



HAL
open science

Edifices théranostiques pour l'ingénierie en bioimagerie IRM et photothérapie dynamique in vitro et in vivo préclinique contre le cancer

Sarah Boumati

► **To cite this version:**

Sarah Boumati. Edifices théranostiques pour l'ingénierie en bioimagerie IRM et photothérapie dynamique in vitro et in vivo préclinique contre le cancer. Chimie thérapeutique. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLC006 . tel-03723713

HAL Id: tel-03723713

<https://pastel.hal.science/tel-03723713>

Submitted on 15 Jul 2022

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris - Chimie ParisTech

**Edifices théranostiques pour l'ingénierie en bioimagerie IRM et
photothérapie dynamique in vitro et in vivo préclinique
contre le cancer**

Soutenue par

Sarah BOUMATI

Le 02-06-2021

Ecole doctorale n° 406

**Chimie moléculaire de Paris-
Centre**

Spécialité

Chimie Moléculaire

Composition du jury :

Bernold, HASENKNOPF Professeur, Sorbonne Université	<i>Président</i>
Cyrille, RICHARD Directeur de recherche, Université de Paris	<i>Rapporteur</i>
Eva, JAKAB TOTH Directeur de recherche, Orleans	<i>Rapporteur</i>
Laurent, LEMAIRE Ingénieur de recherche, Université d'Angers	<i>Examineur</i>
Clotilde, POLICAR Professeur, Ecole Normale Supérieure	<i>Examinatrice</i>
Bich-thuy, DOAN Chargée de recherche, Chimie ParisTech	<i>Directrice de thèse</i>

Avant-propos

Ce travail de thèse a été financé par PSL (Paris science et lettre) dans le cadre d'un contrat doctoral de l'ED406. Il a été réalisé entre l'Institut I-CLeHS (Institute of Chemistry for Life and Health Sciences), l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) et le Laboratoire de Synthèse des Assemblages Moléculaires Multifonctionnels LSAMM (Institut Lebel), sous la direction du Dr. Bich-Thuy DOAN de l'équipe SEISAD (Synthèse, Electrochimie, Imagerie et Systèmes Analytiques pour le Diagnostic).

Au sein de l'Institut I-CLeHS, dirigé par le Pr. Carlo ADAMO, j'ai travaillé dans l'équipe SEISAD (Synthèse, Electrochimie, Imagerie et Systèmes Analytiques pour le Diagnostic) dirigée par le Pr. Anne VARENNE et l'équipe ICB (Inorganic Chemical Biology), dirigée par le Pr. Gilles GASSER, localisées à Chimie ParisTech/PSL Research University, en étroite collaboration avec l'équipe VICT (Vecteurs pour l'Imagerie Moléculaire et le Ciblage Thérapeutique) dirigée par Nathalie MIGNET, directrice de l'UTCBS (initialement Daniel SCHERMAN), à la faculté de pharmacie de l'Université de Paris. Dans le laboratoire LSAAM, j'ai travaillé dans l'équipe LSAMM dirigée par le Pr. Valérie HEITZ à l'Université de Strasbourg.

Cette thèse s'inscrit dans un contexte multidisciplinaire important en allant de la synthèse et la caractérisation physico-chimique à l'IRM in vivo du petit animal, en passant par la biologie cellulaire. Ainsi, plusieurs laboratoires et collaborateurs ont apporté leurs connaissances scientifiques à ce projet :

- LSAMM, Université de Strasbourg , UMR 7177: Synthèse avec les Dr. Angélique SOUR et Dr. Alexis GOSSET, Pr. Valérie HEITZ.
- I-CLeHS, UMR 8060, Chimie ParisTech, PSL: Imagerie par Résonance Magnétique, Relaxométrie avec l'équipe SEISAD et Biologie cellulaire avec l'équipe ICB.
- UTCBS, UMR 8258, Université de Paris (ex Sorbonne Paris Cité, P5/P7) : Imagerie optique, Animalerie, Modèle tumoral et Histologie avec le Dr. Johanne SEGUIN.
- Plateforme ICP AES de l'IPGP Institut de Physique du Globe, Paris : Analyses ICP-AES réalisées par Laure CORDIER.
- Plateau Technique d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire (PTICM), Université de Paris-UFR de Pharmacie: Cryotomie, Microscopie Optique et Microscopie

Confocale, dirigé par le Dr. Bruno SAUBAMEA, avec les conseils de Virginie MIGNON.

Remerciements

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Cyrille Richard et Eva Jakab Toth pour avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également Berni Hasenknopf, Laurent Lemaire et Clotilde policar d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse également des remerciements à PSL (Paris Science et Lettre) qui a financé ma bourse de thèse pendant 3 ans.

J'adresse mes remerciements à ma directrice de thèse, le Dr. Bich-thuy Doan, pour la confiance qu'elle m'a accordée. Je tiens à remercier tous les permanents de l'équipe d'accueil Synthèse, Electrochimie, Imagerie et Systèmes Analytiques pour le Diagnostic avec qui j'ai travaillé et/ou passé d'agréables moments : Anne Varenne, Laura Trapiella, fanny Dorlye et Camille Lescot pour leurs soutiens moral sans faille, Cyrine Slim pour ses conseils, Fethi Bedioui pour sa bonne humeur, son sourire du matin et son aide précieuse et enfin, un grand merci à Sophie Griveau, pour son soutien, sa gentillesse, le temps qu'elle m'accordait chaque vendredi soir, à m'écouter et discuter de tout sujet, sache que tu m'as été d'une aide précieuse et je ne te remercierai jamais assez.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Angélique Sour pour son soutien aimable pendant la période où j'ai travaillé au laboratoire LSAMM. C'était un grand plaisir de travailler avec elle, dans les meilleures conditions possibles. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble, les bons repas alsaciens, les pause-café de 10 h qui robuste le moral et pousse à travailler encore plus (j'avoue que ça m'a trop manqué pendant le reste de ma thèse).

De même, je voudrais remercier le Dr Nathalie Mignet, pour son soutien moral, surtout dans les périodes difficiles, que j'ai pu traverser. Le Dr Johanne Seguin qui m'a beaucoup aidée dans mes manipulations in vivo, Virginie Mignon pour son aide en histologie.

Je tiens aussi à remercier Marie-Noelle Rager, pour son aide, sa gentillesse, ses conseils tout au long de ma thèse, toute ma reconnaissance Marie-Noelle.

Au cours de cette thèse j'ai aussi pu travailler dans d'autres équipes au sein de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP) et je tiens à remercier Gilles Gasser pour tous les moyens qu'il m'a accordés pour réaliser mes études in vitro, je remercie également, Robin Vinck, Johannes et Martha Jakubaszek pour leur aide et disponibilité pour me former.

Un laboratoire n'est rien sans ses doctorants, post-doctorants et stagiaires, je les remercie tous pour les bons moments que nous avons pu partager ensemble, en particulier : Memona, Doan

et Insaf . Un grand merci à Marion Gaudeau pour ses conseils et soutien tout au long de ma thèse, toute ma gratitude Marion. Surtout, ne change pas !

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude et remercie ainsi que mon amour à ma Famille et mes proches : mes parents pour leur affection, leur soutien sans failles et leurs conseils éclairés, sans vous, rien n'aurait été possible. Mes frères Hocine, Yanis et ma sœur Narimane pour les liens et la complicité qui nous unissent. Je pourrais toujours m'appuyer sur vous. Ma grand-mère pour son amour. J'espère que tu es fière de moi Ayi ! A la meilleure des meilleurs, Amina pour sa présence, son aide son soutien et sa patience. Merci d'avoir été présents, soutenu et encouragé durant ces trois années de thèse, auprès de vous, j'ai pu trouver un réconfort et une oreille attentive à tout moment, qui a rendu mes difficultés moins lourdes à porter. Je vous aime !

Table des matières

Liste des abréviations	6
------------------------------	---

Chapitre I

1. Tumeur	9
1.1. Généralités	9
1.2. Développement tumoral.....	10
1.3. Morphologie et angiogenèse de la vascularisation tumorale.....	11
1.3. Traitements du cancer	14
1.4. Cancer du côlon : modèle de tumeurs CT26	15
2. La photothérapie dynamique (PDT)	17
2.1 Principe général.....	17
2.2 Les photosensibilisateurs	20
2.3 Réactions de photo-oxydations : production des ROS	28
2.4 Mécanismes de l'éradication tumorale par PDT.....	30
2.5 Applications cliniques et commercialisation de la PDT actuelle	32
3. Interaction et internalisation de tétrapyrroles : des vaisseaux sanguins à la cellule tumorale	33
3.1 Association d'une porphyrine avec l'albumine	33
3.2 Association d'une porphyrine avec les membranes	35
3.3 Interaction d'une porphyrine avec les protéines LDL (Low density Lipoproteins)	38
4. Imagerie par résonance magnétique	41
4.1. Principe et generalités.....	41
4.2. Agents de contraste pour l'IRM	48
4.3. Agents de contraste à base de gadolinium	49
4.4. Relaxivité des agents de contraste	50
5. Agents théranostiques moléculaires pour la PDT et l'IRM	54
6. Description du projet.....	63

Chapitre II

1. Synthèse et caractérisation in vitro des agents théranostiques	66
1.1 Synthèse de PS-Gd1	66
1.2 Mode opératoire de la synthèse de PS-Gd2	67
1.3 Caractérisation photophysique	77

1.3.1	Mesures spectroscopiques	77
1.3.2	Mesures du rendement quantique de luminescence	78
1.3.3	Mesures de la durée de vie de la luminescence	78
1.3.4	Mesures du rendement quantique de l'oxygène singulet	78
1.3.5	Photostabilité.....	80
1.3.6	Mesure de relaxivité.....	80
1.4	Résultats et discussions	82
1.4.1	Conception des agents théranostiques	82
1.4.2	Mesures spectroscopiques.....	83
1.4.3	Mesures du rendement quantique de l'oxygène singulet	84
1.4.4	Photostabilité.....	84
1.4.5	Mesures de relaxivité	85
2.	Conclusion	86

Chapitre III

1.	Tests de cytotoxicité, phototoxicité et internalisation cellulaire.....	89
1.1.	Réactifs	89
1.2.	Culture de cellules	89
1.3.	Internalisation cellulaire.....	90
1.4.	Cytotoxicité	91
1.5.	Phototoxicité	91
1.6.	Résultats et discussion.....	93
1.6.1	Internalisation cellulaire	93
1.6.2	Cytotoxicité	95
1.6.3	Phototoxicité.....	96
1.7.	Conclusion.....	101
2.	Biodistribution <i>in vivo</i> des agents théranostiques par bioimagerie IRM.....	103
2.1.	Modèle animal	103
2.2.	Biodistribution par bioimagerie IRM	103
2.3.	Résultats et discussion.....	105
2.4.	Conclusion.....	110

Chapitre IV

1.	Elaboration du montage pour la PDT <i>in vivo</i>	113
2.	Application du traitement PDT	114

3. Evaluation du traitement par Imagerie IRM	115
4. Evaluation du traitement par bioluminescence	125
5. Evaluation du traitement par histologie.....	131
6. Conclusion.....	139
Conclusion générale et perspectives	141
Références.....	145
Annexes	155
Annexe 1: Scripts Matlab.....	156
Annexe 2: Macro ImageJ	160

Liste des abréviations

BSA : Bovine Serum Albumin

CT26 : cellules d'adénocarcinome du côlon murin 26

DAB : Diaminobenzidine

DCE : Dynamic Contrast Enhancement

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : Acide tétraazacyclododécane-tétraacétique

DSC : Dynamic Susceptibility Contrast enhancement

EPR : Enhanced Permeability and Retention

FLASH : Fast Low Angle SHot

HE : Hematoxylin Eosin

HT29 : cellules d'adénocarcinome du côlon humain

IC50 : Concentration Efficace médiane

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry

IR : Infrarouge

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IV : Intraveineuse

MGE : Multi-Gradient Echos

MSME : Multi Slice Multi Echo

MRC-5 : cellules de fibroblastes embryonnaires humains

NIR : Near Infra Red, Proche Infra Rouge

PEG : Poly(éthylène glycol)

PDT: Photothérapie dynamique , Photo Dynamic Therapy

PBS : Phosphate Buffered Saline

PS : Photosensibilisateur

PS1: [GdDTTA]—complexes de Gd relié à une méso-tétraphénylporphyrine

PS2: [GdDOTA]—complexes de Gd relié à une porphyrine de zinc

RARE : Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement

RF : Radiofréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

T1 : Temps de relaxation longitudinale

T2 : Temps de relaxation transversale

TE : Temps d'Echo

TIB-75 : cellules d'hépatocytes murins

TR : Temps de Répétition

UV : Ultraviolet

Chapitre I

1. Tumeur

1.1. Généralités

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 9,9 millions de décès, 19,3 millions de nouveaux cas en 2020, soit 13% de la mortalité mondiale¹.

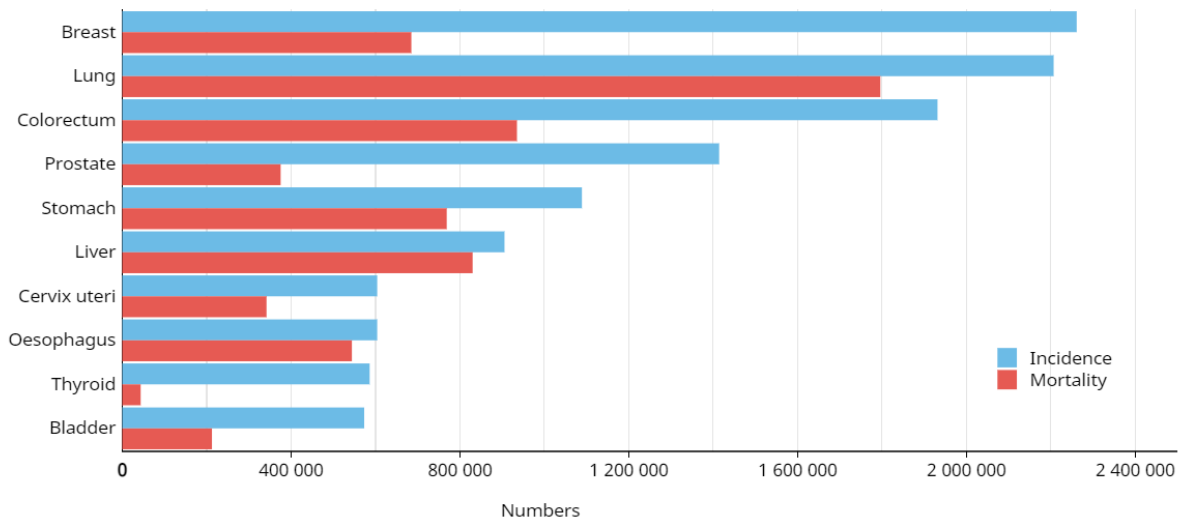


Figure 1: Estimation du nombre de cas incidents et de décès liés au cancer dans le monde en 2020¹

En France, c'est la première cause de mortalité devant les maladies cardiovasculaires. Selon l'Institut National du Cancer (INCa), le nombre de décès par cancer est estimé à 157 400 en 2018 : 89 600 chez l'homme et 67 800 chez la femme. Les taux de mortalité (standardisés monde) estimés sont de 123,8 pour 100 000 hommes et 72,2 pour 100 000 femmes.

