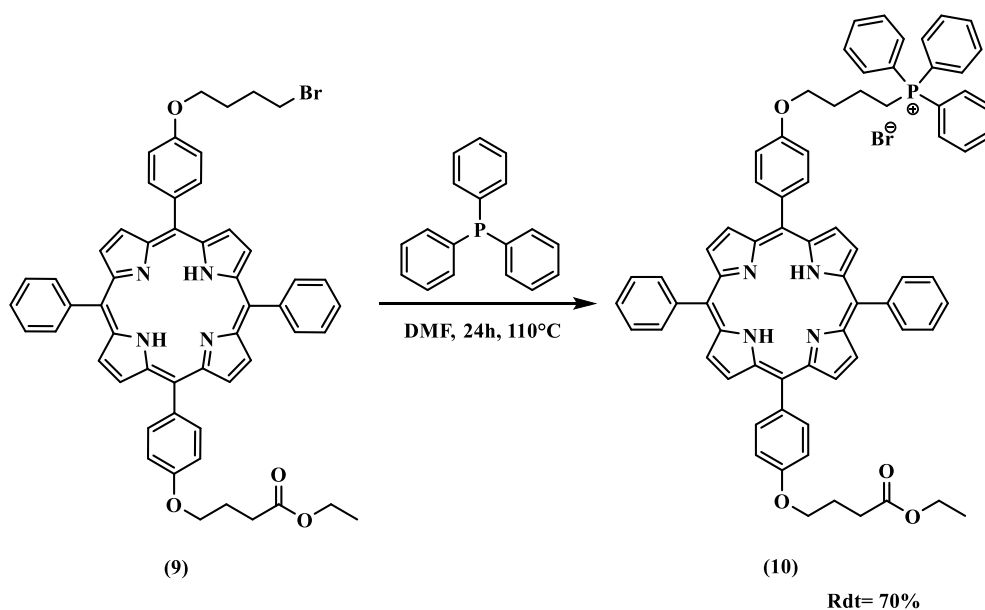


Figure 67: Fixation de la triphénylphosphine sur la porphyrine **10**.

La structure de la porphyrine (**10**) est confirmée par RMN¹H. En effet, la présence des signaux à 4,07 ppm (m, 2H, -CH₂-P), 7,91 ppm (dd, 6H, H_{2,6} PPh₃), et 7,72-7,66 ppm (m, 9H, H_{3,4,5} PPh₃) confirme la fixation de la triphénylphosphine sur la porphyrine (**9**).

VII.2.3. Saponification de l'ester

Des conditions classiques de saponification, utilisées précédemment pour saponifier l'ester du composé (**2**) ont été appliquées pour cette réaction (figure 68).

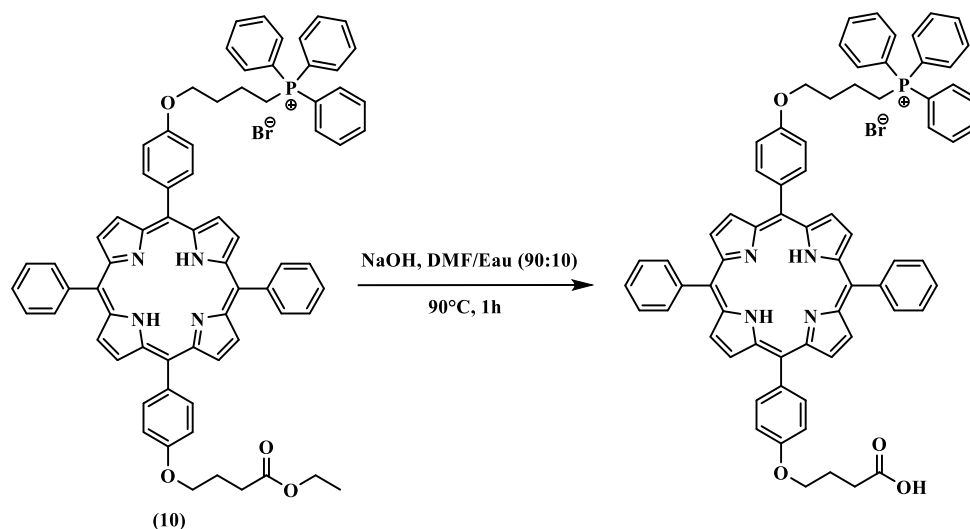


Figure 68 : Saponification de la porphyrine (**10**).

La porphyrine (**10**) est mise à réagir dans le DMF en présence de NaOH. Après 1h de réaction à 90 °C, une CCM est réalisée pour suivre l'avancement de la réaction. Nous avons observé une

tâche présentant un Rf plus élevé que celui de la porphyrine (**10**) nous laissant supposer que le produit s'est dégradé et qu'il n'y a pas eu de formation d'acide carboxylique. La réaction est arrêtée, le solvant est évaporé et le brut réactionnel est neutralisé avec l'acide chlorhydrique. L'analyse RMN ^1H nous a permis de déterminer la structure du composé obtenu, il s'agit du produit résultant de l'élimination du cation TPP.

VII.2.4. Hydrolyse acide de l'ester

Pour résoudre ce problème, nous avons tenté l'hydrolyse acide de l'ester (figure 69).

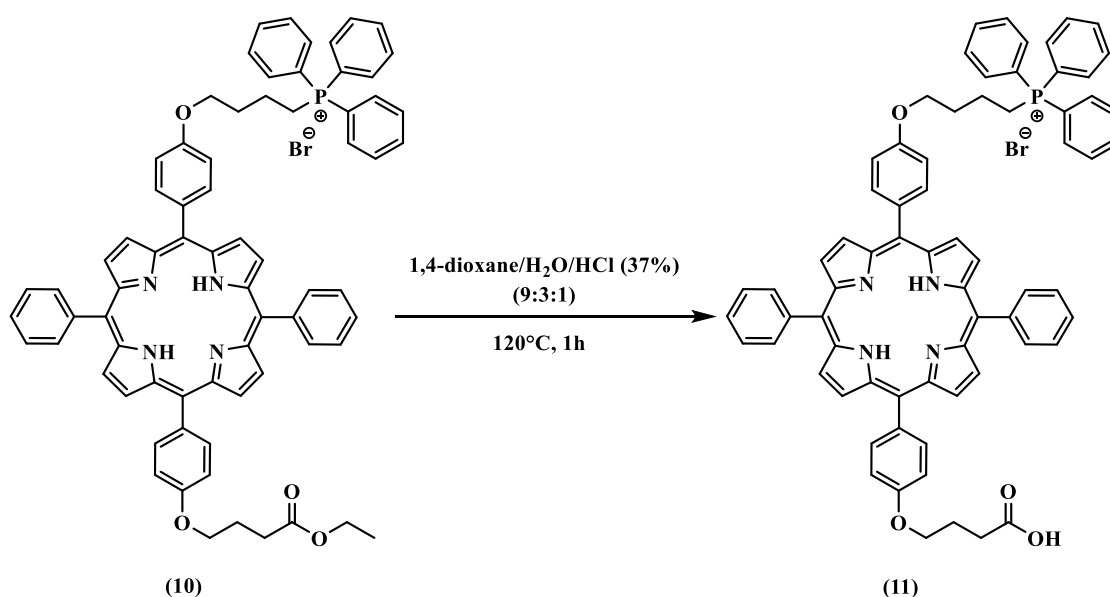


Figure 69: Hydrolyse acide de l'ester.

La porphyrine (**10**) est mise à réagir dans un mélange eau/dioxane en présence de HCl. La réaction a été suivie par CCM. Après une heure de réaction à reflux, on observe la disparition totale de la porphyrine de départ et l'apparition de deux taches : une plus polaire, supposée être le produit désiré avec l'acide carboxylique, et l'autre moins polaire que la porphyrine de départ. L'analyse RMN a confirmé la formation de la porphyrine (**11**) avec toutefois seulement un rendement de 16%.

Le clivage de l'ester d'éthyle nécessite des conditions drastiques (acides ou basiques) qui ne sont pas compatibles avec la présence du cation TPP. Dans un deuxième temps, nous avons donc remplacé l'ester d'éthyle par un ester de tertio-butyle qui peut être facilement hydrolysé à température ambiante en milieu acide, conditions n'affectant pas le cation TPP.

VII.2.5. Synthèse du bras tertibutyle

En s'appuyant sur les travaux réalisés dans notre laboratoire, nous avons envisagé la synthèse du 4-bromobutanoate de tertibutyle selon la méthode de Wright et coll. [188] (figure 70). Cette méthode consiste à faire réagir, en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique, l'acide carboxylique avec l'isobutylène formée *in situ* par déshydratation du tertibutanol.

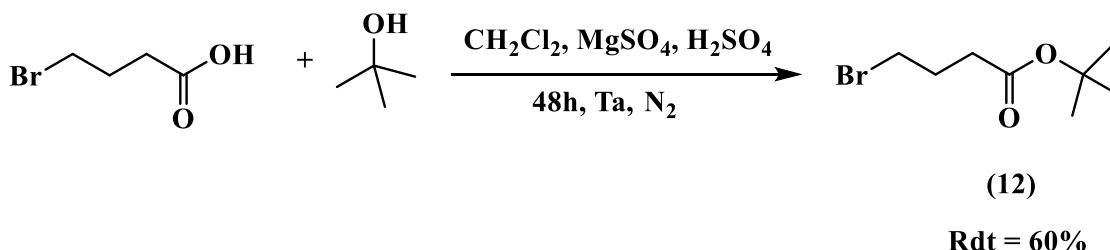


Figure 70: Estérification de l'acide 4-bromobutanoïque par le tertibutanol.

Le protocole expérimental appliqué consiste à faire réagir l'acide 4-bromobutanoïque avec le tertibutanol dans le dichlorométhane anhydre en présence de sulfates de magnésium et d'acide sulfurique. Après 48h de réaction, le sulfate de magnésium, l'acide sulfurique et l'acide carboxylique qui n'ont pas réagi ont été éliminés par lavages avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Le 4-bromobutanoate de tertibutyle (**12**) a été isolé, après purification sur colonne de silice, avec un rendement de 60%.

VII.2.6. Alkylation de la *trans*-TPP(OH)₂ avec le 4-bromobutanoate de tertibutyle.

D'une manière analogue à ce qui a été fait précédemment, nous avons fait réagir le 4-bromobutanoate de tertibutyle avec la porphyrine (**6**) dans le diméthylformamide à 110 °C en présence de carbonate de potassium. Le rendement obtenu par cette méthode, après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice est de l'ordre de 45%, et est similaire à celui obtenu dans le cas de la porphyrine (**8**). Les autres réactions de fonctionnalisation de la porphyrine (**13**) ont été réalisés comme décrit précédemment, et les rendements obtenus sont également similaires (figure 71).

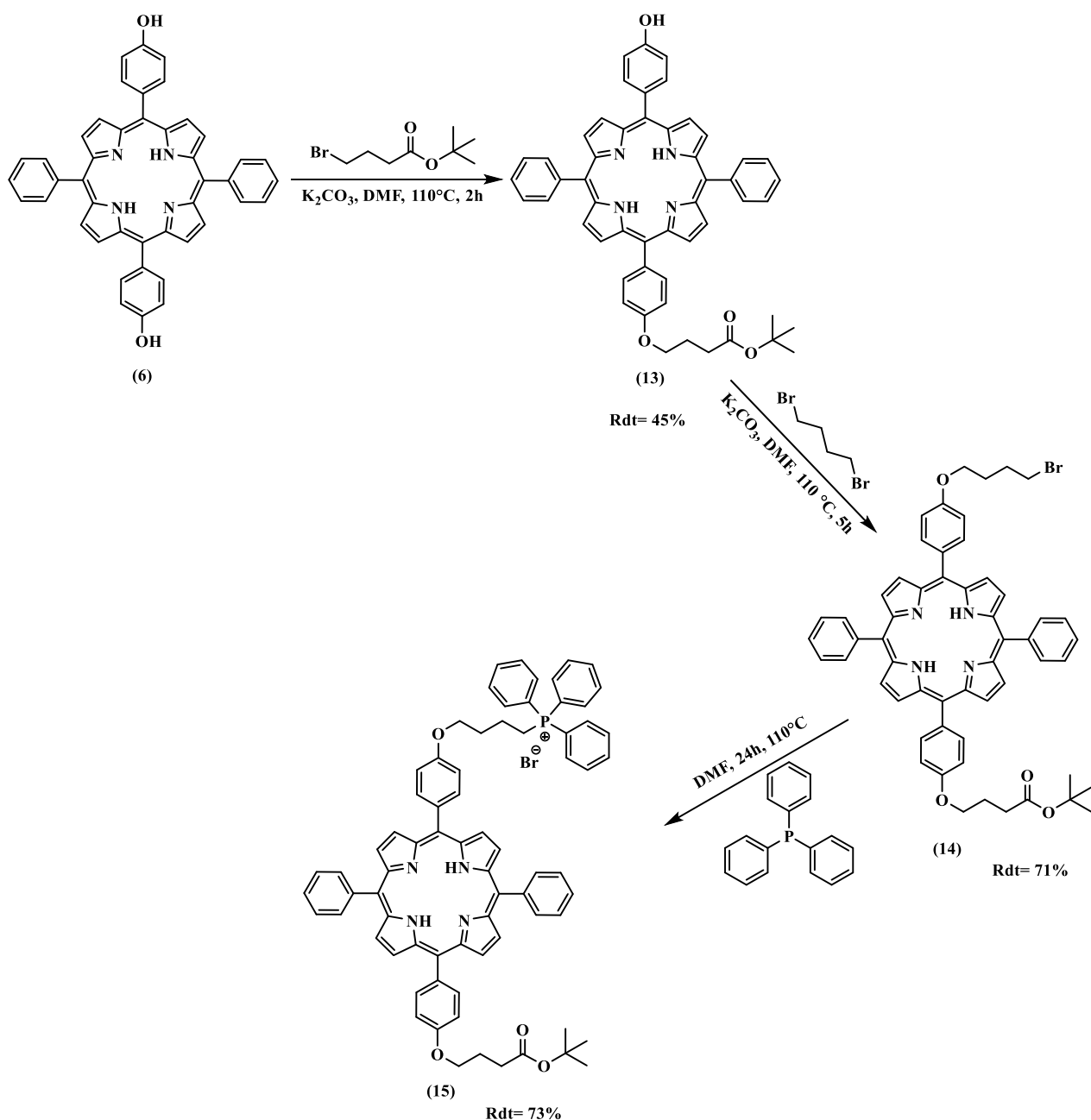


Figure 71: Synthèse de la porphyrine (15).

Les structures des porphyrines (13) (14) et (15) sont confirmées par RMN¹H (voir partie expérimentale).

VII.2.7. Hydrolyse acide du tertiobutyle

Les esters tertiobutylés sont très facilement hydrolysés en milieu acide et l'acide trifluoroacétique est couramment utilisé pour cette réaction.

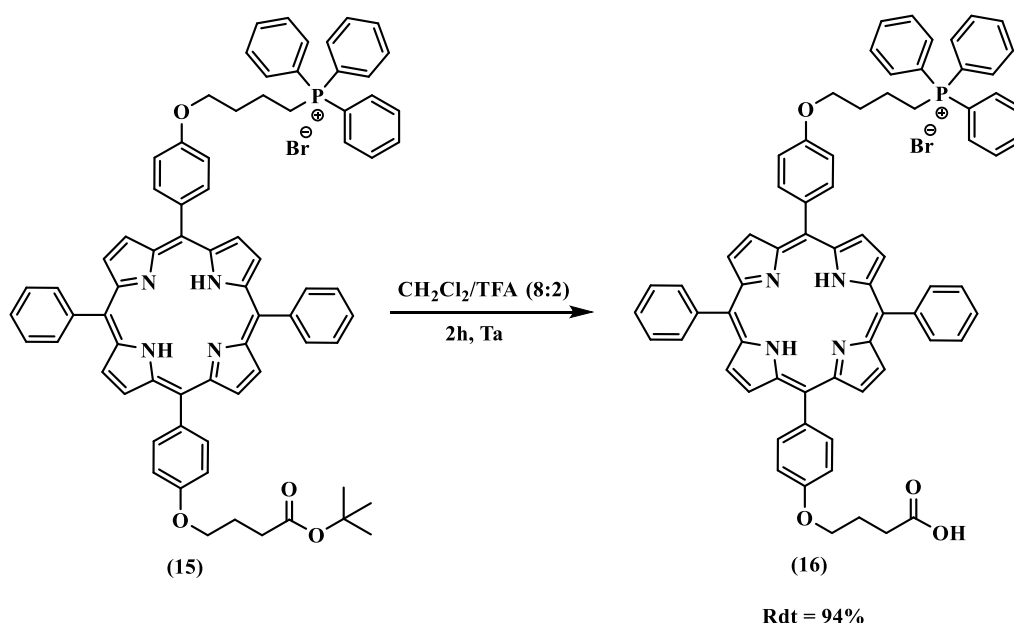


Figure 72 : Hydrolyse acide du tertio-butyle.

La porphyrine **(15)** a été mise à réagir, à température ambiante, dans un mélange de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (80% de DCM et 20% de TFA v/v) (figure 72). Après deux heures de réaction, le produit de départ est entièrement hydrolysé et la porphyrine **(16)** est obtenue avec un rendement de 94%. Nous n'avons observé, dans ces conditions, aucune dégradation de la porphyrine.

La structure de la porphyrine **(16)** est confirmée par RMN¹H (figure 73) et spectrométrie de masse. Les protons des positions β de la porphyrine résonnent sous la forme d'un multiplet à 8,7 et 8,61 ppm et intègrent respectivement pour 6 et 2 protons. Les 4 protons H2 et H6 des phényles et des aryles donnent des signaux à 8,53 ppm et 8,48 ppm respectivement. Les protons des phényles du groupement PPh₃ apparaissent à 8,03 ppm (6H), 7,91 ppm (3H) et 7,68 ppm (6H). Les 6 protons H3, H4 et H5 des phényles sortent entre 7,82 et 7,73 ppm. Les 4 protons H3 et H5 des aryles apparaissent sous la forme d'un doublet à 7,55 ppm. Les 6 protons aliphatiques H7, H8 et H9 du bras acide carboxylique résonnent à 4,44, 2,41 et 2,87 ppm respectivement. Les 8 protons aliphatiques H12, H13, H14 et H15 du bras PPh₃ apparaissent à 4,39 ppm, 2,25 ppm, 2,13 ppm et 3,28 ppm respectivement. Ces résultats sont confirmés par spectrométrie de masse ($m/z = 1049.4195 [M+H]^+$).

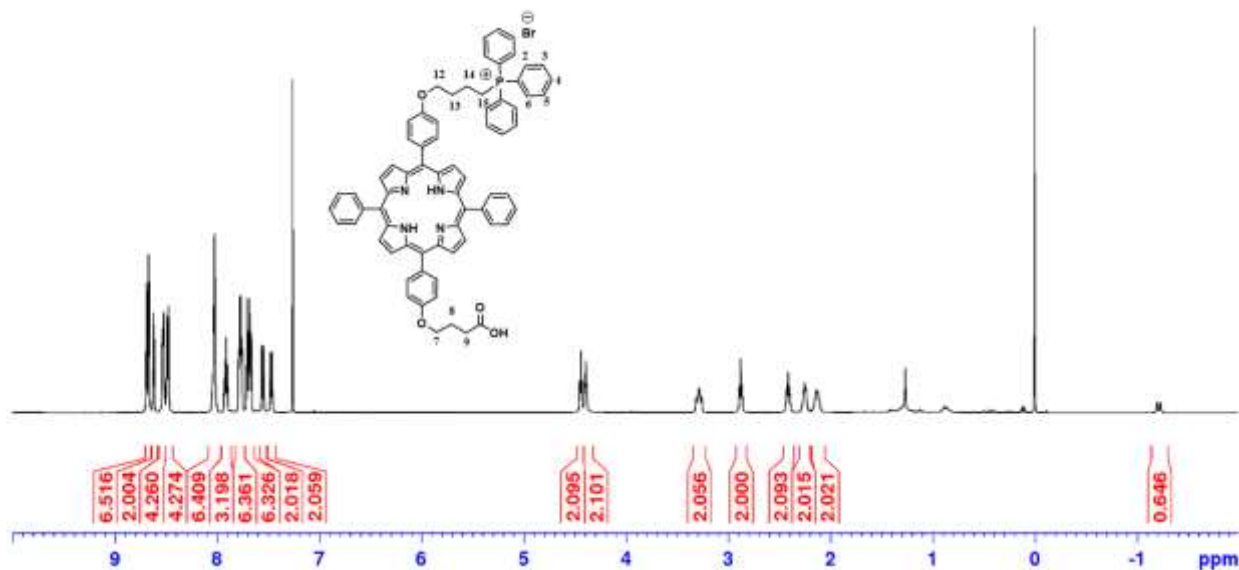


Figure 73: Spectre RMN¹H de la porphyrine (16) dans CDCl₃/TFA.

VII.3. Fonctionnalisation du xylane de hêtre par la porphyrine (16)

La réaction de couplage entre la porphyrine (16) et le xylane a été effectuée selon une réaction d'estérification mettant en jeu les fonctions hydroxyles du xylane et le motif acide carboxylique porté par la porphyrine (16) (figure 74).

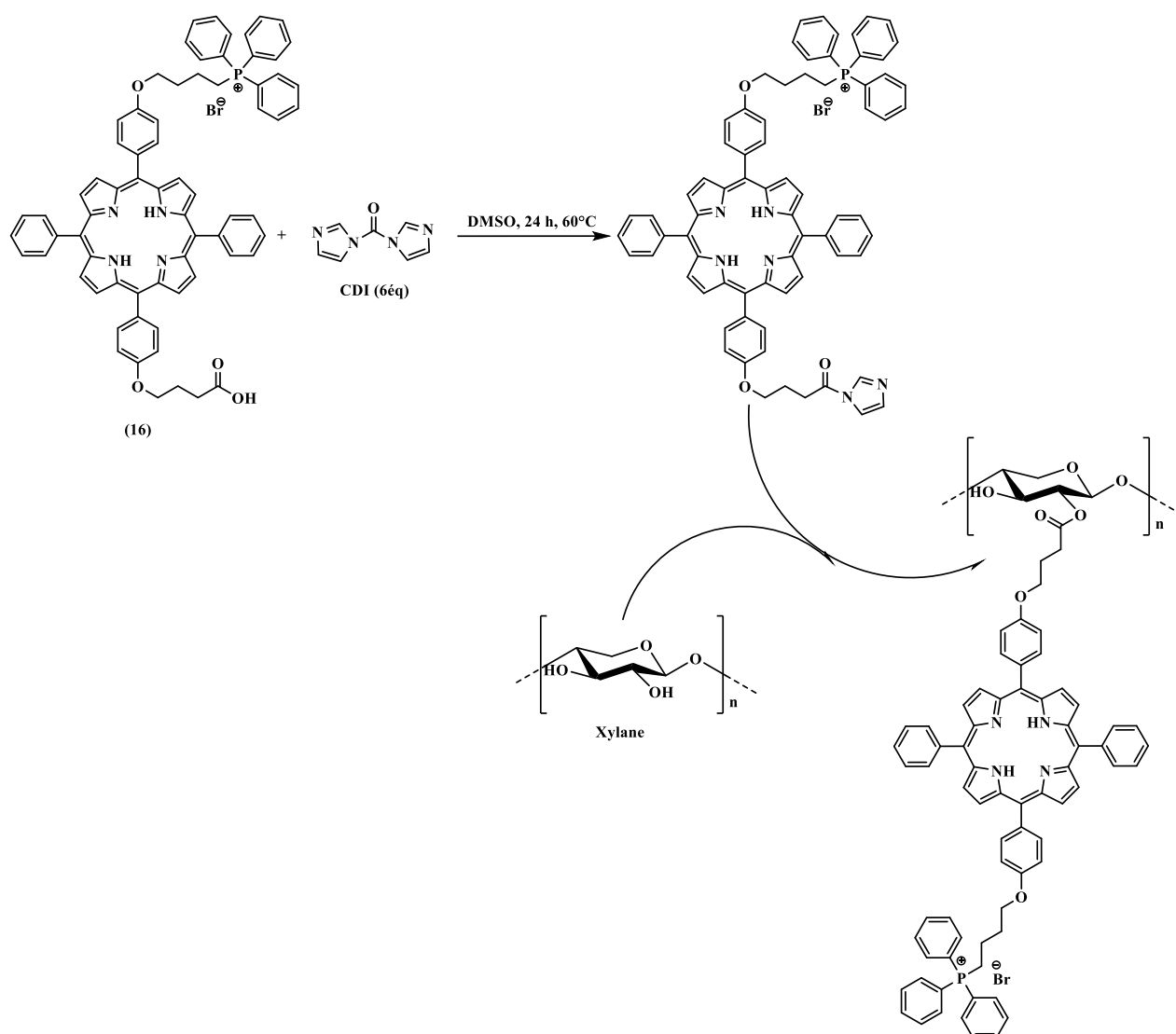


Figure 74 : Fonctionnalisation du xylane par la porphyrine **(16)**.

Dans un premier temps, la fonction acide carboxylique de **(16)** est activée avec 1 équivalent de N, N'-carbonyldiimidazole (CDI) pendant 24 h dans le DMSO à température ambiante. Puis, dans un deuxième temps, le xylane préalablement solubilisé dans le DMSO est ajouté au milieu réactionnel. Nous nous sommes tout d'abord appuyés sur les résultats donnés par le plan d'expériences précédemment discuté. Ainsi, dans le but d'obtenir des structures comparables du point de vue du degré de substitution en porphyrines, nous avons cherché à obtenir pour le xylane fonctionnalisé par le macrocycle **(16)** un DS de l'ordre de 0,2 en appliquant les conditions du plan d'expériences conduisant à ce résultat. Après 48h de réaction à 80 °C, le xylane est précipité et lavé à l'éthanol absolu puis au chloroforme pour éliminer la porphyrine qui n'a pas réagi, et enfin séché sous vide. Le conjugué xylane-porphyrine **(16)** a été caractérisé par RMN ^1H . Cette analyse a permis de calculer un DS de 0,1 bien inférieur à ce qu'on attendait.

Cette baisse de réactivité de la porphyrine (**16**) peut s'expliquer par la formation de dimères zwiterionique par interaction entre le cation TPP et l'acide carboxylique.

Pour résoudre ce problème, le nombre d'équivalents de CDI a été augmenté à 6 éq, et le milieu réactionnel chauffé à 60 °C, lors de la première étape d'activation de la porphyrine. Ceci nous a permis d'augmenter le DS du xylane en porphyrine (**16**) à 0,2. Le conjugué xylane-porphyrine (**16**) est obtenu avec un rendement massique de 106 %.

Le conjugué xylane-porphyrine (**16**) obtenu sera noté par la suite XP-TPP.

VII.4. Fixation du conjugué XP-TPP sur les NPs de silice et analyses UV-Visible

L'enrobage des NPs de silice par le conjugué XP-TPP a été effectué selon le même protocole que celui décrit dans le paragraphe VI.6.

La fonctionnalisation des SNPs avec XP-TPP a été confirmée par analyse UV-visible, et la quantité de XP-TPP fixé sur les SNPs a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage construite avec différentes concentrations de XP-TPP libre dans de l'eau distillée (figure 75).

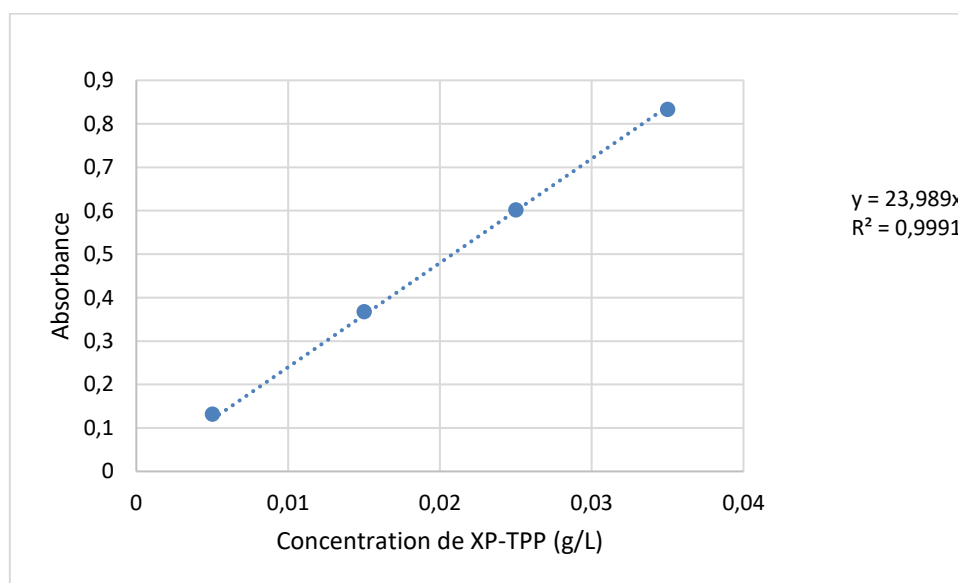


Figure 75: Droite d'étalonnage XP-TPP dans l'eau distillée.

La concentration de porphyrine (**16**) en mol /L fixée sur les XP-TPP SNPs a été calculée selon l'équation 3 (Cf. VI.7). Nous avons calculé une concentration de $1,1 \times 10^{-5}$ mol par gramme de silice.

VIII. Analyses physico-chimiques des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs

VIII.1. Spectroscopie d'émission de fluorescence

L'émission de fluorescence des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs peut être quantifiée par le rendement quantique de fluorescence (Φ_f), qui est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Ce rendement est toujours inférieur ou égal à 1 puisqu'un seul photon absorbé ne peut causer l'émission que d'un seul photon. Il est calculé à partir de l'équation suivante :

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

Où Φ_f et Φ_{f_0} , I_f et I_{f_0} , DO et DO_0 , n et n_0 sont les rendements quantiques, les intensités de fluorescence, les densités optiques, les indices de réfraction de l'échantillon et de la référence respectivement.

Le spectre d'émission de fluorescence du nano-objet XP-SNPs et XP-TPP SNPs est réalisé dans l'éthanol à température ambiante à une concentration de l'ordre de 10^{-6} M et une longueur d'excitation de 422 nm (figure 76).

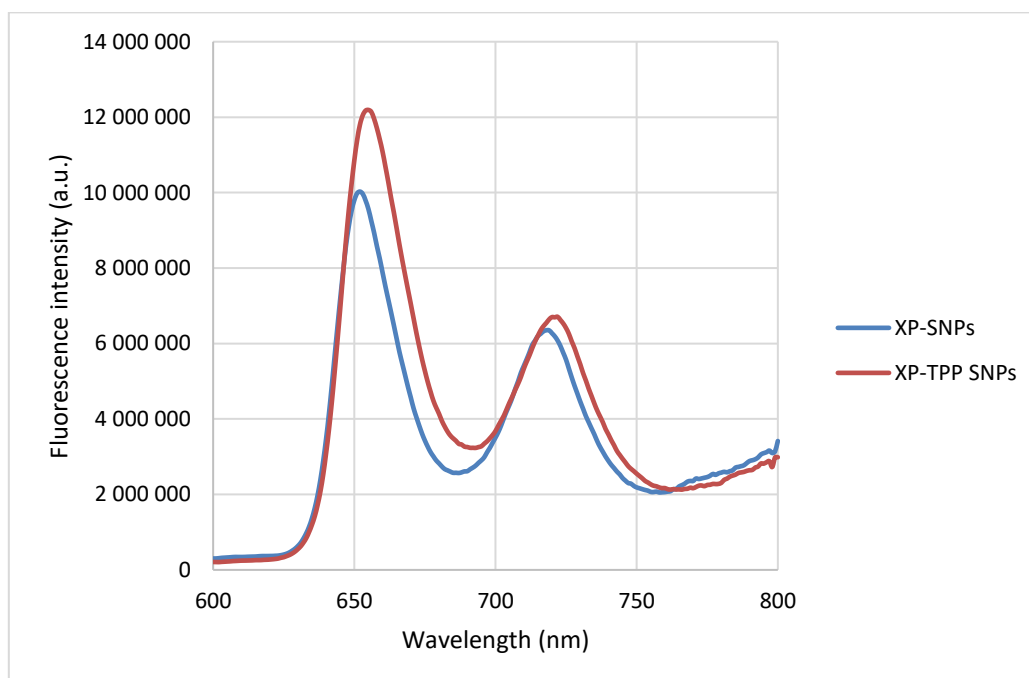


Figure 76: Spectres d'émission de fluorescence de XP-SNPs et XP-TPP SNPs excités à 422 nm dans l'éthanol. Les nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs présentent un spectre de fluorescence caractéristique des porphyrines avec deux bandes d'émission : une bande de forte intensité vers

656 nm et une deuxième de plus faible intensité vers 720 nm. Ces deux bandes correspondent aux transitions vibrationnelles depuis l'état excité S_1 vers l'état fondamental S_0 .

Les nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs ont des rendements quantiques de fluorescence respectivement de 0,04 et 0,05. Ces rendements ont été obtenus en utilisant comme référence le rendement de la tétraphénylporphyrine dans le toluène qui est de 0,11 [189].

VIII.2. Mesures de production d'oxygène singulet

Les analyses de production de l'oxygène singulet sont réalisées par détection directe de sa luminescence caractéristique à 1270 nm, qui correspond à sa relaxation vers son état fondamental. Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est déterminé par l'équation suivante :

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta_0} \cdot \frac{I}{I_0} \cdot \frac{DO_0}{DO}$$

Où Φ_{Δ} et Φ_{Δ_0} , I et I_0 , DO et DO_0 sont les rendements quantiques de production d'oxygène singulet, les intensités de production d'oxygène singulet et les densités optiques de l'échantillon et de la référence respectivement.

La figure 77 présente les spectres de luminescence d'oxygène singulet des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs dans l'éthanol à une longueur d'onde d'excitation de 422 nm.

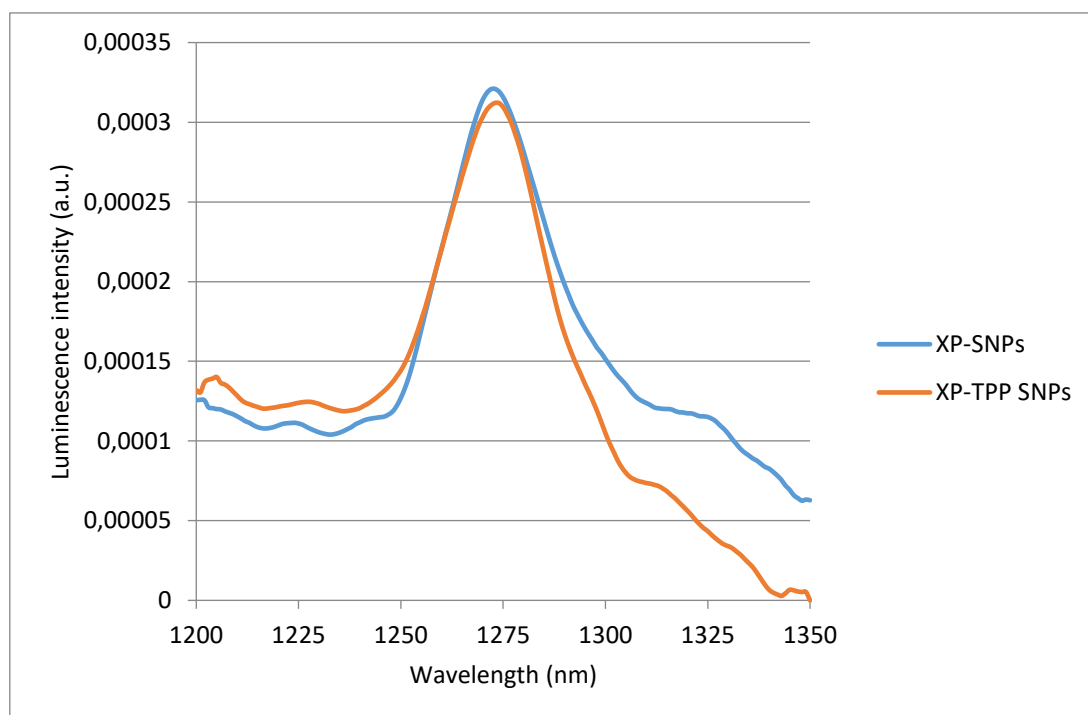


Figure 77: Spectres d'émission de luminescence d'oxygène singulet de XP-SNPs et XP-TPP SNPs dans l'éthanol.

Les spectres montrent que les nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs produisent bien de l'oxygène singulet dans l'éthanol. Des rendements quantiques de production d'oxygène singulet ($\Phi\Delta$) de 0,21 et 0,19 respectivement ont été calculés, en utilisant comme référence une solution de Rose de Bengale ayant un rendement de 0,68 dans l'éthanol [190].

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les nanoparticules XP-TPP SNPs présentent les mêmes rendements quantiques de fluorescence et d'oxygène singulet que ceux des nanoparticules XP-SNPs. L'ajout du cation TPP n'affecte pas les propriétés physico-chimiques du PS. On a donc deux nano-objets similaires qui ne se différencient que par la présence ou l'absence du cation TPP. L'évaluation de l'activité biologique de ces nano-objets déterminera si le ciblage mitochondrial permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique du PS.

IX. Évaluation de l'activité biologique des nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs

La cytotoxicité des nanoparticules hybrides a été étudiée sur deux lignées cellulaires cancéreuses du cancer colorectal humain de grade différent : HCT116 (grade I) et HT-29 (grade II). La toxicité a été déterminée par dosage MTT, 48 h après irradiation avec un laser à 630 nm. Les résultats obtenus montrent que les XP-SNPs, sans irradiation, n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire. Ces nano-objets répondent donc à l'un des critères d'un PS idéal : la non-toxicité en absence de lumière. De plus, une fois photoactivés par la lumière rouge, les XP-SNPs exercent un effet dose dépendant sur la viabilité cellulaire.

Les valeurs des IC_{50} en TPPOH ont été déterminées à partir de ces résultats (tableau 7). Il est à noter que l' IC_{50} est la concentration de PS nécessaire pour obtenir une réduction de 50% de la viabilité cellulaire.

Tableau 7 : Phototoxicité *in vitro* des XP-SNPs dans les cellules de cancer colorectal humain.

	IC_{50} (nM)	
	HCT116	HT-29
TPPOH seule	2943 ± 102	5959 ± 430
XP SNPs	72.6 ± 2.8	550.2 ± 7.5

Comparés à la TPPOH seule, les XP-SNPs sont 40 fois plus efficace contre les cellules HCT116 et 10 fois plus efficace contre les cellules HT-29. Ces résultats montrent que l'association de la TPPOH avec des NPs permet d'augmenter son efficacité.

La morphologie des cellules HCT116 a été caractérisée par analyse MET (figure 78). Après une irradiation à 630 nm, les cellules non traitées présentaient des microvillosités abondantes,

signe d'une morphologie normale. Les cellules traitées avec des XP-SNPs conservés à l'obscurité ont montré une absorption de NPs sans changement morphologique. Cependant, les cellules traitées avec des XP-SNPs puis irradiées présentaient une dégradation complète des structures intracellulaires. Ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques apoptotiques telles que le rétrécissement de la membrane cellulaire, la condensation nucléaire et la formation de vésicules phagocytaires ou des corps apoptotiques [191].