Chez l'homme, le cancer de la prostate reste le plus fréquent (50 430 nouveaux cas estimés en 2015), devant le cancer du poumon (31 231 cas estimés en 2018) et le cancer colorectal (23 216 cas estimés en 2018).

Chez la femme, le cancer du sein se situe en tête (58 459 cas estimés en 2018), devant le cancer colorectal (20 120 cas) et le cancer du poumon (15 132 cas).

En termes de mortalité, le cancer du poumon se situe au premier rang chez l'homme (22 761 décès en 2018), devant le cancer colorectal (9 209 décès) et le cancer de la prostate (8 115 décès).

Chez la femme, le cancer du sein est la première cause de décès par cancer (12 146 décès), devant le cancer du poumon (10 356 décès) et le cancer colorectal (7 908 décès).

1.2. Développement tumoral

D'un point de vue métabolique, le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules saines de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et au système de régulation^{2,3}. Ces cellules vont progressivement envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis migrer à distance pour former des métastases.

D'un point de vue structurel, une tumeur est constituée de cellules tumorales entourées d'un stroma tumoral. Ce dernier comprend le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extra-cellulaire. Le stroma a un rôle de soutien à la tumeur et de nutrition (voir Figure 2).

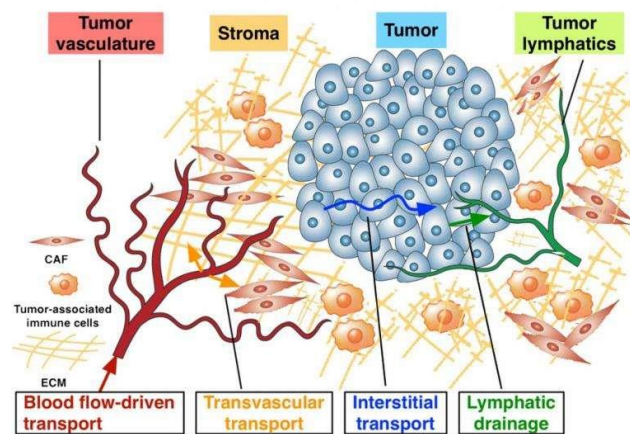


Figure 2 : Schéma de la structure globale d'une tumeur et de son micro-environnement⁴

Les phases métaboliques suivantes, indispensables au développement tumoral seront autant de leviers pour améliorer ou imaginer des thérapies anti-tumorales.

Il s'agit de la phase d'initiation et de promotion du cancer qui consiste en l'apparition de cellules cancéreuses, appelée carcinogénèse et qui correspond l'accumulation progressive de mutations génétiques, après exposition à un carcinogène endogène ou exogène, d'origine chimique, physique ou virale, conduisant à l'activation de certains oncogènes et/ou à l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs^{2,3}.

La phase de progression correspond à l'étape où les cellules cancéreuses induisent des changements profonds dans le tissu voisin normal, formant une masse de cellules qui survit dans l'organisme. A ce stade, l'environnement des cellules cancéreuses, appelé *stroma* tumoral, est dit non coopératif : il ne fournit pas aux cellules cancéreuses les nutriments, le cancer n'évolue pas ou très lentement. Cependant, si le développement

tumoral se poursuit, la tumeur entre dans un état dit d'hypoxie et intervient l'angiogenèse tumorale^{2,5,6}.

1.3. Morphologie et angiogenèse de la vascularisation tumorale

L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Les tumeurs diffèrent des tissus sains notamment par leur vascularisation, le réseau vasculaire tumoral est fortement désorganisé avec des dérivations et tortuosités superflues (voir Figure 3). L'angiogenèse s'effectue par bourgeonnement des vaisseaux présents, ou par intussusception: l'élargissement et la séparation des vaisseaux formés⁷, suivis de l'installation d'un réseau et de sa différenciation en secteurs fonctionnels.

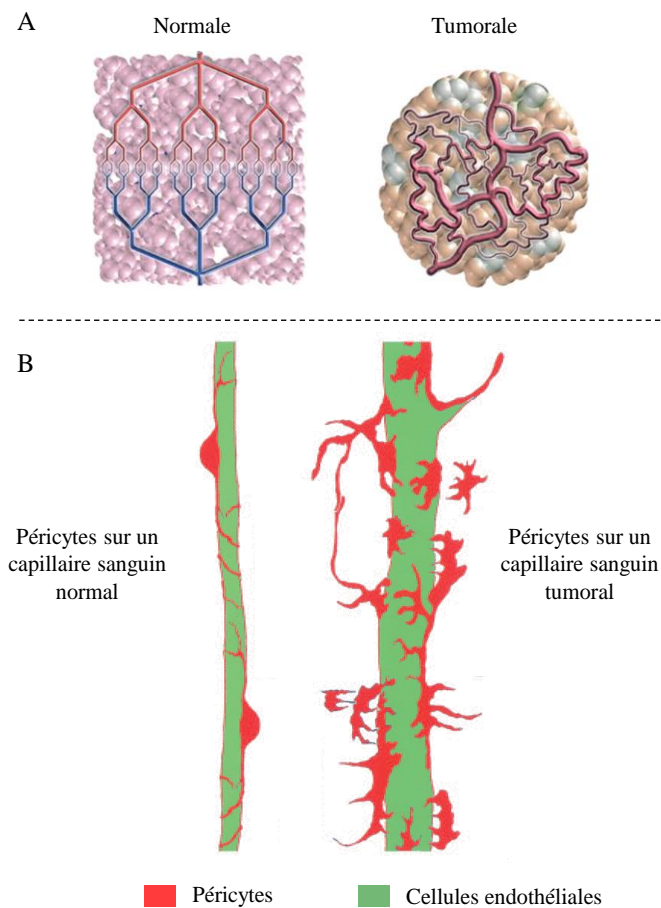


Figure 3: (A) Réseau vasculaire normal et tumoral et (B) structure d'un capillaire normal avec une forte association des péricytes aux cellules endothéliales et structure d'un capillaire tumoral plus dilaté avec des péricytes associés beaucoup plus faiblement aux cellules endothéliales⁸

Le bourgeonnement correspond à la croissance de vaisseaux en forme de bourgeon. C'est un processus complexe faisant intervenir deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire, qui interagissent pour former des néovaisseaux. Les cellules endothéliales capillaires sont les principaux acteurs de ce mécanisme, mais d'autres composants des vaisseaux, tels que les péricytes ou la matrice extracellulaire (MEC) interviennent également.

Au début de la prolifération tumorale, où la taille de la tumeur est inférieure à 1 ou 2 mm³, et indépendamment de l'angiogenèse, l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple^{2,6}. Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active. Cependant, du fait d'un équilibre entre prolifération et mortalité cellulaire, la croissance tumorale ralentit.

Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intra-tumoral est généré, en résulte la rupture de l'équilibre préexistant entre les facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques, déclenchant ainsi l'angiogenèse tumorale⁹.

De manière plus chronologique, l'angiogenèse (voir Figure 4) va permettre la croissance de la tumeur en lui fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa prolifération.

Etape 1 :
Initiation

Sécrétion de **facteurs pro-angiogéniques** (VEGF, bFGF) par les cellules tumorales et les macrophages, induite par l'hypoxie ou l'acidose, notamment

Etape 2 :
Dégradation de la membrane basale

Etape 3 :
Migration des cellules endothéliales

Etape 4 :
Prolifération des cellules endothéliales

Etape 5 :
Remodelage vasculaire

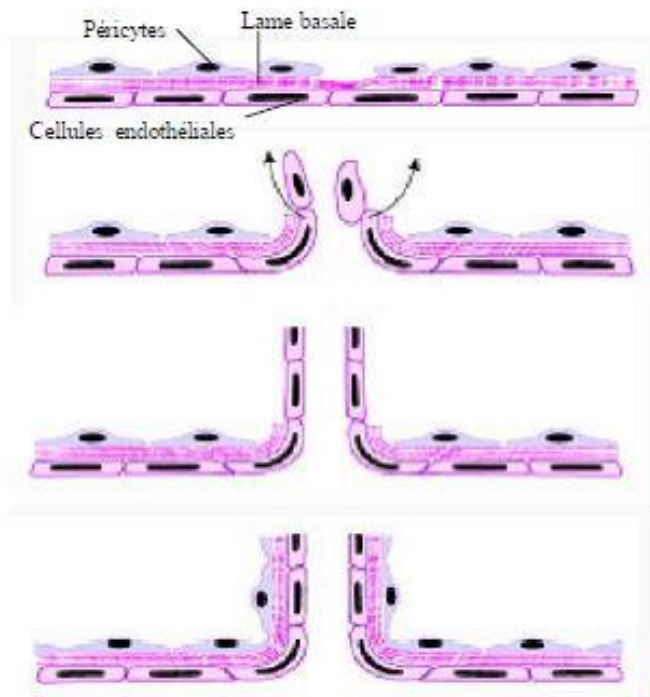


Figure 4 : *Etapes de l'angiogenèse tumorale. 1: Activation des cellules endothéliales par le VEGF sécrété par les cellules tumorales. 2 : Détachement des péricytes et dégradation de la membrane basale. 3 : Migration des cellules endothéliales vers la tumeur. 4 : Prolifération des cellules endothéliales. 5 : Formation de néovaisseaux, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales¹⁰ (VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor)*

La première étape, dite d'initiation, est le signal donné par les cellules tumorales en état hypoxique, provoquant ainsi l'activation des cellules endothéliales et du processus angiogénique.

La deuxième étape consiste en la dégradation de la membrane basale : les bourgeons, guidés par les péricytes, poursuivent leur migration en s'allongeant vers la source du stimulus angiogénique (effet chimiotactique). Cette étape entraîne la destruction de la matrice extracellulaire.

Les étapes 3 et 4 sont des étapes de migration et de prolifération des cellules endothéliales qui vont former les nouveaux vaisseaux sanguins vers la tumeur.

Enfin, une dernière étape dite de remodelage vasculaire permet de finaliser la formation du nouveau vaisseau comportant cellules endothéliales et membrane basale^{2,9}.

Dans le cas des capillaires tumoraux, l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes, qui stabilise fortement la structure des vaisseaux, diminue (voir Figure 3-B). De cette façon, il y a une apparition plus abondante de pores dans les tissus tumoraux vascularisés.

Par ailleurs, la vascularisation particulière des tumeurs provoque l'apparition de régions au pH acide (pH = 6,4) et à faible concentration en O₂ (hypoxie)^{2,8}.

Le drainage lymphatique au sein des tumeurs est quant à lui déficient, ce qui diminue la clairance du milieu extracellulaire.

1.3. Traitements du cancer

Les traitements classiques du cancer sont : la chirurgie qui consiste en l'ablation des tissus tumoraux ou métastatiques; la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisants émis par certains éléments radioactifs pour détruire les cellules anormales, ou du moins ralentir leur progression et enfin la chimiothérapie qui utilise des produits chimiques ayant un effet direct sur les cellules tumorales, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération¹¹.

Nous pouvons également trouver des traitements plus spécifiques, tels que l'hormonothérapie qui inhibe l'action ou la production d'hormones visant à créer un milieu défavorable aux cellules cancéreuses ou encore l'immunothérapie qui mobilise le système immunitaire contre les cellules tumorales.

Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en générale invalidante pour le malade (même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée). Les techniques utilisant des agents antitumoraux regroupant les stratégies chimiothérapeutiques classiques ou les traitements hormonothérapeutiques et immunothérapeutiques plus récents, et en théorie plus spécifiques, manquent encore de sélectivité et touchent également les tissus sains.

D'où l'importance de développer des traitements personnalisés encore plus ciblés tels que la thérapie photodynamique (PDT)¹² récemment acceptée en clinique pour traiter un certain nombre de cancers (prostate, peau, colon) et ne présentant pas tous les

inconvenients des traitements classiques, mais nécessitant des précautions d'usage vis-à-vis de l'exposition à la lumière et de la douleur.

1.4. Cancer du côlon : modèle de tumeurs CT26

En 2018, le cancer du côlon est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde et occasionne près d'1 million de décès. En France, il engendre plus de 25 000 décès par an. De plus en plus de cas sont diagnostiqués chaque année et il constitue la deuxième cause de décès par cancer. L'âge moyen de diagnostic est de 70 ans mais le risque de développer un cancer colorectal augmente à partir de 50 ans. De plus, selon l'INCa, le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale sont des maladies génétiques qui engendrent presque systématiquement ce type de cancer, si aucun traitement préventif n'est appliqué. Les maladies chroniques de l'intestin augmentent aussi les risques de développer un cancer colorectal sur le long terme⁸. Une chirurgie ablative du côlon est souvent préconisée pour prévenir le cancer avant son développement¹³.

Afin de mettre au point des traitements contre ce type de cancer, il est important de choisir un modèle cellulaire ainsi qu'un modèle pour les études *in vivo*. Pour cela, les modèles de tumeurs implantées sur souris ont été développés dans les études dites précliniques servant de base aux futures études cliniques et qui est une étape indispensable à la création d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme.

Dans ce projet, le traitement utilisé qui est la photothérapie dynamique est connu pour engendrer non seulement des effets directs sur la tumeur (nécrose et/ou apoptose) mais aussi des effets indirects visant la destruction du système vasculaire¹⁴. Il est donc intéressant de choisir un modèle tumoral fortement vascularisé et présentant une nécrose faible. C'est pourquoi, nous avons choisi le modèle de tumeurs murines du côlon CT26 ectopique mis au point et caractérisé au laboratoire de l'UTCBS¹³ qui remplit ces conditions et est donc particulièrement adapté pour ce projet de thèse.

Les premières cellules CT26 ont été obtenues d'un carcinome du côlon induit chimiquement à l'aide de N-nitroso-N-méthyluréthane et sont fournies commercialement par l'agence ATCC (American Type Culture Collection). Elles ont ensuite été clonées pour conduire à la formation d'une lignée stable de forme de référence (wild type). Pour obtenir une lignée cellulaire stable exprimant la luciférase afin de permettre le suivi de la progression de la tumeur par bioluminescence, les cellules CT26-wt ont été transduites par un vecteur lentiviral pour former des cellules CT26-Luc¹³.

L'injection de ces cellules CT26-luc en sous-cutané chez la souris permet l'obtention de tumeurs du côlon ectopiques bioluminescentes. Par observation de leur réseau vasculaire, Seguin *et al.*¹³ ont montré que ces tumeurs étaient fortement vascularisées et présentaient bien une désorganisation des vaisseaux sanguins conduisant à de nombreuses déviations et impasses (voir Figure 5).