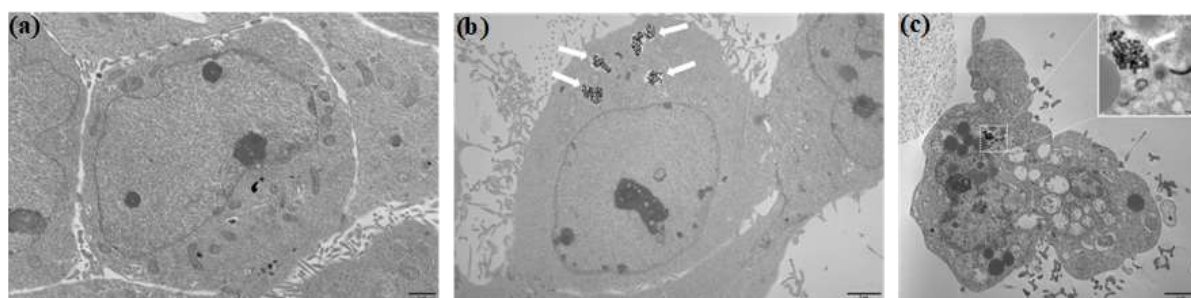


Figure 78 : Analyse MET des cellules HCT116 (a) cellule de contrôle (irradiée) (b) XP-SNPs (non irradiée) (c) XP-SNPs (irradiée).

De la même manière, la cytotoxicité des nanoparticules hybrides XP-TPP SNPs a été étudiée sur les deux lignées cellulaires cancéreuses du cancer colorectal humain HCT116 et HT-29.

Comme dans le cas de XP-SNPs, les XP-TPP SNPs ne présentent pas d'effet sur la viabilité cellulaire à l'obscurité. De plus, une fois photoactivées par lumière rouge, les XP-TPP SNPs exercent un effet dose dépendant sur la viabilité cellulaire. Les IC_{50} obtenues après irradiation sont répertoriées dans le tableau 8.

Tableau 8: Phototoxicité *in vitro* des XP-TPP SNPs dans les cellules de cancer colorectal humain.

	IC_{50} (nM) (n=1)	
	HCT116	HT-29
Porphyrine (16) seule	530	1620
XP-TPP SNPs	10,07	175

Nous pouvons voir que l' IC_{50} des XP-TPP SNPs est inférieure à l' IC_{50} de la porphyrine (**16**) seule, ce qui montre que l'association de la porphyrine (**16**) avec des NPs permet d'augmenter l'efficacité de ce PS. De plus, comparés à la porphyrine (**16**) seule, les XP-SNPs sont 50 fois plus efficace contre les cellules HCT116 et 10 fois plus efficace contre les cellules HT-29.

En comparaison aux résultats obtenus avec XP-SNPs, les nanoparticules XP-TPP SNPs sont 7 fois plus efficace contre les cellules HCT116 et 3 fois plus efficace contre les cellules HT-29.

Ces résultats montrent donc que le ciblage mitochondrial améliore significativement l'efficacité thérapeutique de la TPPOH.

X. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la préparation de nanoparticules hybrides à base de xylane en vue de leur utilisation comme vecteur de porphyrine pour une application en PDT. Pour se faire, nous avons tout d'abord préparé une *méso*-aryle porphyrine par la méthode des aldéhydes mixtes. Nous avons par la suite fonctionnalisé cette porphyrine par un bras espaceur portant une fonction acide carboxylique. Ce bras a permis la fixation de la porphyrine sur le xylane par une réaction d'estérification. Afin d'évaluer l'influence des principaux facteurs influençant l'estérification, la température, le temps de réaction et le nombre d'équivalents de porphyrines sur le degré de substitution en porphyrine, nous avons construit un plan d'expériences en carré gréco-latin. Nous avons effectué neuf expériences qui ont permis d'obtenir neuf échantillons avec des degrés de substitution en porphyrine variables allant de 0,034 à 1,11. Parallèlement, nous avons préparé avec succès, de manière parfaitement reproductible, des nanoparticules de silices de taille mono disperse et de forme sphérique. Il nous a été possible par la suite de les rendre cationiques par l'introduction de groupements amines à l'aide du réactif APTES. Enfin, la dernière étape a consisté à l'utilisation du conjugué xylane-porphyrine qui a le DS le plus élevé en porphyrine tout en restant soluble dans l'eau (0,2) pour l'élaboration des nanoparticules hybrides. Nous avons montré que ce conjugué peut enrober de manière stable les nanoparticules de silices cationiques. Ceci est la conséquence de la présence de groupements carboxylates sur les xylandes favorisant la formation de liaisons ioniques en surface. Des tests de viabilité cellulaire *in vitro*, effectués sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines HCT 116 et HT-29 ont montré une activité très prometteuse des nanoparticules hybrides synthétisées.

Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous avons travaillé sur une deuxième série de nanoparticules hybrides portant une porphyrine fonctionnalisée avec un cation triphénylphosphonium dans le but de cibler les mitochondries, afin d'accroître l'efficacité du PS et initier une mort cellulaire par apoptose. Pour cela, nous avons préparé une porphyrine bifonctionnelle portant à la fois le cation triphénylphosphonium et une fonction acide carboxylique. Nous avons donc tout d'abord préparé une porphyrine di-hydroxylée, la *trans*-TPP(OH)₂. Deux méthodes de synthèse à savoir la méthode des aldéhydes mixtes et la méthode de Lindsey ont été explorées. Sur les deux méthodes étudiées, la méthode des aldéhydes mixtes nous semble la plus adaptée pour obtenir la *trans*-TPP(OH)₂ en quantité massique suffisante

pour effectuer toutes les étapes de fonctionnalisation. La porphyrine bifonctionnelle finale a ensuite été fixée sur le xylane par estérification. Enfin, le conjugué xylane-porphyrine-cation TPP obtenu a été utilisé pour enrober les nanoparticules de silice. Les résultats de production d'oxygène singulet ont montré que les nanoparticules hybrides avec cation TPP ont le même rendement quantique d'oxygène singulet que les nanoparticules hybrides sans cation TPP. Cependant, les tests de viabilité cellulaire *in vitro*, effectués sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines HCT 116 et HT-29 ont montré une amélioration significative de l'efficacité thérapeutique grâce au ciblage par le cation triphénylphosphonium. Ceci confirme donc l'intérêt du ciblage mitochondrial.

Chapitre II : Nanoparticules organiques formées par autoassemblage de xylane

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons la synthèse de nanoparticules 100% organiques, supposées plus facilement biodégradables et non toxiques, dont la structure est constituée uniquement du polysaccharide fonctionnalisé par des PS. Nous pensons ainsi pouvoir limiter les phénomènes de bioaccumulation, pouvant engendrer de la toxicité, décrite pour certains nano-objets inorganiques, réputés moins facilement dégradés ou éliminés. Des travaux de la littérature ont démontré la possibilité d'un autoassemblage en nanoparticule, du xylane amphiphile fonctionnalisé avec des groupements hydrophobes. Pour cela, deux voies ont été explorées : dans une première approche, les photosensibilisateurs sont fixés par liaisons covalentes sur le xylane et le polymère obtenu est alors nanostructuré. Dans une seconde stratégie, les photosensibilisateurs, porteurs de groupements chargés, sont encapsulés par interactions ioniques et hydrophobes dans les nanoparticules formées à l'aide du xylane. Les deux stratégies sont présentées sur la figure 79.

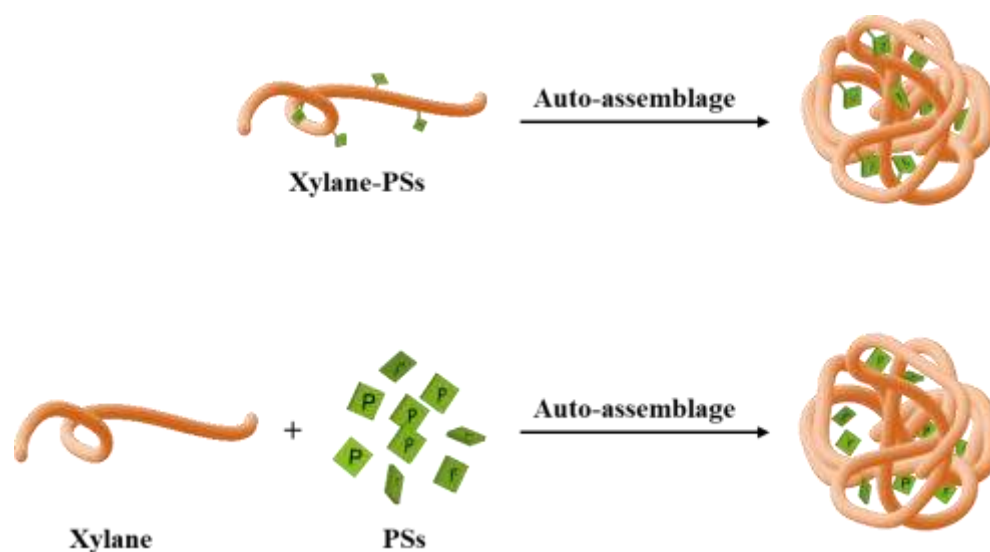


Figure 79: Stratégies de synthèse des nanoparticules de xylane par autoassemblage.

Pour des applications en milieu biologique il est préférable de concevoir des nano-objets dispersibles dans l'eau, ce qui implique que la solubilité du polymère utilisé dans l'eau doit être faible au risque d'obtenir des nanoparticules instables (voire ne pas en obtenir du tout). En principe, la formation de nanoparticules par autoassemblage est réalisée par un déplacement lent d'un solvant par un autre. En effet, un xylane rendu amphiphile, solubilisé dans un solvant organique polaire, doit pouvoir s'organiser en nanoparticules par échange de ce solvant contre de l'eau. L'échange de solvant peut être effectué par dialyse ou par nanoprecipitation contrôlée

[192]. Cette dernière consiste à ajouter, sous agitation, goutte à goutte de l'eau à la solution de polymère. Néanmoins, elle présente un inconvénient : le solvant organique n'est pas directement éliminé lors de la nanoprécipitation, contrairement à la dialyse. Ceci ne pose généralement pas de problèmes lorsqu'un solvant organique volatil, miscible à l'eau peut être utilisé, son élimination étant alors assurée par simple concentration sous vide. Malheureusement dans notre cas ce n'est pas possible, le conjugué xylane-porphyrine n'étant soluble que dans des solvants organiques non volatils comme le DMSO, DMF et DMAc. Nous appliquerons donc la méthode de la dialyse pour préparer les nanoparticules de xylane 100% organiques.

Cette méthode consiste donc à solubiliser le polysaccharide dans un solvant organique et à l'introduire dans une membrane de dialyse au seuil de coupure bien choisi. Puis, la membrane remplie est placée dans un volume donné d'eau, régulièrement renouvelée, pour réaliser l'échange de solvant (figure 80).

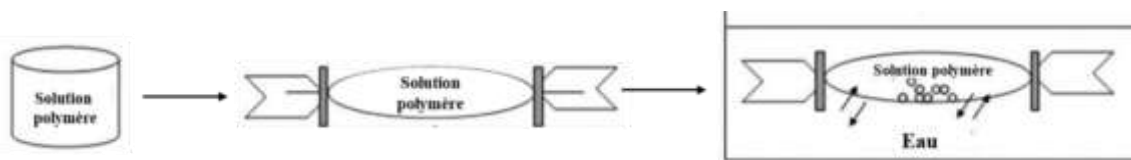


Figure 80: Schéma de dialyse adapté de la référence [193].

Durant la dialyse, le solvant organique présent à l'intérieur de la membrane va progressivement être échangé avec de l'eau. L'entrée progressive de l'eau à l'intérieur de la membrane rend le mélange solvant organique-eau de moins en moins capable de solubiliser le polysaccharide. Par conséquent, l'augmentation de la tension interfaciale pousse les molécules du polysaccharide à s'agréger afin de minimiser l'énergie du système, conduisant ainsi à la formation de nanoparticules [193].

II. Préparation de nanoparticules de xylane portant des PS liés de façon covalente

II.1. Préparation des nanoparticules à partir des échantillons de conjugués xylane-porphyrines issus du plan d'expériences

Rappelons que dans la première partie de ce travail la mise en place d'un plan d'expériences a permis de former différents échantillons de conjugués xylane-porphyrines pour lesquels il est possible d'observer que la solubilité dans l'eau devient faible lorsque le DS en porphyrines dépasse 0,2. Si les échantillons solubles dans l'eau se sont avérés intéressants pour la

préparation des nano-objets hybrides, les composés insolubles dans l'eau ($DS > 0,2$, tableau 9) apparaissent comme de bons candidats pour former les nanoparticules organiques.

Tableau 9 : Échantillons de xylane-porphyrine du plan d'expériences non soluble dans l'eau.

Échantillon	S3	S5	S6	S7	S8
DS _{TPPOH} (motif de répétition de xylane)	0,3	1,11	0,31	0,72	0,4

En s'appuyant sur les travaux de Wondraczek et coll. [192], ces échantillons ont été solubilisés dans le diméthylacétamide (DMAc) à une concentration de 4 mg/mL. La solution de polysaccharide a ensuite été introduite dans une membrane de dialyse de 10 cm de longueur et de porosité 3500 Da, puis dialysée contre 500 mL d'eau pendant 15 h, en changeant l'eau toutes les trois heures.

À la fin de la dialyse, la suspension contenue dans la membrane est centrifugée à 10000 rpm. Uniquement les échantillons S5, S7 et S8 formaient un culot. Le surnageant est donc éliminé et le culot est redispersé dans l'eau puis analysé par microscope électronique à balayage (figure 81). Les images obtenues montrent des particules de taille micrométrique (de 1 à 2 μm).

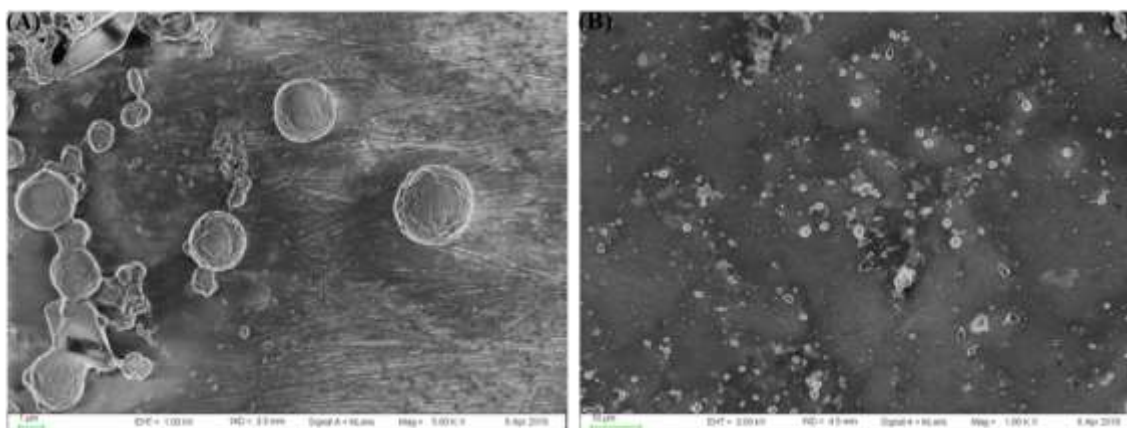


Figure 81: Images MEB des particules obtenues à partir des échantillons S5 (A) et S7 (B).

Nous supposons que la formation de microparticules vient du fait que le DS en porphyrine est faible. En effet, il est décrit dans la littérature que la taille des particules diminue en augmentant le DS en groupements hydrophobes. Nous avons donc cherché à résoudre ce problème en augmentant le DS en groupements hydrophobes par fixation de groupements acétyles. Nous avons réalisé cela sur l'échantillon qui présente le DS le plus élevé en TPPOH, l'échantillon de xylane S5.

II.2. Préparation de nanoparticules à partir de xylane portant des porphyrines après acétylation

II.2.1. Acétylation du xylane S5

L'acétylation des xylanes est décrite depuis de nombreuses années pour modifier les propriétés des xylanes telles que la solubilité, l'hydrophobicité ou encore la thermoélasticité [194]. Elle est le plus souvent réalisée en utilisant des anhydrides en présence de la pyridine comme catalyseur [195,196]. Plus récemment, Zhang et coll. [197] ont publié une méthode plus douce d'acétylation des xylanes utilisant un mélange DMSO/N-méthylimidazole (NMI). Dans cette méthode, la pyridine est remplacée par la NMI, qui joue à la fois le rôle de solvant et de catalyseur d'acétylation.

Le xylane S5 a donc été acétylé suivant la méthode de Zhang et coll. Le xylane S5 a été, dans un premier temps, solubilisé dans le DMSO, puis la NMI est ajoutée et le mélange réactionnel est agité pendant une heure à 80 °C. Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante, puis deux équivalents d'anhydride acétique sont ajoutés. La réaction est ensuite agitée pendant deux heures sous atmosphère inerte (figure 82). En fin de réaction, le xylane acétylé est précipité par l'ajout d'éthanol absolu puis récupéré par filtration et lavé. Le produit nommé S5-Ac est obtenu avec un rendement massique de 90%.

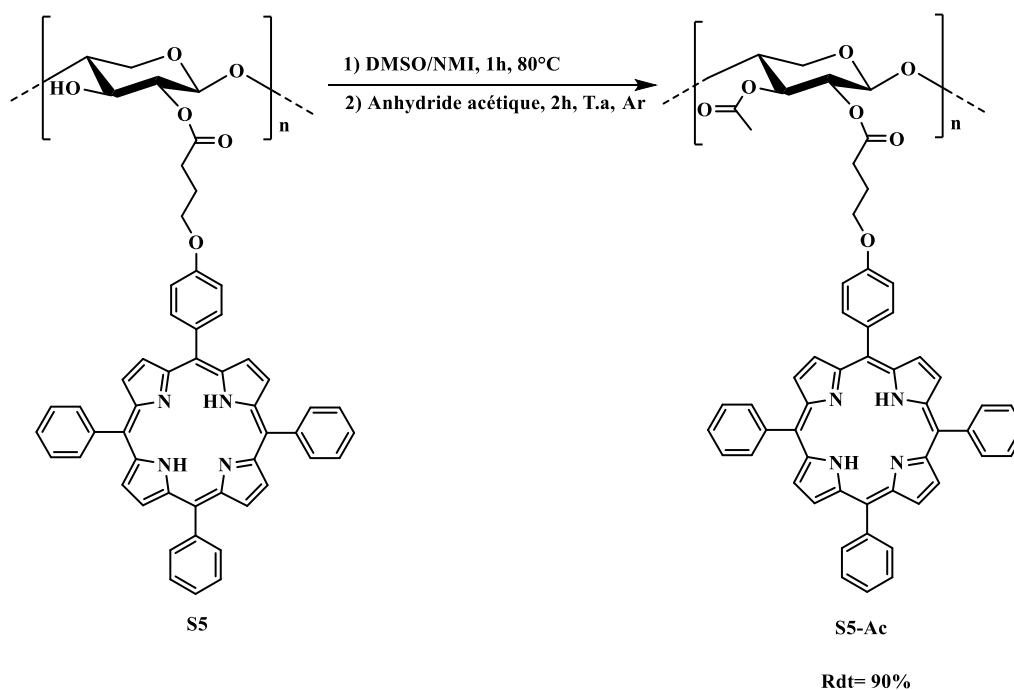


Figure 82: Acétylation du xylane S5.

Le produit S5-Ac a été analysé par RMN ^1H . Le spectre obtenu (figure 83) montre, en plus des protons caractéristiques de la TPPOH, l'apparition d'un signal à 1,97 ppm correspondant aux protons des groupes acétyle. Ce résultat confirme le succès de l'acétylation du xylane S5.

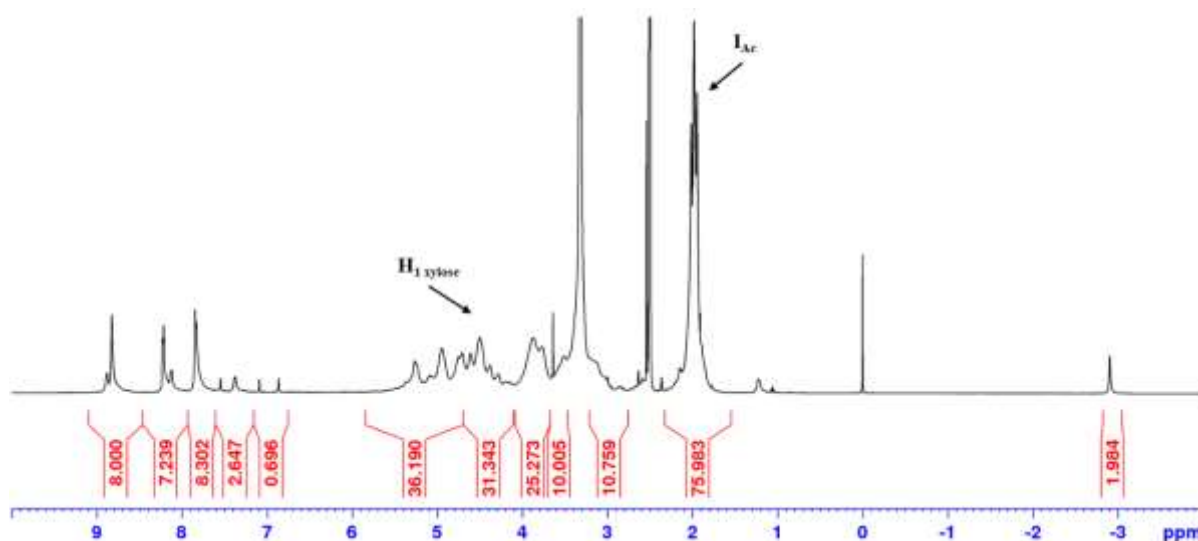


Figure 83: Spectre RMN ^1H du produit S5-Ac dans le DMSO.

Le degré de substitution en acétyle est calculé selon l'équation (4) :

$$(4) \quad DS = \frac{I_{Ac}/3}{I_{H1}}$$

Où I_{Ac} est l'intégration des protons méthyle et I_{H1} est l'intégration des protons anomériques d'unité xylose. Nous avons obtenu un DS de 0,8.

D'autre part, sur la base de ce même spectre RMN, le DS en TPPOH fixé lors de la première étape a été recalculé selon l'équation (2). Il est passé de 1,11 avant acétylation à 0,3. La réaction d'acétylation a donc conduit à une perte de TPPOH, démontrant ainsi la relative instabilité de la liaison ester entre xylose et porphyrine dans les conditions de la réaction d'acétylation. Bien que la charge en porphyrine ait diminué, nous avons étudié l'aptitude de ce polymère à former des nanoparticules.

II.2.2. Préparation des nanoparticules à partir du xylane acétylé S5-Ac

Le xylane acétylé S5-Ac a ensuite été utilisé pour former des nanoparticules organiques. Pour cela, il a été dialysé suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Après dialyse, la suspension est centrifugée à 10000 rpm, le surnageant éliminé et le culot est ensuite lavé plusieurs fois avec de l'eau afin d'éliminer les résidus solubles, non transformés en nanoparticules. Les nanoparticules sont ensuite dispersées dans de l'eau puis caractérisées.

La suspension de nanoparticules obtenues a été caractérisée par spectroscopie DLS (figure 84).

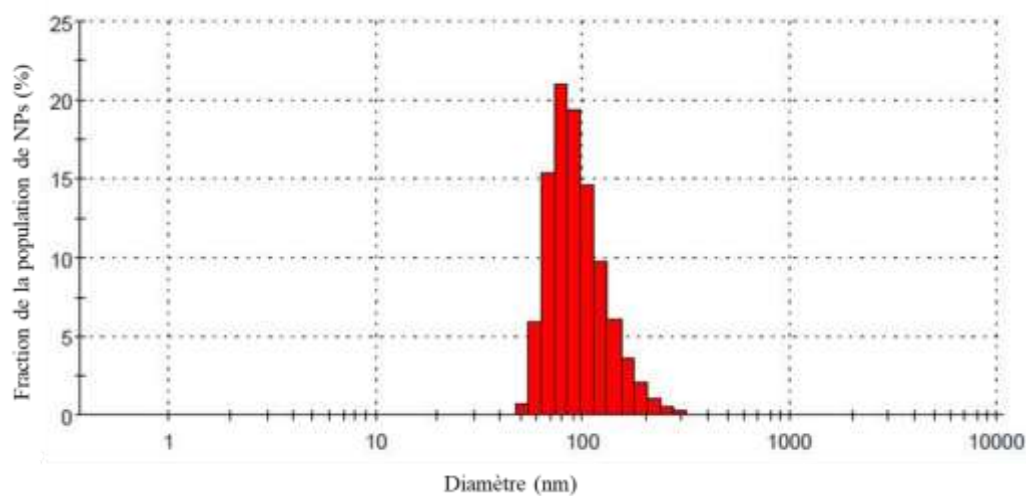


Figure 84: Distribution de taille des nanoparticules S5-Ac obtenues à partir du xylane S5 acétylé par dialyse.

L'analyse de la distribution de taille des nanoparticules S5-Ac obtenue montre qu'environ 82% de nanoparticules formées présentent un diamètre compris entre 68 et 120 nm. Ces résultats ont été confirmés par des analyses au microscope électronique à balayage (figure 85).

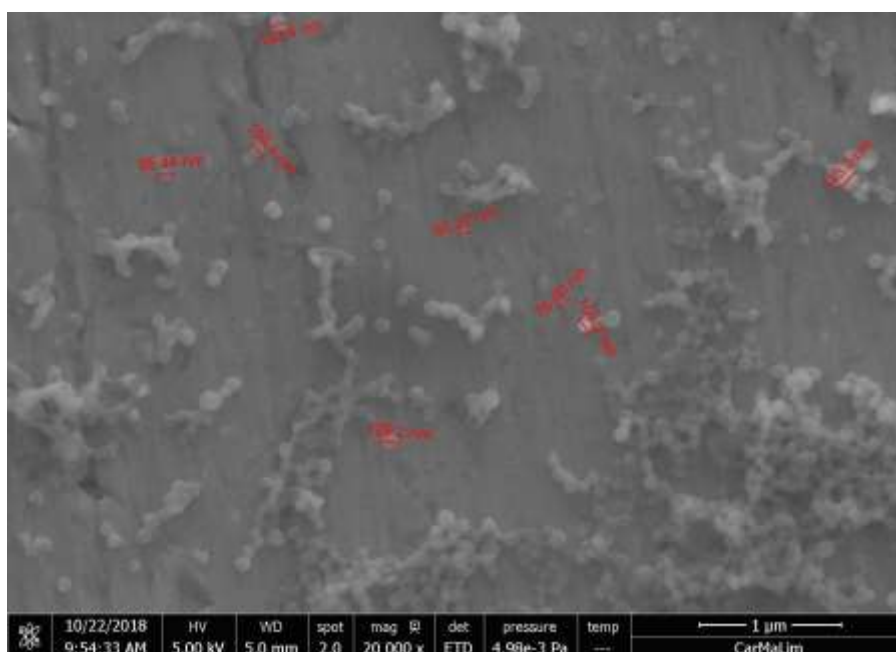


Figure 85: Images MEB des nanoparticules S5-Ac.

L'acétylation du xylane nous a donc permis de réduire la taille des particules obtenues avec le xylane S5 non acétylé. Afin de s'affranchir du problème de perte de porphyrines lors de l'étape d'acétylation, nous avons choisi d'inverser les étapes, en acétylant préalablement le xylane.

II.3. Préparation de nanoparticules à partir du xylane après acétylation suivie du greffage de porphyrines

II.3.1. Acétylation du xylane de hêtre

L'acétylation du xylane de hêtre est effectuée suivant la même méthode que celle décrite précédemment (figure 86). Cette méthode permet, dans les mêmes conditions opératoires, d'augmenter le degré de substitution en augmentant le nombre d'équivalents de l'anhydride acétique.

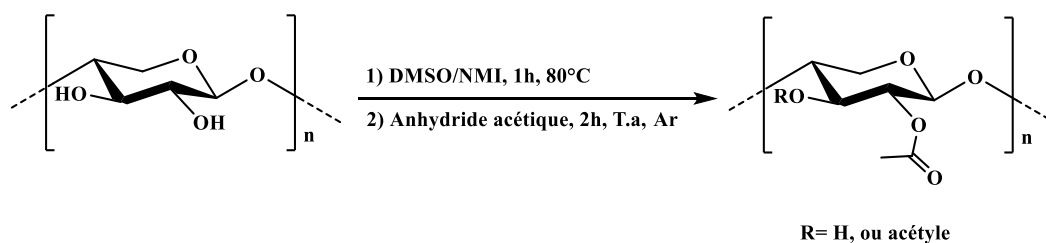


Figure 86: Acétylation du xylane de hêtre.

En faisant varier le nombre d'équivalents de l'anhydride acétique, nous avons obtenu sept xylanes acétylés avec des DS variables, allant de 0,02 à 1,10 (tableau 10). Contrairement aux DS en TPPOH, les DS en acétyles sont exprimés par unité xylose. Les rendements massiques obtenus varient de 71% à 108%. Ces rendements sont faibles, probablement parce que les taux de récupération de produits après filtration sont faibles.

Tableau 10: Rendements massiques et DS des xylanes acétylés.

Échantillon	Xyl-Ac1	Xyl-Ac2	Xyl-Ac3	Xyl-Ac4	Xyl-Ac5	Xyl-Ac6	Xyl-Ac7
DS	0,02	0,11	0,21	0,34	0,68	0,80	1,10
Rdt massique	94	90	72	71	86	89	108

Les DS en acétyles sont calculés à partir des spectres RMN¹H en utilisant l'équation (4). En effet, les spectres RMN¹H des sept produits laissent apparaître un signal vers 1,97 ppm confirmant la présence des groupements acétyles (figure 87).

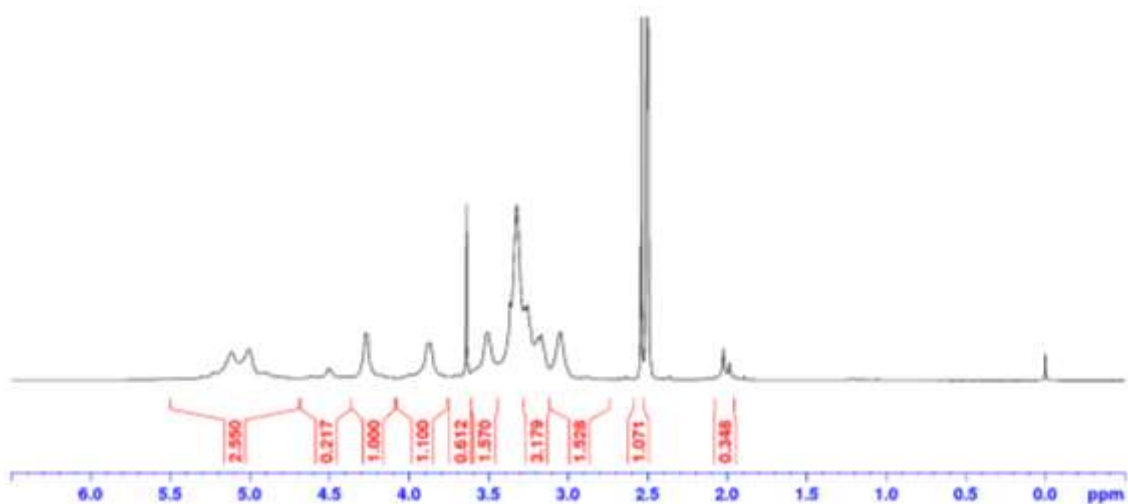


Figure 87: Spectre RMN¹H du Xyl-Ac2 dans le DMSO.

Les xylanes acétylés sont également analysés par spectrométrie infrarouge (figure 88). Les spectres IR des xylanes Xyl-Ac1, Xyl-Ac2, Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, Xyl-Ac5, Xyl-Ac6, Xyl-Ac7, montrent l'existence des bandes à 1735 cm⁻¹ (fonction C=O), 1370 cm⁻¹ (C-H ; (CH₃)) et 1220 cm⁻¹ (C-O) caractéristiques des groupes acétyles. De plus, la comparaison des sept spectres montre une évolution marquante de l'intensité de ces bandes en fonction des degrés de substitution.

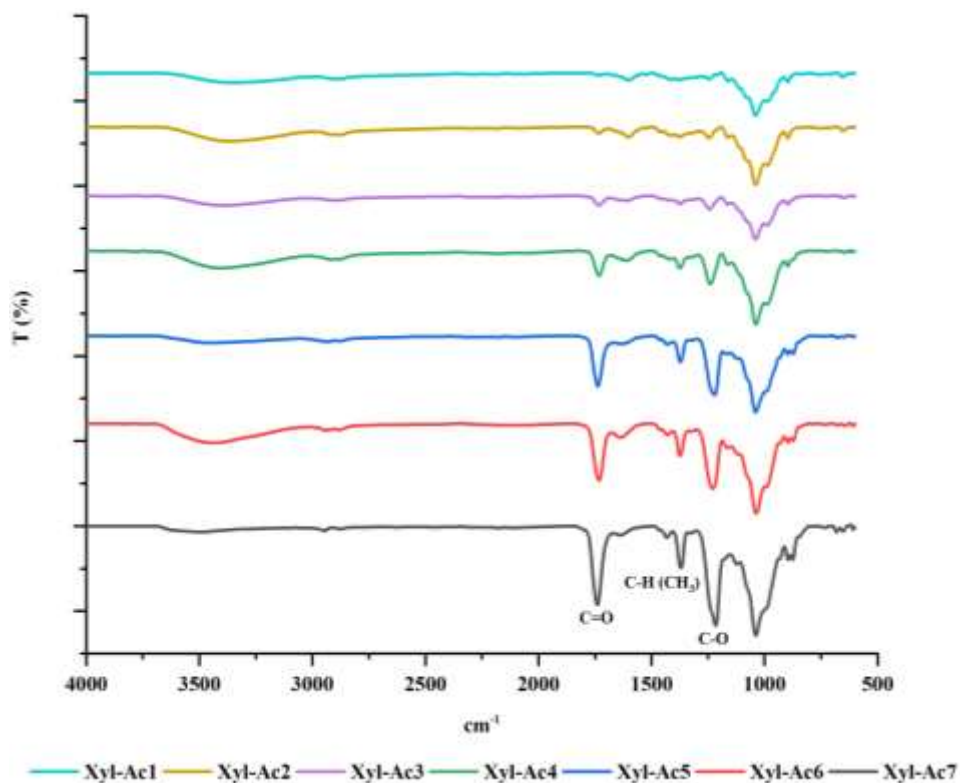


Figure 88: Analyse infrarouge des xylanes acétylés Xyl-Ac1, Xyl-Ac2, Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, Xyl-Ac5, Xyl-Ac6, Xyl-Ac7.

II.3.2. Évaluation de la formation de nanoparticules de xylanes acétylés

Avant de procéder à la fixation des photosensibilisateurs sur ces polymères acétylés, nous avons évalué leur capacité à former des nanoparticules en appliquant la méthode de dialyse décrite précédemment. Après dialyse, seuls les échantillons Xyl-Ac5 (DS = 0,68), Xyl-Ac6 (DS = 0,80), et Xyl-Ac7 (DS = 1,10) ont donné lieu à la formation de nanoparticules.

Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par DLS (figure 89). L'analyse de la répartition en taille des nanoparticules obtenues montre que 86% des nanoparticules obtenues à partir de Xyl-Ac5 ont une taille comprise entre 80 et 120 nm, alors que dans le cas de celles formées à partir de Xyl-Ac6, 87% d'entre elles présentent un diamètre compris entre 60 et 105 nm. Les nanoparticules obtenues à partir de Xyl-Ac7, quant à elles, affiche une taille comprise entre 50 et 90 nm pour 88% d'entre elles.

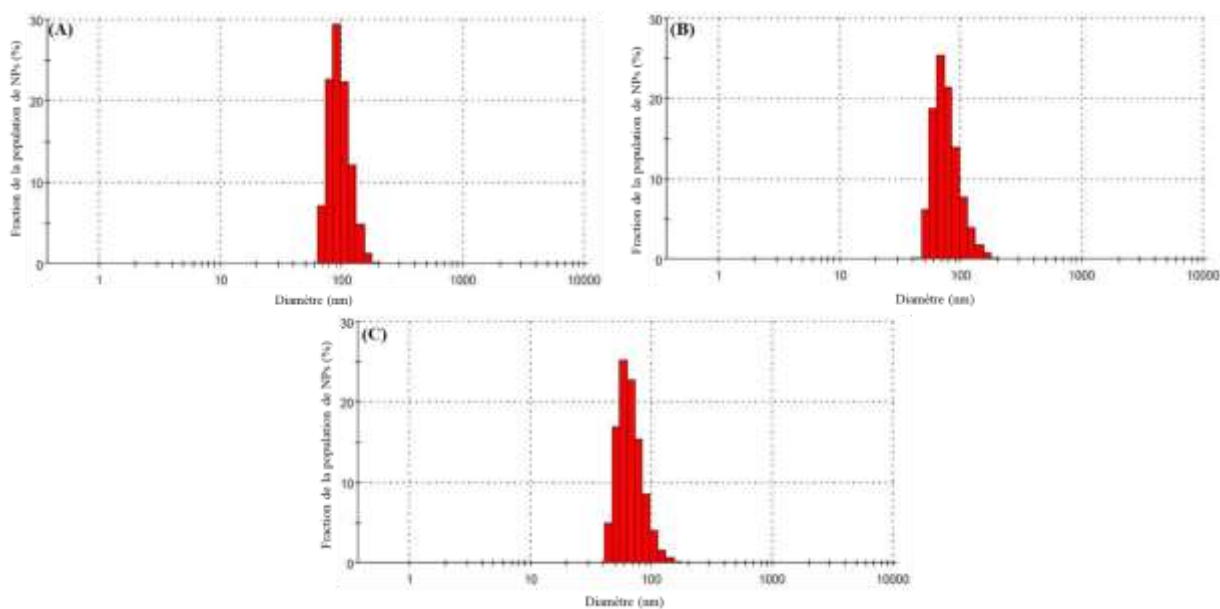


Figure 89: Distribution de taille des nanoparticules (A) Xyl-Ac5, (B) Xyl-Ac6, (C) Xyl-Ac7.

Ces résultats ont été confirmés par des observations au microscope électronique à balayage (figure 90).