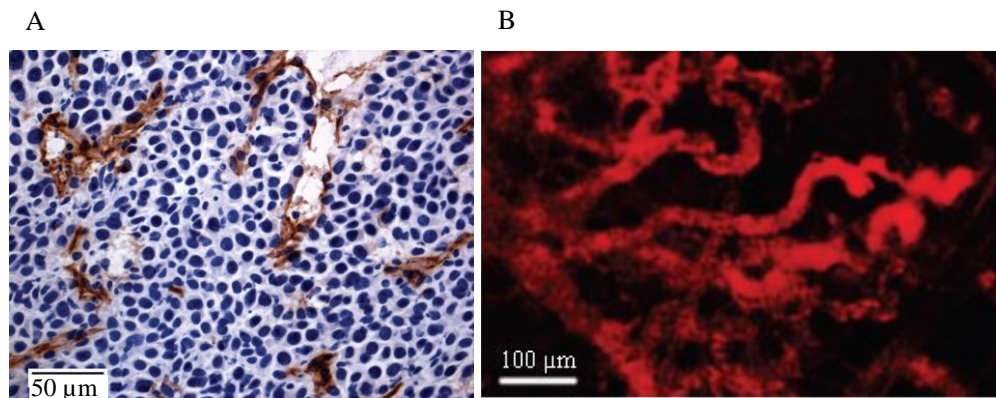


Figure 5 : Tumeurs CT26 ectopiques implantées 15 jours plus tôt observées (A) en histologie après marquage des vaisseaux sanguins par coloration immunohistochimique CD31 en marron et des noyaux cellulaires par coloration hématoxyline en bleu foncé et (B) leur organisation vasculaire 3D *in vivo* observée par microscopie de fluorescence après injection d'albumine marquée à l'Alexa fluor 594¹³

Ce modèle tumoral murin a également été caractérisé *in vivo* par la bioluminescence¹⁵, IRM et par échographie pour suivre la croissance tumorale. Ces techniques ont pu démontrer que le modèle est approprié pour l'évaluation de stratégies thérapeutiques *in vivo* (voir Figure 6).

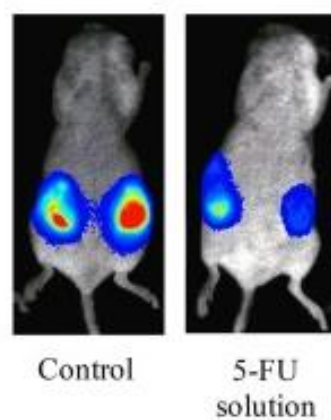


Figure 6: Image *in vivo* de bioluminescence de tumeurs CT-26 chez la souris (plateforme d'imagerie optique *in vivo* LIOPA, Faculté de Pharmacie, Paris)¹⁵

2. La photothérapie dynamique (PDT)

2.1 Principe général

La Photothérapie dynamique (PDT pour PhotoDynamic Therapy) est une méthode thérapeutique qui s'appuie principalement sur trois éléments¹⁶:

- un photosensibilisateur
- la lumière
- l'oxygène, réduit en ROS (Reactive Oxygen Species) qui sont produits après l'interaction des deux composants précédents.

Suite à l'absorption d'un photon, le photosensibilisateur PS situé initialement à l'état fondamental S_0 , va se retrouver à un niveau énergétique supérieur de type singulet S_2 excité. A partir de cet état excité (de courte durée de vie 10^{-10} à 10^{-7} s), se produit une désactivation à un état singulet excité de plus basse énergie S_1 selon un phénomène non radiatif : la relaxation vibrationnelle (IVR : Internal Vibrational Relaxation). A partir de cet état S_1 , un phénomène de croisement inter-système (CIS) vers l'état triplet (T_1) se produit avec une durée de vie relativement longue (de 10^{-6} à 1s)¹⁷ (voir Figure 7).

Puis une désexcitation dite radiative par émission de photons (fluorescence) ou une conversion interne par désexcitation non radiative conduit à un retour du PS à son état fondamental S_0 .

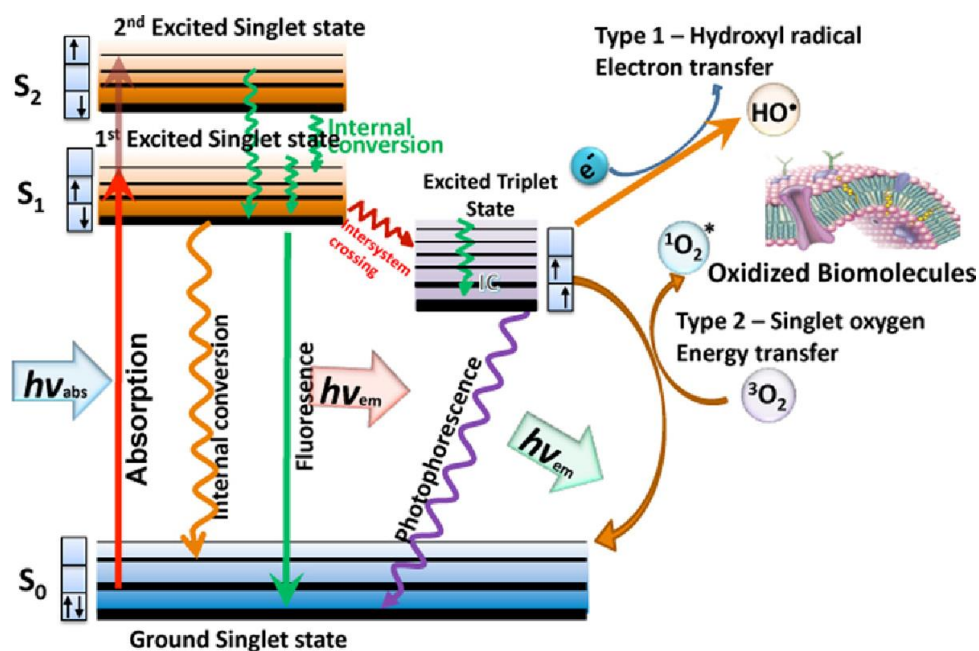


Figure 7 : Diagramme de Jablonski et processus de désactivation impliqués dans la PDT¹⁶

À partir de l'état triplet excité T₁, le retour à l'état fondamental peut se faire selon deux différents processus. Une émission de photons par phosphorescence conduit à la désactivation du PS sans provoquer de cytotoxicité. Une désactivation à l'origine de la PDT implique des mécanismes classés en deux types¹¹.

(i) **Un mécanisme de type I**, le PS réagit via un transfert d'électron ou d'hydrogène avec des substrats biologiques tels l'ADN, les protéines ou encore les acides gras insaturés pour former des radicaux qui vont ensuite réagir avec l'oxygène O₂ afin de générer des espèces réactives de l'oxygène ROS.

(i) **Un mécanisme de type II**, le PS transfère son énergie à l'oxygène ³O₂ pour former de l'oxygène singulet ¹O₂, un puissant oxydant qui va ensuite interagir avec différentes molécules organiques riches en électrons (comme les acides gras) pour générer des ROS.

De par sa durée de vie très courte (10 μs) et sa forte réactivité, l'¹O₂ réagit sur son lieu de formation dans la cellule (parcours libre moyen 0,01 – 0,02 μm). L'activité photocytotoxique dépendra d'une part de la combinaison des rendements quantiques de formation de l'état excité S₁, de la conversion de S₁ vers T₁, de l'efficacité du transfert d'énergie de T₁ vers l'oxygène et d'autre part de la localisation du PS dans le milieu biologique intracellulaire¹¹.

A noter que l'oxygène singulet formé peut réagir avec le PS et le détruire. Cette dégradation, appelée 'photobleaching' est une conséquence des réactions de type I et II. L'ensemble de ces deux processus entraîne la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. La compétition entre ces deux mécanismes est contrôlée par plusieurs paramètres tels que la nature du sensibilisateur et la concentration en oxygène.

La PDT se déroule en deux temps. Tout d'abord, le photosensibilisant est injecté au patient par voie intraveineuse puis s'accumule dans le tissu tumoral après un temps défini, pouvant aller de plusieurs minutes à quelques heures. Ensuite, le tissu est irradié avec une longueur d'onde appropriée à l'excitation du photosensibilisateur ce qui conduit à la production des espèces toxiques induisant la mort cellulaire. La pénétration maximale de la lumière à travers les tissus dépend de la longueur d'onde utilisée, le décalage vers le rouge ou proche IR est favorable à un accès plus profond des tissus biologiques, lié à l'absorption moindre des constituants du sang, des cellules et de l'eau dans cette fenêtre dite thérapeutique, comprise en 650 et 950 nm (voir Figure 8).

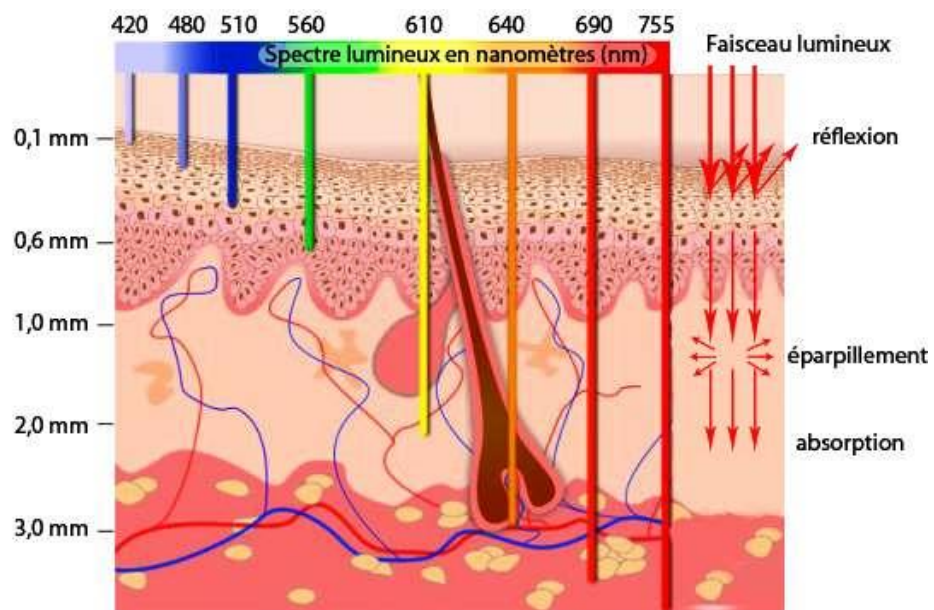


Figure 8 : Relation entre longueur d'onde et pénétration tissulaire¹⁸

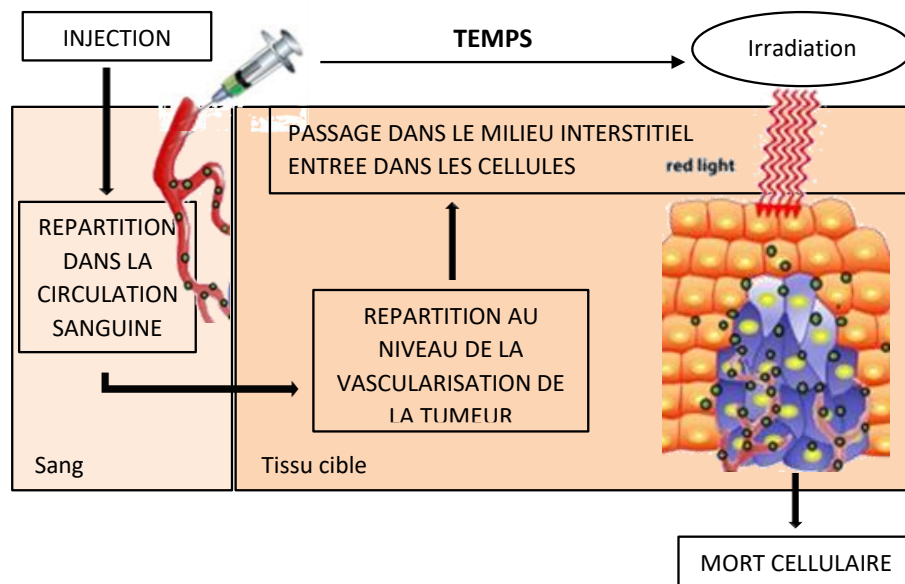


Figure 9 : Etapes de la PDT

2.2 Les photosensibilisateurs

Comme évoqué précédemment, la photothérapie dynamique est basée sur l'utilisation simultanée de la lumière et d'un agent photosensibilisant.

Le choix du photosensibilisateur est un critère primordial pour une bonne efficacité de traitement.

En effet, un PS doit idéalement répondre aux critères généraux suivants^{17,19} :

- ✓ Être un composé pur et stable à température ambiante
- ✓ Avoir un rendement quantique de formation d'oxygène singulet élevé
- ✓ Posséder une longueur d'onde d'absorption se situant dans la fenêtre thérapeutique optique (700 -1000 nm) pour une pénétration maximale de la lumière à travers les tissus
- ✓ Présenter une faible toxicité en l'absence de lumière
- ✓ Avoir une bonne ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion)
- ✓ Avoir une bonne sélectivité (accumulation spécifique dans les tumeurs)
- ✓ Ne pas induire d'effets mutagènes ou cancérigènes
- ✓ Être peu coûteux et disponible à grande échelle commercialement

Les photosensibilisateurs sont représentés par une classe majeure appelée « les porphyrines » (voir Figure 10). Les porphyrines ont une structure tétrapyrrolique et sont utilisées pour des applications anticancéreuses en clinique. Il existe par ailleurs des photosensibilisateurs organiques non tétrapyrroliques ou encore des produits naturels, moins utilisés compte tenu de leurs longueurs d'ondes d'absorption dans la fenêtre qui correspondent à celles des chromophores endogènes interférant ainsi avec la photoactivation du PS¹⁶. Il s'agit par exemple du Rose Bengale¹⁷, de Bodipy¹⁷, des complexes de métaux de transitions tels le ruthénium²⁰, ou l'iridium, des produits naturels comme l'Hypéricine, ou l'Hypocrelline.

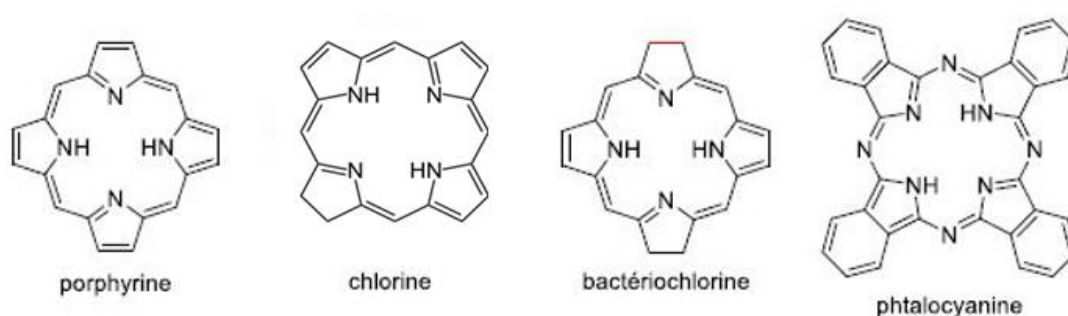


Figure 10 : Structure des tétrapyrroles majoritairement utilisés en PDT¹⁷

Ainsi, nous pouvons regrouper les agents photosensibilisants en deux classes, les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques et les tétrapyrroliques. Dans notre cas, nous allons nous intéresser à cette dernière classe dont nous distinguons trois générations :

a) Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques de première génération

La première génération regroupe l'hématoporphyrine (Hp) et ses dérivés (HpD)²¹.

L'HpD a été obtenue dans les années 60 par Schwartz²¹ à partir de l'hématoporphyrine (Hp) qui est à son tour préparé à partir de l'hémine (protoporphyrine IX PpIX) produite de manière endogène dans le corps humain ; il s'agit d'un dérivé de la PpIX où les deux groupes vinyloxy ont été hydratés (voir Figure 11). L'hématoporphyrine subit un traitement chimique acide puis alcalin conduisant à un mélange de monomères et d'oligomères de porphyrines. Cette préparation fut appelée Dérivés de l'hématoporphyrine (HpD).

Lipson²¹ utilisa ensuite l'HpD en combinaison avec d'autres porphyrines telles que la Protoporphyrine (PpIX) dans le traitement du cancer de sein et ce fut véritablement le

début de la photothérapie dynamique clinique qui est donc basée sur l'utilisation de porphyrines²¹.

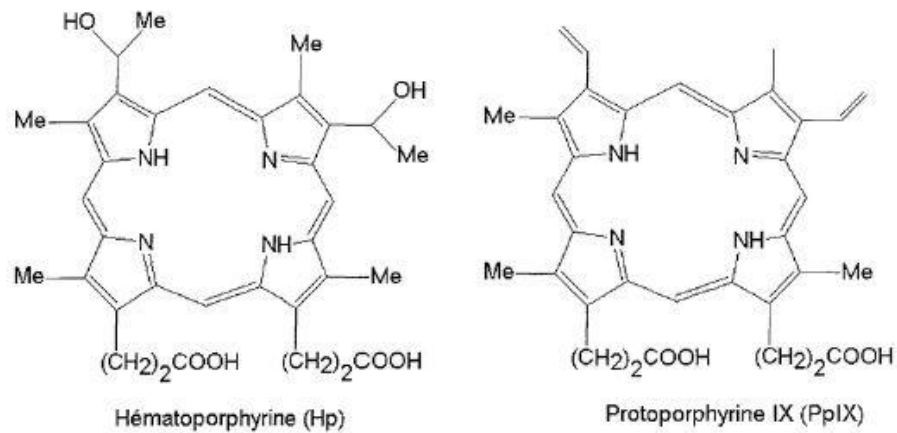


Figure 11 : Formules chimiques de l'hématoporphyrine (Hp) et de la protoporphyrine IX (PpIX)²²

Un mélange enrichi en oligomères de porphyrines est commercialisé sous l'appellation **Photofrin**^{®22}, produit issu de nombreuses purifications et considéré comme le produit phare de la photothérapie dynamique.

Actuellement, le **Photofrin**[®] est prescrit en cas de récurrence des cancers bronchiques ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur (chirurgie). Il présente une photocytotoxicité efficace, mais il possède néanmoins certaines limites. Sa forte et longue accumulation naturelle dans la peau provoque des effets secondaires pouvant aller jusqu'à six semaines après le traitement. Sa longueur d'onde d'absorption est de 630 nm et correspond aussi à la longueur d'onde d'absorption des chromophores endogènes tels la mélanine et l'oxyhémoglobine interférant avec la pénétration de la lumière à travers les tissus (voir Figure 12).

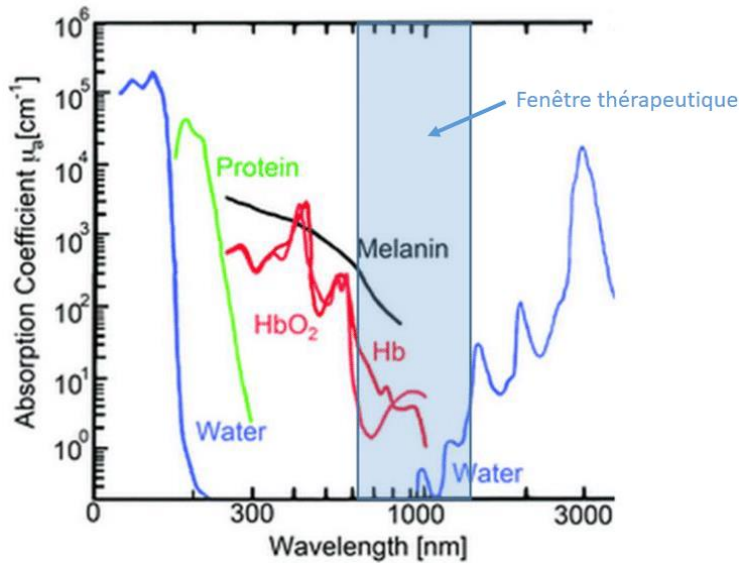


Figure 12 : Spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques : eau, mélanine, protéine, hémoglobine (Hb), oxyhémoglobine (HbO₂)²³

b) Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques de deuxième génération

Contrairement aux porphyrines de première génération, les photosensibilisateurs de deuxième génération²² présentent plusieurs avantages.

En effet, ces derniers sont actifs à une longueur d'onde d'irradiation plus élevée, comprise entre **600 et 800 nm**, permettant ainsi une pénétration de la lumière plus profonde dans les tissus. De plus, ils sont rapidement éliminés, limitant de cette façon la période de photosensibilisation cutanée. Parmi ces molécules, nous retrouvons principalement :

L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA, voir Figure 13)²², un acide aminé commercialisé sous le nom **Lévulan®** (AMM en France en 2000) et principalement utilisé dans le traitement des maladies de la peau, telles que le psoriasis ou des kératoses actiniques (lésions cancéreuses de la peau). Il est le précurseur de la biosynthèse de la protoporphyrine (PpIX).

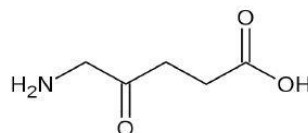


Figure 13 : Structure de la 5-ALA : précurseur de la PpIX²²

La méta-(tétrahydroxyphényl)chlorine (m-THPC, voir Figure 14)²², commercialisée sous le nom **Foscan®** (AMM en 2002) et préconisée pour le traitement des cancers du cou et de la tête.

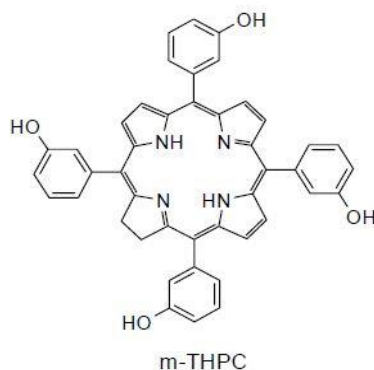


Figure 14 : Structure de la m-THPC

La Verteporfine, un dérivé de type mono-acide de benzoporphyrine (ring A, BDP-MA, voir Figure 15) est la molécule la plus active d'une série de dérivés mono-acide de benzoporphyrine (benzoporphyrin derivative monoacid, BDP). Elle s'est avérée très efficace pour le traitement de la dégénérescence maculaire et a reçu une AMM en 2000 pour cette application sous le nom **Visudyne®**. Elle n'est cependant pas utilisée en thérapie antitumorale.

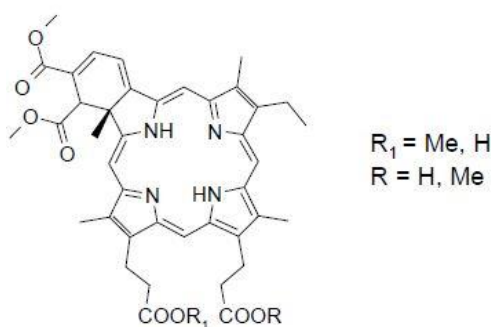


Figure 15 : Structure de la Verteporfine²²

On retrouve aussi les PS qui sont en essai clinique, tels que : L'étiopurpurine stannylé (SnEt₂)²² **Puryltin®**, la mono-L-aspartylchlorin e6 : MACE, **NPe6®** pour le traitement du cancer de la peau et du poumon, la chloro(phtalocyanine sulfonato)-Al(III) employé sous l'appellation **Photosens®** contre le cancer de la peau, du sein et de l'œsophage, la téxaphyrine lutétium : **Lutex®**, il est testé en phase II pour le traitement du cancer de la prostate, du sein et de la peau.

Les principales propriétés photophysiques des photosensibilisateurs de deuxième génération sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Les principales propriétés des photosensibilisateurs de deuxième génération¹¹

Composé	Longueur d'onde d'irradiation (nm)	Rendement de formation de l' ¹ O ₂	Dose type de produit (mg.kg ⁻¹)	Dose type de fluence (J.cm ⁻²)	Temps type d'illumination (s)
5-ALA	635	0.6	60	50-150	500-1500
<i>m</i> -THPC	652	0.43	0.15	5-20	50-200
SnEt ₂	659	0.6	1.2	150-200	1500-2000
MACE	660	0.8	1.0	25-200	1500
Photosens®	675	0.34	1.0	50-200	1500
BPDMA	690	0.7	4	150	1500
Lutex®	732	0.11	1.0	150	1500

c) Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques de troisième génération

Les photosensibilisateurs dits de troisième génération^{11,16} sont des photosensibilisateurs dérivés de la deuxième génération dotés de nouvelles métallations ou d'adjonction de motifs chimiques améliorant la solubilité ou le ciblage vers certains récepteurs, comme par exemple le couplage d'un photosensibilisateur déjà synthétisé avec des anticorps monoclonaux (Ac monoclonaux)¹¹. L'objectif est d'améliorer l'affinité du composé pour la cellule tumorale et donc d'améliorer le ciblage pour tenter de diminuer les effets indésirables.

Les principales voies de recherche concernent les photosensibilisateurs glycoconjugués, glycosylés et conjugués avec de l'estradiol. Le complexe estradiol-porphyrine (E2-Por)¹¹ est un noyau de type tétraphénylporphyrine relié à l'estradiol par le biais d'un bras

espaceur (voir Figure 16). Cette molécule reconnaît les récepteurs à œstrogènes (ER) qui sont surexprimés par les cellules dans certains cancers (cerveau, ovaires, seins).

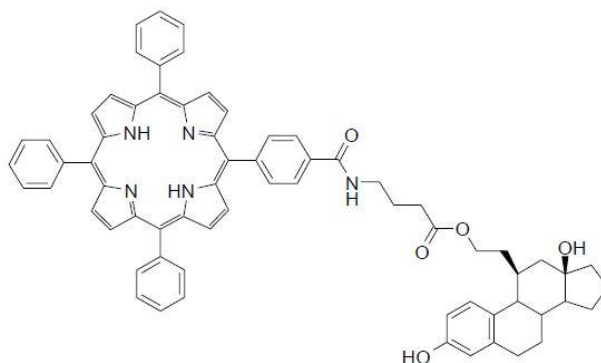


Figure 16 : Complexe estradiol-porphyrine¹¹

Le complexe **d'acide folique** de 4-carboxyphénylporphyrine (Por-COOH-Fa, voir Figure 17) est une molécule ciblant les récepteurs à l'acide folique. Ces récepteurs sont en effet surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancer du cerveau, des ovaires, des poumons...) ¹¹.

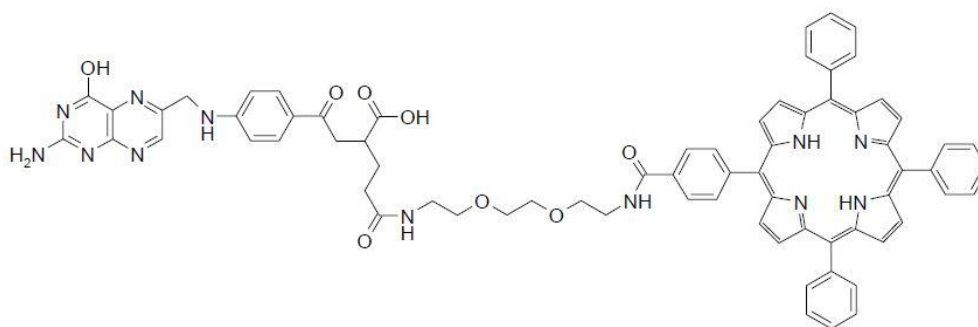


Figure 17 : Complexe d'acide folique de 4-carboxyphénylporphyrine¹¹

Les porphyrines glycosylées greffées avec un motif dérivé d'acide aminé et de sucres ont été développées (voir Figure 18). Elles portent un ou plusieurs acides aminés (alanine) et ont été préparées pour cibler des récepteurs glycosidiques tels que » les sélectines mais également des sites spécifiques à ces acides aminés comme les intégrines. Ces récepteurs sont surexprimés dans le cas de cancer colorectal, du sein et du poumon¹¹.

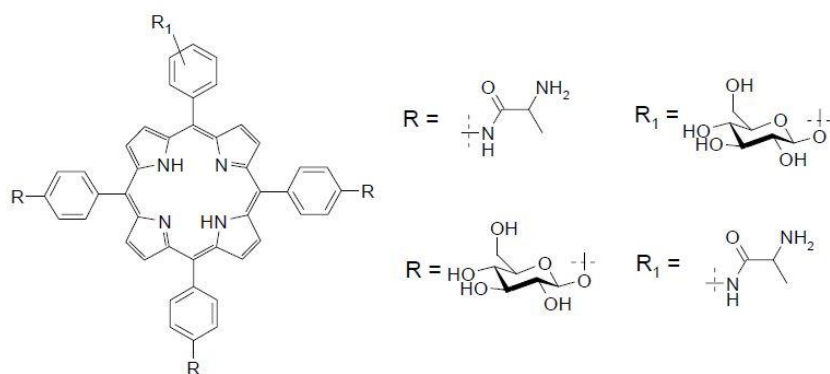


Figure 18 : Porphyrines substituées par des sucres et acides aminés¹¹

Une autre voie de recherche étudie le ciblage passif des cellules tumorales par vectorisation des photosensibilisateurs grâce à des nanovecteurs. En raison de l'angiogenèse tumorale, les parois des vaisseaux sanguins présentent une perméabilité vasculaire accrue avec des ouvertures d'une taille de pores de 100 à 1200 nm²⁴. Cette architecture tumorale particulière est à l'origine d'une extravasation spontanée, d'une accumulation et d'une rétention de certaines nanoparticules, c'est l'effet EPR « Enhanced Permeability and Retention ».

En 2015, Penon et al.²⁵ a développé des nanoparticules d'oxydes de fer fonctionnalisées avec des porphyrines dont les caractéristiques physicochimiques ont été mesurées en solution.

En 2018, Sengar et al.²⁶ a démontré l'efficacité *in vitro* des nanoparticules de silice mésoporeuses, multifonctionnalisées avec de la protoporphyrine IX (PpIX) et de l'acide folique afin de cibler les tumeurs pour une application potentielle en PDT (voir Figure 19)²⁶.