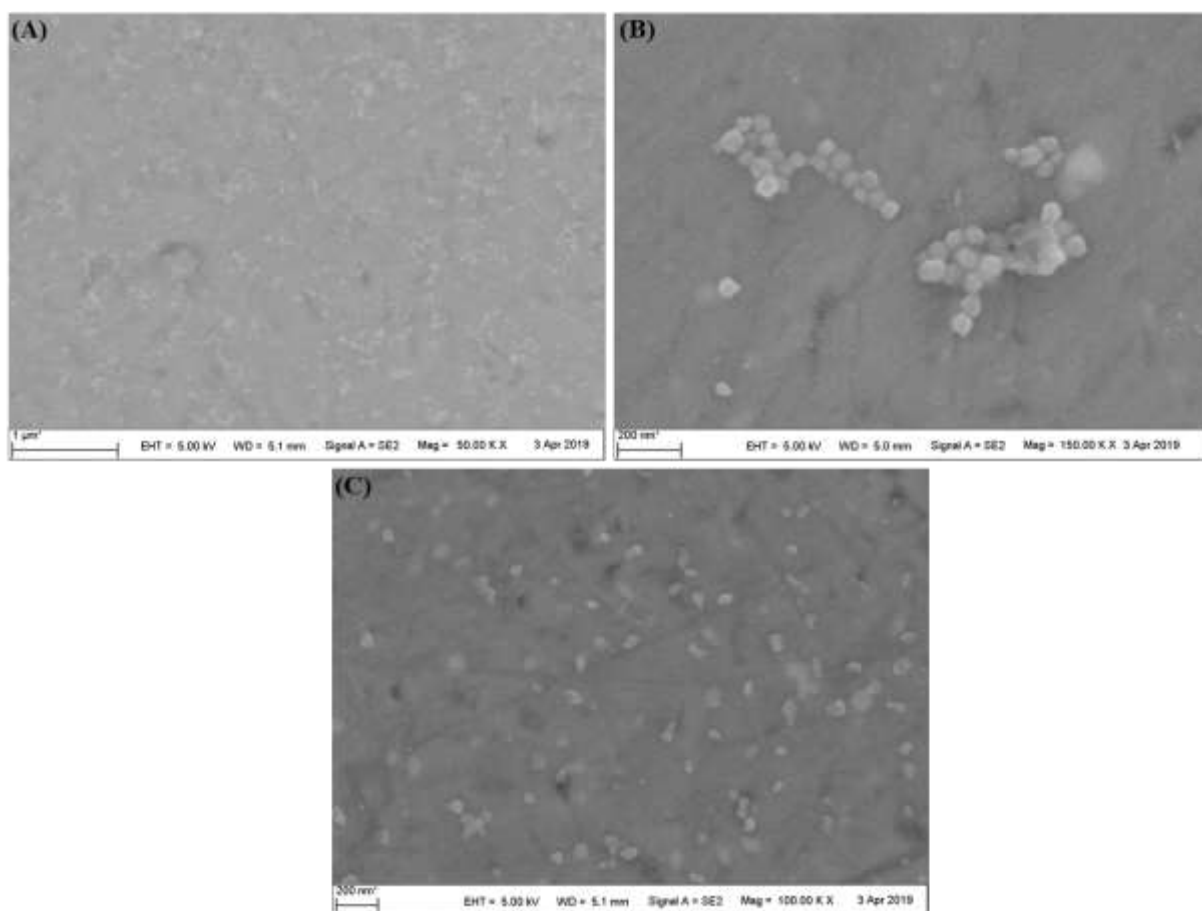


Figure 90: clichés MEB des nanoparticules (A) Xyl-Ac5, (B) Xyl-Ac6, et (C) Xyl-Ac7.

En accord avec des travaux antérieurs, la taille des nanoparticules diminue en augmentant de DS en acétyle. De plus, avec un DS de 1,10 les nanoparticules perdent leur forme sphérique. L'échantillon qui a donc donné les meilleurs résultats est le Xyl-Ac6.

II.3.3. Fonctionnalisation des xylandes acétylés par la TPPOH

Parmi l'ensemble des xylandes acétylés préparés, nous avons choisi Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, et Xyl-Ac5 pour les fonctionnaliser avec la TPPOH. Pour cela, les conditions opératoires du plan d'expériences permettant d'avoir un DS de 1,11 (DS exprimé par motif de xylane) sont appliquées (figure 91) ; notons que six équivalents de CDI ont été utilisés pour activer la TPPOH et le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C.

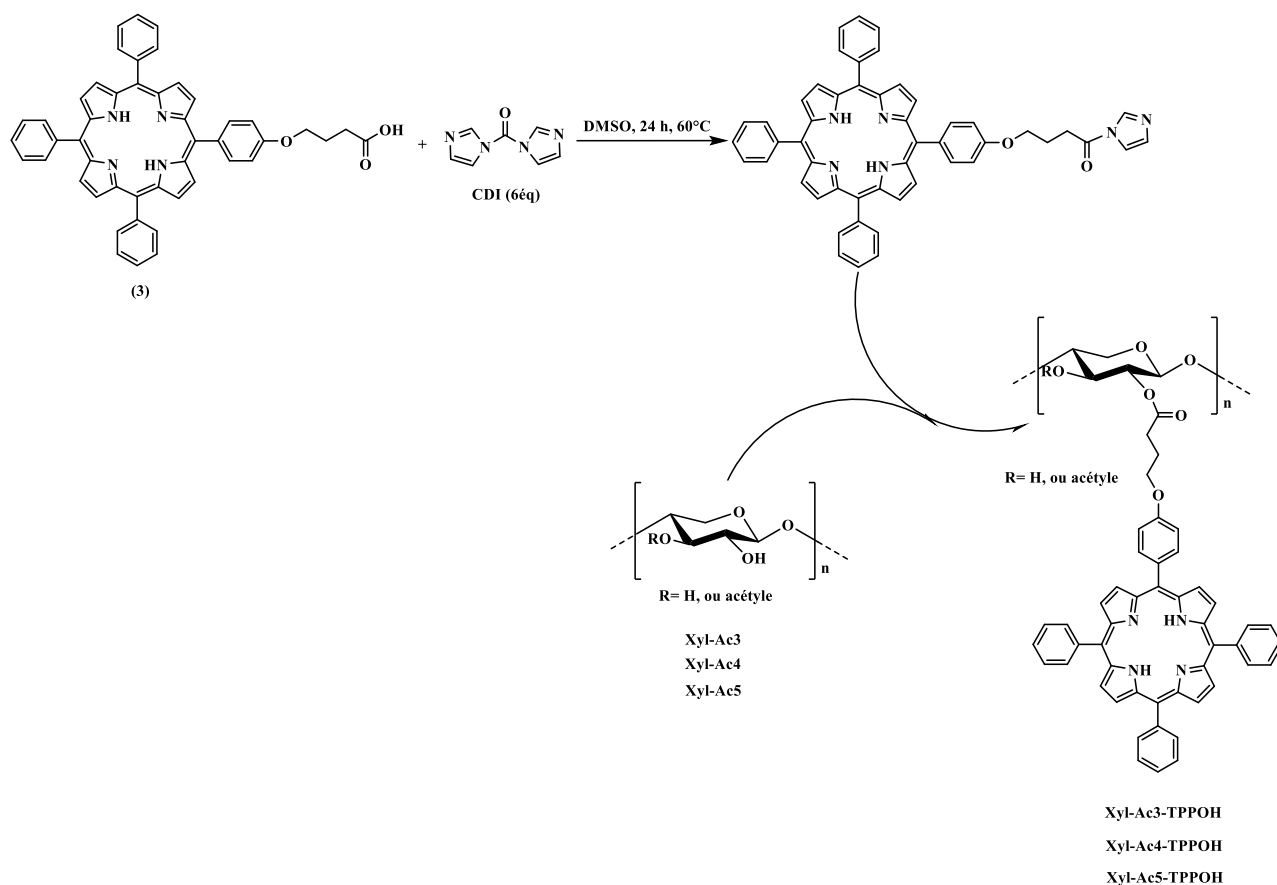


Figure 91: Fixation de la TPPOH sur les xylandes acétylés.

Après fixation de la TPPOH, les produits obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H . Les degrés de substitution calculés sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Degrés de substitution calculés après fixation de la TPPOH sur les xylandes Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, et Xyl-Ac5.

Échantillon	Xyl-Ac3-TPPOH	Xyl-Ac4-TPPOH	Xyl-Ac5-TPPOH
DS _{Acétyle} (exprimé par unité xylose)	0,22	0,31	0,63
DS _{TPPOH} (exprimé par motif de répétition du xylane)	0,71	0,52	0,13

Ces résultats montrent que les xylandes obtenus présentent des degrés de substitution inférieurs à 1,11 et que le DS en TPPOH diminue logiquement lorsque le DS en acétyle augmente. Ceci est en effet dû au fait que les xylandes Xyl-Ac3, Xyl-Ac4, et Xyl-Ac5 présentent moins de groupements hydroxyles libres, ces derniers étant partiellement bloqués par les groupements

acétyles. Les produits nommés Xyl-Ac3-TPPOH, Xyl-Ac4-TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH ont été obtenus avec des rendements massiques respectifs de 92%, 90% et 87%.

II.3.4. Mise en forme de nanoparticules par dialyse

Les xylandes Xyl-Ac3-TPPOH, Xyl-Ac4-TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH ont été solubilisés dans le DMAc et dialysés contre l'eau pendant 15 h. Après traitement classique de lavages et centrifugations, la distribution en taille des nanoparticules obtenues a été estimée par spectroscopie DLS (figure 92).

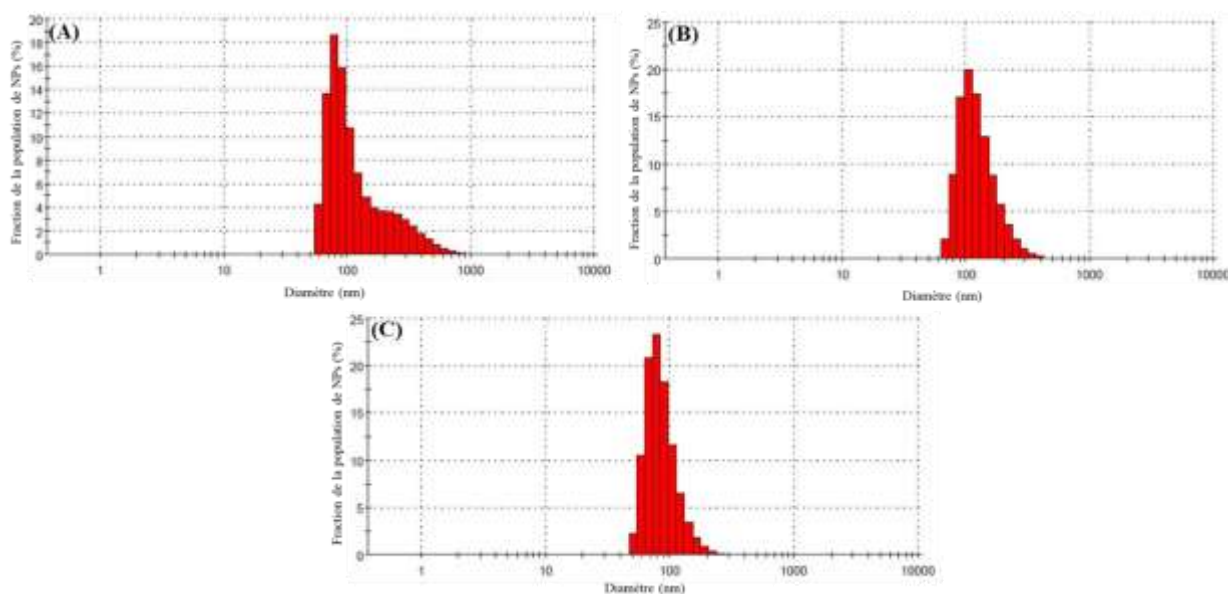


Figure 92: Distribution de taille des nanoparticules (A) Xyl-Ac3-TPPOH, (B) Xyl-Ac4-TPPOH, et (C) Xyl-Ac5-TPPOH.

L'analyse des résultats obtenus montre que des nanoparticules d'un diamètre aux alentours de 100 nm sont en moyenne obtenues pour les échantillons Xyl-Ac4-TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH. En effet, 85% des particules Xyl-Ac4-TPPOH ont une taille comprise entre 80 et 160 nm, et 85% des particules Xyl-Ac5-TPPOH présentent une taille comprise entre 60 et 120 nm. L'échantillon Xyl-Ac3-TPPOH, quant à lui, présente une distribution de taille sur une plage plus large. En effet, 85% de ces particules affichent un diamètre moyen compris entre 70 et 255 nm.

L'observation en microscopie électronique à balayage de l'échantillon Xyl-Ac3-TPPOH (figure 93-A) ne met pas en évidence la formation de nanoparticules. En effet, les images montrent des agrégats de polymère et non pas des nanoparticules. Les DS obtenus en TPPOH et acétyle pour cet échantillon ne permettent donc pas la formation de nanoparticules. En revanche, des

nanoparticules sphériques ont été observées pour les échantillons Xyl-Ac4-TPPOH (figure 93-B) et Xyl-Ac5-TPPOH (figure 93-C).

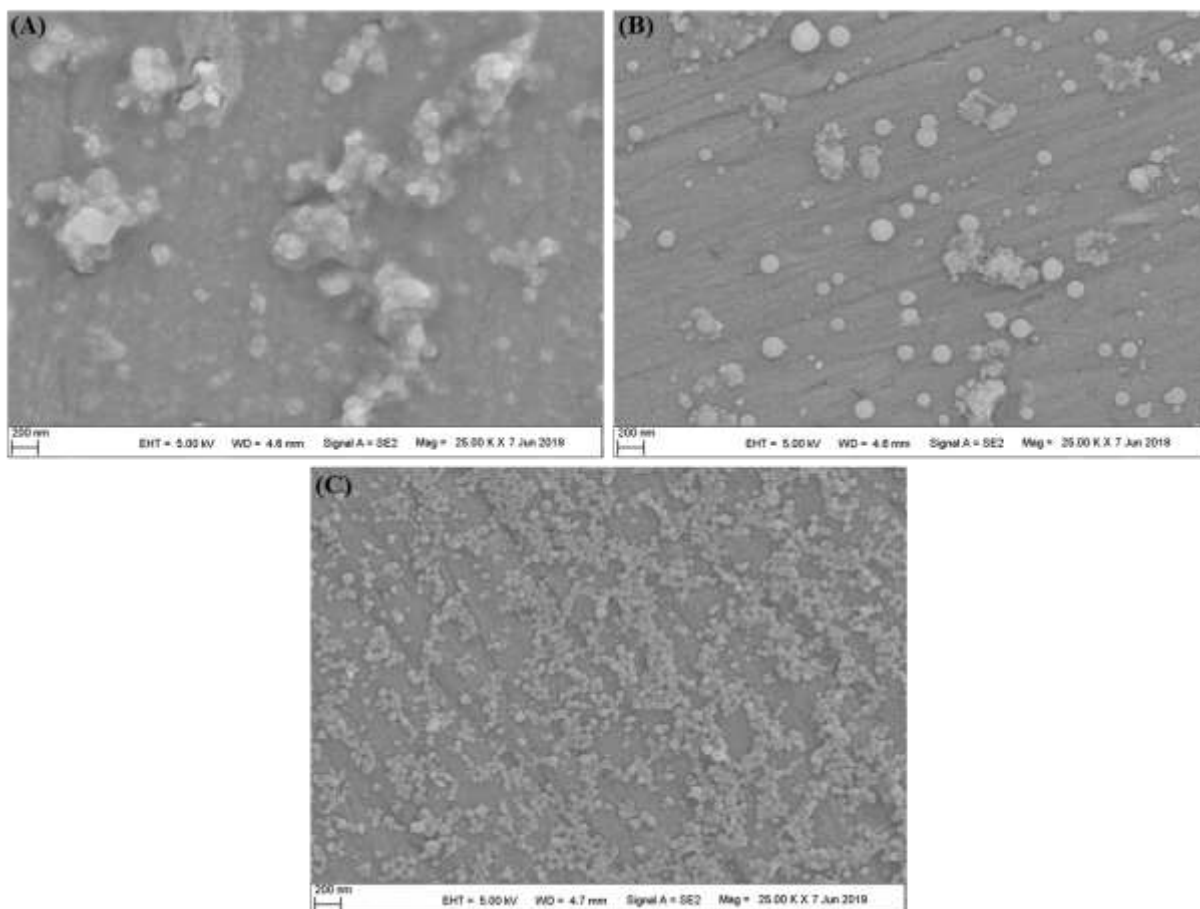


Figure 93: clichés MEB des nanoparticules (A) Xyl-Ac3-TPPOH, (B) Xyl-Ac4-TPPOH, et (C) Xyl-Ac5-TPPOH.

Au vu des résultats obtenus, l'acétylation apparaît nécessaire pour former des nanoparticules de xylane. De plus, le degré de substitution en acétyle joue un rôle important. En effet, comme le montrent les résultats précédents, l'échantillon Xyl-Ac3-TPPOH présentant un DS en TPPOH de 0,71 et un DS en acétyle de 0,22 ne forme pas de nanoparticules. Cependant, l'échantillon Xyl-Ac4-TPPOH présentant un DS plus faible en TPPOH (0,52) et plus élevé en acétyle (0,31) forme des nanoparticules. La formation de nanoparticules de xylane est donc régie principalement par le degré de substitution en acétyle.

En ce qui concerne la fonctionnalisation du xylane avec la TPPOH, le greffage après acétylation semble être le plus adapté. En effet, cette stratégie permet non seulement de préserver la TPPOH, mais également d'obtenir des taux de fonctionnalisation plus importants.

II.4. Préparation de nanoparticules organiques avec cation TPP

Dans le but de produire des nano-objets aux propriétés de ciblage accrues, nous avons choisi, comme dans le cas des nanoparticules hybrides, de les fonctionnaliser par un cation triphénylphosphonium. Pour cela, une stratégie analogue visant à fixer sur le polymère une porphyrine préalablement modifiée par introduction du cation TPP a été retenue.

II.4.1. Fixation de la porphyrine (16) sur le xylane acétylé

En nous appuyant sur les résultats décrits pour la porphyrine TPPOH, nous avons choisi d'appliquer les conditions opératoires permettant de préparer les nanoparticules Xyl-Ac4-TPPOH, adapté à la porphyrine (16). Bien que ces dernières soient plus polydisperses que les nanoparticules Xyl-Ac3-TPPOH, avec une taille comprise entre 80 et 160 nm, les nanoparticules Xyl-Ac4-TPPOH présentent le DS en porphyrine le plus élevé. Les conditions opératoires permettant de les obtenir nous semblent donc les meilleures pour la fonctionnalisation du xylane acétylé avec la porphyrine (16).

Pour se faire, la porphyrine (16) a été greffée, dans un premier temps, sur le xylane acétylé xyl-Ac4 selon les conditions opératoires du plan d'expériences permettant d'avoir un DS de 1,11, en utilisant six équivalents de CDI pour activer la porphyrine (figure 94).

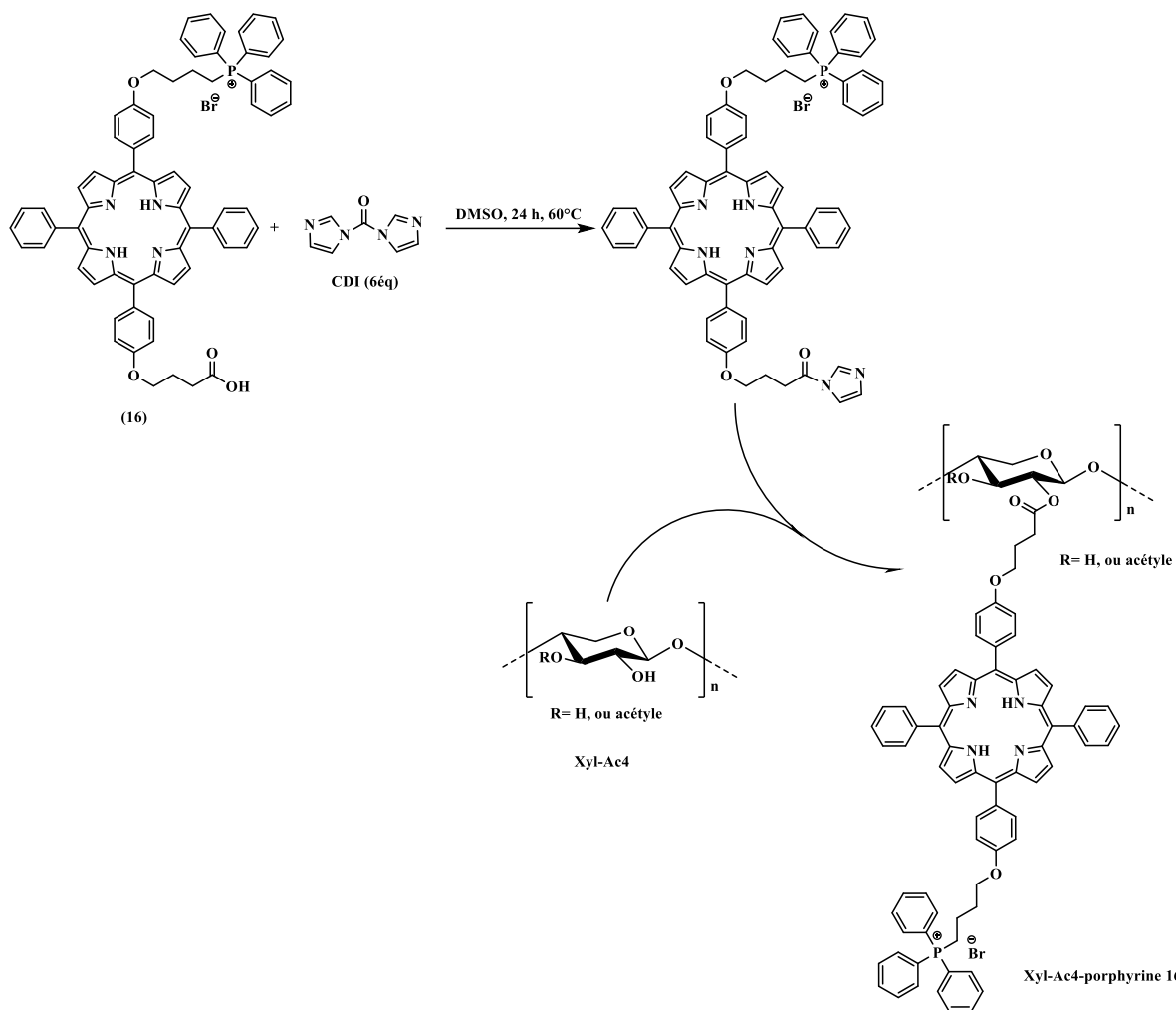


Figure 94: Fixation de la porphyrine **(16)** sur le xylane acétylé xyl-Ac4.

Le produit nommé Xyl-Ac4-porphyrine **(16)** a été obtenu avec un rendement massique de 39%. Le faible rendement est probablement dû au fait de travailler avec une faible quantité de xylanes. En effet, la porphyrine **(16)** n'a été obtenue qu'en petite quantité et nous sommes donc obligés de travailler avec des faibles quantités de xylanes, ce qui complique la récupération du produit par filtration.

Le degré de substitution du xylane Xyl-Ac4 en porphyrine **(16)** est calculé par RMN¹H. Contrairement à ce qu'on attendait, nous avons obtenu un DS de 0,1 en porphyrine **(16)**. Ce degré de substitution est 5 fois plus faible que celui du xylane Xyl-Ac4-TPPOH (DS=0,52). La présence de charges positives sur la porphyrine **(16)** limite probablement son activité, en lui permettant d'interagir avec les acides glucuroniques et les fonctions hydroxyles du xylane.

II.4.2. Mise en forme de nanoparticules par dialyse

Le xylane Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) a été solubilisé dans le DMSO et dialysé contre l'eau pendant 15 h. Après traitement classique de lavages et centrifugations, la distribution en taille des nanoparticules obtenues a été estimée par spectroscopie DLS (figure 95).

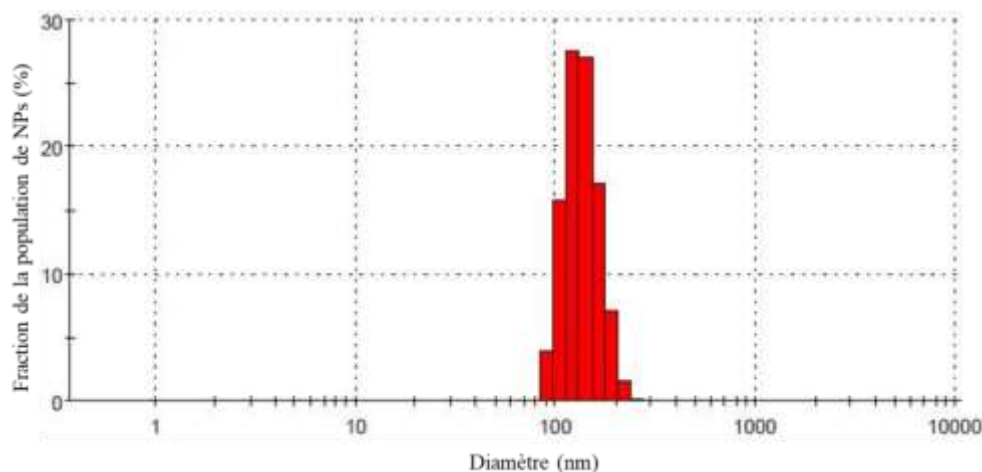


Figure 95: Distribution de taille des nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**).

Les résultats montrent que les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) ont un diamètre légèrement plus large que celui des nanoparticules Xyl-Ac4-TPPOH. En effet, 87 % de la population de nanoparticules affichent une taille comprise entre 100 et 160 nm.

Les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) ont été également observées au microscope électronique à balayage (figure 96).

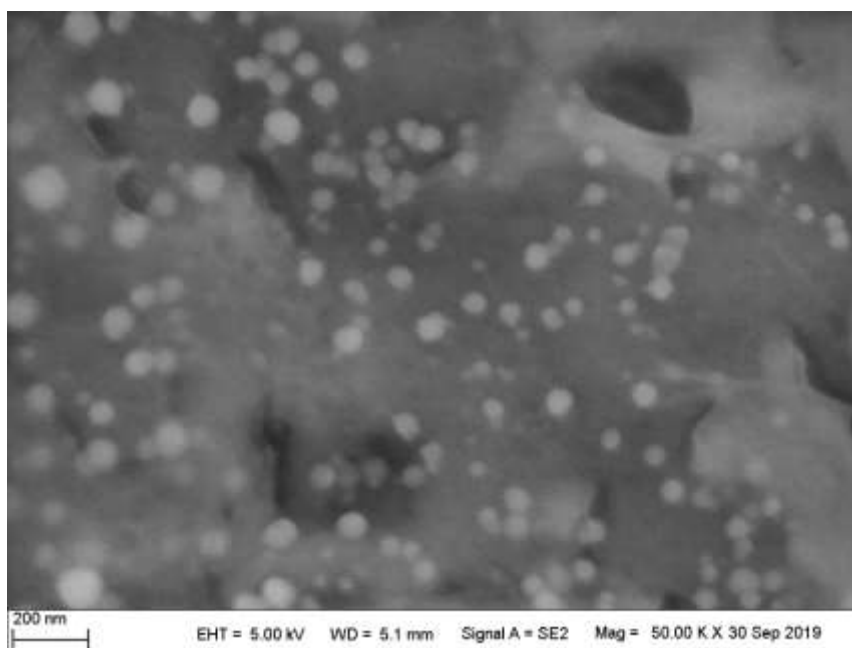


Figure 96: Clichés MEB des nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**).

Les images obtenues montrent, contrairement aux résultats du DLS, la présence de petites nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm. Les résultats de microscopie sont finalement similaires à ceux obtenus avec les nanoparticules xyl-Ac4-TPPOH. Dans ce cas toutefois, on observe que les nanoparticules sont piégées dans une matrice polymérique. Le lavage à l'eau n'a pas permis d'éliminer tout le polymère non transformé ce qui a pu fausser les résultats du DLS.

III. Caractérisation et évaluation biologique des nanoparticules de xylane portant des PS liés de façon covalente

III.1. Détermination de la quantité de photosensibilisateurs dans les nanoparticules

Afin de déterminer la quantité de photosensibilisateurs présente dans les nanoparticules de xylane S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**), les culots obtenus après centrifugation sont redispersés dans 5 mL d'eau distillée, puis 1 mL de ces suspensions est lyophilisé afin d'éliminer l'eau. Les concentrations massiques en nanoparticules sont regroupées dans le tableau 12. Il est à noter que les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH ont été préparées à partir de 20 mg de xylane de départ, tandis que les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) ont été préparées à partir de 15 mg de xylane.

Tableau 12 : Les concentrations massiques des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**)

Échantillon	S5-Ac	Xyl-Ac4-TPPOH	Xyl-Ac5-TPPOH	Xyl-Ac4-porphyrine (16)
Concentration massique (g/L)	6,5	8,7	5,5	6,6

Les nanoparticules sèches obtenues sont ensuite solubilisées dans le DMSO afin de libérer les PS en déstructurant les nano-objets. Ainsi, la quantité de PS en solution est déterminée par dosage par spectroscopie d'absorption UV-Visible. La quantité de PS dans les nanoparticules est déterminée à partir des absorbances de la bande de Soret des différentes solutions de nanoparticules dans le DMSO (figure 97), et des coefficients d'extinction molaire des différents PS.

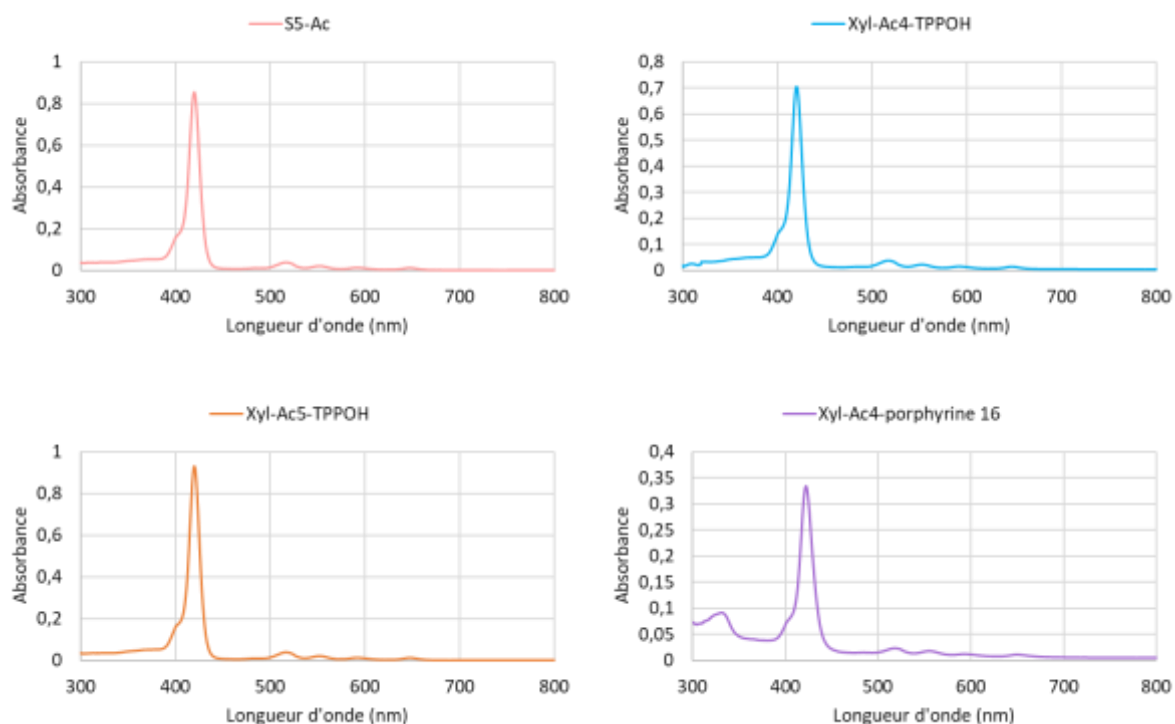


Figure 97: Spectres d'absorption des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) dans le DMSO.

Les concentrations de photosensibilisateurs obtenus pour les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) sont présentées dans le tableau 13. Dans le cas des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH et Xyl-Ac5-TPPOH les concentrations sont déterminées à partir de l'absorbance à 420 nm des solutions de polymères S5-Ac Xyl-Ac4-TPPOH et Xyl-Ac5-TPPOH dissouts dans le DMSO et du coefficient d'extinction molaire de la TPPOH. Ce coefficient, d'une valeur de $444\,347\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, a été calculé à partir de plusieurs solutions de TPPOH dans le DMSO, dont les concentrations étaient comprises entre $3,4\times 10^{-7}$ et $1,71\times 10^{-6}$ mol/L. Dans le cas des nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**), la concentration est déterminée à partir de l'absorbance à 422 nm d'une solution de polymère Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) solubilisés dans le DMSO et du coefficient d'extinction molaire de la porphyrine (**16**). Ce coefficient, d'une valeur de $274\,815\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, a été calculé à partir de solutions de porphyrine (**16**) dans le DMSO, ayant des concentrations comprises entre $4,42\times 10^{-7}$ et $3,1\times 10^{-6}$ mol/L.

Tableau 13: Concentrations de PS greffé sur les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**).

Échantillon	S5-Ac	Xyl-Ac4-TPPOH	Xyl-Ac5-TPPOH	Xyl-Ac4-porphyrine 16
λ de la bande de Soret (nm)		420		422
Coefficient d'extinction molaire de porphyrine non fixée (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)		444 347		274 815
Concentration en (mol/L)	3,45 x10 ⁻⁵	1,24 x10 ⁻⁴	1,59 x10 ⁻⁵	1,26 x10 ⁻⁵

III.2. Caractérisation des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) par spectroscopie d'émission de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées, pour tous les échantillons, dans le D₂O à une longueur d'excitation de 422 nm. La figure 98 présente les spectres d'émission obtenus.

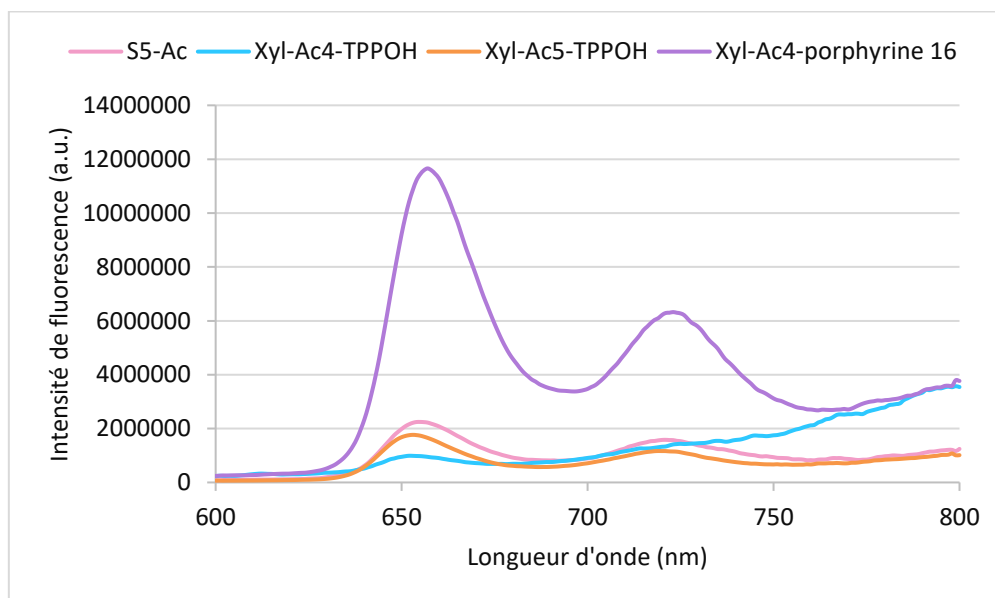


Figure 98: Spectres d'émission de fluorescence des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) excités à 422 nm dans le D₂O.

Les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) présentent un spectre d'émission caractéristique de porphyrines avec deux bandes vers 656 et 720 nm. Les rendements quantiques de fluorescence sont déterminés en utilisant une solution de tétraphénylporphyrine dans le toluène présentant un rendement quantique de fluorescence de 0,11. Des rendements faibles, inférieurs à 0,01 sont obtenus pour les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH et Xyl-Ac5-TPPOH, tandis que les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) ont montré un rendement significatif de 0,05.

III.3. Mesures de la production d'oxygène singlet des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**)

La figure 99 présente les spectres d'émission de luminescence d'oxygène singlet des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) excitées à 422 nm dans le D₂O.

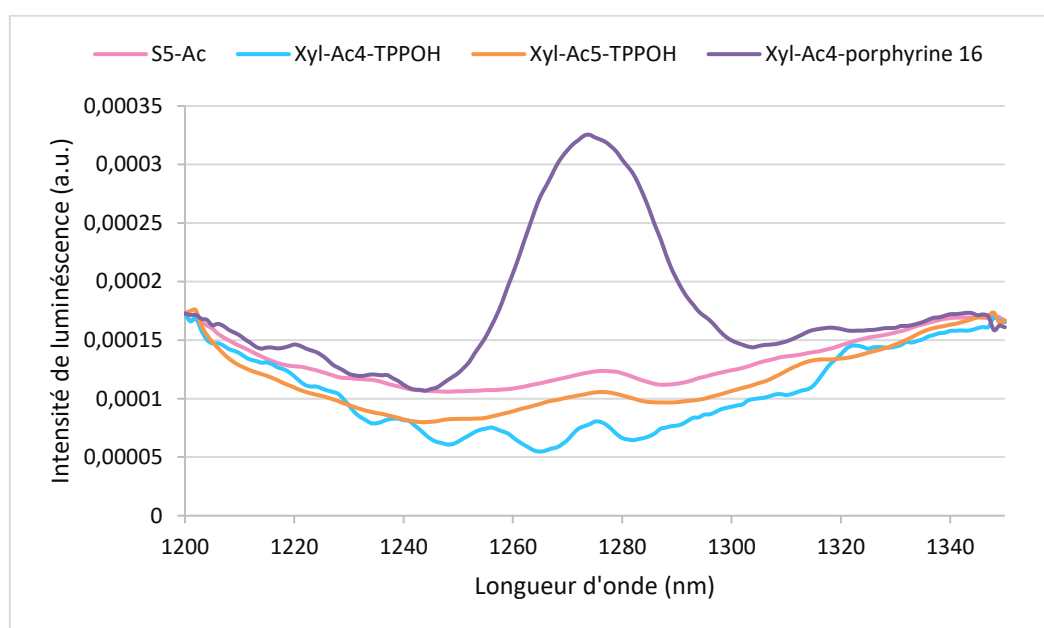


Figure 99: Spectres d'émission de luminescence d'oxygène singlet des nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) dans le D₂O

Comme dans le cas des mesures de fluorescence, seules les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) produisent de l'oxygène singlet dans le D₂O. Leur rendement quantique de production d'oxygène singlet est déterminé en utilisant une solution de Rose de Bengale dans le D₂O présentant un rendement de 0,76 [190]. Les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) présentent un rendement quantique de production d'oxygène singlet de 0,27.

Cette différence de résultats de fluorescence et d'oxygène singulet entre les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH, Xyl-Ac5-TPPOH et les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine est probablement dû à la présence de charges cationiques [198] sur la porphyrine (**16**) facilitant leur dispersion au sein de la nanoparticule, ce qui diminue le quenching des PS [199], fréquemment observé lorsque les PS sont complexés avec des NPs [200,201].