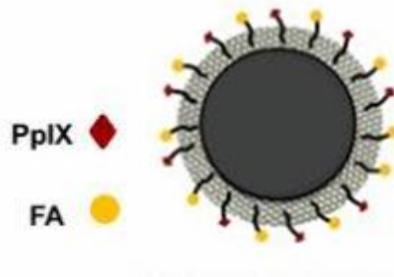


Figure 19 : Représentation schématique du nanocomposite photosensibilisant ciblant $PpIX-FA^{26}$

En 2014, Liang et al. a démontré l'efficacité de ciblage d'une nanoparticule micellaire lipidique greffée avec une porphyrine, sur modèle murin tumoral *in vivo*, et observé l'impact de la PDT par histologie²⁷. Cette voie de recherche est en plein développement. Il s'agit de trouver un compromis entre les faibles tailles du PS avec le risque d'impacter l'efficacité des photosensibilisateurs internalisés. Les PS de petite taille permettent une PDT efficace directe sur les molécules de l'environnement proche, le ciblage et accumulation du PS grâce au greffage par des ligands de ciblages et/ou l'encapsulation dans des nanovecteurs.

Enfin, une nouvelle stratégie consiste à introduire une sonde d'imagerie pour fabriquer un objet dit théranostique que l'on pourrait appeler photosensibilisateur de quatrième génération, et qui sera développé dans la partie V.

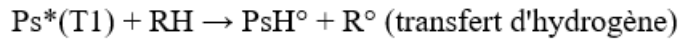
2.3 Réactions de photo-oxydations : production des ROS

Le mécanisme de base de la photothérapie dynamique est la photooxydation, constituée de nombreuses réactions chimiques et biologiques^{11,16}. Nous allons décrire les formations des différentes espèces produites dérivées de l'oxygène ou des biomolécules présentes.

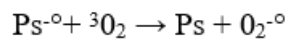
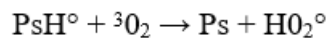
Le PS à l'état triplet T_1 constitue un agent très réactif, pouvant réagir non seulement avec les molécules du tissu où il est concentré, mais aussi avec l'oxygène présent à cet endroit et apporté par le système vasculaire. Deux types de réactions sont alors possibles : les réactions de type I et les réactions de type II.

- **Photo-réaction de type I**

Le photosensibilisateur à l'état triplet T_1 réagit directement avec des substrats biologiques, comme les phospholipides et les acides aminés, par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation d'espèces radicalaires.



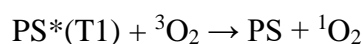
Ces radicaux libres peuvent réagir avec l'oxygène dans son état triplet fondamental 3O_2 pour former des agents oxydants (l'anion superoxyde $O_2^{-\circ}$, l'hydroperoxyde HO_2°) très réactifs.



L'anion superoxyde $O_2^{-\circ}$ va alors pouvoir oxyder les composés de la cellule, mais aussi générer des radicaux hydroxyles HO° hautement réactifs qui sont impliqués dans la destruction des membranes cellulaires en réagissant chimiquement avec des acides gras polyinsaturés: il en résulte alors la formation de radicaux lipidiques (L°), de radicaux lipidiques alkoxydes (LO°), de peroxydes lipidiques (LOO°) et d'hydroperoxydes lipidiques ($LOOH^\circ$). Ces produits réactionnels vont alors entraîner la déstabilisation des membranes de la cellule.

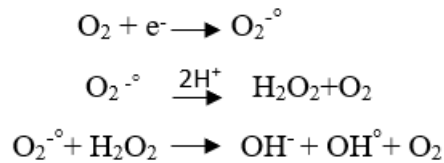
- **Photo-réaction de type II**

Dans ce cas, le photosensibilisateur à l'état triplet T_1 réagit directement avec l'oxygène en lui transférant son excès d'énergie, le faisant passer ainsi de son état triplet 3O_2 à son état singulet 1O_2 .



L'oxygène singulet formé 1O_2 va ensuite interagir avec différentes molécules organiques riches en électrons (comme les acides gras), celles-ci vont s'oxyder, générer des ROS (Reactive Oxygen Species) et atteindre l'intégrité des organites de la cellule tels que la membrane plasmique, les mitochondries, les lysosomes, le noyau, le tout provoquant la

mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. Les réactions impliquées dans la génération des ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et OH^{\cdot}) :



La compétition entre ces deux mécanismes I et II est contrôlée par plusieurs paramètres telle la nature du photosensibilisateur et la concentration en oxygène.

2.4 Mécanismes de l'éradication tumorale par PDT

La destruction des cellules tumorales comme on l'a déjà évoqué, se fait par photo-destruction qui peut se produire suivant plusieurs mécanismes :

- Mécanismes directs type nécrose ou apoptose
- Mécanismes indirects type dommages vasculaires ou réponse immunitaire

• Mécanismes directs

Les dommages cellulaires de ce mécanisme se regroupent en deux catégories : la nécrose et l'apoptose (voir Figure 20), qui dépendent essentiellement de la localisation du photosensibilisateur dans les cellules et de facteurs tels la dose du PS injectée et la lignée cellulaire.

• La nécrose

Il s'agit d'une mort cellulaire « non-programmée ». Les photosensibilisateurs ciblent les membranes cellulaires plasmiques, entraînant la dégradation de s lipides membranaires et la formation d'ampoules, ce qui engendre une perméabilité, provoquant le gonflement puis l'éclatement de la cellule. Ainsi les cellules sont détruites et le contenu se déverse dans les tissus environnants déclenchant une réaction inflammatoire²².

• L'apoptose

Contrairement à la nécrose, il s'agit d'une mort cellulaire « programmée ». L'apoptose est un processus d'élimination cellulaire génétiquement prédéterminé qui consiste en l'autodestruction des cellules présentant un dysfonctionnement ou qui ne sont plus utiles pour l'organisme. C'est un phénomène normal suivi d'une fragmentation de la cellule en

corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés par les globules blancs ou des macrophages (phagocytose). Ces dommages ne provoquent pas de réactions inflammatoires²².

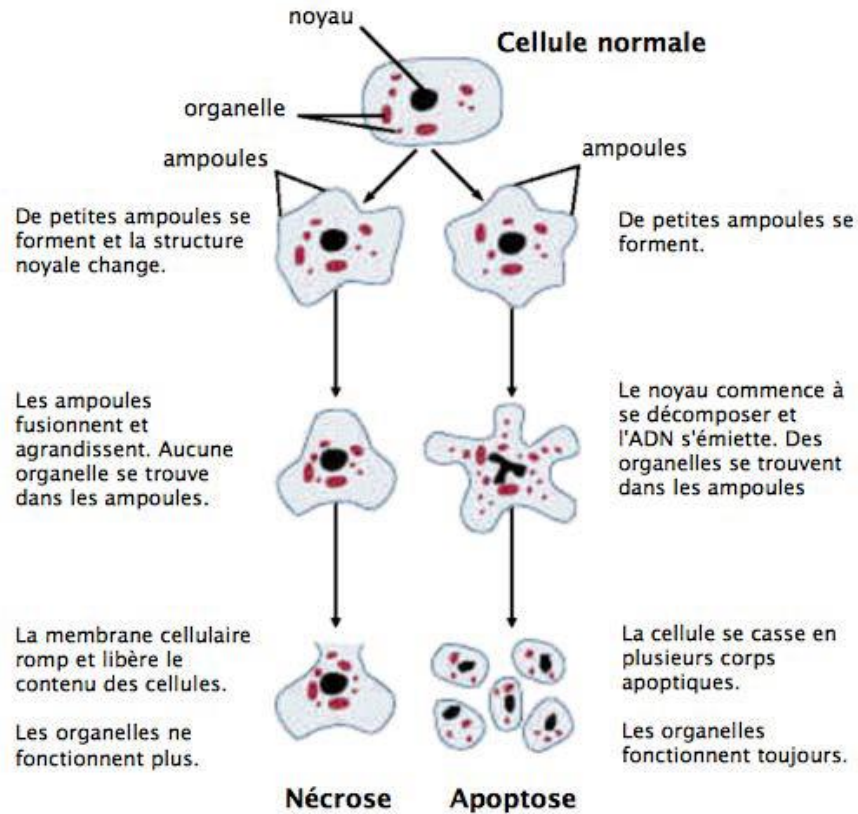


Figure 20 : Mécanismes de nécrose et d'apoptose²²

- **Mécanismes indirects**

Les dommages de ce mécanisme^{11,16} se regroupent en deux catégories : les réactions ciblant le tissu vasculaire tumoral ainsi que les réponses inflammatoires et immunitaires, notant que l'effet le plus rapidement détectable *in vivo* après PDT est de nature vasculaire²². En effet, quelques minutes après l'irradiation, d'importants dommages vasculaires sont observés dans la tumeur, induisant une privation des cellules tumorales en oxygène et nutriments conduisant à la mort cellulaire de la tumeur par asphyxie.

En ce qui concerne les dommages indirects causés par à l'inflammation et la réponse immunitaire, les dommages cellulaires provoqués par les ROS au niveau des tumeurs, par l'atteinte des membranes cellulaires, engendrent un relargage des médiateurs de l'inflammation (les cytokines) qui provoquent une réaction inflammatoire locale avec afflux de neutrophiles, mastocytes, monocytes et macrophages.

Par la suite, ces macrophages générateurs d'antigènes reconnus par les lymphocytes ouvrent la voie à une réponse immunologique systémique voire à une possibilité de vaccination sur site.

2.5 Applications cliniques et commercialisation de la PDT actuelle

En 1993, après toutes les phases d'évaluation clinique, le **Photofrin®** reçoit son autorisation de mise sur le marché (AMM) au Canada, ensuite en Hollande, au Japon, aux Etats-Unis enfin en France en 1996 suivi par le reste des pays européens.

Après cette première commercialisation, de nombreuses molécules apparaissent sur le marché au début des années 2000 avec par exemple en Europe la **Visudyne®** en 2000, le **Levulan®**, le **Metvix®** et le **Foscan®** en 2001¹⁶.

La plupart des photosensibilisateurs « prometteurs » de deuxième voire troisième génération sont encore en phase de recherche et ou en essais cliniques, ce qui explique le peu de molécules photosensibilisantes commercialisées à l'heure actuelle. Toutefois, la plupart de ces photosensibilisateurs sont disponibles en pharmacie hospitalière et un nombre restreint en officine de ville.

Depuis 2016, seulement trois molécules sont disponibles en officine de ville. Il s'agit de la **Visudyne®** en ophtalmologie pour traiter la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA), du **Metvixia®** et de l'**Effala®** en dermatologie pour traiter des kératoses actiniques et certains carcinomes¹⁶.

Tandis qu'en pharmacies hospitalières uniquement, on retrouve quelques autres médicaments particuliers, comme le fameux précurseur de cette classe le **Photofrin®** ainsi que le **Foscan®**.

Bien que la PDT soit en plein développement et présente des résultats très encourageants permettant d'améliorer la prise en charge de certains cancers, des progrès restent encore à accomplir, notamment pour améliorer la sélectivité de ces molécules et augmenter leur vitesse d'élimination du corps humain et ainsi limiter les effets secondaires.

3. Interaction et internalisation de tétrapyrroles : des vaisseaux sanguins à la cellule tumorale

La thérapie photodynamique implique l'accumulation sélective et la rétention d'un photosensibilisateur dans le tissu cible, de façon similaire à notre cas, où une tumeur est suivie d'une irradiation à la lumière à une longueur d'onde appropriée. De ce fait, il est important de déterminer comment les photosensibilisateurs sont transportés dans le sang et accumulés dans la tumeur. Nous nous intéressons dans nos travaux aux porphyrines.

Jusqu'à récemment, l'albumine était considérée comme la principale protéine de liaison à la porphyrine dans le sérum²⁸. Cependant, puisque la plupart des porphyrines sont éliminées par le foie, et que l'albumine n'est pas absorbée par les hépatocytes, il a été supposé que d'autres éléments se lient à la porphyrine, expliquant son transport dans le sang vers la tumeur, existent dans le sérum²⁸.

Plusieurs hypothèses sont proposées dans la littérature. Selon une étude de Jori et Kessel²⁹, l'absorption se produirait grâce à la liaison avec les lipoprotéines de basse densité (LDL Low Density Lipoproteins), le composé formé serait ensuite internalisé dans les cellules tumorales via les récepteurs LDL dont le nombre est important en surface des cellules tumorales en prolifération.

Une autre hypothèse²⁹ attribue la sélectivité au pH plus acide du tissu tumoral par rapport au tissu normal, ce qui favoriserait une diffusion du photosensibilisateur (PS) à travers la membrane cellulaire des cellules tumorales.

Il est également connu que les porphyrines naturelles sont des ligands endogènes du récepteur intracellulaire des benzodiazépines. Cela laisse envisager qu'un photosensibilisateur porphyrinique se lie de la même manière à l'intérieur de la cellule tumorale^{30,31}.

3.1 Association d'une porphyrine avec l'albumine

Il est connu que l'affinité de liaison de l'albumine sérique humaine (Human Serum Albumin HSA) aux divers photosensibilisateurs^{32,33} joue un rôle important dans leur biodistribution au sein du stroma tumoral. Ces dernières années, il a été démontré qu'un ensemble de dérivés d'hématoporphyrines présentait une affinité de liaison à l'HSA en utilisant des méthodes *in vitro* basé sur l'évolution des spectres d'absorption et de fluorescence de ces molécules^{32,33}, notamment Kongshaug et al. a étudié l'affinité avec

l'HSA de plusieurs monomères chimiquement purs³². Toutefois, aucun site de liaison spécifique n'a été identifié.

L'albumine sérique humaine HSA est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin, à hauteur de 80% des protéines plasmatiques, et environ 6 % de la composition du plasma. De nombreux composés, en particulier les médicaments amphiphiles et certaines substances endogènes, s'y lient de manière réversible et avec une forte affinité^{33,34}.

Deux sites de liaison majeurs de l'HSA ont été identifiés en utilisant un marquage par des réactifs fluorescents³³⁻³⁵ le site I avec le 5-diméthylaminonaphtalène 1-sulfonamide (DNSA) et le site II avec la Dansyl-L-proline (DP). Un site III a été reconnu plus tard par Goya et al.³⁶.

Ces sites ont la particularité de contenir des résidus chargés positivement (lysine, arginine) et des résidus-polaires (tyrosine, histidine) constituant les sites actifs de liaison³⁷.

Afin d'étudier l'influence de l'affinité de liaison spécifique des sites HSA sur l'activité *in vivo* du photosensibilisateur, plusieurs expériences ont été réalisées par Tsuchida³⁴ et Pandey⁸. Ces auteurs ont observé que les PS qui se fixaient au site II étaient les plus efficaces pour traiter les souris tumorales contrairement à ceux qui se fixaient au site I ou par liaison hydrophobe non spécifique à l'albumine.

Des identités de séquences ont été identifiées entre l'HSA et l'albumine sérique murine (MSA) et ont révélé que les acides aminés impliqués dans le site II sont presque identiques³⁸, signifiant que la reconnaissance des porphyrines par l'HSA et la MSA provient des mêmes sites de liaison et donc qu'un modèle murin pourrait être utilisé pour évaluer l'efficacité des PS.