III.4. Évaluation de l'activité biologique des nanoparticules organiques

L'activité anticancéreuse des nanoparticules S5-Ac et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) a été étudiée sur les deux lignées cellulaires cancéreuses HCT116 et HT-29, par dosage MTT, 48h après irradiation à 630 nm. Les S5-Ac et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) ont été utilisés aux concentrations reportées dans le tableau 12. Les IC₅₀ calculées sont représentées dans le tableau 14.

Tableau 14: Phototoxicité *in vitro* des S5-Ac et Xyl-Ac4-porphyrine (**16**) dans les cellules de cancer colorectal humain HCT116 et HT-29.

	IC ₅₀ (μM) (n=1)	
	HCT116	HT-29
S5-Ac	2,22 μM	2,12 μM
Xyl-Ac4-porphyrine (16)	0,58 μM	1,06 μM

Les résultats montrent que les nanoparticules qui portent le cation TPP (Xyl-Ac4-porphyrine **16**) sont 4 fois plus efficaces sur la lignée cellulaire HCT116, et 2 fois plus efficaces sur la lignée cellulaire HT-29, comparé aux nanoparticules S5-Ac. Ceci rejoint les résultats obtenus avec les nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs et confirme l'amélioration de l'efficacité thérapeutique apportée par le cation TPP. Néanmoins, les IC₅₀ obtenues avec les nanoparticules organiques sont beaucoup plus élevées que celles obtenues avec les nanoparticules hybrides XP-SNPs et XP-TPP SNPs. Nous supposons que cela vient du fait, que dans le cas des nanoparticules organiques, les photosensibilisateurs sont concentrés à l'intérieur de la nanoparticule. Leur proximité dans l'espace doit provoquer leur autoquenching, par transfert d'énergie entre les PS. En effet, l'autoquenching diminue le rendement quantique d'oxygène singulet qui, par conséquent, diminue l'efficacité PDT. Cependant, dans le cas des nanoparticules hybrides, les photosensibilisateurs sont dirigés vers l'extérieur de la nanoparticule. Ils sont mieux dispersés et séparés les uns des autres, ce qui empêche le phénomène d'autoquenching et préserve l'activité photodynamique.

IV. Encapsulation de PS dans les nanoparticules organiques de xylane

Dans cette deuxième stratégie, les PS sont encapsulés dans les nanoparticules de xylane par interactions non covalentes. Ces nanoparticules sont préparées à partir d'un xylane acétylé, à un DS permettant la formation de NPs et de PS cationiques. En effet, au cours de l'autoassemblage du xylane acétylé en nanoparticule, les PS cationiques sont piégés à l'intérieur de la nanoparticule et stabilisés par interactions ioniques et hydrophobes (figure 100).

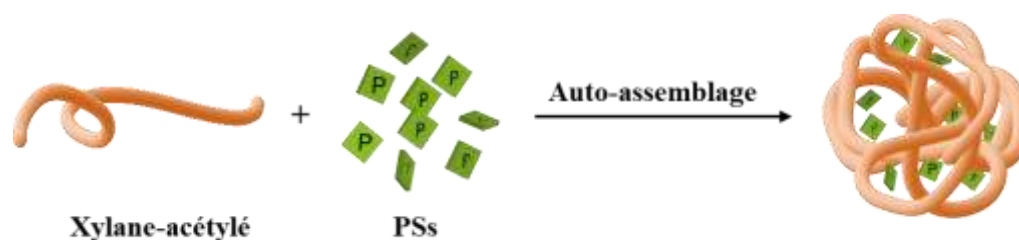


Figure 100: Encapsulation de PS dans des nanoparticules de xylane.

Afin d'étudier la faisabilité de l'encapsulation de PS dans des nanoparticules de xylane acétylé, deux photosensibilisateurs hydrosolubles ont été choisis : une 5,10,15,20-tetrakis(N-méthylpyridinium-4-yl) porphyrine et une 5,10,15,20-tetrakis(N-méthylpyridinium-4-yl) chlorine porteuse de cations triphénylphosphoniums nommées respectivement TMPP et TMPC-TPP (figure 101).

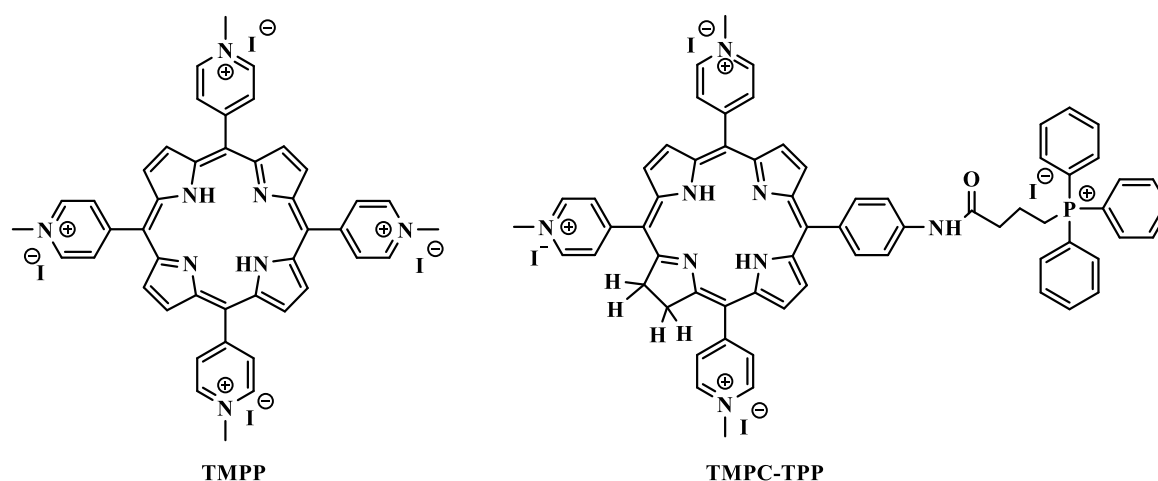


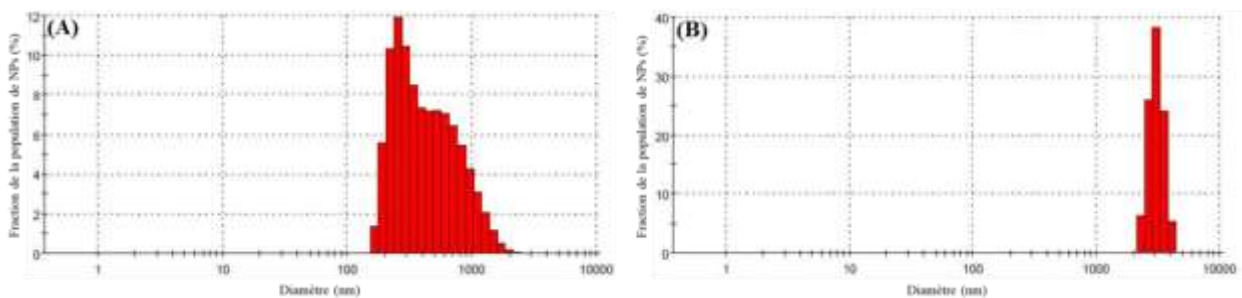
Figure 101: Structure chimique de la TMPP et la TMPC-TPP.

La TMPC-TPP a par ailleurs été choisie, car elle présente une bande d'absorption dans le rouge (lumière plus pénétrante dans les tissus biologiques), 10 fois plus intense que celle des porphyrines. Sa synthèse a été préalablement réalisée au laboratoire [202].

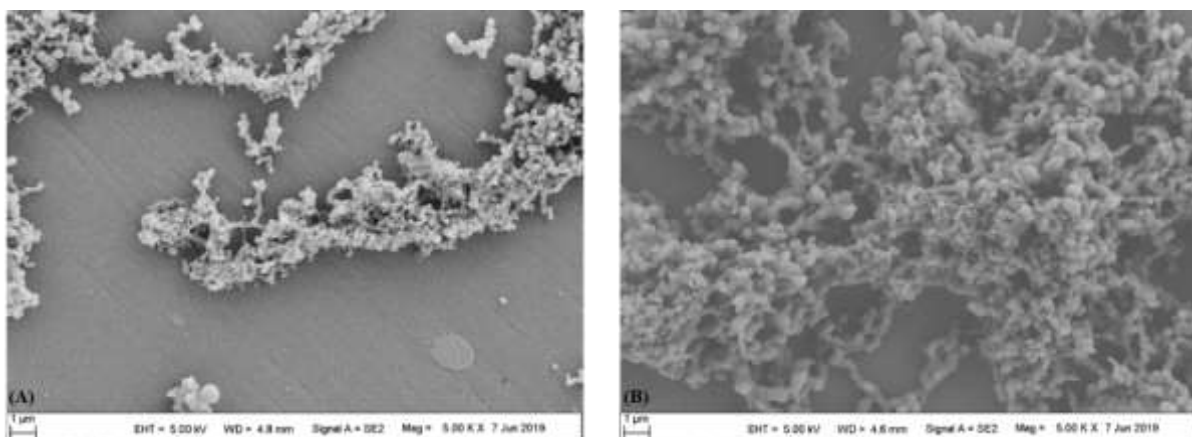
Nous n'avons pas utilisé la TPPOH et la porphyrine (16), car elles sont très hydrophobes, et forment des agrégats en milieu aqueux.

IV.1. Préparation des nanoparticules

L'encapsulation a été effectuée par la méthode de dialyse décrite précédemment. Le Xyl-Ac6 a été solubilisé dans le DMSO à une concentration de 4 mg/mL, puis 2 mg de la TMPP ou la TMPC-TPP sont ajoutés. Le DMSO a été utilisé, car la TMPP et la TMPC-TPP n'étaient pas solubles dans le DMAc. Le ratio xylane acétylé/PS a été choisi d'après les travaux d'encapsulation de kétoprofène, par des nanoparticules de xylane, décrits par Fu et al. [160]. Les solutions obtenues ont ensuite été dialysées contre de l'eau pendant 15 h, en changeant l'eau toutes les trois heures. Les nanoparticules obtenues ont ensuite été caractérisées par DLS (figure 102) et MEB (figure 103).



L'analyse de la distribution en taille des nanoparticules montre une augmentation du diamètre des particules obtenues par rapport à celui des nanoparticules Xyl-Ac6 obtenues lorsqu'aucun PS n'est encapsulé. L'analyse au microscope électronique à balayage confirme effectivement une augmentation de taille des nanoparticules. En effet, ces dernières forment des agrégats qui ont la forme de grappes, ce qui peut être dû à la présence d'interactions ioniques entre les acides carboxyliques du xylane et les groupements pyridiniums des PS.



IV.2. Détermination de la quantité de photosensibilisateurs encapsulés

Afin de déterminer la quantité de photosensibilisateurs encapsulée dans les nanoparticules de xylane, les culots obtenus après centrifugation sont redispersés dans 5 mL d'eau distillée, puis 1 mL de ces suspensions est lyophilisé afin d'éliminer l'eau. Les concentrations massiques en nanoparticules sont regroupées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Les concentrations massiques en nanoparticules TMPC-TPP et TMPP.

Échantillon	TMPC-TPP	TMPP
Concentration massique (g/L)	17	20

Les nanoparticules sèches obtenues sont ensuite solubilisées dans le DMSO afin de libérer les PS en déstructurant les nano-objets. Ainsi, la quantité de PS en solution est déterminée par dosage par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

La quantité de PS dans les nanoparticules est déterminée à partir des absorbances de la bande de Soret des différentes solutions de nanoparticules dans le DMSO (figure 104), et des coefficients d'extinction molaire des différents PS.

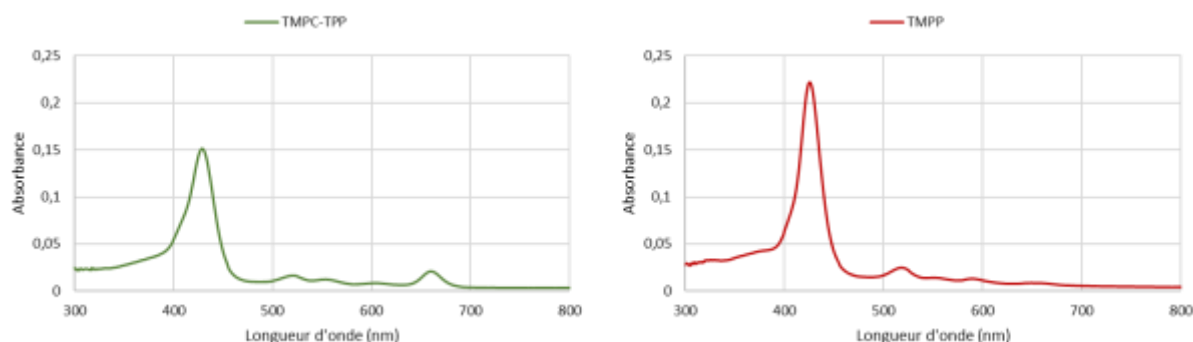


Figure 104: Spectres d'absorption des nanoparticules TMPC-TPP et TMPP dans le DMSO.

Les concentrations de photosensibilisateurs obtenus pour les nanoparticules TMPC-TPP et la TMPP sont présentées dans le tableau 16. Dans le cas de la TMPC-TPP la concentration est déterminée à partir de l'absorbance à 429 nm de la solution de nanoparticules TMPC-TPP dissoutes dans le DMSO et du coefficient d'extinction molaire de la TMPC-TPP. Ce coefficient, d'une valeur de $230\,389\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, est calculé à partir de plusieurs solutions de TMPC-TPP dans le DMSO, dont les concentrations sont comprises entre $3,19\times 10^{-7}$ et $3,18\times 10^{-6}$ mol/L. Dans le cas de la TMPP, la concentration est déterminée à partir de l'absorbance à 425 nm d'une solution de nanoparticules TMPP solubilisées dans le DMSO et du coefficient d'extinction

molaire de la TMPP. Ce coefficient, d'une valeur de $247\,705\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, est calculé à partir de solutions de TMPP dans le DMSO, ayant des concentrations comprises entre $8,55\times 10^{-7}$ et $1,14\times 10^{-6}$ mol/L.

Tableau 16 : Concentrations de PS encapsulées dans les nanoparticules TMPC-TPP et TMPP.

Échantillon	TMPC-TPP	TMPP
λ de la bande de Soret (nm)	429	425
Coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) dans DMSO	230 389	247 705
Concentration en (mol/L)	$9,85 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-4}$

IV.3. Caractérisation des nanoparticules TMPC-TPP par spectroscopie d'émission de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées dans le D_2O à une longueur d'excitation de 422 nm. La figure 105 présente le spectre d'émission obtenu.

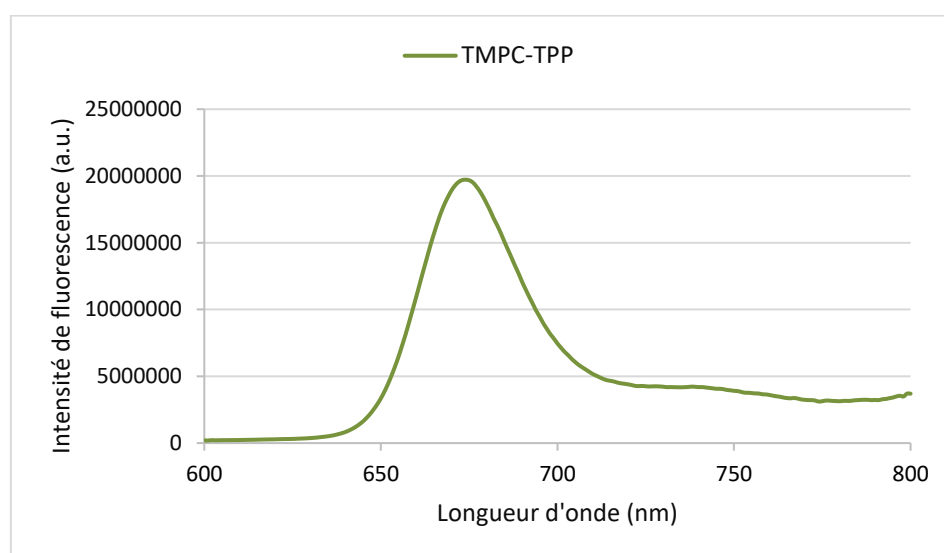


Figure 105: Spectre d'émission de fluorescence des nanoparticules excitées à 422 nm dans le D_2O .

Les nanoparticules TMPC-TPP montrent un spectre d'émission caractéristique des chlorines avec une bande unique à 676 nm. Un rendement quantique de fluorescence de 0,07 est calculé en utilisant une solution de tétraphénylporphyrine dans le toluène présentant un rendement quantique de fluorescence de 0,11.

IV.4. Mesures de la production d'oxygène singulet des nanoparticules TMPC-TPP

La figure 106 présente le spectre d'émission de luminescence d'oxygène singulet des nanoparticules TMPC-TPP excitées à 422 nm dans le D₂O.

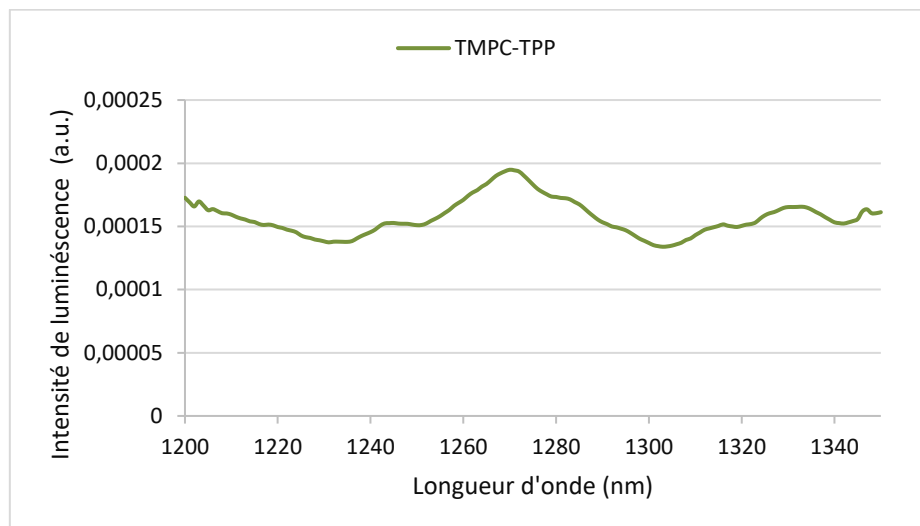


Figure 106: Spectre d'émission de luminescence d'oxygène singulet des nanoparticules TMPC-TPP dans le D₂O.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est déterminé en utilisant une solution de Rose de Bengale dans le D₂O présentant un rendement de 0,76. Les nanoparticules TMPC-TPP présentent un rendement quantique très faible de 0,06.

V. Conclusion

Dans cette deuxième partie, nous avons travaillé sur la synthèse de nanoparticules entièrement organiques constituées du xylane seul fonctionnalisé par des PS. La mise en forme de nanoparticules a été réalisée par autoassemblage du polysaccharide, portant des groupements hydrophobes, lors d'un échange lent d'un solvant organique avec de l'eau, au cours d'une dialyse. Pour commencer, nous avons utilisé les échantillons du plan d'expériences qui n'était pas soluble dans l'eau pour la mise en forme des nanoparticules. Cependant, les résultats obtenus ont montré des microparticules et non pas des nanoparticules. Pour résoudre ce problème, nous avons augmenté le degré de substitution du xylane en groupements hydrophobes par acétylation. Ceci a permis de réduire la taille des nanoparticules. Nous avons donc montré que la balance hydrophile/hydrophobe du xylane joue un rôle important sur la taille des nanoparticules obtenues. Des nanoparticules organiques avec et sans cation triphénylphosphonium ont été préparées. Les mesures de production d'oxygène singulet ont montré que seulement les NPs qui portent le cation TPP produisent l'oxygène singulet avec un rendement de 0,27. Cette différence de résultats d'oxygène singulet entre les nanoparticules

avec et sans cation TPP a été attribué à la présence de charges cationiques sur le cation TPP qui facilite la dispersion de la porphyrine par répulsion de charge. L'activité anticancéreuse des nanoparticules organiques avec et sans cation TPP a été étudiée sur les deux lignées cellulaires cancéreuses du cancer colorectal humain HCT116 et HT-29. Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules qui portent le cation TPP sont plus efficace comparées aux nanoparticules sans cation TPP. Ceci rejoint les résultats obtenus avec les nanoparticules hybrides et confirme l'amélioration de l'efficacité thérapeutique apportée par le cation TPP.

Nous avons également étudié la fixation de PS dans des NPs de xylane par interactions non covalentes. Ces nanoparticules ont été préparées à partir d'un xylane acétylé, à un DS permettant la formation de NPs et des PS cationiques. Cependant, les résultats obtenus ont montré des nanoparticules agrégées sous forme de grappes. Ceci a été attribué à la présence d'interactions ioniques entre les acides carboxyliques du xylane et les groupements pyridiniums des PS choisis. Malheureusement, ces nanoparticules ne produisent pas d'oxygène singulet, ce qui est probablement dû au fait qu'elles sont agrégées. Nous supposons que l'utilisation de PS possédant moins de charges pourrait résoudre ce problème. Cette hypothèse sera certainement explorée dans la suite de ce travail.

Chapitre III : Préparation de nanoparticules organiques naturelles pour une application en PDT

Nous nous sommes intéressés dans ce troisième chapitre, à la préparation de nanoparticules organiques 100% naturelles, constituées de produits extraits de matière première végétale. Ces nanoparticules sont formées d'un 4-*O*-méthyl-glucuronoxylane extrait de sciures de bois de châtaignier et un photosensibilisateur d'origine naturelle, le phéophorbide a. La figure 107 résume la stratégie appliquée.

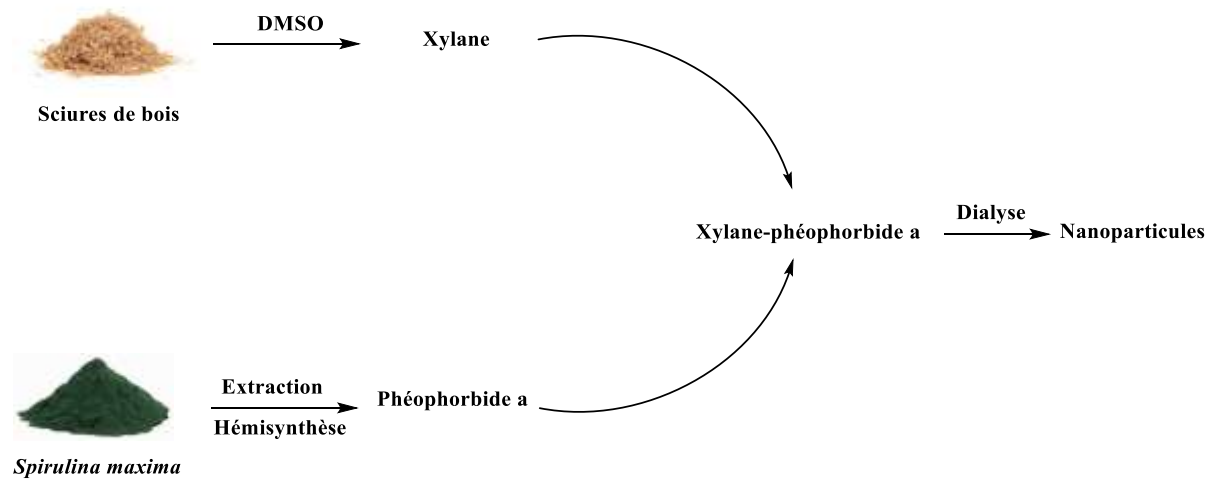


Figure 107 : Stratégie de synthèse des nanoparticules 100% naturelles.

Dans un premier temps, le xylane et le phéophorbide a sont extraits à partir des matières premières. Puis, le xylane est fonctionnalisé avec le phéophorbide a selon une réaction d'estérification. Enfin, le conjugué xylane-phéophorbide a est dialysé contre l'eau pour former des nanoparticules 100% naturelles.

I. Extraction des xylandes du bois de châtaignier

Après les grains de céréales qui peuvent contenir jusqu'à 50%, de leur masse en xylane, le bois est la principale source terrestre de xylane. En effet, le bois contient de 25 à 35% de glucuronoxylanes (GX) et arabinoglucuronoxylanes (AGX). Le xylane peut également être isolé des cultures annuelles telles que les pailles, les tiges, les écorces, les coques, et les épis de maïs. Les épis de maïs, co-produits de l'industrie de transformation du maïs, sont la source la plus conventionnelle de xylandes. Ces produits contiennent jusqu'à 50% de AX, AGX, GAX, et HX. Les MGX, quant à eux, peuvent être isolés des coques d'arachide, des coques de tournesol ou des fibres de lin [203].

I.1. Le xylane de châtaignier, un sous-produit à fort potentiel

Dans cette étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux xylanes de bois de châtaignier pour plusieurs raisons. En plus d'être une des essences de bois les plus abondantes dans la région limousine, le bois de châtaignier est riche en hémicellulose de type xylane. En effet, les travaux réalisés dans notre laboratoire par Moine [179] sur l'extraction et la valorisation des xylanes de bois ont montré que les xylanes représentent jusqu'à 25% en masse du bois de châtaignier. De plus, ils sont très homogènes dans leur composition et principalement composés de xylose. Par ailleurs, une étude réalisée par Moine et coll. [204] a démontré que le MGX extrait du bois de châtaignier inhibe la prolifération des cellules de carcinome épidermoïde humain A431, en inhibant l'expression des métalloprotéinases MMP2 et MMP9, qui sont impliquées dans la dégradation de la membrane basale des cellules tumorales.

I.2. Extraction et caractérisation des xylanes du bois de châtaignier

I.2.1. Les différentes méthodes d'extraction des xylanes

Dans la paroi cellulaire, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine sont liées entre elles par des liaisons covalentes, ioniques ou hydrogènes (Figure 108). En effet, les hémicelluloses sont liées à la lignine par des liaisons covalentes et interagissent avec la cellulose par des liaisons hydrogène et des liaisons de Van der Waals. Les xylanes sont liés à la lignine par liaisons éther avec le xylose et par liaisons ester avec les acides ironiques. Cette diversité structurelle du bois et les interactions entre les constituants de la paroi cellulaire rendent difficile l'extraction des xylanes, et nécessite que les protocoles d'extraction à utiliser soit suffisamment sélectifs, pour permettre l'extraction des xylanes tout en préservant leur structure.

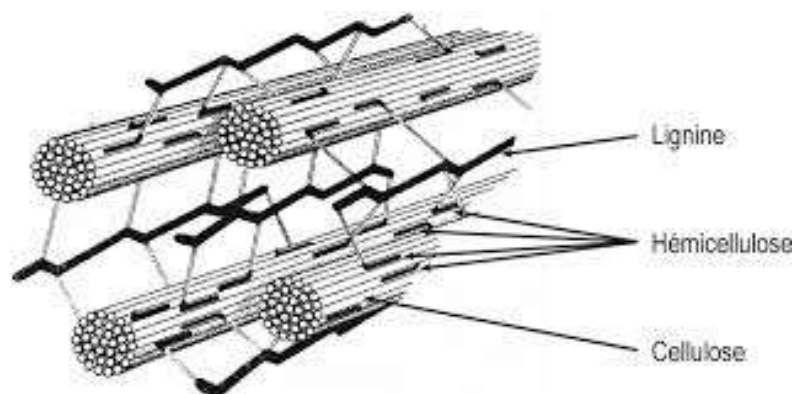


Figure 108: Arrangement spatial de la cellulose, hémicellulose et lignine dans la paroi cellulaire végétale.

De nombreux protocoles d'extraction de xylanes sont décrits dans la littérature. Le choix de l'un ou l'autre de ces protocoles dépendra de l'origine du matériel végétal, du type de xylane désiré et de l'application envisagée. L'extraction alcaline reste le protocole classiquement utilisé pour extraire les xylanes à partir du bois. Elle provoque la rupture des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires, ainsi que la saponification des liaisons ester, ce qui permet de séparer les xylanes des autres macromolécules du bois. L'extraction alcaline peut être réalisée avec ou sans délignification préalable, dépendant de la teneur en lignine dans la paroi végétale. La délignification peut avoir lieu avant l'extraction en milieu aqueux souvent par le chlorite de sodium (NaClO_2) ou en 'one pot' par extraction en milieu alcalin en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) permettant d'obtenir des hémicelluloses relativement pures (3 à 5% de lignine résiduelle).

Les solvants d'extraction les plus utilisés sont les solutions alcalines de soude ou de potasse. La potasse s'est révélée plus sélective que la soude vis-à-vis de l'extraction des xylanes. De plus, elle est facilement éliminée au cours de l'étape de purification des xylanes par précipitation dans l'éthanol. En effet, l'acétate de potassium formé lors de la neutralisation avec l'acide acétique est plus soluble dans l'éthanol que l'acétate de sodium, donc plus facilement éliminé. L'utilisation de solutions alcalines peut entraîner la désacétylation des xylanes, la saponification des ramifications esters, et la dépolymérisation des xylanes par réaction de « peeling » [205].

L'extraction des xylanes peut également se faire avec des solvants organiques comme le DMSO ou le DMF. Par rapport aux solutions alcalines, l'extraction par le DMSO présente l'avantage de préserver les groupements acétyles des xylanes, qui sont saponifiés lors des extractions alcalines aqueuses. Ce mode d'extraction permet de conserver la structure native du xylane, mais donne de faibles rendements, généralement inférieurs à 50%.

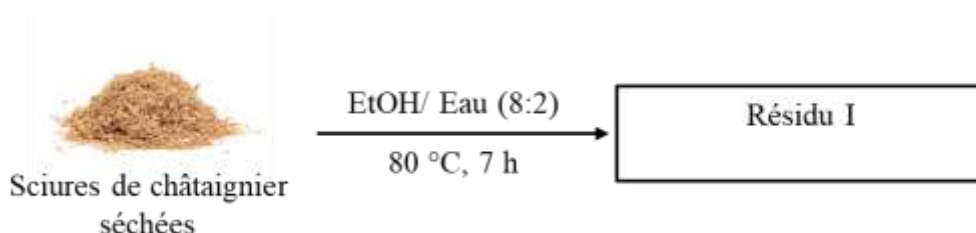
Des traitements mécaniques et thermiques peuvent également être appliqués pour augmenter le rendement de l'extraction, tels que les ultrasons et les micro-ondes. Finalement, la technique de purification la plus utilisée est la précipitation sélective par ajout de quantités précises, d'un solvant organique comme l'éthanol ou l'acétone.

Dans ce travail, nous avons choisi de faire une extraction des xylanes au DMSO, afin de conserver les groupements acétyles, permettant la formation de nanoparticules.

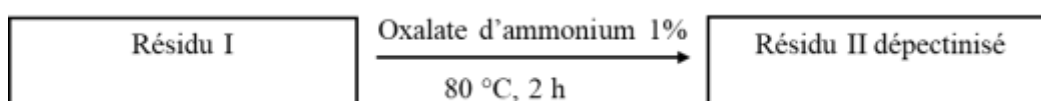
I.2.2. Extraction des xylanes de châtaignier au DMSO

I.2.2.1. Extraction séquentielle de l'holocellulose

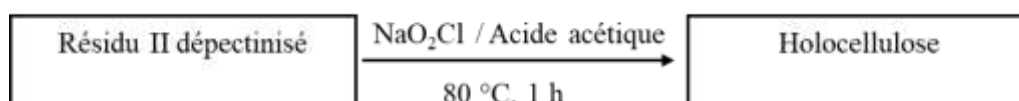
Le protocole d'extraction débute par le traitement des sciures de châtaignier (30 g) par l'éthanol à chaud pour éliminer les sucres circulants (glucose, fructose, saccharose). Ce traitement effectué pendant 6 heures à reflux permet d'obtenir après filtration et séchage à 40 °C, le résidu I avec un rendement massique de 90%.



Les pectines sont ensuite éliminées du résidu I par une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium (chélateur de calcium) à 1%, pendant 2 h à reflux. À la fin de la réaction, les sciures sont filtrées, lavées à l'eau puis séchées à 40 °C. Le résidu II dépectinisé est obtenu avec un rendement massique de 83% par rapport aux sciures de départ.



Le résidu II est ensuite délignifié afin de permettre une extraction optimale des xylanes. La délignification est réalisée dans une solution tamponnée de chlorite de sodium (0,6 g pour 1 g de matière sèche initiale) dans l'acide acétique glacial (0,2 mL pour 1 g de matière sèche) à 80 °C pendant 1 heure. Cette méthode permet d'oxyder les fonctions phénols de la lignine par le chlore et l'acide hypochloreux, formés *in situ* et qui sont plus réactif que le chlorite en lui-même. Après filtration et séchage, l'holocellulose est obtenue avec un rendement massique de 73 % par rapport aux sciures brutes.



I.2.2.2. Extraction au DMSO

L'extraction dans le DMSO a été réalisée à partir de l'holocellulose suivant le protocole décrit par Carvalho et al. [206]. La réaction est réalisée à température ambiante, sous argon, pendant 24 h. À la fin de la réaction, les sciures résiduelles sont filtrées sur fritté et rincées à l'eau

distillée. Le filtrat récupéré est ajouté à l'éthanol et laissé à 4 °C pendant 24 h. Les xylanes précipités sont ensuite isolés par centrifugation et lavés plusieurs fois avec l'éthanol. Après séchage à 40 °C, 120 mg de xylane, nommé Xyl_{DMSO}, sont obtenus, soit un rendement massique de 0,8%. Ce rendement est faible, mais reste conforme aux rendements de la littérature.

I.2.3. Caractérisation du xylane extrait

Des analyses par chromatographie en phase gazeuse effectuées au sein du laboratoire, sur des fractions d'hémicelluloses extraites du bois de châtaignier par DMSO, ont montré que l'hémicellulose extraite de cette manière est un 4-*O*-méthyl-glucuronoxylan [207]. La structure du xylane obtenu est caractérisée par analyses infrarouges et RMN¹H.

I.2.3.1. Analyses infrarouges

Afin de déterminer les fonctions présentes dans le xylane extrait, une analyse infrarouge est réalisée. La figure 109 représente le spectre correspondant aux xylanes Xyl_{DMSO}.

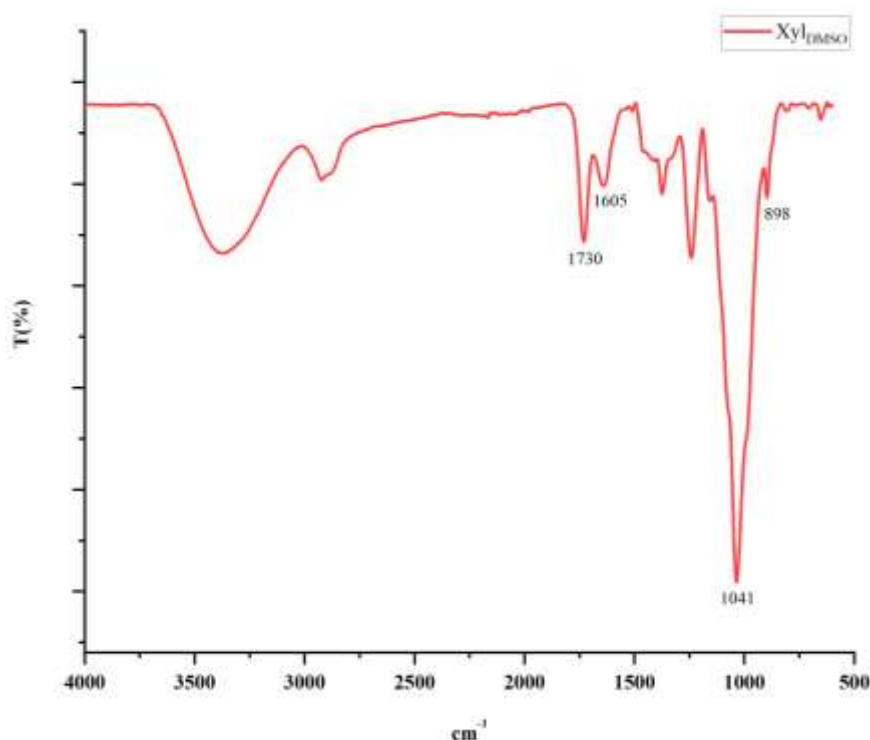


Figure 109: Spectre infrarouge du xylane Xyl_{DMSO}.

Le spectre présente des bandes caractéristiques d'un 4-*O*-méthyl-glucuronoxylan à savoir :

- Une bande vers 1605 cm⁻¹ indiquant la présence d'acides glucuroniques, sous forme de sels d'acides.

- Une bande maximale à 1041 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons du cycle (C-O et C-C) et des liaisons C-OH.
- Une bande de faible intensité, mais très nette à 898 cm^{-1} caractéristique des liaisons glycosidiques de type β .

On observe également une bande élargie vers 3400 cm^{-1} correspondant aux fonctions OH, très nombreuses dans les xylanes. Ainsi que les bandes à 2900 cm^{-1} ($\nu(\text{C-H})$), 1465 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$), 1375 cm^{-1} ($\delta(\text{CH})$) et 1241 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$).

En plus de ces bandes, le spectre IR du xylane Xyl_{DMSO} laisse apparaître une bande à 1730 cm^{-1} caractéristiques des fonctions C=O ester, montrant la présence des groupements acétyles sur le xylane Xyl_{DMSO} . Ceci est confirmé par analyse RMN¹H.

I.2.3.2. Analyses RMN

La figure 110 représente le spectre RMN¹H du xylane Xyl_{DMSO} .

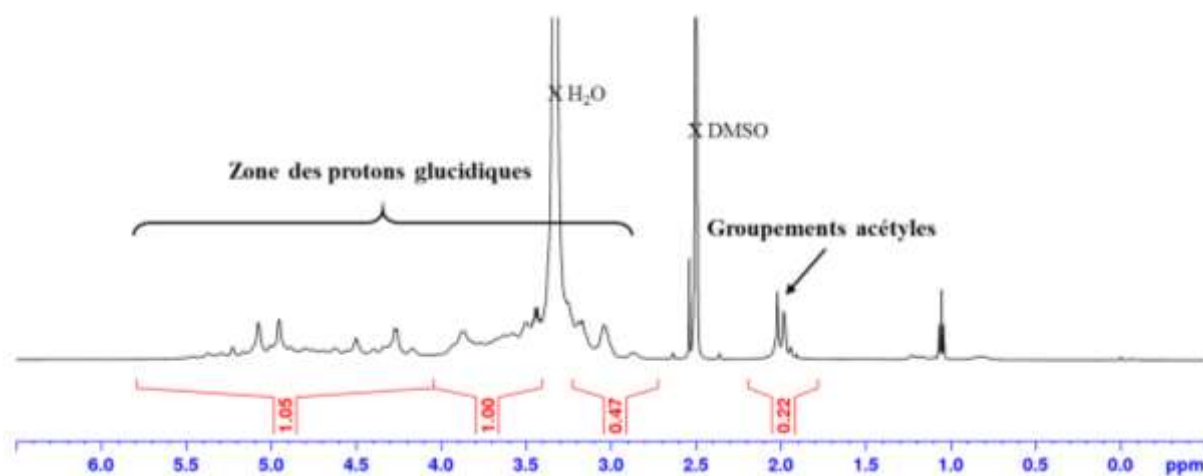


Figure 110: Spectre RMN¹H du xylane Xyl_{DMSO} .