Pour établir et comprendre davantage la corrélation de l'affinité de liaison au site HSA II avec l'efficacité *in vivo*, Tsuchida et al.³⁴ a étendu cette étude à certains dimères et trimères de porphyrines. Les résultats préliminaires *in vivo* semblent confirmer la relation entre la capacité d'un composé à se lier au site II de l'albumine et son efficacité *in vivo* en tant que photosensibilisateur. Une explication serait que le site II de l'albumine ressemble également à un site des récepteurs de benzodiazépine situé sur la membrane mitochondriale externe pour lequel la porphyrine a une affinité. Ainsi, cette similarité

favoriserait l'affinité de la porphyrine à se lier dans un second temps aux mitochondries une fois le PS internalisé dans la cellule et donc expliquerait l'efficacité de la phototoxicité des porphyrines.

3.2 Association d'une porphyrine avec les membranes

Les membranes biologiques sont constituées de phospholipides, de protéines et de glucides (voir Figure 21). Les phospholipides, principalement des phosphatidylcholines sont organisés sous forme d'une bicouche lipidique, comportant une partie apolaire à l'intérieur de la bicouche, et une partie polaire répartie de part et d'autre de la bicouche, en contact avec le milieu aqueux, ces deux parties leur conférant un caractère amphiphile³⁹⁻⁴¹.

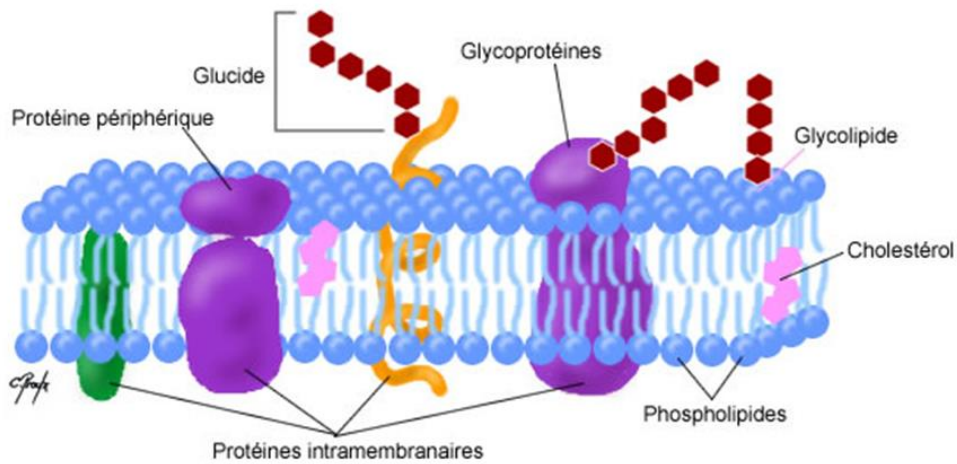
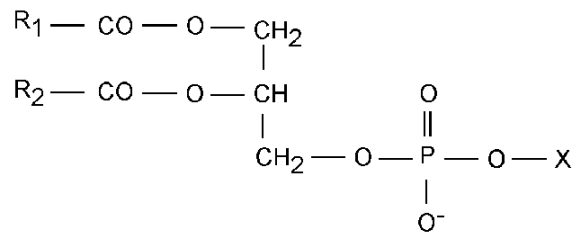


Figure 21 : Structure de la membrane cellulaire



R1 et R2 : chaînes carbonées

X = H : acide phosphatidique

X = — CH₂—CH₂—N⁺(CH₃)₃ : phosphatidylcholine

Figure 22 : Structure chimique générale des phospholipides, R : fonction apolaire, X : fonction polaire ; exemple de la phosphatidylcholine

Le passage d'une molécule à travers une membrane lipidique peut se faire selon deux mécanismes :

- Une diffusion passive qui se fait sans consommation d'énergie, selon le gradient électrochimique pour les solutés chargés (ou, pour les solutés non chargés, selon le gradient de concentration)
- Le transport actif qui implique le transfert d'une molécule grâce à l'utilisation d'une protéine transmembranaire de type pompe à protons. Il y a donc nécessité de fournir de l'énergie car ce transport n'est pas spontané.

Dans le cas des porphyrines amphiphiles carboxyliques, il s'agit d'une diffusion passive, la traversée du cœur lipidique des membranes peut être favorisée, dans un sens donné, suivant le gradient de pH par exemple et donc le gradient électrochimique entre les deux compartiments aqueux délimités par la bicouche³⁹⁻⁴¹.

En effet, Bonneau et al.⁴² en 2007, a montré avec la molécule de deutéroporphyrine (DP) (figure 29) que les conditions physico-chimiques du milieu extracellulaire des cellules tumorales jouent un rôle clé dans les processus d'incorporation des porphyrines dans les cellules. L'acidification relative du PS dans le milieu extracellulaire de la tumeur (autour de pH 6,9) favorise l'association du PS avec la couche lipidique de la membrane. Tandis que le pH du milieu intracellulaire, légèrement plus basique (7,4) que le pH externe, rend la sortie de la molécule plus aisée du côté cytoplasmique que vers le liquide extracellulaire, facilitant ainsi la dissociation et l'internalisation. L'acidification du pH extracellulaire dans les tumeurs contribue donc positivement à la rétention des molécules porphyrines dans ces tissus. En effet, il existe une gamme de pH correspondant à la « zone d'efficacité » pour le transfert des porphyrines à travers les membranes. Cette fenêtre, relativement étroite, est grossièrement comprise entre la zone de neutralité de la molécule (noyau pyrrolique) aux alentours du pH 4,7, et la zone où les deux chaînes carboxyliques sont chargées située entre pH 4,7 et pH 8,4⁴² (voir Figure 23).

En outre par un jeu de « pompe », une légère acidification du milieu extracellulaire par rapport au milieu intracellulaire conduit à la fuite des molécules de PS sous forme basique COO⁻ vers le milieu intracellulaire (par gradient de pH, diffusion passive)^{42,40}.

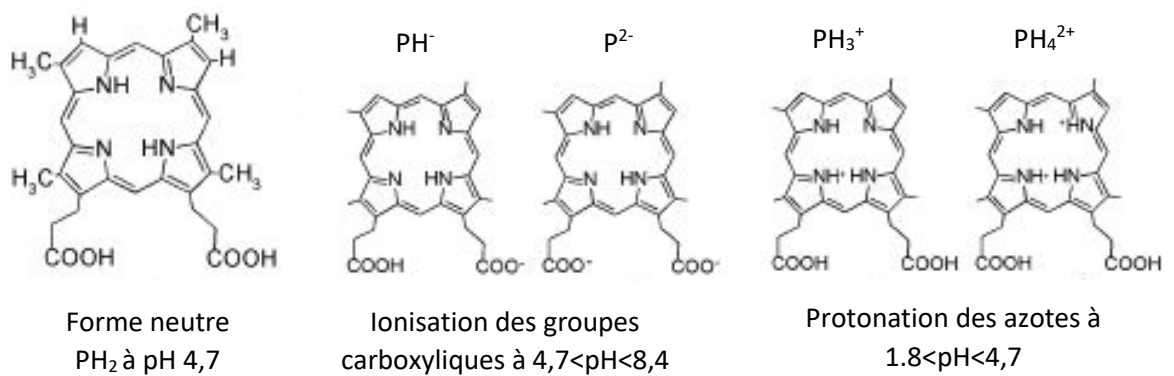


Figure 23 : Structure de la deutéroporphyrine dans ses différents états de protonation selon le pH⁴²

La figure 24 illustre le mécanisme d'internalisation des porphyrines lié à la présence dans la porphyrine d'une partie hydrophobe (cycle d'azote neutralisé en carré) et hydrophile (ronds : groupes carboxylates chargés COO⁻).

L'incorporation de la molécule par le feuillet externe de la bicouche lipidique se fait par le noyau hydrophobe, les chaînes polaires étant orientées vers la phase aqueuse pour lesquelles elles ont plus d'affinité. Dans ces conditions, la traversée de la membrane se fait par retournement de la molécule (Flip-Flop) lui permettant de retrouver le même type d'orientation de l'autre côté de la bicouche (voir Figure 24).

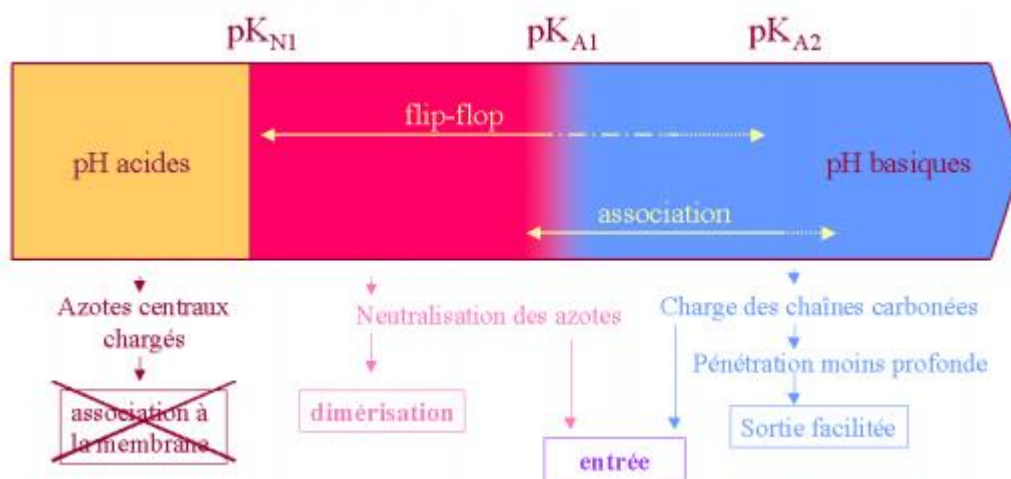
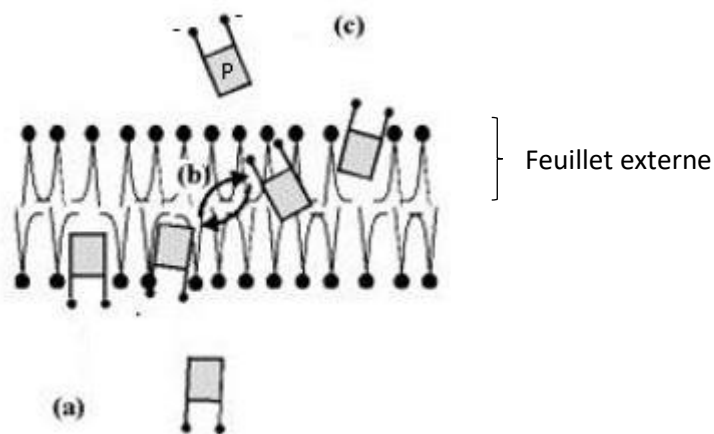


Figure 24 : Modèle d'interaction d'une porphyrine avec une bicouche lipidique. a) entrée, b) Flip-Flop, c) sortie, rond : chargé COO^- et carré : non chargé⁴²

3.3 Interaction d'une porphyrine avec les protéines LDL (Low density Lipoproteins)

Les lipoprotéines de basse densité LDL sont constituées de 78% de lipides et 22% de protéines et sont présentes sous forme de vésicules ayant une couche externe d'Apoprotéine et une couche interne lipidique renfermant une cavité hydrophobe (voir Figure 25). Elles permettent le transport de diverses substances: triglycérides, cholestérol, vitamines liposolubles (A,D,E,K) dans le sang pour les apporter aux cellules³³.

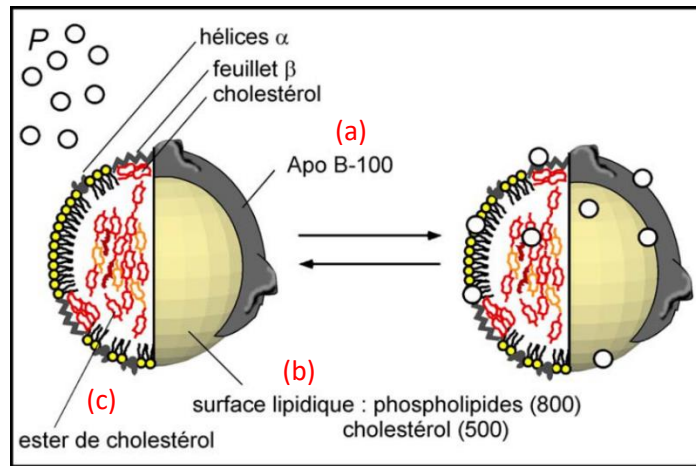


Figure 25 : Fixation de la deutéroporphyrine (DP) aux protéines LDL. Différents types possibles d'association dans les compartiments de LDL : a) apoprotéine, b) lipides, c) cavité interne hydrophobe³³

Il a été mis en évidence, en utilisant la variation de fluorescence de la porphyrine et le quenching de la fluorescence intrinsèque des lipoprotéines, deux types de fixation aux protéines LDL. Le premier, met en œuvre des sites dits de *classe P* qui sont localisés sur la partie protéique. Le second type d'interaction, défini comme fixation dite de *classe L*, se situe dans la phase lipidique, soit à la surface soit au cœur de la cavité riche en cholestérol. Le caractère amphiphile des porphyrines expliquerait ces affinités. De ce fait, chaque LDL fixe largement plus de 4 porphyrines (voir Figure 26)^{33,41}.

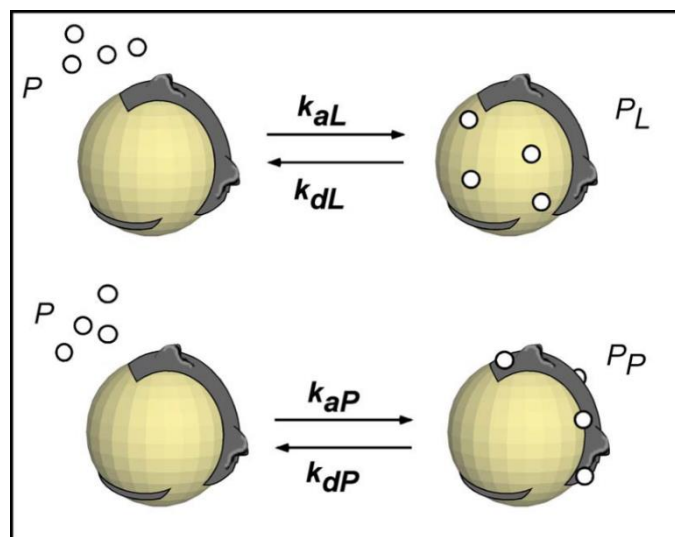


Figure 26 : Représentation schématique des équilibres, où k_{aP} et k_{dP} sont les constantes de vitesse d'association et de dissociation pour les sites de classe P et k_{aL} et k_{dL} celles pour l'association de la porphyrine à la phase lipidique de la lipoprotéine (classe L)³³

Les LDL semblent, par conséquent, être de bons transporteurs de porphyrines. Elles permettraient l'association de plusieurs photosensibilisateurs porphyriniques. De plus, cette association ne gêne pas la reconnaissance des LDL par leurs récepteurs cellulaires spécifiques surexprimés par les cellules cancéreuses en hyperprolifération⁴².