Le spectre RMN¹H du Xyl_{DMSO} montre un signal vers 2 ppm correspondant aux protons des groupements acétyles. Ce résultat, en accord avec les données infrarouges, est conforme à ce qui était attendu : l'extraction au DMSO permet de préserver les groupements acétyles du xylane.

Le degré de substitution en acétyles est calculé selon l'équation (5) [208] suivante :

$$DS(Ac) = \frac{\Sigma (\text{intégrations des protons des acétyles à } 2.0 \text{ ppm}) \times 6}{\Sigma (\text{intégrations des protons glucides entre } 3.2 \text{ et } 5.6 \text{ ppm}) \times 3}$$

L'équation (4) (page 133) n'a pas pu être utilisée dans ce cas. En effet, malgré l'utilisation des techniques RMN à deux dimensions, l'identification des protons anomériques s'avère trop délicate pour le xylane Xyl_{DMSO} (Figure 111). Ceci est probablement dû au fait que les groupements acétyles sont fixés de façon hétérogène sur le xylane. Ils peuvent être fixés sur les positions **O-2**, **O-3** ou **O-2,3**, ce qui entraîne un changement dans les déplacements chimiques des protons anomériques, se traduisant par une multiplication du nombre de signaux, en partie superposés. Le degré de substitution calculé à partir de l'équation (5) est de 0,18.

II. Extraction du phéophorbide a

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les macrocycles tétrapyrroliques sont très largement présents dans les milieux vivants et jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques. Chez les végétaux, les noyaux tétrapyrroliques sont retrouvés dans différentes molécules telles que les chlorophylles, des pigments présents chez toutes les plantes vertes. Ces molécules sont des macrocycles qui, par absorption de photons et transfert d'énergie, sont à l'origine de la photosynthèse. Les chlorophylles sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique métallé par du magnésium et portant comme substituant une chaîne carbonée en C20, le phytol (figure 111).

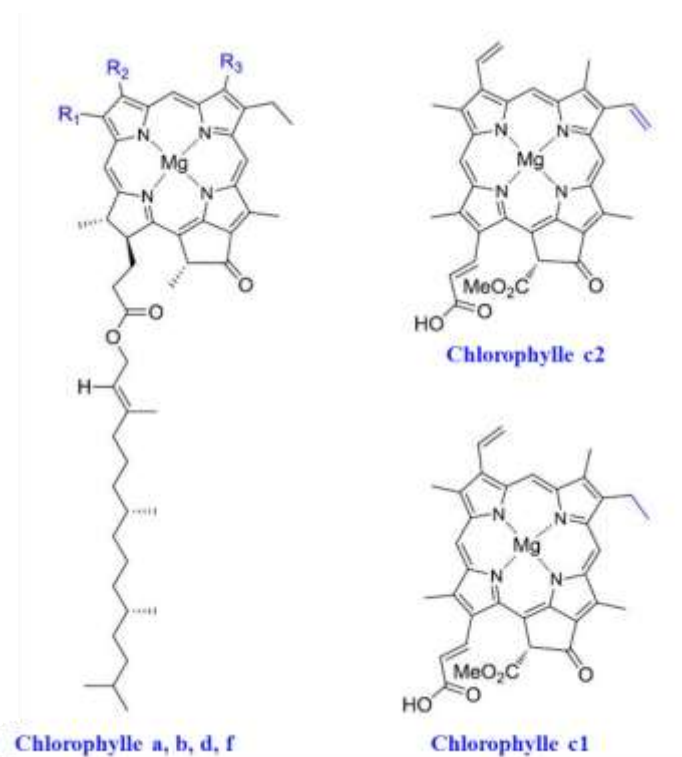


Figure 111: Structure chimique des différentes chlorophylles.

La plupart des chlorophylles (a, b, d, et f) sont des chlorines, mais peu d'entre elles sont des porphyrines (chlorophylle c1 et c2). Les chlorophylles peuvent avoir plusieurs structures chimiques, en fonction des substituants périphérique du macrocycle (tableau 17).

Tableau 17: Structure des différentes chlorophylles.

	Chlorophylle a	Chlorophylle b	Chlorophylle d	Chlorophylle f
R1	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃	-CHO
R2	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CHO	-CH=CH ₂
R3	-CH ₂ CH ₃	-CHO	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃

La chlorophylle a est le pigment le plus courant et le plus répandu du règne végétal. Elle est à la base d'un grand nombre de préparations de porphyrines et dérivés.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés au phéophorbide a. En effet, ce PS présente l'avantage d'être obtenu facilement par traitement acide de la chlorophylle a. De plus, il présente un spectre d'absorption dans le rouge et s'est révélé efficace contre plusieurs types de cancer [209,210,211].

II.1. Extraction et hémisynthèse du phéophorbide a

Afin d'obtenir la chlorophylle a, nous avons choisi comme matière de départ une algue : la *Spirulina maxima*. Celle-ci a été choisie, car elle ne contient qu'un seul type de chlorophylle, la chlorophylle a [212], et en contient une forte teneur (1% en masse) [213].

La synthèse du phéophorbide a s'effectue suivant la méthode décrite par You et coll. [214] (figure 112). Tout d'abord, la chlorophylle a est obtenue par deux extractions successives à l'acétone sur 100 g d'algue sèche. Le brut récupéré (4,3 g) est ensuite traité avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 M afin d'éliminer l'ion magnésium. Après purification sur colonne de silice, 1g d'un produit vert-gris, le phéophytine a, est obtenu, soit un rendement de 24%. Enfin, le groupe ester phytylique de la phéophytine a est hydrolysé par réaction avec de l'acide trifluoroacétique à 80% pour donner, après purification sur colonne de silice, 320 mg de phéophorbide a, soit un rendement massique de 32%. En supposons une concentration en masse de 1% de chlorophylle a dans l'algue utilisée, le phéophorbide a est obtenu avec un rendement molaire de 48,2%.

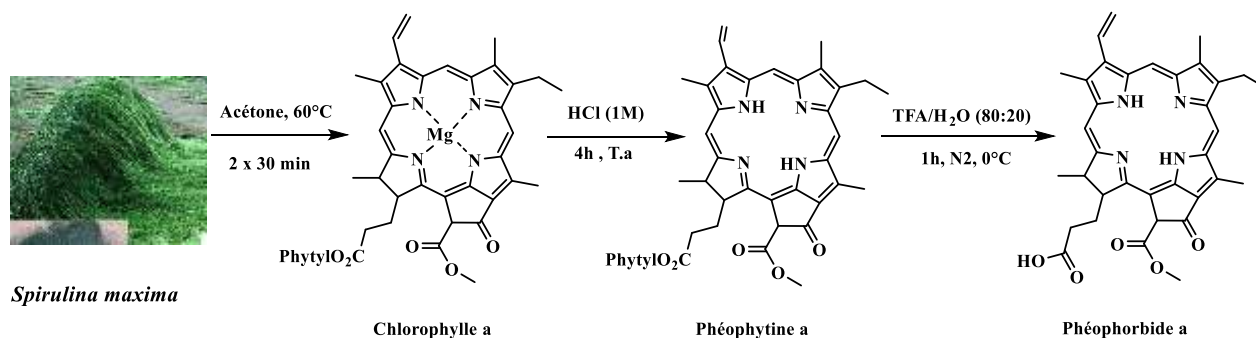


Figure 112: Extraction et hémisynthèse du phéophorbide a.

II.2. Caractérisation du phéophorbide a

Le phéophorbide a a été caractérisé par spectroscopie RMN¹H et d'absorption UV-Visible et spectrométrie de masse. Le spectre RMN¹H (figure 113) du phéophorbide a est caractérisé par la présence de trois singulets, entre 8,85 et 9,56 ppm, correspondant aux protons des ponts méthines. On voit également le signal des protons H16 (dd, 1H, J=11,62/11,57 Hz) à 8 ppm, le signal des protons H9 (S, 1H) à 6,34 ppm, le signal des protons vinyles H15 (d, 1H, J= 17,91 Hz ; dd, 1H, J= 11,56/11,1 Hz) entre 6,13 et 6,27 ppm. Les différents signaux ont été attribués selon la référence [215].

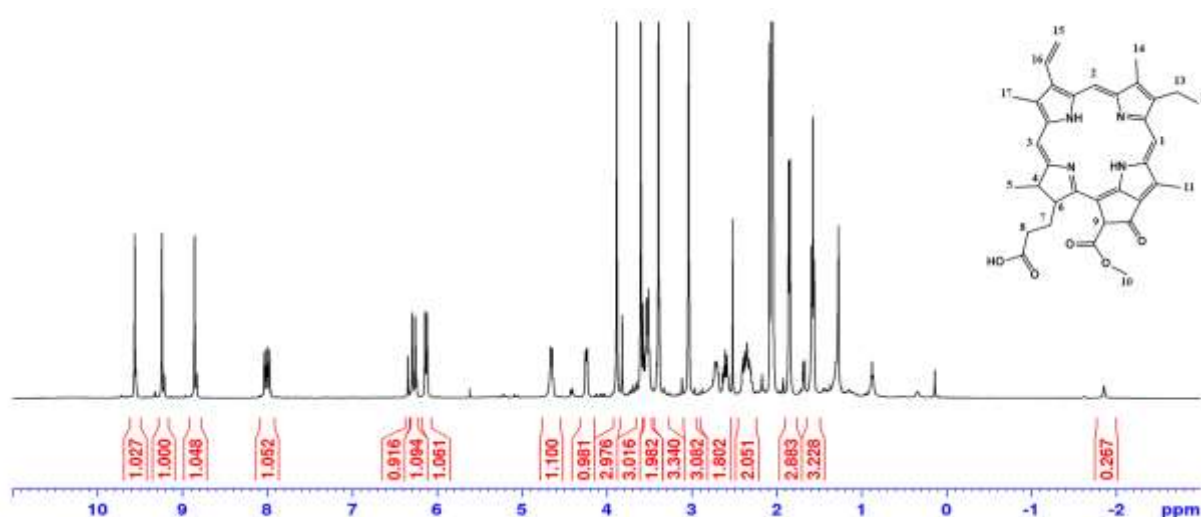


Figure 113: Spectre RMN¹H du phéophorbide a dans l'acétone.

Le spectre d'absorption UV-Visible (figure 114) est comme attendu similaire à celui d'une chlorine, avec une bande QI plus intense à 669 nm, les trois autres bandes QII, QIII, QIV respectivement à 612 nm, 539 nm et 509 nm, et une bande de Soret à 416nm.

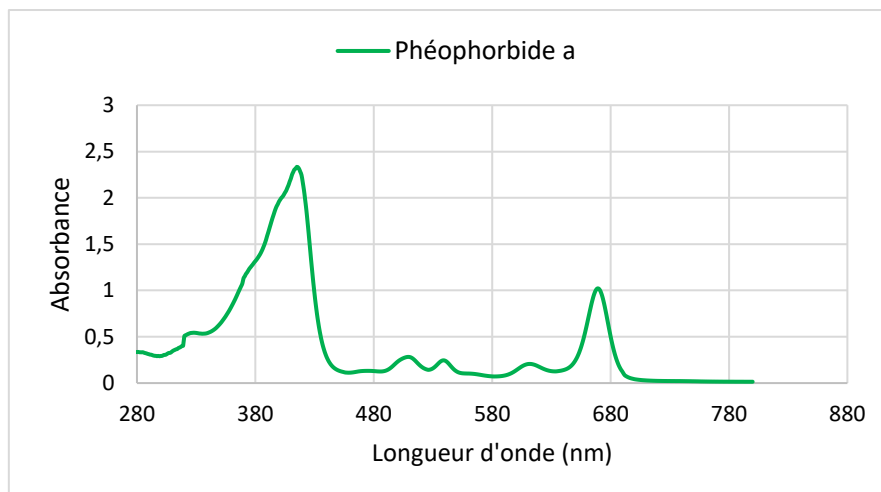


Figure 114: Spectre UV-visible du phéophorbide a dans DMSO.

Ces résultats ont été confirmés par spectrométrie de masse : masse ($m/z = 593,2758 [M+H]^+$). Après avoir présenté l'extraction des produits de départ, passons maintenant à la fonctionnalisation du xylane Xyl_{DMSO} avec le phéophorbide a.

III. Greffage du phéophorbide a sur le xylane Xyl_{DMSO}

Le phéophorbide a a été fixé sur le xylane Xyl_{DMSO} suivant les conditions opératoires du plan d'expériences (chapitre I) permettant d'obtenir un DS (par motif de répétition de xylane) de 1,11 (figure 115).

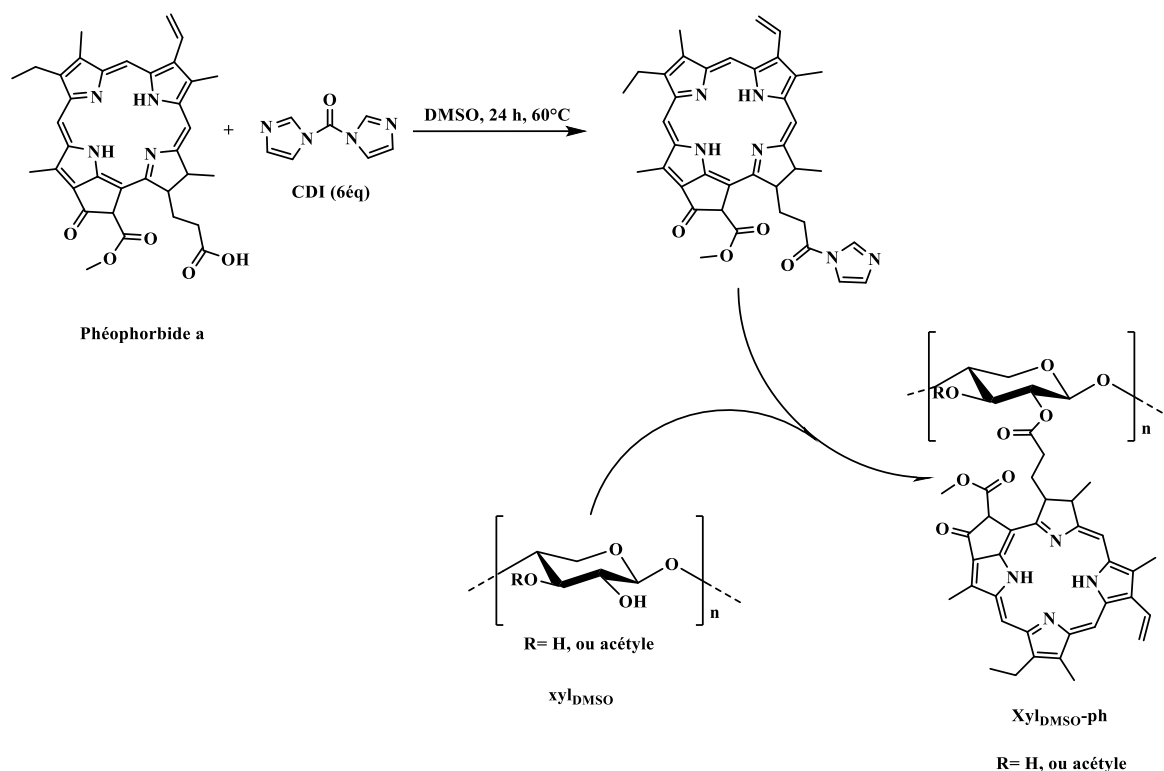


Figure 115: Estérification du xylane, Xyl_{DMSO} avec le phéophorbide a.

Après traitement classique de précipitation et lavage à l'éthanol, le xylane Xyl_{DMSO}-ph a été obtenu avec un rendement massique de 50 %. Xyl_{DMSO}-ph avait, même après plusieurs lavages au chloroforme, une couleur verte caractéristique du phéophorbide a. Cependant, l'analyse RMN ne nous a pas permis de calculer un DS en phéophorbide a. En effet, les signaux caractéristiques du phéophorbide a (les protons méthine) n'apparaissent pas sur le spectre. Nous avons tenté de résoudre ce problème en métallant le phéophorbide a au Zinc. La caractérisation du xylane fonctionnalisé avec le phéophorbide a métallé par RMN¹H a montré une amélioration relative des signaux des protons méthine. Cependant, le calcul du degré de substitution n'était pas possible. De plus, les protons anomériques du xylane ne sont pas identifiables. Nous avons donc effectué un dosage UV-visible afin de déterminer le DS en phéophorbide a fixé sur les xylanes (tableau 18).

Tableau 18 : Dosage UV-visible de la quantité de phéophorbides a fixé sur le xylane, Xyl_{DMSO}.

Échantillon	Concentration en phéophorbide a (mol/g)
Xyl _{DMSO} -ph	$6,97 \times 10^{-5}$
DS motif xylane	0,09

Un taux de greffage de 69,7 μmol par gramme de xylane est obtenu pour $\text{Xyl}_{\text{DMSO-ph}}$. Cette quantité est calculée à partir de l'absorbance à 416 nm d'une solution de $\text{Xyl}_{\text{DMSO-ph}}$ dans le DMSO et le coefficient d'extinction molaire du phéophorbide a. Ce dernier, d'une valeur de 63948 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a été calculé à partir de solutions de phéophorbide a dans le DMSO, de concentrations comprises entre $8,09 \times 10^{-6}$ et $1,6 \times 10^{-5}$ mol/L.

IV. Mise en forme des nanoparticules par dialyse

Le xylane $\text{Xyl}_{\text{DMSO-ph}}$ a (17 mg) été solubilisé dans le DMSO à une concentration de 4 mg/mL et dialysé contre l'eau pendant 15 h. Après traitement classique de lavages et centrifugations, la distribution en taille des nanoparticules $\text{Xyl}_{\text{DMSO-ph}}$ obtenues a été estimée par spectroscopie DLS (figure 116).

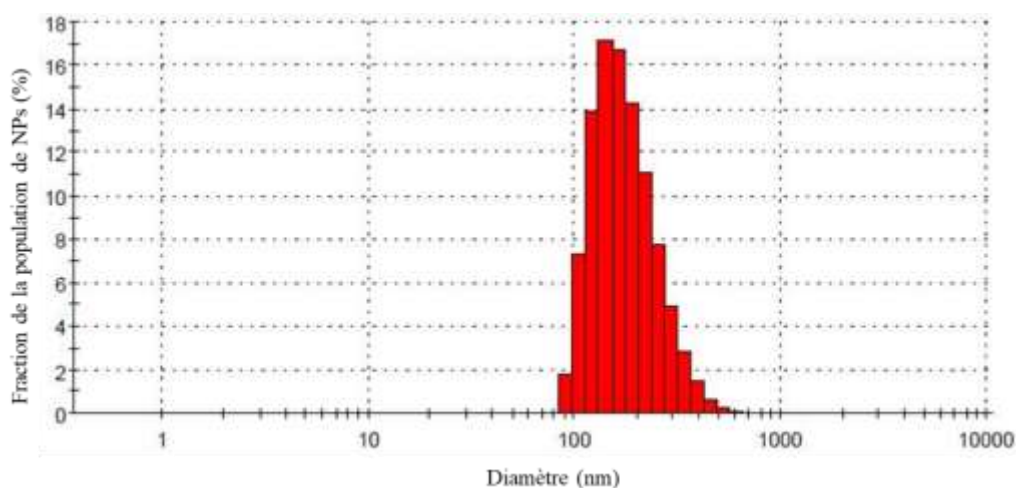


Figure 116: Distribution de taille des nanoparticules $\text{Xyl}_{\text{DMSO-ph}}$.

Les résultats montrent que 88% de la population de nanoparticules présente une taille comprise entre 100 et 250 nm. Ce résultat a été confirmé par microscopie électronique à balayage (figure 117).

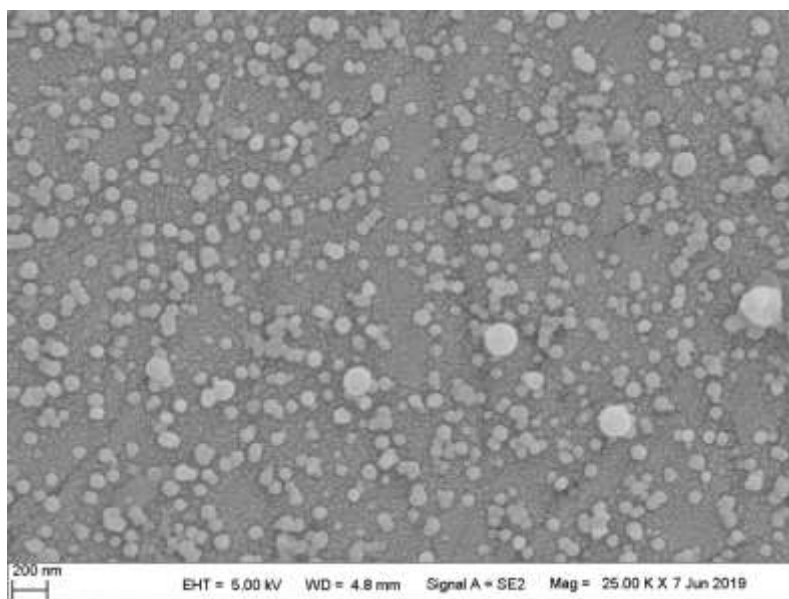


Figure 117; Image MEB des nanoparticules Xyl_{DMSO}-ph.

V. Détermination de la quantité de phéophorbides a dans les nanoparticules organiques Xyl_{DMSO}-ph

Afin de déterminer la quantité de phéophorbides a greffés dans les nanoparticules Xyl_{DMSO}-ph. Le culot obtenu après centrifugation est redispersé dans 5 mL d'eau distillée, puis 1 mL de cette suspension est lyophilisée afin d'éliminer l'eau. 0,41 mg de nanoparticules sont obtenus, soit une concentration massique en nanoparticules de 2,05 g/L. Ces nanoparticules sèches obtenues sont ensuite solubilisées dans le DMSO afin de libérer le phéophorbide a en déstructurant les nano-objets. Ainsi, la quantité de phéophorbides a en solution est déterminée par dosage par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

La quantité de phéophorbides a dans les nanoparticules Xyl_{DMSO}-ph est déterminée à partir de l'absorbance de la bande de solet à 416 nm de la solution de nanoparticules dans le DMSO (figure 118), et le coefficient d'extinction molaire du phéophorbide a dans le DMSO, qui est de 63948 L.mol⁻¹.cm⁻¹. Une concentration de 1,71x10⁻⁴ mol/L est calculée.

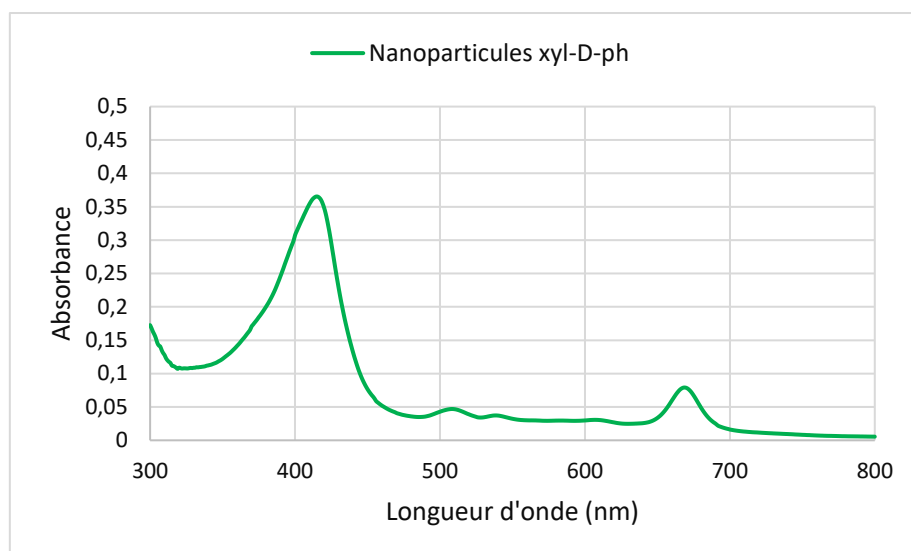


Figure 118: Spectre d'absorption des nanoparticules Xyl_{DMSO}-ph dans le DMSO.

Les analyses physico-chimiques effectuées sur ces nanoparticules ont montré que, comme dans le cas des nanoparticules NPs xyl-1, NPs xyl-2 et NPs xyl-3, les rendements quantiques de fluorescence et d'oxygène singulet des nanoparticules Xyl_{DMSO}-ph sont très faibles, inférieurs à 0,01, ce qui est probablement dû au quenching de ces photosensibilisateurs.

VI. Conclusion

Dans cette troisième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la préparation de nanoparticules organiques 100% naturelles. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux xylanes de bois de châtaignier, une des essences de bois les plus abondantes dans la région limousine. Nous avons tout d'abord commencé par l'extraction du xylane de châtaignier au DMSO afin de préserver les groupements acétyles qu'on a montré nécessaires pour la mise en forme de nanoparticules organiques. Nous avons dans une deuxième étape extrait le phéophorbide a, une chlorine naturelle ayant une forte bande d'absorption dans le rouge. Enfin, le phéophorbide a a été fixé sur le xylane extrait au DMSO par estérification. Le conjugué xylane-phéophorbide a a permis de préparer des nanoparticules bien sphériques de taille comprise entre 100 et 250 nm. Les analyses physico-chimiques effectuées sur ces nanoparticules ont montré que, comme dans le cas des nanoparticules organiques décrites dans le chapitre II, le rendement quantique d'oxygène singulet de ces nanoparticules est très faible. Ceci est probablement dû au quenching de ces photosensibilisateurs. Nous supposons que l'insertion d'une charge sur le phéophorbide a (cation TPP par exemple) pourrait améliorer sa dispersion à l'intérieur de la nanoparticule par répulsion de charge. Cette hypothèse serait intéressante à étudier dans la suite de ce travail.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux de recherche du Laboratoire PEIRENE s'articulent autour de deux principaux axes de recherche : d'une part le développement de nouvelles molécules ou nouvelles stratégies thérapeutiques pour des applications en photothérapie dynamique des cancers et d'autre part la valorisation des co-produits des filières agricoles et forestières, leurs fractions polysaccharidiques en particulier. Le sujet de recherche présenté dans ce manuscrit, en proposant une voie de valorisation pour un 4-*O*-Me-glucuronoxylane, une des hémicelluloses les plus abondantes pour une application en PDT s'inscrivait parfaitement à l'interface des deux thématiques développées au laboratoire. Nous avons pu démontrer, à travers ce travail, que les xylanes de bois de feuillus et plus précisément de hêtre et de châtaignier pouvaient être avantageusement utilisés pour élaborer des nano-objets vecteurs de principes actifs pour une application comme agents anticancéreux. Deux types de nanoparticules ont été développées : des nanoparticules hybrides (organiques/inorganiques) et des nanoparticules organiques.

Nous nous sommes intéressés, dans une première partie à l'élaboration de nanoparticules hybrides. Pour cela, il a tout d'abord été nécessaire de préparer une mésoaryle porphyrine (noyau tétrapyrrolique choisi comme modèle) fonctionnalisée avec un acide carboxylique afin de permettre son greffage sur le polymère par réaction d'estérification. La mise en œuvre d'un plan d'expérience a permis de déterminer les conditions optimales et d'étudier les variations du degré de substitution en fonction des facteurs influençant l'estérification (température, quantité de porphyrine et temps de réaction). Des degrés de substitution en porphyrine allant de 0,034 à 1,11 ont été obtenus. Parmi les produits obtenus, ceux qui étaient solubles dans l'eau ont été utilisés pour former des nanoparticules hybrides. Pour ce faire, nous avons tout d'abord préparé avec succès, et de manière parfaitement reproductible, des nanoparticules de silices de taille mono disperse et de forme sphérique. Ensuite, il nous a été possible de les rendre cationiques par l'introduction de groupements amines à l'aide de l'APTES. Enfin, la dernière phase a consisté à utiliser les conjugués xylanes-porphyrines hydrosolubles pour enrober de manière stable les nanoparticules de silice cationiques. Les groupements carboxylates présents sur les xylanes permettent la formation de liaisons ioniques avec les ammoniums présents sur les billes de silice. Les tests de viabilité cellulaire *in vitro*, effectués sur les lignées cellulaires cancéreuses colorectales humaines HCT 116 et HT29 ont montré une activité très prometteuse des nanoparticules synthétisées. Une évaluation biologique *in vivo* a également été menée sur ces nanoparticules dans le cadre d'une thèse de doctorat au sein du laboratoire PEIRENE. Les résultats obtenus ont montré

une grande efficacité anticancéreuse de ces nano-objets, confirmant ainsi l'intérêt des nanoparticules dans la vectorisation de photosensibilisateurs.

De la même manière, des nanoparticules hybrides portant une porphyrine fonctionnalisée avec un cation triphénylphosphonium ont été préparées. Les résultats des caractérisations physico-chimiques ont montré que ces nanoparticules présentent les mêmes rendements quantiques de fluorescence et d'oxygène singulet que ceux des nanoparticules précédentes. De plus, les tests de viabilité cellulaire *in vitro* ont montré une amélioration de l'efficacité thérapeutique de la porphyrine par greffage de l'agent de ciblage mitochondrial.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux nanoparticules organiques. Nous avons cherché à montrer que le conjugué xylane-porphyrines pouvait conduire à un autoassemblage régulier à l'échelle nanométrique pour former des nanoparticules 100% organiques, supposées plus facilement biodégradables et non toxiques. La balance hydrophile-hydrophobe du polymère et donc son degré de substitution s'avère être un paramètre déterminant pour l'obtention des nano-objets. Nous avons ainsi obtenu des résultats prometteurs en modulant le taux de zones hydrophobes par acétylation partielle du squelette osidique du polymère. Des xyloxygènes avec un degré de substitution en acétyles de 0,31 par unité xylose ont permis de former des nanoparticules d'environ 100 nm contenant $1,26 \times 10^{-6}$ mol/L et $1,24 \times 10^{-4}$ mol/L de porphyrines avec et sans cation triphénylphosphonium respectivement. Nous avons également étudié l'encapsulation de photosensibilisateurs, par interactions ioniques, dans les nanoparticules de xyloxygènes. Toutefois des meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le photosensibilisateur est fixé au xylane de façon covalente. L'encapsulation, bien qu'elle présente une plus grande facilité de mise en œuvre, n'a pas permis d'obtenir des nanoparticules dispersées. En effet, les images du MEB montrent que ces nanoparticules forment des agrégats qui ont la forme de grappes.

Les premiers résultats *in vitro* ont montré que les nanoparticules formées de xylane de hêtre acétylé qui portent le cation triphénylphosphonium sont 4 fois plus efficace sur la lignée cellulaire HCT116, et 2 fois plus efficace sur la lignée cellulaire HT-29, comparées aux nanoparticules sans cation triphénylphosphonium. Dans la suite de ce travail, au cours des prochains mois, une étude *in vivo* devrait débiter afin de confirmer ces résultats et de vérifier la localisation mitochondriale des nanoparticules portant des porphyrines avec le cation triphénylphosphonium.

Parallèlement, des nanoparticules 100% naturelles ont été préparées à partir de xyloxygènes et de photosensibilisateurs naturels, extraits de matières premières végétales. L'extraction au DMSO a permis de préserver les groupements acétyles naturellement présents dans le xylane et ainsi s'affranchir de l'étape d'acétylation. Le phéophorbide a, quant à lui, a été extrait et fixé avec succès

sur le xylane de châtaignier. Des nanoparticules de forme sphérique d'une taille comprise entre 100 et 250 nm ont été obtenues par autoassemblage du xylane-phéophorbide a avec une concentration très intéressante en phéophorbide a de $1,71 \times 10^{-4}$ mol/L.

Dans la suite de ce travail, il conviendra tout d'abord de mener une première évaluation biologique *in vitro* sur les nanoparticules 100% naturelles. En effet, l'absorption intense à 669 nm du phéophorbide a et l'origine 100% naturelle du photosensibilisateur aussi bien que du xylane font de ces nanoparticules, un candidat de choix pour une application en PDT.

De nombreuses autres perspectives découlent de ces travaux de thèse. Il est en particulier envisagé d'étudier d'autres types de photosensibilisateurs, notamment dans le cas de l'encapsulation. En effet, comme nos résultats ont pu le montrer, seules les nanoparticules qui présentent une charge positive produisent l'oxygène singulets. L'utilisation de photosensibilisateurs possédant peu ou pas de charge tout en restant hydrosolubles semble donc être intéressants pour cette application.

Il serait également intéressant de moduler les liens porphyrine-xylane. En effet, l'utilisation de liens rompable uniquement dans le microenvironnement des cellules cancéreuses pourrait augmenter l'efficacité du ciblage tumoral.

Enfin, une exploration plus large des sources possibles de xylanes pourrait également s'avérer pertinente, leur degré de polymérisation, de substitution en groupements chargés, et même la nature de ces groupements (carboxylates ou sulfates) étant autant de facteurs importants pour la structuration en nanoparticules. De plus, outre leur rôle dans l'architecture des nanovecteurs, certains xylanes sont également connus pour posséder une activité antitumorale intrinsèque ce qui pourrait permettre des effets de synergie.

Matériels et méthodes

I. Matériels

I.1. Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants commerciaux ont été obtenus auprès de divers fournisseurs (ACROS Organics, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Alfa Aesar) et utilisés sans purification préalable. Le xylane de hêtre provient de Sigma-Aldrich.

I.2. Chromatographie

I.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative

Les plaques préparatives de silice sont préparées à l'aide de 80 g de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ et 220 mL d'eau distillée. Le gel de silice est déposé sur des plaques de verre (20 cm × 20 cm) avec environ 2 mm d'épaisseur. La silice est séchée à l'air libre pendant une nuit, puis les plaques sont placées à l'étuve pour être activées, à 100 °C pendant deux heures. Le produit à purifier est solubilisé dans un minimum de solvant et déposé sur un nombre de plaques permettant d'avoir environ 30 mg de produit par plaque. Après élution, les bandes de produits sont grattées, solubilisées dans le solvant et filtrées sur fritté pour séparer la silice du produit d'intérêt.

I.2.2. Chromatographie sur couche mince analytique

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de silice de type Kieselgel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur (Merck). La révélation des plaques se fait soit par observation directe à l'œil nu, soit par observation sous lumière UV (254 et 365 nm).

I.2.3. Chromatographie flash

Les purifications des porphyrines ont été réalisées sur un appareil Combiflash Rf 100® de la marque "Teledyne Isco". Cet appareil est équipé d'une détection UV-Visible. Il est muni de deux pompes permettant de réaliser des gradients binaires. La phase stationnaire est une colonne de silice de 40 ou 80 g selon la quantité de produits à purifier. L'échantillon à purifier est solubilisé dans un minimum de solvant puis fixé sur Florisil® (60-100 mesh, VWR), à raison de 4 g de florisil® pour 1 g de produit, avant d'être déposé dans une pré-colonne.

I.3. Spectroscopie

I.3.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ont été réalisées au sein de la plateforme BISCEm de l'université de Limoges sur un appareil DPX-500 (Bruker) à une fréquence de 500,15 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont données en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées sont : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), m (multiplet), qt (quintuplet), qd (quadruplet).

I.3.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les analyses infrarouges ont été réalisées sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier ATR Frontier de la marque Perkin Elmer. Les spectres ont été acquis entre 500 et 4000 cm^{-1} . Les fréquences sont exprimées en cm^{-1} .

I.3.3. Spectroscopie de Masse

Les analyses par spectrométrie de masse ESI-HRMS (ionisation par électrospray à haute résolution) ont été réalisées par la plateforme HRMS de l'Institut de Chimie organique et Analytique de l'université d'Orléans. Un spectromètre de masse maXis Q-TOF de Bruker a été utilisé.

I.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les analyses UV-Visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre du type Specord 210 Lambda double faisceau de la marque Analytik Jena. Les spectres ont été acquis entre 300 et 800 nm et exploités à l'aide du logiciel WinAspect®.

I.3.5. Spectroscopie d'émission de fluorescence et production d'oxygène singulet

Les spectres de fluorescence et de rendement quantique en oxygène singulet ont été réalisés au sein du Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP, UMR 7274 CNRS) à l'université de Lorraine (Nancy).

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés par un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-222 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau). L'excitation des échantillons est assurée par une lampe Xénon à arc de 450 W. Le faisceau d'excitation est diffracté par un monochromateur SPEX double réseau (1200 raies/mm blasé à 330 nm). Le faisceau d'émission a été diffracté par un monochromateur SPEX double réseau (1200 raies/mm blasé à 500 nm). L'oxygène

singulet a été détecté par l'intermédiaire d'un monochromateur SPEX double réseau (600 raies/mm blasé à 1 μm) et un filtre passe-haut (780 nm).

Toutes les mesures ont été effectuées à l'aide d'une cuve en quartz à 4 faces. Les solutions de référence et de nanoparticules ont été diluées jusqu'à ce que l'absorption de la bande de Soret soit inférieure à 0,2. Dans un but de comparaison, les valeurs d'absorption à la longueur d'onde d'excitation des références et des nanoparticules ont été ajustées à 0,2. Tous les spectres d'émission ont été normalisés à la même absorbance avec les corrections de lampe et de photomultiplicateur.

La production d'oxygène singulet a été mesurée directement par observation de la bande d'émission à 1270 nm.

I.3.6. Spectroscopie DLS

La distribution en taille des nanoparticules a été mesurée à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano-ZS de la marque Malvern Instrument. Les nanoparticules sont préalablement diluées soit dans l'éthanol pour les nanoparticules de silice, soit dans l'eau distillée dans le cas des nanoparticules organiques. L'analyse DLS est effectuée à 20 °C, en utilisant un angle de diffusion de la lumière de 173°. Les données de potentiel zêta ont été recueillies par diffusion électrophorétique de la lumière à 20 °C et à 150 V en utilisant ce même instrument. Les résultats sont traités par un logiciel Zetasizer software.

I.4. Microscopie

I.4.1. Microscope Electronique à Transmission (MET)

Les analyses par microscopie électronique en transmission ont été réalisées au sein de la plate-forme SerMiEL de l'Université de Limoges sur un microscope de 100KV de type JEOL 100CX2. Les nanoparticules de silice ont été diluées dans l'éthanol, puis déposées sur une grille en cuivre 400 mesh. Aucune métallation préalable des nanoparticules n'est effectuée.

I.4.2. Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Les observations par microscope électronique à balayage ont été réalisées au sein de la plate-forme SerMiEL de l'Université de Limoges sur un microscope de type LEO 1530 VP. Les nanoparticules organiques ont été diluées dans de l'eau distillée puis déposées et séchées sur un porte-échantillon. Elles sont métallisées par pulvérisation cathodique de platine à l'aide d'un appareil Agar Sputter Coater.

I.5. Four micro-ondes

Les réactions ont été effectuées dans un four micro-ondes de la marque Milestone, Ethos 1600 Microsynth. La température est mesurée à l'aide d'un thermomètre à fibre optique (ATC-FO) /Ethos. La température et la puissance sont ajustées à l'aide d'un logiciel de contrôle.

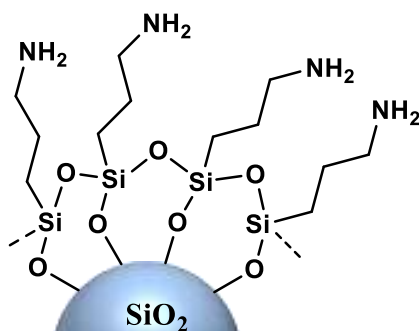
I.6. Tests biologiques

Les tests de viabilité cellulaire ont été réalisés par Ludovic Bretin et Aline Pinon, au sein du laboratoire PEIRENE. Des cellules humaines de cancer colorectal HCT116 et HT-29 ont étéensemencées à 4×10^3 cellules/puits et à 7×10^3 cellules/puits respectivement, dans des plaques de culture à 96 puits et cultivées pendant 24 h dans 100 μ L de milieu de culture. Six puits sont réalisés pour chaque condition à analyser (PS seul, nanoparticules sans PS et nanoparticules avec PS), et les expériences ont été effectuées trois fois. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non (témoin) par une gamme de concentrations de nanoparticules allant de 1 à 200 μ g/mL. Les solutions mères de nanoparticules et de photosensibilisateur ont été diluées dans du milieu de culture pour obtenir les concentrations finales appropriées. Après 24 h en présence de nanoparticules, le milieu de culture a été remplacé par 100 μ L du milieu de culture dépourvu de rouge phénol et les cellules ont été irradiées ou non par une lumière rouge (630 à 660 nm, 75 J/cm², PhotoCure™ Lamp CURElight (PhotoCure ASA, Oslo, Norway)). La viabilité des cellules cancéreuses a été évaluée par le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium bromide) 48 h après l'irradiation. Ce test est basé sur la transformation, par des cellules vivantes, du MTT en formazan (cristaux bleus) à l'aide d'une enzyme mitochondriale. La quantité de formazan formée étant proportionnelle à l'activité métabolique des cellules, le dosage de celle-ci permettra donc d'évaluer la viabilité cellulaire. Pour chaque condition étudiée, 10 μ L de solution MTT sont alors ajoutés dans chaque puits. Après 4 h d'incubation à 37°C, le milieu est éliminé et remplacé par 100 μ L de DMSO par puits, afin de lyser les cellules et de libérer les cristaux de formazan formés. Les absorbances sont mesurées à 550 nm, par un lecteur de plaques ELISA (Multiskan EX, Labsystems) et les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées de la même manière (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules témoins) x 100.

II. Synthèses

II.1. Préparation des nanoparticules hybrides silice/xylane-porphyrine

II.1.1. Nanoparticules de silice (SNPs)



II.1.1.1. Synthèse de nanoparticules de silice de 80 nm

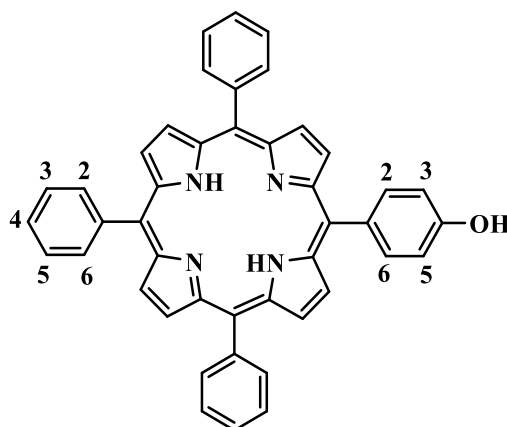
Dans un erlenmeyer de 100 mL, 45 mL d'éthanol absolu, 3 mL (75,34 mmol) de NH₄OH et 1,5 mL (6,77 mmol) de TEOS (orthosilicate de tétraéthyle) sont introduits successivement et laissés sous agitation pendant 4 h à 50 °C. À la fin de la réaction, les nanoparticules sont recueillies par centrifugation à 8000 rpm pendant 30 min, puis lavées trois fois avec l'éthanol, et conservées dans 25 mL d'éthanol absolu.

II.1.1.2. Modification de la surface des nanoparticules de silice avec l'APTES

Les nanoparticules de silice sont dispersées dans 25 mL d'éthanol à 96%. Ensuite, 4 mL (17,08 mmol) d'APTES sont ajoutés goutte à goutte. À la fin de l'ajout, le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 24 h à température ambiante. Après trois cycles de centrifugation/lavage à l'éthanol, les nanoparticules de silice sont conservées dans 25 mL d'éthanol absolu.

II.1.2. Préparation du conjugué xylane-TPPOH

II.1.2.1. Synthèse de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (1)



Dans un ballon bicol de 500 mL, 3,53g (28,90 mmol, 1 éq.) de 4-hydroxybenzaldéhyde, 8,8 mL (86,24 mmol, 3 éq.) de benzaldéhyde sont solubilisés dans 300 mL d'acide propionique. Le mélange est agité pendant 30 min à 140 °C. Ensuite, 8 mL (115,64 mmol, 4 éq.) de pyrrole sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée. Après ajout des réactifs, la réaction est maintenue pendant 90 min. Après refroidissement, 50 mL de méthanol sont ajoutés pour précipiter la porphyrine. Le produit est laissé au frigo pendant une nuit. La porphyrine brute est isolée par filtration sur papier filtre. Une masse de produit brut de 1,450g est obtenue, après purification nous avons obtenu 0,670 g du produit (1) pure soit un rendement molaire de 3,7%.

R_f = 0,4 (CHCl₃)

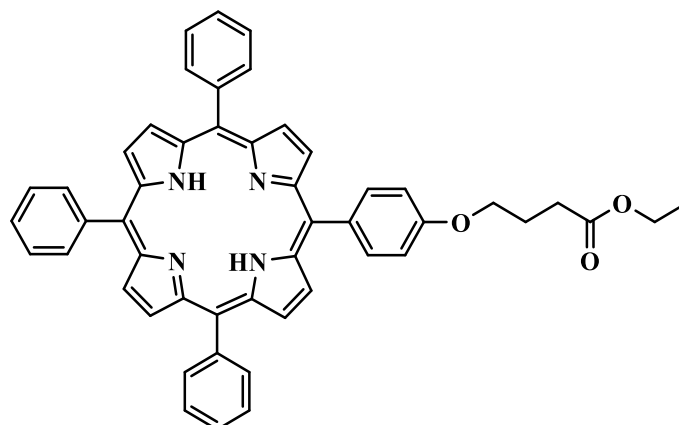
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δppm : -2,74 (s, 2H, NH pyrrole) 8,87 (d, 2H, J = 4,8Hz, Hβpyrrole); 8,83 (s, 6H, Hβpyrrole); 8,21 (d, 6H, J = 7,6 Hz, H2,6-phényle); 8,04 (d, 2H, J = 8,3 Hz, H2,6-aryle); 7,75 (d, 9H, 7,4 Hz, H3,4,5-phényle); 7,16 (d, 2H, J = 8,2 Hz, H3,5-aryle).

¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δppm : 155,5 (C-4 aryle) ; 142,2 (Cα pyrrole) ; 135,7 (C-1 aryle) ; 134,6 (C-2,6 aryle) ; 131,2-132,3 (Cβ pyrrole) ; 126,7 to 129,1 (C phényle); 119,9-120,1 (C *méso*); 113,7 (C-3,5 aryle).

UV-Visible : UV-Vis (CHCl₃) λ max nm (ε, 10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 419 (550), 518 (18), 556 (8), 598 (6), 647 (5).

SM (ESI) : m/z = C₄₄H₃₁N₄O, [M+H]⁺, 631, 2497 calculée, 631,2492 trouvée.

II.1.2.2. Synthèse de 5-(4-[3-éthoxycarbonylpropoxy] phényl) -10,15,20-triphénylporphyrine (2)



Dans un bicol de 50 mL, 0,2 g (0,32 mmol, 1éq.) de (1) sont solubilisés dans 15 mL de DMF. Ensuite, 1,09 g (7.92 mmol, 25éq.) de K_2CO_3 et 0,43 g (2,22 mmol, 7éq.) de 4-bromobutyrate d'éthyle sont ajoutés successivement. La réaction est réalisée au micro-ondes, sept activations de cinq minutes sont effectuées à 120 °C et 300 W. La disparition de la TPPOH est contrôlée par CCM (éluant chloroforme). À la fin de la réaction, le DMF est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à palette. Le produit est repris dans 15 mL de chloroforme, puis lavé trois fois avec 30 mL d'eau à l'aide d'une ampoule à décanter (pH neutre). Après évaporation du chloroforme, le produit est purifié par chromatographie flash. Pour cela, le composé (2) est solubilisé dans 15 mL de chloroforme. Ensuite, 2,5 g de florisil sont ajoutés, le chloroforme est évaporé à l'évaporateur rotatif. La séparation des produits est réalisée sur une colonne de silice de 80 g en utilisant un mélange d'éther de pétrole/chloroforme (20/80, v/v). Après purification, 0,216 g la porphyrine (2) sont obtenues soit un rendement molaire de 91%.

Rf= 0,82 (éther de pétrole/chloroforme (10/20))

1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H , ppm : 8,83 (s, 8H, H β pyrrole), 8,20 (d, 6H, J = 7,5 Hz, H2,6 phényles), 8,10 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H2,6 aryle), 7,72 (m, 9H, H3,4,5 phényles), 7,22 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H3,5 Aryle), 4,25 (t, 2H, J = 6 Hz, -O-CH $_2$ -), 4,22 (qd, 2H, J = 7 Hz, CH $_2$ éthyle), 2,66 (t, 2H, J = 7,5 Hz, -CH $_2$ -C=O), 2,27 (qt, 2H, J = 6,5 Hz, -CH $_2$ -), 1,32 (t, 3H, J = 7,5 Hz, CH $_3$ éthyle), -2,74 (s, 2H, NH pyrrole).

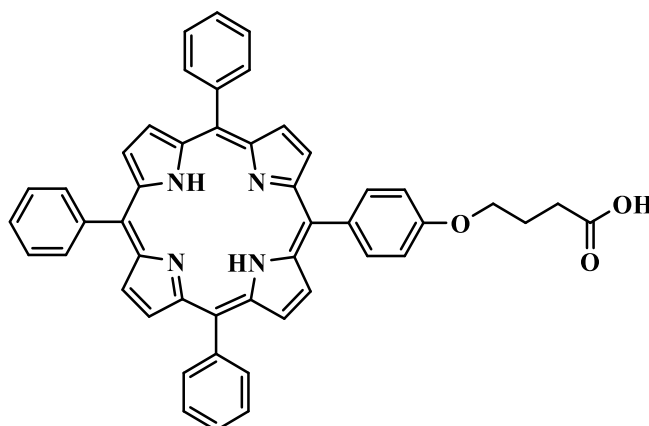
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_c , ppm : 14,31 (CH $_3$ éthyle) ; 24,87 (-CH $_2$ -) ; 30,99 (CH $_2$ -C=O) ; 60,52 (CH $_2$ éthyle); 67,03 (O-CH $_2$); 113,96 (C3,5 aryle); 120,05 -120,07 (C*més*o) ; 126,65-

127,67 (C phényle) ; 130,88-131,13 (C β pyrrole) ; 134,54-134,59 (C-2,6 aryle); 135,59 (C1 aryle) ; 142,19-142,22 (C α pyrrole) ; 158,70 (C-4 aryle) ; 173,30 (C=O).

UV-Visible : UV-Vis (CHCl₃) λ max nm (ϵ , 10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 420 (609), 519 (21), 553 (10), 591 (6), 649 (5).

SM (ESI) : m/z = C₅₀H₄₁N₄O₃, [M+H]⁺, 745,3178 calculée, 745,3173 trouvée.

II.1.2.3. Synthèse de 5-(4-[3-carboxypropyloxy] phényl) -10,15,20-triphénylporphyrine (3)



Dans un ballon de 100 mL, 0,3 g (0,40 mmol, 1 \acute{e} q.) du produit (2) sont solubilisés dans 20 mL de DMF. Ensuite, 0,160 g (4,03 mmol, 10 \acute{e} q.) de NaOH préalablement solubilisé dans 2 mL d'eau distillée sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation à reflux à 100 °C pendant 2 h. La réaction est contrôlée par CCM en utilisant un mélange éthanol/chloroforme (10/90, v/v) comme éluant. Après refroidissement à température ambiante, le DMF est évaporé. Le produit est repris dans 15 mL de chloroforme, puis neutralisé avec 333 μ L (4,03 mmol) d'acide chlorhydrique (37%, 12M). Trois lavages à l'eau (3 x 30 mL) sont ensuite effectués. Après séchage de la phase organique sur sulfate de magnésium (MgSO₄), filtration et évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash en utilisant un mélange éthanol/chloroforme (10/90, v/v). La masse du produit (3) (TPPOH) obtenue après purification est de 0,278 g soit un rendement molaire de 96%.

R_f = 0,6 (EtOH/CHCl₃ 1/9)

¹H NMR (CDCl₃+10% TFA, 500 MHz) δ H, ppm: 8,7 (s, 8H, H β pyrrole), 8,53 (m, 8H, H2,6 phényles, H2,6 aryle), 8,02 (m, 9H, H3,4,5 phényles), 7,56 (d, 2H, J = 7,7Hz, H3,5 aryle), 4,44 (t, 2H, J = 6 Hz, CH₂-O), 2,87 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂-C=O), 2,39 (qt, 2H, J = 6,5 Hz, -CH₂-).

^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3+10\%$ TFA, 500 MHz) δc , ppm : 24,6 (-CH₂-) ; 30,9 (CH₂-C=O) ; 67,1 (O-CH₂); 115,09 (C-3,5 aryle); 122,44-123,98 (C *méso*) ; 128,79-129,55 (C phényle) ; 130,79-133,02 (C β pyrrole) ; 139,2-138,3 (C-2,6 aryle); 140,3 (C1 aryle) ; 146,46-145,17 (C α pyrrole) ; 161,1 (C-4 aryle) ; 181 (C=O)

UV-Vis (CHCl_3) λ max nm (ϵ , 10^3 L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 420 (451), 516 (21), 553 (10), 591 (6), 647 (5).

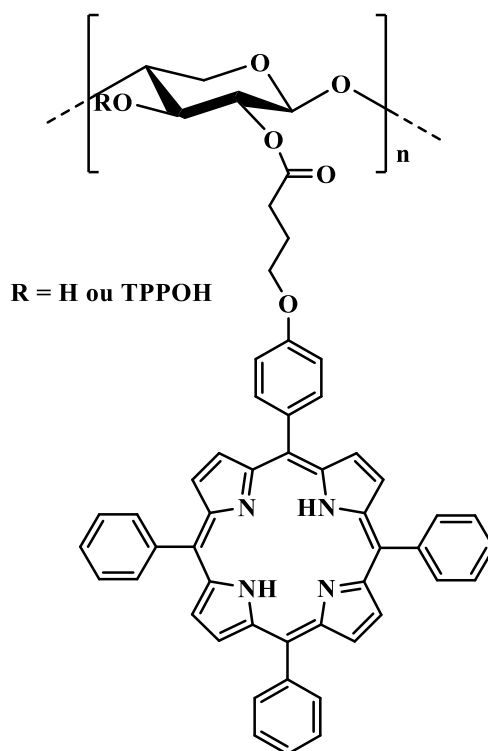
SM (ESI) : $m/z = \text{C}_{48}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_3$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, 717,2865 calculée, 717,2860 trouvée.

II.1.2.4. Greffage par estérification de la TPPOH sur le xylane de hêtre

II.1.2.4.1. Solubilisation du xylane

Dans un erlenmeyer de 50 mL, 1 g de xylane sont solubilisés dans 20 mL de DMSO. Le mélange est laissé sous agitation à 60 °C pendant 24 h. Enfin, la solution est filtrée sur papier filtre pour éliminer la fraction de polymère non solubilisée. Pour déterminer la concentration de la solution obtenue, 1 mL est précipité avec 3 mL d'éthanol absolu puis filtré sur fritté et séché sous vide. La masse du xylane précipité est de 45 mg. La solution de xylane dans le DMSO a donc une concentration de 45 mg/mL.

II.1.2.4.2. Greffage de la TPPOH sur le xylane de hêtre (XP)



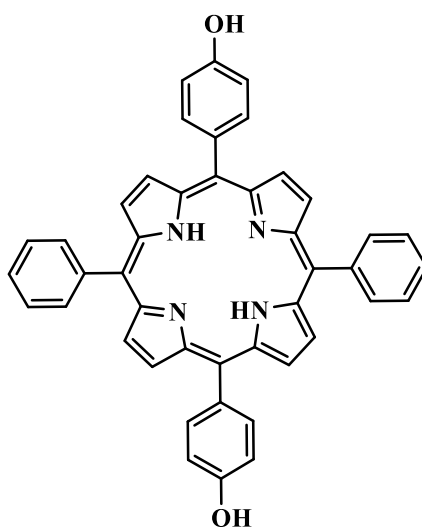
Toutes les synthèses ont été réalisées suivant le même protocole expérimental. La TPPOH est solubilisée dans le DMSO, puis 1 équivalent de CDI est ajouté. Le mélange est agité pendant 24h à température ambiante. Ensuite, une solution de 100 mg (0,76 mmol d'unités anhydroxylose) de xylane dans le DMSO est ajoutée et laissée réagir sous agitation. Les conditions opératoires pour chaque réaction du plan d'expériences sont résumées dans le tableau 19. À la fin de la réaction, le xylane est précipité dans l'éthanol absolu et lavé trois fois avec l'éthanol, et trois fois avec le chloroforme pour éliminer la porphyrine de départ non fixée, puis séché sous vide.

Tableau 19 : Les conditions opératoires du plan d'expériences.

Échantillon	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Temps (h)	8	8	8	24	24	24	48	48	48
T (°C)	20	50	80	20	50	80	20	50	80
TPPOH (éq/mg)	0,1/50	0,05/25	0,2/100	0,05/25	0,2/100	0,1/50	0,2/100	0,1/50	0,05/25
DS	0,034	0,073	0,3	0,07	1,11	0,31	0,72	0,4	0,2

II.1.3. Préparation du conjugué xylane-porphyrine (16)

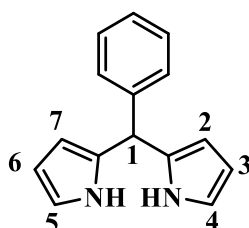
II.1.3.1. Synthèse de la 5,15-di(p-hydroxyphényl)-10,15-diphénylporphyrine (*trans*-TPP(OH)₂) (6)



II.1.3.1.1. Par la méthode des dipyrrrométhanés

Dans un ballon de 1L, 400 mL d'éthanol (dégazé sous argon pendant 10 minutes), 0,44 g (2 mmol) de dipyrrrométhane (**4**) et 0,22 g (2 mmol) d'hydroxybenzaldéhyde sont ajoutés et laissé réagir pendant 10 min. Ensuite, 100 mL d'une solution de HCl à 0,242 mol/L sont ajoutés. La réaction est conduite pendant 16 h sous argon et à l'abri de la lumière. À la fin de la réaction, le solvant est évaporé et le milieu réactionnel est repris dans 200 mL de chloroforme. Puis, trois lavages avec 100 mL d'eau distillée et un lavage avec 100 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ sont effectués afin de neutraliser le milieu réactionnel. Le porphyrinogène formé est ensuite oxydé avec 0,74 g (3 mmol) de *p*-chloranil pendant une heure. Après purification par chromatographie flash, poursuivie par purification sur plaques préparatives (éluant CH₂Cl₂/MeOH, 19/1) la *trans*-TPP(OH)₂ est obtenue avec une masse de 80 mg soit un rendement molaire de 12,5 %.

II.1.3.1.1.1. Synthèse du 5-phényl dipyrrrométhane (**4**)

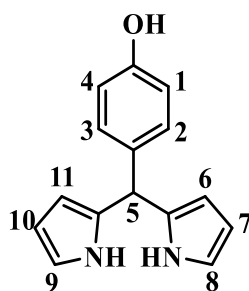


Dans un bicol de 500 mL, 150 mL (217 mmol) de pyrrole et 6 mL (58,8 mmol) de benzaldéhyde sont ajoutés et désoxygéné sous argon pendant 15 minutes. Ensuite, 0,45 mL de l'acide trifluoroacétique (TFA) sont additionnés et la réaction est laissée sous agitation magnétique pendant 20 minutes. Enfin, l'excès de pyrrole est enlevé par évaporation et le brut purifié sur colonne de silice avec comme éluant CH₂Cl₂/Éther de pétrole (5/5). Le dipyrrrométhane (**4**) est obtenu avec une masse de 7,5 g soit un rendement molaire de 58%.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm : 7.83 (s, 2H), 7.18 - 7.32 (m, 5H, H phényles), 6.64 (dd, J = 4,4 et J = 2.6, 2H, H4, H5), 6.15 (dd, J = 5,6 et J = 2.6, 2H, H3, H6), 5.88 (s, 2H, H2, H7), 5.43 (s, 1H, H1).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ_c, ppm: 142,03; 132,45; 128,56; 128,29; 126,85; 117,16; 108,31; 107,12; 43,85.

II.1.3.1.1.2. Synthèse du 5-(p-hydroxyphényl)dipyrrométhane (5)



Dans un bicol de 100 mL, 1,76 g (14,41 mmol) de 4-hydroxybenzaldéhyde et 25 mL (361 mmol) de pyrrole fraîchement distillé sont ajoutés. Le ballon est désoxygéné sous argon pendant 15 minutes. Ensuite, 0,11 mL de TFA sont additionnés et le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 20 minutes. Le milieu est neutralisé avec 0,058g (1,44 mmol) de NaOH. Après évaporation, une huile violette persiste. Les produits sont séparés sur chromatographie flash avec comme éluant CH₂Cl₂ / acétate d'éthyle (19 :1). Un produit rose pâle est obtenu avec une masse de 2,487g soit un rendement molaire de 72,5%.

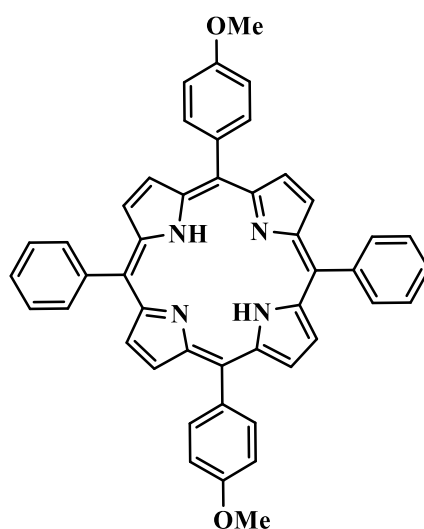
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δH, ppm : 7,91 (s, 2H, NH), 7,07 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H 1,4 phényle), 6,76 (d, 2H, J= 8,6 Hz, H 2,3 phényle), 6,70 (m, 2H, H 8,9 pyrrole), 6,16 (q, 2H, J= 3 Hz, H 7,10 pyrrole), 5,9 (m, 2H, H 6,11 pyrrole), 5,41 (s, 1H, H5), 4,74 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δc, ppm: 154,51; 134,41; 132,94; 129,62; 117,15; 115,43; 108,43; 107,08.

II.1.3.1.2. Par déprotection de 5,15-di(p-méthoxyphényl)-10,15-diphénylporphyrine (7)

Dans un ballon de 250 mL, 0,107 g (158 mmol) de méthoxyporphyrine (7) sont solubilisés dans 3,78 mL d'une solution de BBr₃ à 1M dans CH₂Cl₂. Le milieu est laissé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante. Puis, 20 mL de méthanol sont ajoutés et le milieu est neutralisé avec de la triéthylamine. Le produit est évaporé à sec, solubilisé dans 100 mL d'acétate d'éthyle puis lavé trois fois avec l'eau distillée. Après purification sur plaques préparatives (éluant CH₂Cl₂/MeOH, 19/1), la *trans*-TPP(OH)₂ est obtenu avec une masse de 55,4 mg soit un rendement molaire de 54,9 %.

II.1.3.1.2.1. Synthèse de la 5,15-di(*p*-méthoxyphényl)-10,15-diphénylporphyrine (7)



Dans un ballon de 1L, 0,445g (2 mmol) de dipyrrométhane (4), 0,243 mL (2 mmol,) de méthoxybenzaldéhyde, et 400 mL d'éthanol sont ajoutés. Le mélange est dégazé sous argon pendant 10 minutes. Puis, 100 mL d'une solution de HCl dans l'eau à 0,24 mol/L sont ajoutés. La réaction est conduite sous argon pendant 16 heures. À la fin de la réaction, le solvant est évaporé et le produit est resolubilisé dans 200 mL de chloroforme, puis lavé trois fois avec l'eau distillée (3 x 100 mL) et une fois avec 100 mL d'une solution saturée de NaHCO₃. Ensuite, 0,74 g (3 mmol, 1,5éq.) de *p*-chloranil sont ajoutés et le milieu est laissé sous agitation pendant une heure. Après purification par chromatographie flash (éluant CH₂Cl₂/éther de pétrole ; 7/3), la porphyrine (7) est obtenue avec une masse de 107 mg, soit un rendement molaire de 15,9%.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δH, ppm : 8,87 (d, 8H, J = 4.7 Hz, Hβ pyrrole), 8.21 (d, 4H, J = 7,7 Hz, H 2,6 phényles), 8,10 (d, 4H, J = 8,5 Hz, H 2,6 aryle), 7,74 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,25 (d, 4H, J= 8,5 Hz, H 3,5 aryle), 4,06 (s, 6H, O-CH₃), -2.74 (s, 2H, NH).

II.1.3.1.3. Par la méthode des aldéhydes mixtes

Dans un bicol de 500 mL, 7,02 g (57,5 mmol) de 4-Hydroxybenzaldéhyde, 6,10 g (57,5 mmol) de benzaldéhyde et 300 mL d'acide propionique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 140 °C (reflux) puis 8 mL de pyrrole sont ajoutés goutte à goutte par le biais d'une ampoule de coulée. La réaction est maintenue pendant 90 min à reflux. A la fin de réaction, l'acide propionique est évaporé à la pompe à palettes et le brut est purifié une première fois sur un Plug pour éliminer les goudrons, puis par chromatographie flash (Gradient MeOH de 2 à 6% dans chloroforme), et enfin par plaque préparatives pour séparer la *trans*-TPP(OH)₂ et la *cis*-

TPP(OH)₂. La *trans*-TPP(OH)₂ est obtenue avec une masse de 260 mg soit un rendement molaire de 1,4%.

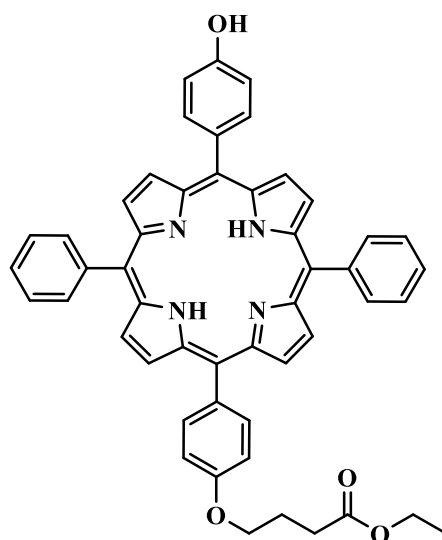
R_f = 0,68 (EtOH/CHCl₃ 10/90)

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: -2,78 (s, 2H, NH pyrrole), 8,85 (d, 8H, J= 4,6 Hz, Hβ-pyrroliques), 8,20 (d, 4H, J= 6,4 Hz, H 2,6 phényles), 8,06 (d, 4H, J= 8,15 Hz, H 2,6 aryles), 7,75 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,19 (d, 4H, J= 8,2 Hz, H 3,5 aryles).

SM (ESI) : m/z = C₄₄H₃₁N₄O₂, [M+H]⁺, 647,2446 calculée, 647,2435 trouvée.

II.1.3.2. Fonctionnalisation de la *trans*-TPP(OH)₂

II.1.3.2.1. Synthèse de la 5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -15-(p-hydroxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine (8)



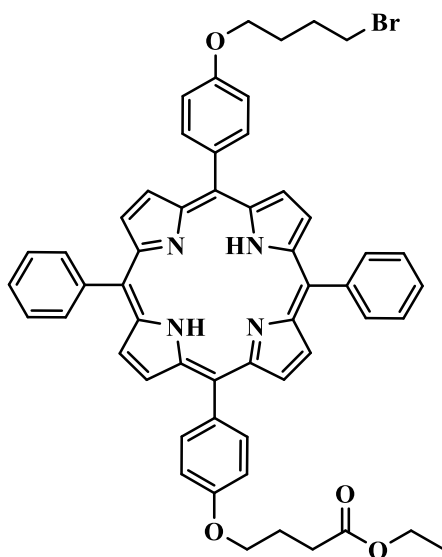
Dans un ballon de 25 mL, 0,17 g (0,26 mmol) de porphyrine (6) sont solubilisés dans 8 mL de DMF. Puis, 2,15 g (15,58 mmol) de K₂CO₃ et 38 μL (0,26 mmol) de 4-bromobutyrate d'éthyle sont ajoutés successivement. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2 h à 110 °C. À la fin de la réaction, le DMF est évaporé et le brut réactionnel est repris dans 15 mL de chloroforme. La phase organique est ensuite lavée trois fois avec 30 mL d'eau distillée. Après purification sur plaque préparatives de silice avec comme éluant éthanol/chloroforme (5/95), la porphyrine (8) est obtenue avec une masse de 81 mg soit un rendement molaire de 40,3 %.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,86 (d, 8H, J= 4,6 Hz, Hβ-pyrroliques), 8,20 (d, 4H, J= 6,3 Hz, H 2,6 phényles), 8,1 (d, 2H, J= 8,45 Hz, H 2,6 aryle-OH), 8,05 (d, 2H, J= 8,05 Hz, H 2,6 aryle-ester), 7,75 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,25 (d, 2H, J= 8,1 Hz, H 3,5 aryle-ester), 7,16

(d, 2H, J= 8,1 Hz, H 3,5 aryle-OH), 4,29 (t, 2H, J= 6 Hz, O-CH₂-), 4,24 (qd, 2H, J= 7,2 Hz, CH₂ éthyle), 2,69 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH₂-C=O), 2,31 (qt, 2H, J= 6,7 Hz, -CH₂-), 1,34 (t, 3H, J= 7,1 Hz, CH₃), -2,76 (s, 2H, NH pyrrole).

SM (ESI) : m/z = C₅₀H₄₁N₄O₄, [M+H]⁺, 761,3127 calculée, 761,3122 trouvée.

II.1.3.2.2. Synthèse de la 5--(4-[4-bromobutoxy] phényl) -15-(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -10,20-diphénylporphyrine (9)

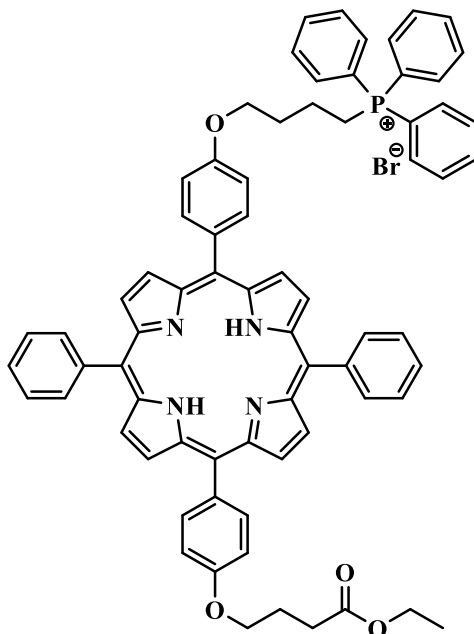


Dans un ballon de 25 mL, 0,11 g (0,146 mmol) de porphyrine (**8**) sont solubilisés dans 6 mL de DMF. Ensuite, 0,5 g (3,62 mmol) de K₂CO₃ et 434 μL (3,62 mmol) de dibromobutane sont ajoutés successivement. Après 5 h d'agitation à 110 °C, le DMF est évaporé et le brut réactionnel est repris dans 10 mL de chloroforme. La phase organique est lavée trois fois avec l'eau distillée, afin d'éliminer le K₂CO₃. Le brut réactionnel est purifié sur plaques préparatives de silice en utilisant pour éluant du chloroforme pur. La masse du produit (**9**) obtenu après purification est de 103 mg soit un rendement molaire de 80 %.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,85 (d, 8H, J= 4,6 Hz, Hβ-pyrroliques), 8,21 (d, 4H, J= 6,3 Hz, H 2,6 phényles), 8,1 (d, 4H, J= 8,46 Hz, H 2,6 aryles), 7,75 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,24 (m, 4H, H 3,5 aryles), 4,29 (t, 2H, J= 6 Hz, O-CH₂- (ester)), 4,23 (qd, 2H, J= 7,2 Hz, -CH₂- éthyle), 4,25 (t, 2H, J= 6,3 Hz, O-CH₂- (bromobutane)), 3,61 (t, 2H, J= 6,6 Hz, -CH₂-Br), 2,69 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH₂-C=O), 2,31 (qt, 2H, J= 6,7 Hz, -CH₂-CH₂-C=O), 2,23 (qt, 2H, J= 6,7 Hz, CH₂-CH₂-Br), 2,12 (qt, 2H, J= 6,5 Hz, O-CH₂-CH₂-(bromobutane)), 1,34 (t, 3H, J= 7,1 Hz, CH₃), -2,75 (s, 2H, NH pyrrole).

SM (ESI) : $m/z = C_{54}H_{48}BrN_4O_4$, $[M+H]^+$, 895,2858 calculée, 895,2853 trouvée.

II.1.3.2.3. Synthèse de la Bromure de 5--(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy] phényl) -15-(4-[4-(triphénylphosphonium) butoxy]phényl)-10,20-diphénylporphyrine (10)

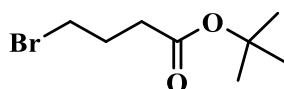


Dans un ballon de 25 mL, 0,167 g (0,186 mmol) de porphyrine (9) sont solubilisés dans 13 mL de DMF. Ensuite, 0,766 g (2,92 mmol) de triphénylphosphine sont ajoutés. La réaction est conduite pendant 24 h à 110 °C. Après purification sur plaque préparatives de silice (éluant : éthanol/chloroforme 5/95), 151 mg de la porphyrine (10) sont obtenus, soit un rendement molaire de 70%.

1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H , ppm: 8,88 (dd, 8H, $J = 4,6$ Hz, $J = 4,4$ Hz, H β -pyrroliques), 8,19 (d, 4H, $J = 6,4$ Hz, H 2,6 phényles), 8,07 (dd, 4H, $J = 8,1$ Hz, $J = 7,76$ Hz, H 2,6 aryles), 7,91 (dd, 6H, $J = 7,46$ Hz, $J = 7,5$ Hz H2,6 PPh₃), 7,82-7,72 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,72-7,66 (m, 9H, H3,4,5 PPh₃), 7,22 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H 3,5 aryle-ester), 7,17 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H 3,5 aryle-PPh₃), 4,34 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, O-CH₂-(ester)), 4,25 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, O-CH₂- (PPh₃)), 4,23 (qd, 2H, $J = 7,1$ Hz, -CH₂-éthyle), 4,07 (m, 2H, CH₂-PPh₃), 2,66 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-C=O), 2,39 (qt, 2H, $J = 6,3$ Hz, -CH₂-CH₂-C=O), 2,27 (qt, 2H, $J = 6,7$ Hz, O-CH₂-CH₂-(PPh₃)), 2,04 (m, 2H, CH₂-CH₂- PPh₃)), 1,32 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH₃), -2,75 (s, 2H, NH pyrrole).

SM (ESI) : $m/z = C_{72}H_{62}N_4O_4P$, $[M+H]^+$, 1077,4508 calculée, 1077.4503 trouvée.

II.1.3.2.4. Synthèse de 4-bromobutanoate de tertiobutyle (12)



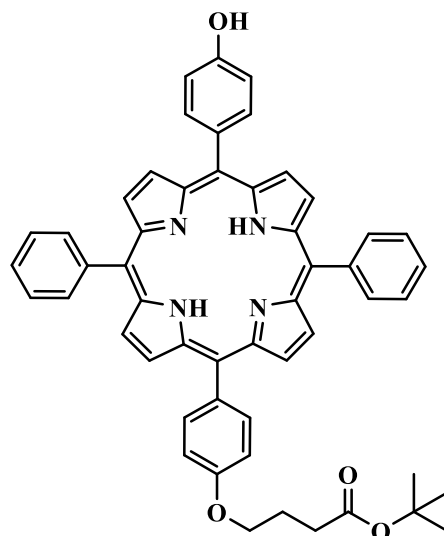
Dans un ballon de 250 mL, contenant 40 mL de dichlorométhane fraîchement distillé, 1,375 mL (25 mmol, 1éq.) d'acide sulfurique concentré et 12,02 g (25 mmol, 1éq.) de sulfate de magnésium anhydre sont ajoutés. Après 15 minutes d'agitation, 4,15 g (25 mmol, 1éq.) d'acide 4-bromobutanoïque et 11,95 mL (100 mmol, 5éq.) de tertiobutanol sont ajoutés. Le ballon est ensuite fermé hermétiquement et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante et sous argon. Après 48 heures de réaction, le mélange réactionnel est versé dans 187 mL d'une solution saturée de bicarbonate de sodium glacée puis agité jusqu'à dissolution complète du sulfate de magnésium. La phase organique est ensuite isolée puis lavée successivement avec 25 mL de solution saturée de bicarbonate de sodium puis avec de l'eau (3x50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium de la phase organique et évaporation du dichlorométhane, le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash en éluant avec du chloroforme. Le composé (**12**), est obtenu sous la forme d'un liquide de couleur jaune très pâle, avec un rendement de 60% (3,27 g).

Rf= 0,65 (CHCl₃). La CCM est révélée par pulvérisation successive de deux solutions permettant de voir les composés bromés. La première est composée de 0,1% de fluorescéine dans un mélange éthanol/eau (1/1) et la deuxième est constituée d'un mélange d'acide acétique et d'eau oxygéné (1/1).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δH, ppm : 1,45 (s, 9H, CH₃), 2,13 (qt, 2H, J = 6,8 Hz, -CH₂-), 2,40 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂-C=O), 3,45 (t, 2H, J = 6,8 Hz, Br-CH₂-).

IR ν(cm⁻¹) :2973, 2927, 1727 (C=O), 1364, 1156, 842.