Cependant, les interactions PS-membrane impliquées ont des dynamiques extrêmement rapides. Les échanges de molécules de PS entre LDL et la membrane plasmique doivent donc également être très rapides. Etant donné que le flip-flop transmembranaire est lui aussi caractérisé par sa grande vitesse, il est probable que les molécules de porphyrine ne restent pas associées aux LDL. Une grande partie d'entre elles entrent vraisemblablement dans la cellule par diffusion passive⁴³.

En effet, les résultats des études de Bonneau et al⁴² ont montré que la localisation subcellulaire des molécules porphyriques est sous la gouverne de la dynamique des interactions « molécule-membrane » .

Dans le cadre de la PDT, il a été noté qu'une distribution cytoplasmique diffuse est un facteur favorisant l'efficacité photodynamique⁴². Une meilleure connaissance de la dynamique des interactions LDL-médicament et membrane-médicament devraient permettre une amélioration significative du ciblage médicamenteux⁴⁴.

4. Imagerie par résonance magnétique

4.1. Principe et generalités

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux d'une substance sous l'action de champs magnétiques.

Chaque proton possède un moment magnétique représenté par un vecteur en rotation sur lui-même que l'on nomme spin et qui se comporte différemment en absence ou présence d'un champ magnétique extérieur (voir Figure 27a). Ces spins possèdent un mouvement de rotation formant un cône autour de l'axe B_0 que l'on nomme mouvement de précession (voir Figure 27b).

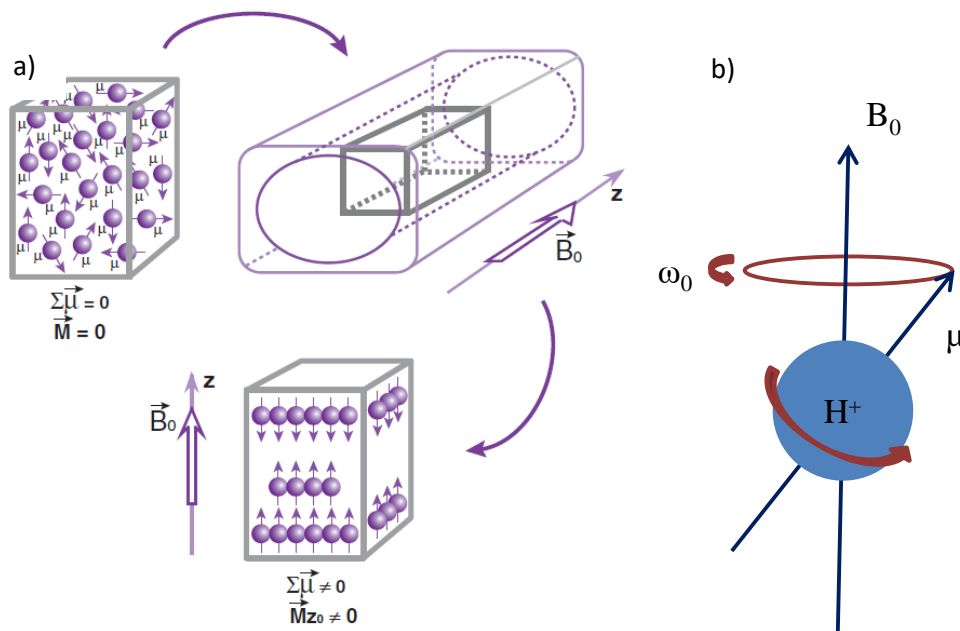


Figure 27: a) En l'absence d'un champ magnétique externe, les protons (μ) d'un échantillon tissulaire sont orientés de façon aléatoire en tous sens : la somme des vecteurs d'aimantation élémentaire microscopique ($\Sigma\mu$) est nulle et il n'y a pas de vecteur d'aimantation macroscopique ($M = 0$). Soumis à un champ magnétique extérieur, les protons s'orientent selon la direction de ce dernier (Oz) avec apparition d'un vecteur d'aimantation macroscopique $\Sigma\mu = MZ_0$. b) Mouvement de précession du proton placé sous un champ magnétique B_0 ⁴⁶

Une onde radiofréquence (RF) peut interagir avec les spins. Lorsque l'impulsion RF est arrêtée, les spins vont émettre une onde RF pour revenir à leur état initial.

Ainsi l'aimantation globale peut se décrire suivant deux composantes : la composante longitudinale selon l'axe de B_0 et la composante transversale dans le plan perpendiculaire à B_0 (composante qui s'annule par déphasage des spins). Lors de l'excitation des spins par une onde RF, on parle de bascule de l'aimantation globale selon une composante longitudinale et transversale⁴⁶:

De la même façon, le retour à l'équilibre ou relaxation est décomposé en deux temps caractéristiques :

- le temps de relaxation longitudinale T_1 qui correspond au temps de retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale. La cinétique de retour à l'équilibre de cette aimantation suit une courbe exponentielle croissante et T_1 correspond au temps qu'il faut pour que la composante longitudinale revienne à 63% de sa valeur initiale (voir Figure 28 A).
- Le temps de relaxation transversale T_2 qui correspond au temps de retour à une aimantation transversale nulle par le déphasage des spins. Cette aimantation décroît suivant une exponentielle et T_2 correspond au temps qu'il faut pour que la composante transversale revienne à 37% de sa valeur initiale (voir Figure 28 B).

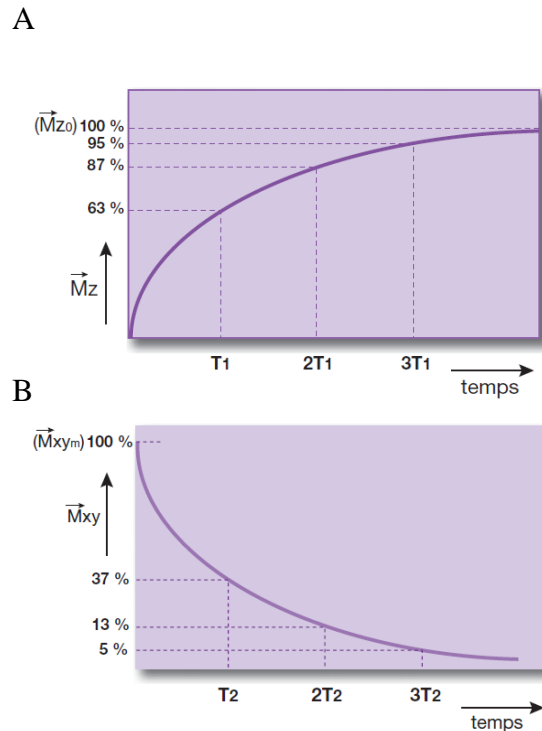


Figure 28 : (A) Courbe de relaxation T_1 de la composante longitudinale et (B) courbe de relaxation T_2 de la composante transversale de l'aimantation globale⁴⁶

Le temps T_1 dépend en l'absence d'agents de contraste de la mobilité des protons en milieu naturel, ou de la présence d'agents de contraste IRM et est caractéristique d'un tissu. Le temps T_2 , toujours plus court que le T_1 , est lié aux interactions spin-spin qui créent des hétérogénéités de champs et donc de précession⁴⁶.

L'acquisition du signal en IRM se fait à l'aide de bobines qui enregistrent les variations de l'aimantation. Selon les séquences de RF réalisées, il est possible de pondérer le signal en fonction de la valeur du T_1 , du T_2 ou encore de la densité de proton. Pour cela, deux principaux paramètres sont ajustés :

- Le temps d'écho TE qui correspond à la durée entre l'impulsion RF et l'enregistrement du signal.
- Le temps de répétition TR qui correspond à la durée entre 2 impulsions RF successives.

Des TE et TR longs permettent de pondérer le signal suivant la relaxation transversale T_2 tandis qu'un TR court le pondère suivant la relaxation longitudinale T_1 (figure 29).

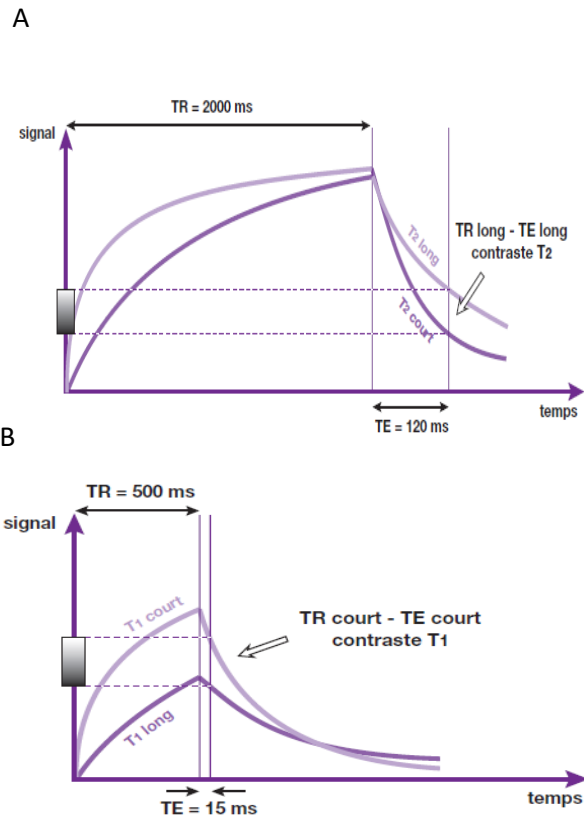


Figure 29 : Sur ces graphiques sont représentés la récupération longitudinale à la suite d'une impulsion RF pendant le temps TR puis la décroissance transversale suite à une nouvelle impulsion RF. (A) Un TR long n'entraîne pas de différence liée à la relaxation longitudinale contrairement à (B) un TR court⁴⁶

- **Formation d'une image IRM**

Pour former une image, des gradients de champs magnétiques sont utilisés afin d'ajouter une information spatiale dans les 3 dimensions de l'espace au signal obtenu (voir Figure 30). Ce sont des gradients dits de coupe G_{ss} , de codage de phase G_{ϕ} , et de fréquence G_{ω} .

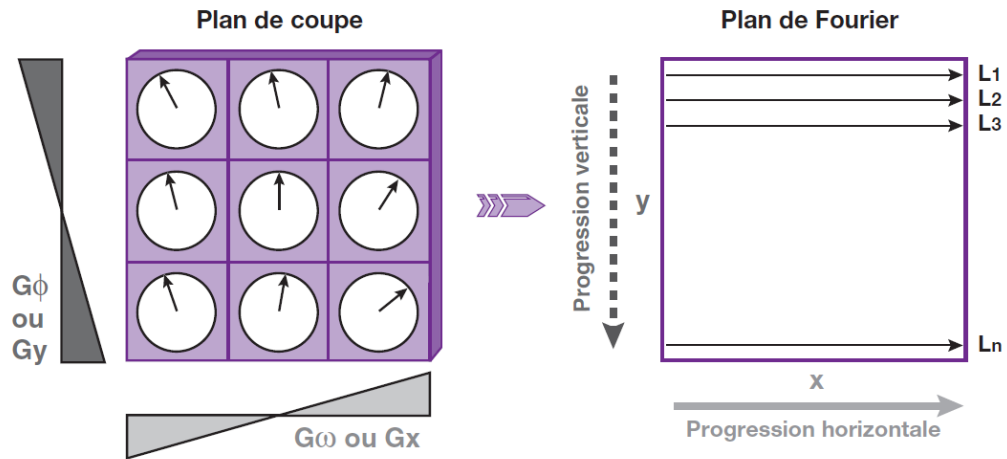


Figure 30: Illustration du principe de l'acquisition des données d'un plan de coupe. L'acquisition des données est obtenue « ligne par ligne » par une double progression horizontale (en x) « balayage » ou lecture d'une même ligne = codage en fréquence par le gradient de lecture $G\omega$, et verticale (en y) passage d'une ligne à la suivante par « incrémentation » du gradient de codage de phase $G\phi$ pour obtenir successivement les n lignes du plan de Fourier⁴⁶

La coupe étudiée dans l'objet est sélectionnée par l'application d'un gradient de sélection de coupe G_{ss} qui permet de sélectionner un plan de coupe selon la direction z par application simultanée d'une impulsion RF « sélective » dans ce plan. En effet, l'excitation des spins se fait à la fréquence ω_0 dépendante du champ magnétique ($\omega_0 = \gamma \cdot B_0$). Ainsi, en adaptant la fréquence des RF, seuls les spins de la tranche à observer seront excités et donneront un signal. Ensuite, un gradient de codage de phase $G\phi$ permet de modifier la phase des spins avant la réception du signal, ce qui permet de réceptionner, à ce moment-là, une information spécifique et « unique » qui constituera une ligne du plan de Fourier. Ce gradient $G\phi$ doit être appliqué (et incrémenté) autant de fois qu'il y a de « lignes » dans le plan dit de Fourier, ce plan comporte l'information en fréquence spatiale qui constituera l'image IRM. Enfin, un gradient de fréquence $G\omega$, appliqué au moment du recueil du signal, permet de réceptionner plusieurs fréquences à partir du plan sélectionné par G_{ss} : c'est le gradient de lecture⁴⁶.

Le signal radiofréquence recueilli permet de remplir un espace de fréquences spatiales (domaine de Fourier) noté Espace K . La formation d'une image dans le domaine spatial usuel nécessite alors une transformée de Fourier 2D donnant un nombre complexe pour

chaque voxel. Les images sont généralement constituées de niveaux de gris caractérisant la magnitude mais les informations de phase peuvent aussi être utilisées⁴⁶.

Une séquence d'acquisition IRM est organisée sous forme de « cycles ». Chaque cycle permet de remplir une ou plusieurs lignes du plan de Fourier : Toute séquence d'acquisition IRM est décrite par un schéma représentant la succession temporelle d'impulsions et délais (TE et TR), combinés aux gradients de champs magnétiques précédemment décrits G_{ss} , G_{ϕ} et G_{ω} , et présentant le signal IRM généré sous forme d'écho. Cette séquence élémentaire est répétée tous les temps TR avec incrémentation du gradient G_p de manière à remplir les lignes du plan dit de Fourier comportant l'information spatiale IRM.

- **Pondération de l'image IRM T_1 et T_2**

Une des séquences IRM les plus utilisées est la séquence FLASH (Fast Low Angle SHot). C'est une séquence en écho de gradient dont l'angle de bascule des spins imposé par l'impulsion RF est inférieur à 90° (voir Figure 31).