II.1.3.2.5. Synthèse de la 5-(2-[3-terbutoxycarbonylpropoxy] phényl) -15-(p-hydroxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine (13)

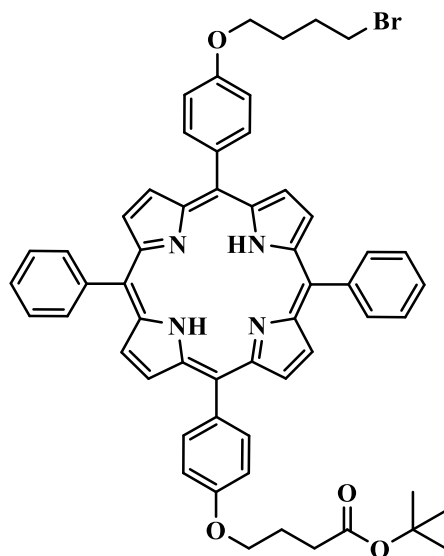


Dans un ballon de 100 mL, 0,5 g (0,772 mmol, 1 éq.) de porphyrine (**6**) sont solubilisés dans 20 mL de DMF. Puis, 2,69 g (19,31 mmol, 25 éq.) de K_2CO_3 et 0,172 g (0,772 mmol, 1 éq.) de 4-bromobutanoate de tertibutyle sont ajoutés successivement. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2 h à 110 °C. À la fin de la réaction, le DMF est évaporé et le brut réactionnel est repris dans 15 mL de chloroforme. La phase organique est ensuite lavée trois fois avec 30 mL d'eau distillée. Après purification sur plaque préparatives de silice avec comme éluant éthanol/chloroforme (5/95), la porphyrine (**13**) est obtenue avec une masse de 279 mg soit un rendement molaire de 45 %.

R_f = 0,41 (CHCl₃/EtOH, 95/5)

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,85 (dd, 8H, J= 4,6 Hz, J= 4,7 Hz Hβ-pyrroliques), 8,21 (d, 4H, J= 6,3 Hz, H 2,6 phényles), 8,1 (d, 4H, J= 8 Hz, H 2,6 aryles), 7,75 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,24 (m, 4H, H 3,5 aryle), 4,37 (t, 2H, J= 6 Hz, O-CH₂-), 2,59 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH₂-C=O), 2,25 (qt, 2H, J= 6,8 Hz, -CH₂-), 1,52 (s, 9H, CH₃-tert), -2,76 (s, 2H, NH pyrrole).

II.1.3.2.6. Synthèse de la 5--(4-[4-bromobutoxy] phényl) -15-(4-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy] phényl)-10,20-diphénylporphyrine (**14**)

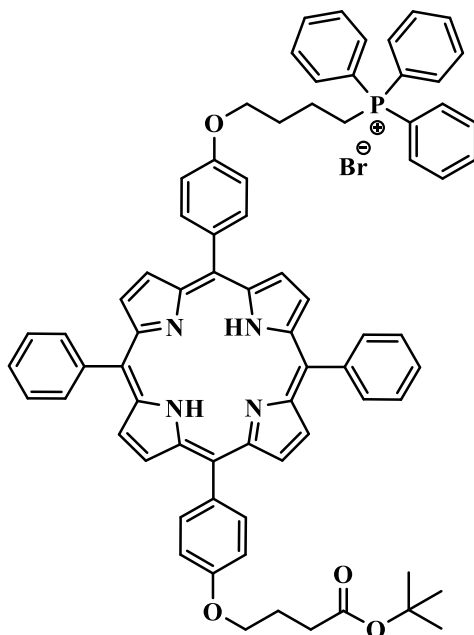


Dans un ballon de 25 mL, 0,285 g (0,361 mmol, 1 éq.) de porphyrine (**13**) sont solubilisés dans 12 mL de DMF. Ensuite, 1,24 g (9,03 mmol, 25 éq.) de K_2CO_3 et 1,95 g (9,03 mmol, 25 éq.) de dibromobutane sont ajoutés successivement. Après 5 h d'agitation à 110 °C, le DMF est évaporé et le brut réactionnel est repris dans 15 mL de chloroforme. La phase organique est lavée trois fois avec l'eau distillée, afin d'éliminer le K_2CO_3 . Le brut réactionnel est purifié sur plaques préparatives de silice en utilisant pour éluant du chloroforme pur. La masse du produit (**14**) obtenu après purification est de 237 mg soit un rendement molaire de 71 %.

R_f = 0,47 (CHCl₃/EtOH, 95/5)

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,85 (d, 8H, J= 4,6 Hz, Hβ-pyrroliques), 8,21 (d, 4H, J= 6,3 Hz, H 2,6 phényles), 8,1 (d, 4H, J= 8,46 Hz, H 2,6 aryles), 7,74 (m, 6H, H 3,4,5 phényles), 7,24 (m, 4H, H 3,5 aryles), 4,28 (t, 2H, J= 6,15 Hz, O-CH₂- (ester)), 4,24 (t, 2H, J= 6,2 Hz, O-CH₂- (bromobutane)), 3,6 (t, 2H, J= 6,4 Hz, -CH₂-Br), 2,59 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH₂-C=O), 2,25 (qt, 2H, J= 6,5 Hz, -CH₂-CH₂-C=O), 2,02 (qt, 2H, J= 6,5 Hz, CH₂-CH₂-Br), 1,85 (qt, 2H, J= 6,5 Hz, O-CH₂-CH₂- (bromobutane)), 1,54 (s, 9H, CH₃-tert), -2,75 (s, 2H, NH pyrrole).

II.1.3.2.7. Synthèse de la bromure de 5--(4-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy] phényl)-15-(4-[4-(triphénylphosphonium)butoxy]phényl)-10,20-diphénylporphyrine (15)



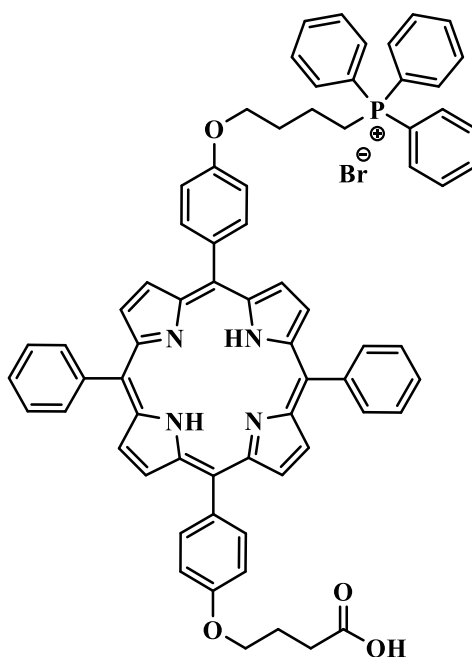
Dans un ballon de 25 mL, 0,224 g (0,242 mmol, 1éq.) de porphyrine (**14**) sont solubilisés dans 10 mL de DMF. Ensuite, 1,03 g (3,93 mmol, 16éq.) de triphénylphosphine sont ajoutés. La réaction est conduite pendant 24 h à 110 °C. Après purification sur plaque préparatives de silice (éluant : éthanol/chloroforme 5/95), 210 mg de la porphyrine (**15**) sont obtenus, soit un rendement molaire de 73%.

R_f = 0,23 (CHCl₃/EtOH, 90/10)

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,84 (m, 8H, Hβ-pyrroliques), 8,2 (d, 4H, J= 6,4 Hz, H 2,6 phényles), 8,09 (d, 4H, J= 8,5 Hz, H 2,6 aryles), 7,94 (dd, 6H, J= 7,4 Hz, J= 7,5 Hz, H2,6 PPh₃), 7,86-7,69 (m, 15H, H3,4,5 phényles et H3,4,5 PPh₃), 7,27 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H 3,5 aryle-ester), 7,19 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H 3,5 aryle-PPh₃), 4,38 (t, 2H, J= 5,3 Hz, O-CH₂- (ester)), 4,29 (t, 2H, J= 6,1 Hz, O-CH₂- (PPh₃)), 4,09 (m, 2H, CH₂-PPh₃), 2,6 (t, 2H, J= 7,3 Hz, -CH₂-C=O), 2,41 (qt, 2H, J= 6,2 Hz, -CH₂-CH₂-C=O), 2,3 (qt, 2H, J= 6,7 Hz, O-CH₂-CH₂-(PPh₃)), 2,06 (m, 2H, CH₂-CH₂- PPh₃), 1,54 (s, 9H, CH₃-tert), -2,76 (s, 2H, NH pyrrole).

SM (ESI) : m/z = C₇₄H₆₆N₄O₄P, [M+H]⁺, 1105,4821 calculée, 1105.4816 trouvée.

II.1.3.2.8. Synthèse de la bromure de 5--(4-[3-carboxypropyloxy] phényl) -15-(4-[4-(triphénylphosphonium) butoxy] phényl) -10,20-diphénylporphyrine (16)



Dans un ballon de 50 mL, 0,297 g (0,25 mmol, 1éq.) de porphyrine (**15**) sont solubilisés dans 16 mL de dichlorométhane puis 4 mL de TFA sont ajoutés. Après 2 heures de réaction à température ambiante et sous agitation, le solvant est évaporé et le brut réactionnel repris dans 30 mL de dichlorométhane. Ensuite, la phase organique est neutralisée avec 100 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Après trois lavages à l'eau (3 x 50 mL) puis séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est alors purifié sur plaque préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol 85/15). On obtient alors 266 mg de porphyrine (**16**), soit un rendement molaire de 94%.

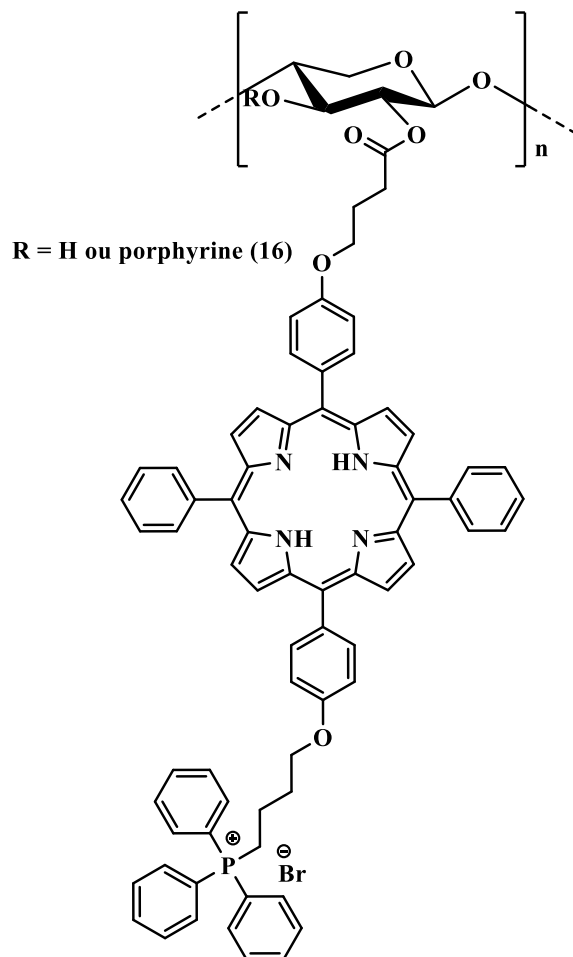
R_f = 0,13 (CHCl₃/EtOH, 80/20)

¹H NMR (CDCl₃+10% TFA, 500 MHz) δ_H, ppm: 8,7 (m, 6H, Hβ-pyrroliques), 8,61 (m, 2H, Hβ-pyrroliques), 8,53 (d, 4H, J= 7,4 Hz, H 2,6 phényles), 8,48 (d, 4H, J= 7,5 Hz, H 2,6 aryles), 8,03 (m, 6H, H2,6 PPh₃), 7,91 (dd, 3H, J=7,65 Hz, J= 7,06 Hz H4 PPh₃), 7,82-7,73 (m, 6H, H3,4,5 phényles), 7,68 (dd, 6H, J= 7,65 Hz, J= 7,65 Hz, H3,5 PPh₃), 7,55 (d, 2H, J= 8,5 Hz, H 3,5 aryle-ester), 7,47 (d, 2H, J= 8,4 Hz, H 3,5 aryle-PPh₃), 4,44 (t, 2H, J= 5,8 Hz, O-CH₂- (ester)), 4,39 (t, 2H, J= 5,2 Hz, O-CH₂- (PPh₃)), 3,28 (m, 2H, CH₂-PPh₃), 2,87 (t, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-C=O), 2,41 (qt, 2H, J= 6,5 Hz, -CH₂-CH₂-C=O), 2,25 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-(PPh₃)), 2,13 (m, 2H, CH₂-CH₂- PPh₃).

SM (ESI) : m/z = C₇₀H₅₈N₄O₄P, [M+H]⁺, 1049,0195 calculée, 1049.4190 trouvée.

UV-Vis (DMSO) λ max nm (ϵ , 10^3 L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 422 (274), 518 (11), 554 (7), 593 (4), 649 (3).

II.1.3.3. Greffage de la porphyrine (16) sur le xylane de hêtre (XP-TPP)



Dans un ballon de 25 mL, 0,043 g (0,038 mmol, 1éq.) de porphyrine (**16**) sont solubilisés dans 8 mL de DMSO. Ensuite, 0,037 g (0,23 mmol, 6éq.) de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, 100 mg de xylane solubilisé dans le DMSO, sont ajoutés. La réaction est maintenue 48h à 80 °C. À la fin de la réaction, le xylane est précipité avec l'éthanol absolu, puis filtré et séché sous vide. Le conjugué xylane-porphyrine (**16**) (XP-TPP) est obtenu avec une masse de 106 mg soit un rendement massique de 106%.

II.1.4. Enrobage de nanoparticules de silice par le xylane modifié

Le même protocole est appliqué pour les nanoparticules XP-SNPs et XP-TPP SNPs. Dans un erlenmeyer de 50 mL, 0,01 g de xylane modifié (XP ou XP-TPP) sont solubilisés dans 20 mL d'eau distillée. Le mélange est placé dans un bain à ultrason, puis l'équivalent de 100 mg de la suspension de nanoparticules de silice dans l'éthanol est ajouté goutte à goutte. Après ajout des

nanoparticules de silice, la sonication est maintenue pendant 5 min, puis le milieu réactionnel est agité magnétiquement pendant 15 min. Enfin, le mélange est centrifugé pendant 30 min à 8000 r/min, et le culot récupéré est lavé trois fois avec 25 mL d'eau distillée, puis deux fois avec l'éthanol absolu.

II.2. Préparation des nanoparticules organiques

II.2.1. Acétylation du xylane de hêtre

II.2.1.1. Acétylation du xylane de hêtre avant greffage des porphyrines

Dans un ballon de 50 mL, 4,44 mL (1,51 mmol d'unité xylose, équivalent de 200 mg de xylane, solution à 45 mg/mL) d'une solution de xylane dans le DMSO sont ajoutés. Ensuite, 15,56 mL de DMSO, et 10 mL (125,43 mmol) de NMI sont additionnés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 h à 80 °C. Après une heure, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante, puis l'anhydride acétique est ajouté. La réaction est maintenue à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 2 h. À la fin de la réaction, le xylane est précipité par ajout d'éthanol absolu, récupéré par filtration et lavé, puis séché sous vide. Le tableau 20 résume les quantités d'anhydres acétiques employées ainsi que les rendements massiques obtenus.

Tableau 20 : Conditions opératoires de l'acétylation du xylane.

Échantillon	Équivalent Anhydride acétique/unité xylose	Anhydride acétique (mmol/g)	Masse de xylanes acétylés récupérée (mg)	DS en acétyle
Xyl-Ac1	0,25/1	0,38/0,039	189	0,02
Xyl-Ac2	0,5/1	0,75/0,077	180	0,11
Xyl-Ac3	1/1	1,51/0,15	144	0,21
Xyl-Ac4	1,5/1	2,25/0,23	142	0,34
Xyl-Ac5	2,5/1	3,77/0,385	173	0,68
Xyl-Ac6	3/1	4,54/0,46	178	0,80
Xyl-Ac7	4/1	6,04/0,616	217	1,10

II.2.1.2. Acétylation du xylane de hêtre après greffage des porphyrines

70 mg (0,53 mmol d'unité xylose, 1éq.) de xylane S5 sont solubilisés dans 7 mL de DMSO, puis 3,5 mL (43,90 mmol) de N-méthylimidazole sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation à 80 °C pendant 1 h. Ensuite, le mélange est refroidi à température ambiante, puis 0,108 g (1,06 mmol, 2éq.) d'anhydride acétique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant deux heures, sous atmosphère inerte, à température ambiante. À la fin de réaction, le xylane est précipité par ajout d'éthanol absolu, puis récupéré par filtration et lavé. Le produit S5-Ac est obtenu avec un rendement massique de 90% (63 mg).

II.2.2. Fonctionnalisation des xylanes acétylés par la TPPOH

Dans un ballon de 50 mL, 0,108 g (0,15 mmol, 1éq.) de TPPOH sont solubilisés dans 20 mL de DMSO, puis 0,147 g (0,903 mmol, 6éq.) de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, 100 mg (0,757 mmol de xylose) de xylane acétylé sont ajoutés. La réaction est conduite à 50 °C pendant 24 h. À la fin de réaction le xylane est précipité à l'éthanol, filtré sur fritté, lavé plusieurs fois avec l'éthanol, puis séché sous vide. La même procédure a été appliquée pour les trois échantillons Xyl-Ac3-TPPOH, Xyl-Ac4-TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH. Le tableau 21 regroupe les rendements massiques ainsi que les masses de xylanes obtenues.

Tableau 21: Masses et rendements massiques des xylanes Xyl-Ac3-TPPOH, Xyl-Ac4-TPPOH, et Xyl-Ac5-TPPOH.

Échantillon	Xyl-Ac3-TPPOH	Xyl-Ac4-TPPOH	Xyl-Ac5-TPPOH
Masse de xylanes obtenue (mg)	91,85	90,18	86,84
Rendement massique	92	90	87
DSTPPOH (exprimé par motif de répétition du xylane)	0,71	0,52	0,13

II.2.2.1. Fonctionnalisation des xylanes acétylés par la porphyrine (16)

Dans un ballon de 50 mL, 0,07 g (0,062 mmol, 1éq.) de porphyrine (16) sont solubilisés dans 12 mL de DMSO, puis 0,061 g (0,37 mmol, 6éq.) de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, 40 mg (0,31 mmol de xylose) de xylane acétylé Xyl-Ac4 sont ajoutés. La réaction est conduite à 50 °C pendant 24 h. À la fin de réaction le xylane est précipité à l'éthanol, filtré sur fritté, lavé plusieurs fois avec l'éthanol, puis séché sous vide. Le xylane modifié Xyl-Ac4-porphyrine 16 est obtenu avec un rendement massique de 39% (16 mg) et un DS en porphyrine (16) de 0,1.

II.2.3. Préparation de nanoparticules de xylane organiques portant des photosensibilisateurs liés de façon covalente

Dans un pilulier, 20 mg de xylane sont solubilisés dans 5 mL de solvant organique ; DMSO ou DMAc en fonction de la solubilité du xylane. La solution obtenue est ensuite introduite dans une membrane de dialyse de 10 cm de longueur et de porosité 3500 Da (de la marque CelluSep®- H1), puis dialysé contre 500 mL d'eau pendant 15 h, en changeant l'eau toutes les 3 heures. À la fin de la dialyse, le contenu de la membrane est centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot obtenu est redispersé dans l'eau distillée, puis deux cycles de lavage/centrifugation sont effectués. Les nanoparticules sont alors redispersées dans 5 mL d'eau et conservées à +4°C. Ce mode opératoire a été appliqué pour préparer les nanoparticules S5-Ac, Xyl-Ac4-TPPOH et Xyl-Ac5-TPPOH. Les nanoparticules Xyl-Ac4-porphyrine (16), quant à elle, ont été préparées comme suite : 15 mg de xylane Xyl-Ac4 sont solubilisés dans 3,75 mL de DMSO. La solution obtenue est ensuite introduite dans une membrane de dialyse de 10 cm de longueur et de porosité 3500 Da (de la marque

CelluSep®- H1), puis dialysé contre 375 mL d'eau pendant 15 h, en changeant l'eau toute les 3 heures. À la fin de la dialyse, le contenu de la membrane est centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min, Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot obtenu est redispersé dans l'eau distillée, puis deux cycles de lavage/centrifugation sont effectués. Les nanoparticules sont alors redispersées dans 5 mL d'eau et conservées à +4°C

II.2.4. Encapsulation de photosensibilisateurs dans les nanoparticules organiques de xylane

Dans un pilulier, 20 mg de xylane Xyl-Ac6 sont solubilisés dans 5 mL de DMSO (concentration de 4 mg/mL), puis 2 mg de la TMPP ou la TMPC-TPP sont ajoutés. Les solutions obtenues sont ensuite dialysées contre de l'eau pendant 15 h, en changeant l'eau toutes les trois heures (membrane de dialyse de 10 cm de longueur avec un seuil de coupure de 3500 Da). En fin de dialyse, le contenu de la membrane est transféré dans un tube de centrifugation, puis la suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 30 min. Après deux cycles de lavage/centrifugation, les nanoparticules sont alors redispersées dans 5 mL d'eau et conservées à +4°C.

II.3. Préparation des nanoparticules 100% naturelles

II.3.1. Extraction des xylandes

Les sciures de châtaignier utilisées ont été fournies par la scierie Mazière (la Chapelle Montbrandeix, 87). Elles sont préalablement séchées à l'étuve à 50 °C pendant 48 h.

L'extraction des xylandes repose sur une extraction séquentielle des différents constituants de la paroi cellulaire végétale. Elle a été réalisée sur 30 g de sciure de bois de châtaignier.

II.3.1.1. Extraction à l'éthanol

Cette première étape permet d'extraire les sucres circulants (glucose, fructose, saccharose) et les tanins. L'extraction a été réalisée dans 600 mL d'éthanol à 80% à 80°C pendant 2h. Le résidu est récupéré par filtration sur verre fritté (porosité 3) et rincé à l'eau distillée. Après une nuit de séchage à l'étuve (40 °C), 27 g de sciures, nommées résidu I, sont récupérés, soit un rendement massique de 90%.

II.3.1.2. Extraction des pectines

Le résidu I a été dépectinisé dans 1,3 L d'une solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 1%, à 80 °C pendant 2 h. Après filtration sur fritté, le résidu dépectinisé (résidu II) est rincé à l'eau

distillée puis séché à l'étuve à 40 °C. Le résidu II est obtenu avec une masse de 25 g, soit un rendement massique de 83% par rapport aux sciures de départ.

II.3.1.3. Délignification

L'élimination de la lignine du résidu II est réalisée dans une solution tamponnée de chlorite de sodium dans l'acide acétique (11,75 g/5 mL) à 80 °C pendant 1 h. Après filtration, l'holocellulose est lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralisation. Après séchage à 40 °C, 22 g de sciures sont récupérés, soit un rendement massique de 73 % par rapport aux sciures brutes

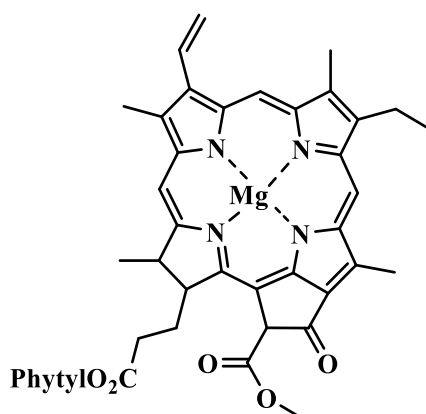
II.3.1.4. Extraction au DMSO des xylanes

15 g d'holocellulose sont solubilisés dans 325 mL de DMSO et laissés sous agitation magnétique à température ambiante, sous argon, pendant 24 h. À la fin de la réaction, les sciures résiduelles sont filtrées sur fritté et rincées à l'eau distillée. Le filtrat récupéré est ensuite ajouté à l'éthanol et laissé à 4 °C pendant 24 h. Les xylanes précipités sont ensuite isolés par centrifugation et lavés plusieurs fois avec l'éthanol. Après séchage à 40 °C, 120 mg de xylane, nommé xyl-D, sont obtenus, soit un rendement massique de 0,8%.

II.3.2. Extraction du phéophorbide a

Toutes les étapes d'extraction sont effectuées à l'abri de la lumière afin d'éviter, au maximum, la dégradation des produits.

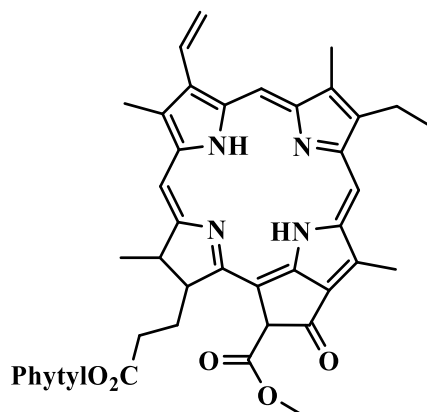
II.3.2.1. Extraction de la chlorophylle a



Dans un erlenmeyer de 3L, 100 g de *Spirulina maxima* sont mis en présence de 2 L d'acétone. Après 30 min de reflux, sous agitation, à l'abri de la lumière, l'extrait est filtré sur papier filtre et le solide est re-extrait une deuxième fois avec 2 L d'acétone. Les deux fractions sont

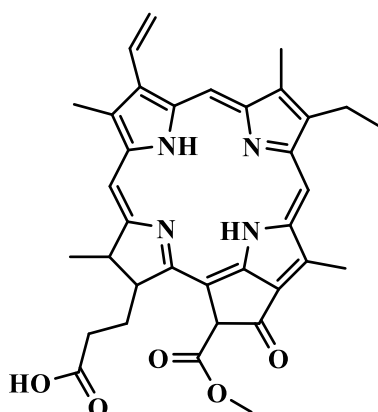
additionnées et l'acétone évaporée à l'évaporateur rotatif. Un résidu vert jaunâtre est obtenu avec une masse de 4,3 g.

II.3.2.2. Préparation du phéophytine a



4,3 g du brut récupéré sur la première étape est solubilisé dans un mélange acétone (40 mL) et méthanol (100 mL). Ensuite, 25 mL d'une solution de HCL à 1 M sont ajoutés afin d'éliminer l'ion magnésium. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 4 h à température ambiante. Après évaporation de l'acétone et du méthanol, le brut réactionnel est repris dans le chloroforme et lavé avec l'eau distillée. Après évaporation du chloroforme suivi d'une purification sur colonne de silice, 1g d'un produit vert-gris, le phéophytine a, est obtenu, soit un rendement massique de 24%.

II.3.2.3. Préparation du phéophorbide a



1g de phéophytine a sont solubilisés dans 100 mL d'une solution de TFA à 80% préalablement dégazée. Le mélange est laissé sous agitation pendant 1 h sous azote à 0 °C. À la fin de l'hydrolyse, 250 mL d'eau distillée sont ajoutés, et le phéophorbide a est extrait au chloroforme. Ensuite, un lavage avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 10% est effectué. Ceci forme un précipité qui est ensuite éliminé par un lavage avec une solution d'acide citrique à

10%. Ensuite, un dernier lavage à l'eau est effectué et le chloroforme est évaporé à l'évaporateur rotatif. Après purification par chromatographie flash, en utilisant comme éluant chloroforme/méthanol (95/5), 320 mg de phéophorbide a sont obtenus, soit un rendement massique de 32%.

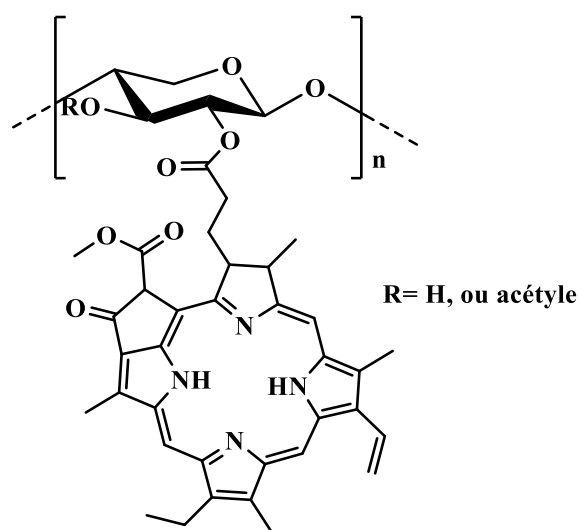
R_f = 0,4 (EtOH/CHCl₃ 5/95)

¹H NMR (acétone-d₆, 500 MHz) δ_H, ppm: 8 (dd, 1H, J=11,62/11,57 Hz, H16), 6,34 (s, 1H, H9), 6,13-6,27 (d, 1H, J= 17,91 Hz ; dd, 1H, J= 11,56/11,1 Hz, H15), 4,65 (m, 1H, H6), 4,24 (m, 1H, H4), 3,88 (s, 3H, H10), 3,6 (s, 3H, H11), 3,52 (q, 2H, J= 7,5 Hz, H13), 3,38 (s, 3H, H17), 3,04 (s, 3H, H14), 2,6 (m, 2H, H7), 2,35 (m, 2H, H8), 1,85 (d, 3H, J= 7,4 Hz, H5), 1,58 (t, 3H, J= 7,6 Hz, H12).

SM (ESI) : m/z = C₃₅H₃₇N₄O₅, [M+H]⁺, 593,2763 calculée, 593,2758 trouvée.

UV-Vis (DMSO) λ max nm (ε, 10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 416 (64), 509 (7), 539 (5), 612 (4), 669 (28).

II.3.3. Fixation du phéophorbide a sur le xylane de châtaignier



Dans un ballon de 25 mL, 0,036 g (0,06 mmol, 1éq.) de phéophorbide a sont solubilisés dans 6 mL de DMSO. Ensuite, 0,058 g (0,36 mmol, 6éq.) de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, 40 mg de xylane solubilisé dans le DMSO, sont ajoutés. La réaction est maintenue 24 h à 50 °C. À la fin de la réaction, le xylane est précipité avec l'éthanol absolu, puis filtré et séché sous vide. Le conjugué Xyl_{DMSO}-ph est obtenu avec une masse de 20 mg, soit un rendement massique de 50%.

II.3.4. Préparation des nanoparticules de xylane-phéophorbide a

17 mg de xylane $Xyl_{DMSO-ph}$ sont solubilisés dans 4,25 mL de DMSO. La solution obtenue est ensuite introduite dans une membrane de dialyse de 10 cm de longueur et de porosité 3500 Da (de la marque CelluSep®- H1), puis dialysé contre 500 mL d'eau pendant 15 h en changeant l'eau toutes les 3 heures. À la fin de la dialyse, le contenu de la membrane est centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot obtenu est redispersé dans l'eau distillée, puis deux cycles de lavage/centrifugation sont effectués. Les nanoparticules sont alors redispersées dans 5 mL d'eau et conservées à +4°C.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] H Nagai, Y H Kim, Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns *Journal of thoracic disease*, **2017**, 9, 448–451.
- [2] https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr223_F.pdf
- [3] https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_F.pdf
- [4] <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>
- [5] F Bray, J Ferlay, I Soerjomataram, R L Siegel, L A Torre, A Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, **2018**, 0, 3–31.
- [6] http://gco.iarc.fr/today/onlineanalysispie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=
- [7] T L Vincent, R A Gatenby, An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis, *Int. J. Oncol.* **2008**, 32: 729-737
- [8] www.cancerresearchuk.org
- [9] R A Weinberg et D Hanahan, The hallmarks of cancer, *Cell*, **2000**, 100, 57–70.
- [10] R A Weinberg et D Hanahan, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, **2011**, 144, 646-674.
- [11] R Lacave, C J Larsen, J Robert, *Cancérologie fondamentale, éditions John Libbey Eurotext Paris*, **2005**, P 83.
- [12] D Boujard, B Anselme, C Cullin, C Raguene-Nicol, *Biologie cellulaire et moléculaire 2^e édition*, **2012-2015**, P 468.
- [13] <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie-specifique/Medecine-de-precision>
- [14] M Barberi-Heyob, C Frochot, L Bezdetnaya-Bolotina, D Brault, D Dumas, F Guillemin, P Krausz, P Maillard, B Maunit, J L Merlin, S Mordon, J F Muller, T Patrice, G Simonneaux C Tanielian, La thérapie photodynamique, *l'actualité chimique* **2007**, 308-309.
- [15] M D Zheng Huang, A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy, *Technol Cancer Res Treat*, **2005**, 4, 283–293.

- [16] C Ringot, V Sol, M Barriere, N Saad, P Bressollier, R Granet, P Couleaud, C Frochot, P Krausz, Triazinyl Porphyrin-Based Photoactive Cotton Fabrics: Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 1716–1723.
- [17] C Frochot, M Barberi-Heyob, M Blanchard-Desce, L Bolotine, S Bonneau, C M Jimenez, J O Durand, H P Lassalle, G Lemercier, S Mordon, P Maillard, V Sol, C Vever-Bizet P Vicendo, La thérapie photodynamique : état de l'art et perspectives, *l'actualité chimique*, **2015** ,397-398.
- [18] D E Dolmans, D Fukumura, R K Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nature Reviews Cancer*, **2003**, 3, 380–387.
- [19] O Raab, The action of fluorescent material on infusorien, *Z Biol*, **1900** , 39,524–546
- [20] A Jesionek, H von Tappeiner, Therapeutische Versuche mit fluorescieren, *Muench. Med. Wochschr*, **1903**, 41, 2042-2051.
- [21] H. V. Tappeiner, A. Joldlbauer, On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes, *Arch. Klin. Med.*, **1904**,80, 427–487,
- [22] W Haussmann, Die sensibilisierende wirkung des ham-atoporphyrins, *Biochem. Z*, **1910**, 30, 276-316.
- [23] F Meyer-Betz, Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments, *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, **1913**, 112, 476-503.
- [24] À Policard, Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood, *CR Soc Biol*, **1924**, 91,1423–1424.
- [25] H Auler, G Banzer, Untersuchungen uber die Rolle der Porphyrin bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z Krebsforschung*, **1942**, 53, 65-68.
- [26] F H J Figge., G S Weiland., L O J. Manganiello, Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
- [27] S Schwartz, K. Absolon, H Vermund, Some relationships of porphyrins, Xrays and tumors, *Univ. Minn. Med. Bull*, **1955**, 27,7–8.
- [28] R Lipson, E. Baldes, The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative, *Archives of Dermatology*, **1960**,82(4):508
- [29] T J Dougherty, Activated Dyes as Antitumor Agents, *J. Natl. Cancer Inst*, **1974**, 52, 1133-1136.

- [30] T J Dougherty, J Kaufman, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Res.*, **1978**, 38(8), 2628-2655.
- [31] K R Weishaupt, C J Gomer, T J Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor, *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.
- [32] T J Dougherty, W R Potter, K R Weishaupt, The structure of the active component of hematoporphyrin derivative, in D. R. Doiron and C. J. Gomer (eds.), *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors, Progress in Clinical and Biological Research*, **1984**, 170, 301-314.
- [33] https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/AETMIS/Rapports/Cancer/2004_01_fr.pdf
- [34] C S Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, 54 (5), 659.
- [35] K Plaetzer, B Krammer, J Berlanda, F Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers Med Sci*, **2009**, 24,259–268.
- [36] B Halliwell, Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning), *Free Rad. Res.*, **1999**, 31, 261-272.
- [37] B Wilson, J Van Lier, Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy., *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, **1989**, 3(3), 459.
- [38] C Foote, F Shook, R Abakerli, Characterization of singlet oxygen., *Methods in enzymology*, **1984**, 105, 36-47
- [39] T S Mang, T J Dougherty, W R PotterWilliam, D G. Boyle Stein Somer Johan Moan, Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochembtry and Photobiology*, **1987**,45, 501-506,
- [40] M B Ericson, S Grapengiesser, F Gudmundson, A M Wennberg, O Larkö, J Moan, A Rosén, A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution, *Lasers Med Sci*, **2003**,18,56–62
- [41] J Moan, E Boye, Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin. *Photobiochem Photobiophys*, **1981**, 2,301–307.
- [42] J Moan, On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol* **1990**, 6,343-344
- [43] A P Castanoa, T N Demidovaa, M R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy:Part three–Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 91—106

- [44] U Chilakamarthi, L Giribabu, Photodynamic Therapy: Past, Present and Future, *Chem. Rec.* **2017**, 17, 775–802
- [45] I Mfouo-Tynga, H Abrahamse, Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16(5), 10228-1024.
- [46] P Agostinis, K Berg, KA Cengel, T H Foster, A W Girotti, S O Gollnick, S M Hahn, M R Hamblin, A Juzeniene, D Kessel, M Korbelik, J Moan, P Mroz, D Nowis, J Piette, B C Wilson, J Golab, Photodynamic Therapy of Cancer: An Update, *CA: Cancer Journal for Clinicians*, **2011** , 61, 250–281.
- [47] B Favaloro, N Allocati, V Graziano, C Di Ilio ,V. De Laurenzi, Role of apoptosis in disease, *Aging*, **2012**, 4, 330–349.
- [48] M Dewaele, H Maes, P Agostinis, ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy, *Autophagy*, **2010**, 6, 838-854.
- [49] D Kessel, M G H Vicente, J J Reiners, Jr, Initiation of Apoptosis and Autophagy by Photodynamic Therapy, *Lasers Surg Med.*, **2006**, 38(5), 482–488.
- [50] H He, L H Zang, Y S Feng, J Wang, W W Liu, L X Chen, N Kang, S Tashiro, S Onodera, F Qiu, T Ikejima, Physalin A Induces Apoptotic Cell Death and Protective Autophagy in HT1080 Human Fibrosarcoma Cells, *J. Nat. Prod.*, **2013**, 76, 880–888.
- [51] S Manoto, N Houreld, N Hodgkinson, H Abrahamse, Modes of Cell Death Induced by Photodynamic Therapy Using Zinc Phthalocyanine in Lung Cancer Cells Grown as a Monolayer and Three-Dimensional Multicellular Spheroids, *Molecules*, **2017**, 22(5), 791
- [52] J O Yoo, K S Ha, New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **2012**, 295 ,139-145.
- [53] B. Krammer, Vascular effects of photodynamic therapy, *Anticancer Research*, **2001**, 21, 4271–4278
- [54] Z Huang, H Xu, A D Meyers, A I Musani, L Wang, R Tagg, A B Barqawi, Y K Chen. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat.*, **2008** ,7(4),309-20.
- [55] V H Fingar, Vascular Effects of Photodynamic Therapy, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, **1996**,14, 323-328.
- [56] P Mroz, A Szokalska, M X Wu, M R Hamblin, Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response, *PLoS ONE*, **2010**, 5, 12.
- [57] E Reginato, P Wolf, M R Hamblin, Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects, *World journal of immunology*, **2014**, 4(1), 1–11.

- [58] M Korbelik, Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, **1996**,14, 329-334.
- [59] P V Tsalu, B M Nsimba, D T Mwanangombo, D D Tshilanda, P T Mpiana, Z G Yav, Correlation between Structure and Crystallization of Porphyrins and Derivatives, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, **2015**, 3(4):1-6
- [60] P J Rothmund, Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System, *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 61, 2912-2915.
- [61] A D Adler, F R Longo, J D Finarelli, J Goldmacher, J Assour, L Korsakoff, A simplified synthesis for meso-tetraarylporphine, *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476-476
- [62] R G Little, J A Anton, P A Loach, J A Ibers; The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins, *J Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12, 343-349.
- [63] A M A R Gonzalves, M M Pereira, A new look into the rothemund meso-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis, *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.
- [64] J S Lindsey, H C Hsu, I C Schreiman, Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.
- [65] J S Lindsey, S Prathapan, T E Johnson, R W Wagner, Porphyrin building blocks for modular construction of bioorganic model systems, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 8941-8968.
- [66] D Oulmi, P Maillard, J L Guerquin-Kern, C Huel, M Momenteau, Glycoconjugated Porphyrins. 3. Synthesis of Flat Amphiphilic Mixed meso- (Glycosylated aryDarylporphyrins and Mixed meso- (Glycosylated aryl)alkylporphyrins Bearing Some Mono- and Disaccharide Groups, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 1554-1560.
- [67] (a) R B Woodward, Totalsynthese des chlorophylls, *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662.
 (b) R B Woodward, The total synthesis of chlorophyll, *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404.
 (c) G P Arsenault, E Bullock, S F MacDonald., Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.
- [68] Thèse O Rezazgui, Thèse Université de Limoges, Towards a Bio-Inspired Photoherbicide: Synthesis and Studies of Fluorescent Tagged or Water-Soluble Porphyrins, from Solution to Plant Cells, **2015**.
- [69] H Abrahamse, M R Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.*, **2016**, 473, 347–364.
- [70] S Bonneau, C Vever-Bizet, Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches, *Expert Opin. Ther. Patents*, **2008**, 18(9),1-15

- [71] A M De Pinillos Bayona Pawel Mroz Connor Thunshelle Michael R. Hamblin, Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers, **2017**, 89, 192-206.
- [72] S Bonneau, P Morlière, D Brault, Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution, *Biochemical Pharmacology*, **2004**, 68, 1443-1452.
- [73] D Gal, M Ohashi, P C MacDonald, H J Buchsbaum, E R Simpson, Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1981**, 139, 877-885.
- [74] S Bonneau, C Vever-Bizet, P Morlière, J C Mazière, D Brault, Equilibrium and kinetic studies of the interactions of a porphyrin with low density lipoproteins, *Biophys. J.*, **2002**, 83, 3470-3481.
- [75] D Braul, Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1990**, 6, 79-86.
- [76] S Bonneau, N Maman, D Brault, Dynamics of pH-dependent self-association and membrane binding of a dicarboxylic porphyrin: a study with small unilamellar vesicles, *Biochim Biophys Acta*, **2004**, 1661 (1): 87 -96
- [77] H Mojzisoava, S Bonneau, C Vever-Bizet, D Brault, The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach. *Biochim Biophys Acta*, **2007**; 1768 (2): 366 -74.
- [78] S Kwiatkowski, B Knap, D Przystupski, J Saczko, E Kędziarska, K Knap-Czop, Jolanta Kotlińska, O Michel, K Kotowski, J Kulbacka, Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2018**, 106, 1098–1107.
- [79] A B Ormond, H S Freeman, Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy, *Materials* **2013**, 6, 817-840.
- [80] [https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:E2018G0830\(02\)&from=PT](https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:E2018G0830(02)&from=PT)
- [81] S S Taneja, J Bennet, J Coleman, R Grubb, G Andriole, R E Reiter, L Marks, A Azzouzi, M Emberton, Final Results of a Phase I/II Multicenter Trial of WST11 Vascular Targeted Photodynamic Therapy for Hemi-Ablation of the Prostate in Men with Unilateral Low Risk Prostate Cancer Performed in the United States, **2016**, 1096-1104.

- [82] N Shirasu, S O Nam, M Kuroki, Tumor-targeted Photodynamic Therapy, *Anticancer research*, **2013**, 33,2823-2832.
- [83] N Solban, I Rizvi, T Hasan, Targeted Photodynamic Therapy, *Lasers in Surgery and Medicine*, **2006**, 38, 522–531.
- [84] A M D P Bayona, P Mroz, C Thunshelle, M R Hamblin, Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers, *Chemical Biology and Drug Design*, **2017**, 89, 192-206.
- [85] J W M Lagerberg, K P Überriegler, B Krammer, J Van Steveninck, T M AR Dubbelman Plasma membrane properties involved in the photodynamic efficacy of merocyanine 540 nd tetrasulfonated aluminium phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 71, 341-346.
- [86] Y Matsumura, H Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, **1986**, 46, 6387–6392.
- [87] Y Barenholz, Doxil(R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, **2012**, 160, 117–34.
- [88] E Miele, G P Spinelli, F Tomao, S Tomao, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *Int J Nanomedicine*. **2009**, 4:99–105
- [89] T E Stinchcombe, M A Socinski, C M Walko, B H O'Neil, F A Collichio, A Ivanova, H Mu, M J Hawkins, R M Goldberg, C Lindley, E C Dees, Phase I and pharmacokinetic trial of carboplatin and albumin-bound paclitaxel, ABI-007 (Abraxane) on three treatment schedules in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **2007**, 60,759–66.
- [90] R Binetruy-Tournaire, C Demangel, B Malavaud, R Vassy, S Rouyre, M Kraemer, J Plouet, C Derbin, G Perret, J C Mazie, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J*, **2000**, 19, 1525–1533.
- [91] B Y Zheng, X Q Yang, Y Zhao, Q F Zheng, M R Ke, T Lin, R X Chen, K K K Ho, N Kumar, J D Huang, Synthesis and photodynamic activities of integrin-targeting silicon(IV) phthalocyanine-cRGD conjugates, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, 155, 24-33.
- [92] Y N Konan, R Gurny, E Allémann, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2002**, 66, 89-106.
- [93] D Mew, C K Watts, G H N Towers, J G Levy, Photoimmunothérapie: traitement de tumeurs animales avec des conjugués anticorps monoclonal anti-tumeur spécifiques à l'hématoporphyrine, *J. Immunol.*, **1983**, 130, 1473 – 1477.

- [94] M Mitsunaga, M Ogawa, N Kosaka, L T Rosenblum, P L Choyke, H Kobayashi, Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules, *nature medicine*, **2011**, 17, 1685-1692.
- [95] G A M Svan Dongen, G W M Visser, M B Vrouenraets, Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 31-52
- [96] H Kataok, H Nishie, N Hayashi, M Tanaka, A Nomoto, S Yano, T Joh, New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers, *Ann Transl Med*, **2017**, 5(8),183.
- [97] S Sakuma, E Otake, K Torii, M Nakamura, A Maeda, RnTujii, H Akashi, H Ohi, S Yano, A Morita, Photodynamic therapy with glycoconjugated chlorin photosensitizer, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2013**, 17, 1–12.
- [98] H Nishie, H Kataoka, S Yano, J I Kikuchi, N Hayashi, A Narumi, A Nomoto, E Kubota, T Joh, A next-generation bifunctional photosensitizer with improved water-solubility for photodynamic therapy and diagnosis, *Oncotarget.*, **2016**, 7(45), 74259–74268.
- [99] Y Zorlu, F Dumoulin, D Bouchu, V Ahsen, Dominique Lafont, Monoglycoconjugated water-soluble phthalocyanines. Design and synthesis of potential selectively targeting PDT photosensitisers, *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51, 6615-6618.
- [100] M C Desroches, A Bautista-Sanchez, C Lamotte, B Labeque, D Auchère, R Farinotti, P Maillard, D S Grierson, P Prognon, A Kasselouri, Pharmacokinetics of a tri-glucoconjugated 5,10,15-(meta)-trihydroxyphenyl-20-phenyl porphyrin photosensitizer for PDT. A single dose study in the rat, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2006**, 85, 56-64.
- [101] Y Lu, P S Low, Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, 54, 675-693.
- [102] R Schneider, F Schmitt, C Frochot, Y Fort, N Lourette, F Guillemin, J F Müller, M Barberi-Heyob, Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13, 2799-2808.
- [103] J Wang, Q Liu, Y Zhang, H Shi, H Liu, W Guo, YnMa, W Huang, Z Hong, Folic acid conjugated pyropheophorbide a as the photosensitizer tested for in vivo targeted photodynamic therapy, *journal of pharmaceutical sciences*, **2017**, 106, 1482–1489.
- [104] G Battogtokh, Y T Ko, Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2017**,13,733–743.

- [105] A A Rosenkranz, D A Jans, A S Sobolev, Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immunology and Cell Biology*, **2000**, 78, 452–464.
- [106] S Zhanga, L Yang, X Ling, P Shao, X Wang, W B Edwards, Mingfeng Bai, Tumor mitochondria-targeted photodynamic therapy with a translocator protein (TSPO)-specific photosensitizer, *Acta Biomaterialia*, **2015**, 28, 160-170.
- [107] P Agarwal, M Mitra, S Roy - Handbook of Mitochondrial Dysfunction, 2 Structure, Function and Evolutionary Aspects of Mitochondria, **2019**, pp 9.
- [108] C Sauvanet, L Arnauné-Pelloquin, C David, P Belenguer, M Rojo, Dynamique et morphologie mitochondriales Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle, *Med Sci (Paris)*, **2010**, 26, 823–829.
- [109] S J Hu, S S Jiang, J Zhang, D Luo, B Yu, L Y Yang, H H Zhong, M W Yang, L Y Liu, F F Hong, S L Yang, Effects of apoptosis on liver aging, *World J Clin Cases.*, **2019**, 7(6), 691-704.
- [110] S Shirjang, B Mansoori, S Asghari, P H G Duijf, A Mohammadi, M Gjerstorff, B Baradaran, MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis, *Free Radical Biology and Medicine*, **2019**, 139, 1-15.
- [111] R A J Smith, C M Porteous, A M Gane, M P Murphy, Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**, 100(9): 5407–5412.
- [112] M Yang, J Deng, D Guo, Q Sun, Z Wang, K Wang, F Wu, Mitochondria-targeting Pt/Mn porphyrins as efficient photosensitizers for magnetic resonance imaging and photodynamic therapy, *Dyes and Pigments*, **2019**, 166, 189-195.
- [113] G Battogtokh, Y S Choi, D S Kang, S J Park, M S Shim, K M Huh, Y Y Cho, J Y Lee, H S Lee, H C Kang, Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: current strategies and future perspectives, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2018**, 8, 862-880.
- [114] W Lei, J Xie, Y Hou, G Jiang, H Zhang, P Wang, X Wang, B Zhang, Mitochondria-targeting properties and photodynamic activities of porphyrin derivatives bearing cationic pendant, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2010**, 98, 167-171.
- [115] L Yang, P Gao, Y Huang, X Lu, Q Chang, W Pan, N Li, B Tang, Boosting the photodynamic therapy efficiency with a mitochondria-targeted nanophotosensitizer, *Chinese Chemical Letters*, **2019**, 30, 1293-1296.
- [116] A Wicki, D Witzigmann, V Balasubramanian, J Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *Journal of Controlled Release*, **2015**, 200, 138-157.

- [117] <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article87>
- [118] D B Warheit, C M Sayes, K L Reed, K A Swain, Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks, *Pharmacology & Therapeutics*, **2008**, 120, 35-42.
- [119] M Elsabahy, K L Wooley, Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications, *Chem Soc Rev.*, **2012**, 41(7), 2545–2561.
- [120] D E Owens III, N A Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, 307,93–102.
- [121] J Wang, J D Byrne, M E Napier, J DeSimone, More Effective Nanomedicines through Particle Design, *Small.*, **2011**, 7(14), 1919–1931.
- [122] F Zhao, Y Zhao, Y Liu, X Chang, C Chen, Y Zhao, Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials, *Nanotechnology with Soft Matter*, **2011**, 7, 1322-1337.
- [123] P Aggarwal, J B Hall, C B McLeland, M A Dobrovolskaia, S E McNeil, Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, 61, 428-437.
- [124] J S Suk, Q Xu, N Kim, J Hanes, L M Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv Drug Deliv Rev.*, **2016**, 99, 28-51.
- [125] C Lemarchand, R Gref, P Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**, 58, 327-341.
- [126] G Lan, K Ni, W Lin, Nanoscale metal–organic frameworks for phototherapy of cancer, *Coordination Chemistry Reviews*, **2019**, 379, 65-81
- [127] S Wang, P Huang, L Nie, R Xing, D Liu, Z Wang, J Lin, S Chen, G Niu, G Lu, X Chen, Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Adv Mater.*, **2013**, 25(22), 3055-3061.
- [128] L Motte, what are the Current Advances Regarding Iron Oxide Nanoparticles for Nanomedicine? *J Bioanal Biomed* **2012**, 4,6.
- [129] S Richard, M Boucher, Y Lalatonne, S Mériaux, L Motte, Iron oxide nanoparticle surface decorated with cRGD peptides for magnetic resonance imaging of brain tumors, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **2017**, 1861, 1515-1520.
- [130] J P Fortin, C Wilhelm, J Servais, C Ménager, J C Bacri, F Gazeau, Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia, *J Am Chem Soc.*, **2007**, 129(9), 2628-35.

- [131] M Thandu, V Rapozzi, L Xodo, F Albericio, C Comuzzi, S Cavalli, “Clicking” Porphyrins to Magnetic Nanoparticles for Photodynamic Therapy, *ChemPlusChem*, **2014**, 79, 90 – 98.
- [132] P V Ostroverkhov, A S Semkina, V A Naumenko, E A Plotnikova, P A Melnikov, T O Abakumova, R I Yakubovskaya, A F Mironov, S S Vodopyanov, A M Abakumov, A G Majouga, M A Grin, V P Chekhonin, M A Abakumov, Synthesis and characterization of bacteriochlorin loaded magnetic nanoparticles (MNP) for personalized MRI guided photosensitizers delivery to tumor, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2019**, 537, 132-141.
- [133] F Yan, J Jiang, X Chen, S Tian, K Li, Synthesis and Characterization of Silica Nanoparticles Preparing by Low-Temperature Vapor-Phase Hydrolysis of SiCl₄, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2014**, 53, 11884–11890.
- [134] W Stöber, A Fink, E Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1968**, 26, 62–69.
- [135] K S Rao, K El-Hami, T Kodaki, K Matsushige, K Makino, A novel method for synthesis of silica nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 289 (1), 125-131.
- [136] V K LaMer, R H Dinegar, Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols, *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, 72, 4847-4854.
- [137] C C M C Carcouët, M W P Van De Put, B Mezari, P C M M Magusin, J Laven, P H H Bomans, H Friedrich, A C C Esteves, N A J M. Sommerdijk, R A T M van Benthem, Gijsbertus de With, Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles, *Nano Lett.*, **2014**, 14,1433-1438
- [138] L Colombeau, S Acherar, F Baros, P Arnoux, A Mohd Gazzali, K Zaghdoudi, M Toussaint, R Vanderesse, C Frochot, Inorganic Nanoparticles for Photodynamic Therapy, *Top Curr Chem*, **2016**, 370, 113-134.
- [139] J G Croissant, J I Zink, L Raehm, J O Durand, Two-Photon-Excited Silica and Organosilica Nanoparticles for Spatiotemporal Cancer Treatment, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7, 1701248.
- [140] F Yan, R Kopelman, The Embedding of Meta-tetra (Hydroxyphenyl)-Chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties, *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 78(6),587–591.
- [141] I Roy, T Y Ohulchansky, H E Pudavar, E J Bergey, A R Oseroff, , J Morgan, T J Dougherty, P N Prasad, Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble

- photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, 125 , 7860-7865.
- [142] D H M Dam, L Zhao, S A Jelsma, Y Zhao, A S Paller, Folic acid functionalized hollow nanoparticles for selective photodynamic therapy of cutaneous squamous cell carcinoma, *Mater. Chem. Front.*, **2019**,3, 1113-1122.
- [143] C M Jimenez, D Aggad, J G Croissant, K Tresfield, D Laurencin, D Berthomieu, N Cubedo, M Rossel, S Alsaiari, D H Anjum, R Sougrat, M A Roldan-Gutierrez, S Richeter, E Oliviero, L Raehm, C Charnay, X Cattoën, S Clément, M W C Man, M Maynadier, V Chaleix, V Sol, M Garcia, M Gary-Bobo, N M Khashab, N Bettache, J O Durand, Porous Porphyrin-Based Organosilica Nanoparticles for NIR Two-Photon Photodynamic Therapy and Gene Delivery in Zebrafish, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, 28(21),1800235.
- [144] N Clemente, I Miletto, E Gianotti, M Invernizzi, L Marchese, U Dianzani, F Renò, Verteporfin-loaded mesoporous silica nanoparticles inhibit mouse melanoma proliferation in vitro and in vivo, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2019**, 197,111533.
- [145] J L Vivero-Escoto, D L Vega, Stimuli-responsive protoporphyrin IX silica-based nanoparticles for photodynamic therapy in vitro, *RSC Adv.*, **2014**,4, 14400-14407.
- [146] A Akbarzadeh, R Rezaei-Sadabady, S Davaran, S W Joo, N Zarghami, Y Hanifehpour, M Samiei, M Kouhi, K Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters* **2013**, 8,102.
- [147] A S L Derycke, P A M de Witte, Liposomes for photodynamic therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 17-30.
- [148] F Jiang, L Lilge, J Grenier, Y Li, M D Wilson, M Chopp, Photodynamic Therapy of U87 Human Glioma in Nude Rat Using Liposome-Delivered Photofrin, *Lasers in Surgery and Medicine*, **1998**, 22,74–80.
- [149] K Nawalany, A Rusin, M Kępczyński, A Mikhailov, G Kramer-Marek, M Sniatura, J Poltowicz, Z Krawczyk, M Nowakowska, Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: In vitro studies, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, 97, 8–17.
- [150] A K Iyer, K Greish, T Seki, S Okazaki, J Fang, K Takeshita, H Maeda, Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation, *Journal of Drug Targeting*, **2007**, 15(7–8): 496–506

- [151] F Q Hu, XH Jiang, X Huang, XL Wu, H Yuan, X H Wei, Y Z Du, Enhanced cellular uptake of chlorine e6 mediated by stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles, *Journal of Drug Targeting*, **2009**, 17(5), 384–391.
- [152] B Klajnert, M Rozanek, M Bryszewska, Dendrimers in photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, 19, 4903–4912.
- [153] A Narsireddy, K Vijayashree, M G Adimoolam, S V Manorama, N M Rao, Photosensitizer and peptide conjugated PAMAM dendrimer for targeted in vivo photodynamic therapy, *Int J Nanomedicine*. **2015** ,10, 6865–6878.
- [154] J Nicolas, P Couvreur, Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux, *médecine/sciences*, **2017** ,33, 11-7.
- [155] G Saravanakumar, D Jo, J H Park, Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging, *Current Medicinal Chemistry*, **2012**, 19, 3212-3229.
- [156] M Swierczewska, H S Han, K Kim, J H Park, S Lee, Polysaccharide-based Nanoparticles for Theranostic Nanomedicine, *Adv Drug Deliv Rev*. **2016**, 99,70–84.
- [157] S Daus, T Heinze, Xylan-Based Nanoparticles: Prodrugs for Ibuprofen Release, *Macromolecular Bioscience*, **2010**, 10, 211-220.
- [158] S U Kumar, V Kumar, R Priyadarshi, P Gopinath, Y S Negi, pH-responsive prodrug nanoparticles based on xylan-curcumin conjugate for the efficient delivery of curcumin in cancer therapy, *Carbohydrate Polymers*, **2018**, 188, 252-259.
- [159] X Peng, Z Xiang, F Du, J Tan, L Zhong, R Sun, Amphiphilic xylan–cholic acid conjugates: synthesis and self-assembly behaviors in aqueous solution, *Cellulose*, **2018**, 25, 245–257.
- [160] G Q Fu, L Y Su, P P Yue, YH Huang, J Bian, MF Li, F Peng, R Sun, Syntheses of xylan stearate nanoparticles with loading function from by-products of viscose fiber mills, *Cellulose*, **2019**, 1–12.
- [161] Y I L Jeong, B Cha, H L Lee, Y H Song, Y H Jung, T W Kwak, C Choi, G W Jeong, J W Nah, D H Kang, Simple nanophotosensitizer fabrication using water- soluble chitosan for photodynamic therapy in gastrointestinal cancer cells, *International Journal of Pharmaceutics*, **2017**, 532, 194-203.
- [162] S J Lee, H Koo, H Jeong, M S Huh, Y Choi, S Y Jeong, Y Byun, K Choi, K Kim, I C Kwon, Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy, *Journal of Controlled Release*, **2011**,152, 21-29.

- [163] Y Wang, M Yang, J Qian, W Xu, J Wang, G Hou, L Ji, A Suo, Sequentially self-assembled polysaccharide-based nanocomplexes for combined chemotherapy and photodynamic therapy of breast cancer, *Carbohydrate Polymers*, **2019**, 203, 203-213.
- [164] L Dai, J Li, B Zhang, J Liu, Z Luo, K Cai, Redox-Responsive Nanocarrier Based on Heparin End-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Tumor Therapy in Vitro and in Vivo, *Langmuir*, **2014**, 30, 7867–7877.
- [165] K S Kim, J Kim, J Y Lee, S Matsuda, S Hideshima, Y Mori, T Osakab, K Na, Stimuli-responsive magnetic nanoparticles for tumor-targeted bimodal imaging and photodynamic/hyperthermia combination therapy, *Nanoscale*. **2016**, 8(22), 11625-34.
- [166] Q Zhao, J Liu, W Zhu, C Sun, D Di, Y Zhang, P Wang, Z Wang, S Wang, Dual stimuli responsive hyaluronic acid-conjugated mesoporous silica for targeted delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Acta Biomater*, **2015**, 23, 147-156.
- [167] L Li, M Nurunnabi, M Nafiujjaman, Y Lee, K M Huh, GSH-mediated photoactivity of pheophorbide a-conjugated heparin/gold nanoparticle for photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*, **2013**, 171, 241-250.
- [168] G F Luo, W H Chen, Y Liu, Q Lei, R X Zhuo, X Z Zhang, Multifunctional Enveloped Mesoporous Silica Nanoparticles for Subcellular Co-delivery of Drug and Therapeutic Peptide, *Sci Rep*. **2014**, 4, 6064.
- [169] K Kim, H Choi, E S Choi, M H Park, J H Ryu, Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy, *Pharmaceutics*, **2019**, 11, 301.
- [170] Q He, J Shi, F Chen, M Zhu, L Zhang, An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles, *Biomaterials*, **2010**, 31, 3335-3346.
- [171] S E Park, M Y Park, PK, S W Lee, The Effect of pH-adjusted Gold Colloids on the Formation of Gold Clusters over APTMS-coated Silica Cores, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, 27, 1341-1345.
- [172] M J García-Soto, O González-Ortega, Synthesis of silica-core gold nanoshells and some modifications/variations, *Gold Bulletin*, **2016**, 49, 111–131.
- [173] K Hettrich, S Fischer, N Schröder, J Engelhardt, U Drechsler, F Loth. Derivatization and Characterization of Xylan from Oat Spelts. *Macromolecular Symposia*, **2006**, 232, 37–48.
- [174] A Ebringerová, Z Hromádková, Xylans of Industrial and Biomedical Importance, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **2013**, 16, 325-346.
- [175] R H Marchessault, C Y Liang, The Infrared Spectra of Crystalline Polysaccharides VIII. Xylans, *Journal of Polymer Science*, **1962**, 59, 357-378.

- [176] A Ebringerová, Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses, *Macromolecular. Symposia*, **2006**, 232, 1-12.
- [177] J Havlicek, O Samuelson, Chromatography of oligosaccharides from xylan by various techniques, *Carbohydrate Research*, **1972**, 22, 307-316.
- [178] R Toman, R Kohn, A Malovíková, J Rosik Distribution of 4-O-methyl-D-glucuronic acid units in xylan of the bark of white willow (*Salix alba* L.), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1981**, 46(6), 1405-1412.
- [179] Charlotte MOINE, Thèse Université de Limoges, extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois. Obtention de matériaux plastiques par modification des xylandes, **2005**, page 108.
- [180] R G Little, J A Anton, P A Loach, J A Ibers, The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1975**, 12, 343-349.
- [181] R Boscencu, R Socoteanu, A S Oliveira, L F V Ferreira, Synthesis and spectral characterization of some unsymmetrically substituted mesoporphyrinic compounds. *Revista de Chimie*, **2007**, 58, 498-501.
- [182] V Chaleix, P Couleaud, V Sol, R Zerrouki, S Alves, P Krausz, Microwave-assisted expeditious O-alkylation of meso-hydroxyphenylpotphyrins, *Journal of Porphyrins and Phtalocyanines*, **2009**, 13, 888-892.
- [183] M Österberg, J Laine, P Stenius, A Kumpulainen, P M Claesson, Forces between xylan-coated surfaces: effect of polymer charge density and background electrolyte. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2001**, 242, 59-66.
- [184] C H Lee, J S Lindsey, One-flask synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and their application in the synthesis of trans-substituted porphyrin building blocks, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 11427-11440.
- [185] A Nowak-Król, R Plamont, G Canard, J A Edzang, D T Gryko, T S Balaban, An Efficient Synthesis of Porphyrins with Different meso Substituents that Avoids Scrambling in Aqueous Media, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 1-12.
- [186] B J Littler, Y Ciringh, J S Lindsey, Investigation of Conditions Giving Minimal Scrambling in the Synthesis of trans-Porphyrins from Dipyrromethanes and Aldehydes, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 2864-2872.
- [187] W Lei, J Xie, Y Hou, G Jiang, H Zhang, P Wang, X Wang, B Zhang, Mitochondria-targeting properties and photodynamic activities of porphyrin derivatives bearing cationic pendant, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2010**, 98, 167-171.

- [188] S W Wright, D L Hageman, A S Wright, L D McClure, Convenient preparations of t-butyl esters and ethers from t-butanol., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38(42), 7345-7348.
- [189] T L C Figueiredo, R A W Johnstone, A M P S Sørensen, D Burget, P Jacques, Determination of Fluorescence Yields, Singlet Lifetimes and Singlet Oxygen Yields, *Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 69(5), 517-528.
- [190] RW Redmond, J N Gamlin, A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem Photobiol*, **1999**, 70, 391-475.
- [191] S Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **2007**, 35, 495–516.
- [192] H Wondraczek, K Petzold-Welcke, P Fardim, T Heinze, Nanoparticles from conventional cellulose esters: evaluation of preparation methods, *Cellulose*, **2013**, 20,751–760.
- [193] L Chronopoulou, I Fratoddi, C Palocci, I Venditti, M V Russo, Osmosis Based Method Drives the Self-Assembly of Polymeric Chains into Micro- and Nanostructures, *Langmuir*, **2009**, 25(19), 11940–11946
- [194] N G V Fundador, Y Enomoto-Rogers, A Takemura, T Iwata, Acetylation and characterization of xylan from hardwood kraft pulp, *Carbohydrate Polymers*, **2012**, 87, 170-176.
- [195] N G V Fundador, Y Enomoto-Rogers, A Takemura, T Iwata, Syntheses and characterization of xylan esters, *Polymer*, **2012**, 53, 3885-3893.
- [196] M Gröndahl, A Teleman, P Gatenholm, Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood, *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 52, 359-366.
- [197] X Zhang, A Zhang, C Liu, J Ren, Per-O-acylation of xylan at room temperature in dimethylsulfoxide/N-methylimidazole, *Cellulose*, **2016**, 23, 2863–2876.
- [198] A Stallivieri, F Le Guern, R Vanderesse, E Meledje, G Jori, C Frochot, S Acherar, Synthesis and photophysical properties of photoactivable cationic porphyrin 5-(4-N-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)- 21H,23H-porphyrin tetraiodide for anti-malaria PDT, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, 14, 1290 – 1295.
- [199] S Wang, R Gao, F Zhou, M Selke, Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 487–493.
- [200] Y Li, WD Jang, N Nishiyama, A Kishimura, S Kawauchi, Y Morimoto, S Miake, T Yamashita, M Kikuchi, T Aida, K Kataoka, Dendrimer generation effects on photodynamic efficacy of dendrimer porphyrins and dendrimer-loaded supramolecular nanocarriers, *Chem. Mater.*, **2007**, 19, 5557–5562.

- [201] S Hackbarth, V Horneffer, A Wiehe, F Hillenkamp, B Röder, Photophysical properties of pheophorbide-a-substituted diaminobutane poly-propylene-imine dendrimer, *Chem. Phys.*, **2001**, 269, 339–346.
- [202] F Bregier, J Godard, J Thiais, S Bouramtane, A Moulin, Y Champavier, A Mailleau, VChaleix, V Sol, Regioselective reduction of 5-aryl-10, 15, 20-tris (pyridyl) porphyrin to 5-aryl-10, 15, 20-tris (pyridyl) dihydroporphyrin (chlorin), *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2019**, doi: 10.1142/S1088424619501438.
- [203] A Ebringerova, Z Hromadkova, T Heinze, Hemicellulosemolsaccharides I. Advances in Polymer Science, **2005**, 186, 1-67, 186. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [204] C Moine, P Krausz, V Chaleix, O Sainte-Catherine, M Kraemer, V Gloaguen, Structural Characterization and Cytotoxic Properties of a 4-O-Methylglucuronoxylan from *Castanea sativa*, *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 60-66.
- [205] Emmanuel Renault, Thèse Université de Limoges, Délignification du bois de châtaignier par une approche de chimie verte : Mise en œuvre et impacts sur la structure et le potentiel ant-radicalaire des Phyto-polysaccharides extraits, **2014**.
- [206] D M de Carvalho, A Martínez-Abad, D V Evtugin, J L Colodette, M E Lindström, F Vilaplana, O Sevastyanova, Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw, *Carbohydrate Polymers*, **2017**, 156, 223–234.
- [207] Aline Barbat, Thèse Université de Limoges, Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de châtaignier. Développement de nouveaux procédés de délignification, **2009**, page 83.
- [208] M Gröndahl, A Teleman, P Gatenholm, Effect of acetylation on the material properties of glucuronoxylan from aspen wood, *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 52, 359-366.
- [209] H E Yoon, S H Oh, S A Kim, J H Yoon, S G Ahn, Pheophorbide a-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis via the activation of MAPKs in human skin cancer cells. *Oncol Rep*, **2014**, 31(1), 137–144.
- [210] P M K Tang, J Y W Chan, S W N Au, S K Kong, S K Tsui, M M Waye, T C W Mak, W P Fong, K P Fung, Pheophorbide a, an active compound isolated from *Scutellaria barbata*, possesses photodynamic activities by inducing apoptosis in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Biol Ther*, **2006**, 5, 1111-1116.
- [211] G Battogtokh, Y T Ko, Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2017**, 13, 733–743.

- [212] W Y Choi, H Y Lee, Enhancement of Chlorophyll a Production from Marine *Spirulina maxima* by an Optimized Ultrasonic Extraction Process, *Appl. Sci.* **2018**, 8(1), 26.
- [213] N Drogat, M Barrière, R Granet, V Sol, P Krausz, High yield preparation of purpurin-18 from *Spirulina maxima*, *Dyes and Pigments*, **2011**, 88, 125-127.
- [214] H You, H E Yoon, J H Yoon, H Ko, YC Kim, Synthesis of pheophorbide-a conjugates with anticancer drugs as potential cancer diagnostic and therapeutic agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 5383-5391.
- [215] J J Katz, C E Brown, Nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophylls and corrins *Bull. Magn. Reson.*, **1983**, 5, 3-49.

Article 1:

Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy

Soukaina Bouramtane, Ludovic Bretin, Aline Pinon, David Leger, Bertrand Liagre, Laurence Richard, Frédérique Brégier, Vincent Sol, Vincent Chaleix

Carbohydrate Polymers, **2019**, 213, 168-175

Porphyrins are widely used in anticancer photodynamic therapy (PDT). However, low physiological solubility and lack of selectivity towards cancer cells are the main limitations of their clinical use. Nanoparticles are being intensively explored as photosensitizer carriers for PDT to overcome these limitations. The aims of this work are to synthesize core-shell hybrid nanoparticles formed by a silica core and xylan carrying a 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH) shell, and evaluate their anticancer activity. To afford drug-controlled incorporation and enhance blood circulation, TPPOH was covalently linked to xylan. Different xylans with degrees of substitution in TPPOH ranging from 0.034 to 1.11, were obtained and characterized. Then, the xylan-TPPOH conjugate (PX) was used to coat the silica nanoparticles (PX SNPs). The obtained nano-objects were characterized and their therapeutic potential for photodynamic therapy evaluated against colorectal cancer cell lines. *in vitro* analysis showed that PX SNPs were 40-fold and 10-fold more effective against HCT116 cells and HT-29 cells respectively compared to free TPPOH.

Article 2:

Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer

Ludovic Bretin, Aline Pinon, **Soukaina Bouramtane**, Catherine Ouk, Laurence Richard, Marie-Laure Perrin, Alain Chaunavel, Claire Carrion, Frédérique Bregier, Vincent Sol, Vincent Chaleix, David Yannick Leger, Bertrand Liagre.

Cancers, **2019**, 11(10), 1474

Photodynamic therapy (PDT) using porphyrins has been approved for treatment of several solid tumors due to the generation of cytotoxic reactive oxygen species (ROS). However, low physiological solubility and lack of selectivity towards tumor sites are the main limitations of their clinical use. Nanoparticles are able to spontaneously accumulate in solid tumors through an enhanced permeability and retention (EPR) effect due to leaky vasculature, poor lymphatic drainage, and increased vessel permeability. Herein, we proved the added value of nanoparticle vectorization on anticancer efficacy and tumor-targeting by 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH). Using 80 nm silica nanoparticles (SNPs) coated with xylan-TPPOH conjugate (TPPOH-X), we first showed very significant phototoxic effects of TPPOH-X SNPs mediated by post-PDT ROS generation and stronger cell uptake in human colorectal cancer cell lines compared to free TPPOH. Additionally, we demonstrated apoptotic cell death induced by TPPOH-X SNPs-PDT and the interest of autophagy inhibition to increase anticancer efficacy. Finally, we highlighted *in vivo*, without toxicity, elevated anticancer efficacy of TPPOH-X SNPs through improvement of tumor-targeting compared to a free TPPOH protocol. Our work demonstrated for the first time the strong anticancer efficacy of TPPOH *in vitro* and *in vivo* and the merit of SNPs vectorization.

Article 3:

Regioselective reduction of 5-aryl-10,15,20-tris(pyridyl) porphyrin to 5-aryl-10,15,20-tris(pyridyl)dihydroporphyrin (chlorin)

Frederique Bregier, Jeremy Godard, Jordan Thiais, **Soukaina Bouramtane**, Alexia Moulin, Yves Champavier, Alexis Mailleau, Vincent Chaleix, Vincent Sol

Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, **2019**, doi: 10.1142/S1088424619501438.

Dihydroporphyrins or chlorins differ from porphyrins only by saturation of a peripheral double bond of the macrocycle. However, this small structural difference leads to a significant increase of the absorption band at approximately 650 nm, which makes them very interesting candidates for photodynamic therapy applications. The reduction of porphyrins bearing two, three or four pyridyl substituents with tin (II) chloride has been developed for the synthesis of dihydroporphyrins in yields of 15–73%. The reduction of 5-(aryl)-10,15,20-tris (2 or 4-pyridyl) porphyrin with tin(II) chloride dihydrate demonstrated good regioselectivity. Porphyrins with one *meso*-aryl substituted with one electron-donating groups (EDG) gave 5-aryl-10,15,20-tris (2- or 4-pyridyl)-17,18-dihydroporphyrins in 17–72% yield. Porphyrins with one *meso*-aryl substituted with one electron-withdrawing groups (EWG) gave 5-aryl-10,15,20-tris(4-pyridyl)-17,18-dihydroporphyrins or 5-aryl-10,15,20-tris(4-pyridyl)-7,8- dihydroporphyrins in 15–21% yield and isobacteriochlorin. We have also proven the possibility of functionalizing these compounds to design new regioisomerically pure photosensitizers.

Les photosensibilisateurs les plus utilisés dans la Photothérapie dynamique (PDT) sont des porphyrines et leurs dérivés. Cependant, ces composés souffrent souvent d'une faible solubilité dans les milieux physiologiques et d'un manque de sélectivité envers les cellules cancéreuses, ce qui limite leurs utilisations cliniques. L'utilisation des nanoparticules comme vecteurs de photosensibilisateurs (PS) constitue une des stratégies les plus prometteuses pour surmonter ces problèmes. Dans ce contexte, nous avons développé des nanoparticules à base de xylane pour une délivrance ciblée de porphyrines. Deux types de nanoparticules ont été étudiées : des nanoparticules hybrides, noyau-coquille, et des nanoparticules organiques. Dans une première étude, les xylanes-porphyrines ont été utilisés pour enrober des nanoparticules de silice (SNPs). En effet, la présence de groupes acides glucuroniques sur le xylane permet la formation de liaisons ioniques à la surface des SNPs rendues cationiques par des sels d'ammonium. L'évaluation biologique de ces nano-objets a montré que l'association des porphyrines avec les nanoparticules augmente leur efficacité thérapeutique. De plus, l'adressage mitochondrial de ces photosensibilisateurs avec le cation triphénylphosphonium améliore encore de plus l'efficacité thérapeutique. Dans une deuxième approche, nous avons montré que les xylanes-porphyrines pouvaient conduire, par un autoassemblage, à des nanoparticules 100% organiques. Différents nano-objets à degré de substitution variable en porphyrine ont été obtenus et caractérisés. En parallèle, des nanoparticules 100% naturelles formées de xylane extrait de bois de châtaignier, et d'une chlorine naturelle, le phéophorbide a ont été obtenus et caractérisés. L'évaluation biologique de ces nanoparticules est en cours de réalisation et les premiers résultats sont très encourageants.

Mots-clés : Photothérapie dynamique, photosensibilisateur, porphyrine, chlorine, nanoparticules organiques, nanoparticule de silice, xylane, mitochondrie, délivrance ciblée

The most used photosensitizers in photodynamic therapy (PDT) are porphyrins and their derivatives. However, these compounds often suffer from low solubility in physiological media and a lack of selectivity towards cancer cells which limits their clinical uses. One of the most promising strategies to overcome these problems is the use of nanoparticles as a vector of photosensitizers (PS). In this context, we have developed xylan-based nanoparticles for targeted delivery of porphyrins. Two types of nanoparticles have been studied: core-shell hybrid nanoparticles, and organic nanoparticles. In a first study, xylan-porphyrins were used to coat silica nanoparticles (SNPs). Indeed, the presence of glucuronic acid groups on xylan allows the formation of ionic bonds on the surface of the SNPs made cationic by ammonium salts. The biological evaluation of these nano-objects has shown that the combination of porphyrins with nanoparticles increases their photodynamic activity. In addition, mitochondrial targeting with triphenylphosphonium (TPP) increases significantly therapeutic efficacy of this PS. In a second approach, we have demonstrated that xylans-porphyrins can form nanoparticles fully organic by self-assembly in. Different nano-objects with variable degree of substitution in porphyrins have been obtained and characterized. In parallel, 100% natural nanoparticles from chestnut xylan and natural chlorine, pheophorbide a were obtained and characterized. The biological evaluation of these nanoparticles is in progress and preliminary results are very encouraging.

Keywords: Photodynamic therapy, photosensitizers, porphyrins, chlorins, organic nanoparticles, silica nanoparticles, xylan, mitochondrial, targeted delivery.