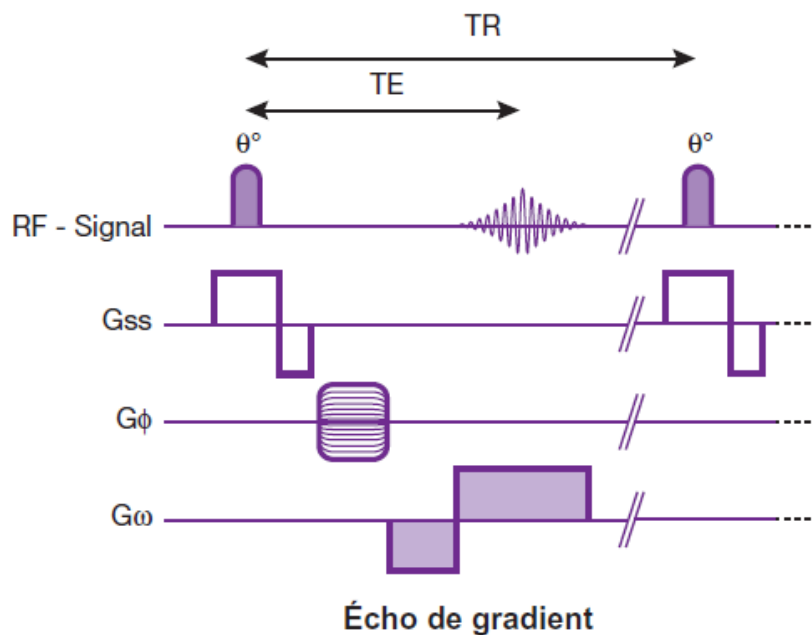
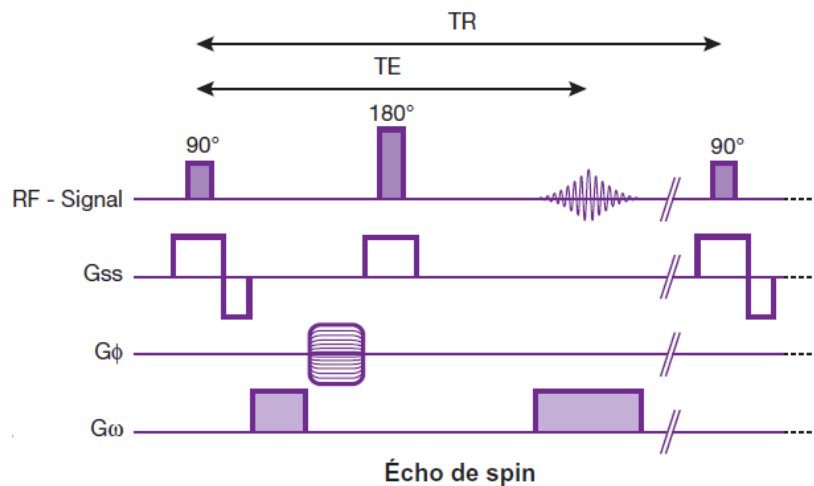


Figure 31 : Schéma d'une séquence d'écho de gradient⁴⁶

En diminuant l'angle de bascule, le retour à l'équilibre est plus rapide, il est alors possible de diminuer le temps TR pour obtenir une forte pondération T_1 , ce qui diminue aussi les temps d'acquisition. Dans ce type de séquence, la décroissance transversale n'est pas

seulement liée à la relaxation T_2 , elle dépend aussi des hétérogénéités du champ magnétique. Avec de longs TE (et TR), on parle alors de pondération T_2^* .

Les séquences en écho de spin possèdent un angle de bascule de 90° et font quant à elles intervenir une impulsion à 180° à la moitié du temps d'écho TE/2 qui permet de s'affranchir des hétérogénéités de champ magnétique (voir Figure 32).



*Figure 32 : Schéma d'une séquence d'écho de spin*⁴⁶

En écho de spin, avec de long TE et TR, la pondération est, cette fois, en T_2 grâce à l'impulsion de rephasage.

Des séquences RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement)³ avec des temps de répétition TR courts permettent d'obtenir les images d'une même zone plus ou moins pondérée selon T_1 .

- **Quantification des temps de relaxation T_1 et T_2 .**

Le temps de relaxation longitudinale T_1 est calculé par la modélisation de la courbe du signal en fonction du temps de répétition TR qui suit l'équation suivante :

$$I_S = A_1 + C_1 \left(1 - e^{-TR/T_1} \right)$$

Avec I_s l'intensité du signal et A_1 et C_1 deux constantes à modéliser.

De la même façon, des séquences MSME (Multi Slice Multi Echo) comprenant plusieurs temps d'écho TE permettent de calculer le temps de relaxation T_2 d'une région d'intérêt

en modélisant l'intensité du signal en fonction du temps d'écho TE selon l'équation suivante :

$$I_S = A_2 + C_2 e^{-TE/T_2}$$

Avec I_s l'intensité du signal et A_2 et C_2 deux constantes à modéliser.

Par conséquent, en résumé, en choisissant un type de séquence IRM par écho de gradient ou écho de spins, ainsi que les paramètres d'acquisition expérimentaux TR, TE, angle de bascule, il est possible de modifier le niveau de signal IRM en fonction de la valeur des relaxations T_1 ou T_2 des spins de l'eau observés. On parle d'images pondérées T_1 ou T_2 .

Il existe de multiples pondérations IRM générées par des séquences spécifiques, apportant d'autres informations liées par exemple à la diffusion des spins, (autodiffusion de l'eau par l'IRM de diffusion ou du tenseur de diffusion pour effectuer de la tractographie), la perfusion vasculaire (IRM de perfusion avec agent de contraste), l'interaction avec de macromolécules (IRM de transfert d'aimantation), élasticité des tissus par IRM élastographique (ERM Elastographie par Résonance Magnétique), à l'échange du proton de l'eau avec un agent de contraste de Gd en interaction spécifique dit CEST (IRM CEST, Chemical Exchange Saturation Transfer)⁴⁶.

4.2. Agents de contraste pour l'IRM

Les premiers agents de contraste ont été développés dans les années 80⁴⁷ et sont utilisés dans 35 % des examens médicaux⁴⁸. Un agent de contraste pour l'IRM est un composé qui modifie les temps de relaxation des protons de l'eau dans les tissus. Il va permettre d'améliorer le contraste de l'image afin de différencier plus finement différents types de tissus⁴⁹. L'action des produits de contraste IRM est donc indirecte : le produit lui-même n'est pas visible, mais nous détectons son influence sur les temps de relaxation des protons d'eau environnants.

Plus précisément, les produits de contraste IRM raccourcissent les temps de relaxation T_1 et T_2 des tissus, un de ces effets étant prédominant en fonction du produit utilisé ou de sa concentration.

- Les agents de contraste à effet T_1 prédominant : en diminuant le temps de relaxation T_1 des tissus, ils conduisent, grâce à une séquence d'acquisition pondérée T_1 , à une

augmentation de signal de la structure avec laquelle ils sont en contact; on parle aussi d'agents à contraste «positif». Ces agents de contraste sont majoritairement composés d'ions métalliques paramagnétiques avec un grand nombre d'électrons célibataires comme le Mn(II) avec 5 électrons libres ou le Gd(III), avec 7 électrons libres.

- Les agents de contraste à effet T_2 prédominant : en diminuant le temps de relaxation T_2 des tissus, ils induisent des inhomogénéités du champ magnétique qui accélèrent le déphasage des protons. Ils provoquent ainsi une diminution du signal des structures en contact avec ces substances. Ce sont des agents à contraste «négatif». Ils sont généralement formés de nanoparticules d'oxyde de fer⁵⁰.

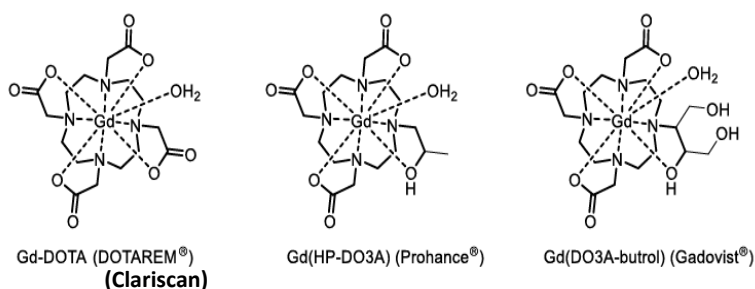
4.3. Agents de contraste à base de gadolinium

Le gadolinium, métal de la classe des lanthanides ou terres rares, avec ses 7 électrons libres, possède la relaxivité la plus élevée et présente, par conséquent, la meilleure efficacité pour modifier les temps de relaxation, notamment T_1 et former des agents de contraste à base de Gd efficaces⁵¹.

L'ion Gd(III) libre est un métal lourd toxique possédant une taille proche de celle du calcium(II). Cette proximité de taille peut conduire à des inhibitions de processus biologiques impliquant les ions Ca^{2+} , provoquant de la toxicité⁵². C'est pourquoi, il faut le chélater dans un complexe stable (chélate) tout en maintenant ses propriétés paramagnétiques. Les chélates sont des complexes contenant des ligands de type polyamino carboxylate carboxylatées, linéaire ou macrocyclique (voir Figure 33).

Afin de prédire et minimiser la quantité de gadolinium libre pouvant résulter de la décomplexation des chélates en solution et induire une toxicité notamment *in vivo*, il est important que ces complexes possèdent à la fois une grande stabilité cinétique, issue de la structure macrocyclique, ainsi qu'une bonne stabilité thermodynamique, renforcée par l'ionicité dans le cas des macrocycles⁵³.

Complexes de Gd(III) macrocycliques



Complexes de Gd(III) linéaires

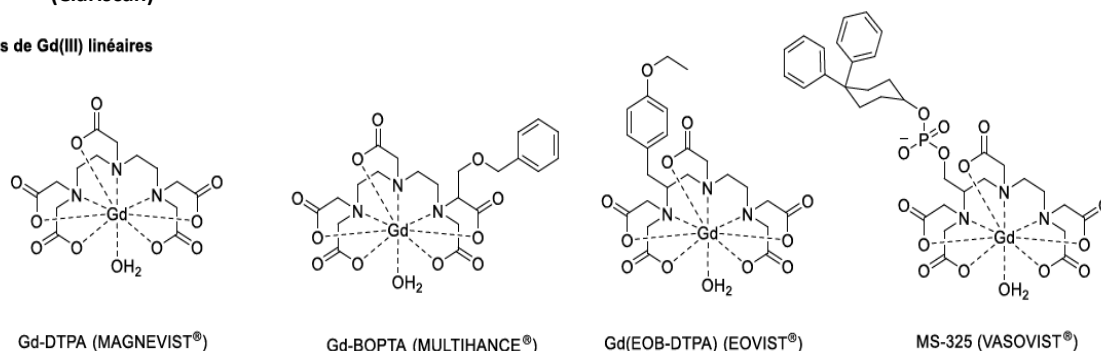


Figure 33: Structure chimique d'agents de contraste IRM à base de Gd(III) utilisés en clinique⁵²

Les complexes DTPA linéaires possèdent une constante de stabilité de l'ordre de $\log K = 19$.

Les complexes DOTA macrocycliques possèdent de hautes constantes de stabilité ($21,8 < \log K < 25,6$), ce qui permet de diminuer les phénomènes de transmétallation avec des ions présents dans le corps et de ce fait, limiter la toxicité^{54,55}. Leur faible relaxivité, pour un champ magnétique de 1,5 T, comprise entre $2,9$ et $5,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, nécessite l'injection d'une grande quantité d'agents de contraste au patient. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux agents de contraste avec des relaxivités plus élevées pour diminuer la quantité à administrer au patient.

4.4. Relaxivité des agents de contraste

L'efficacité d'un agent de contraste est évaluée par sa relaxivité, autrement dit de combien il va augmenter la vitesse de relaxation des protons de l'eau à une concentration de 1 mM. La théorie décrivant la relaxation des protons de l'eau en présence d'un composé paramagnétique a été développée par Solomon, Bloembergen et Morgan⁵⁶⁻⁵⁸.

Plusieurs facteurs vont influencer la relaxivité comme la température, le champ magnétique et des facteurs microscopiques inhérents au complexe de Gd(III) (voir Figure 34) : le nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd(III), le temps de corrélation

rotationnelle τ_r et la vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex} qui définira le temps de résidence τ_M .

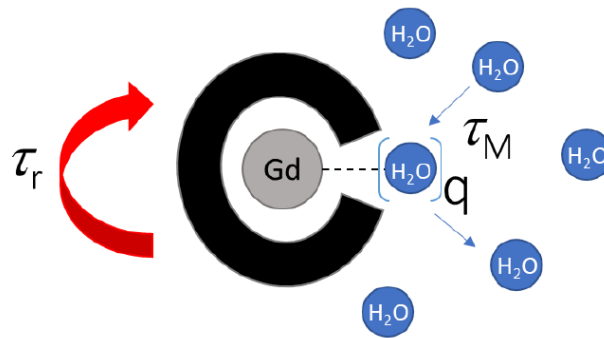


Figure 34: Schéma d'un complexe de *Gd(III)* et des facteurs influençant la relaxivité

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

Les ligands actuellement utilisés en clinique sont octadentates et complètent huit sites de coordination du *Gd(III)*. Il ne reste donc qu'un site de coordination pour les molécules d'eau. Plusieurs groupes ont donc développé des ligands heptadentates laissant deux sites de coordination pour les molécules d'eau, et ont ainsi augmenté la relaxivité r_1 .

Nous pouvons, par exemple, citer le ligand heptadentate DTTA qui a été développé par le groupe de Merbach, Helm et al. (voir Figure 35)^{59,60,61}. Ils ont réalisé la synthèse d'un complexe heptanucléaire composé d'un complexe de fer(II) portant six complexes de *GdDTTA*. Cet agent de contraste possède une relaxivité élevée de $16,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à 25°C et 200 MHz. L'étude par IRM à 200 MHz de ce composé sur des souris a montré une relaxivité *in vivo* quatre fois supérieure au composé commercial *GdDOTA* tout en possédant une pharmacocinétique similaire.

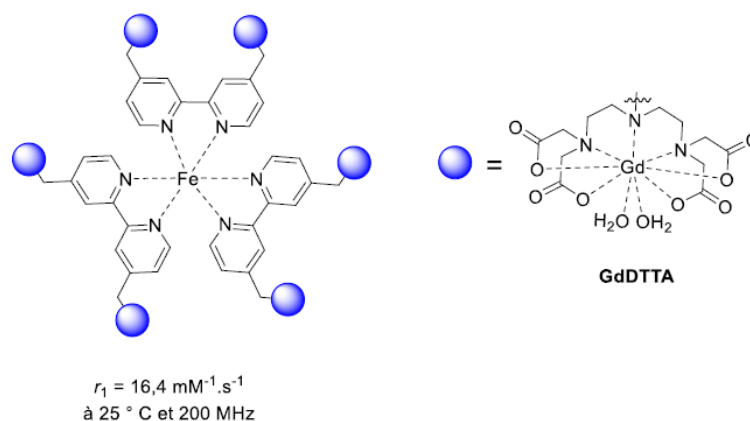


Figure 35 : Complexes de Gd(III) développés par Merbach et le complexe GdDTTA.⁶⁰⁻
62

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

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

Le groupe de Gros (voir Figure 36) a développé des agents de contraste multimodaux permettant de réaliser simultanément de l'imagerie IRM et de la tomographie à émission de positrons TEP scan. Une porphyrine de Cu(II) a été reliée à un ou deux complexes de Gd(III) (voir Figure 42). Les relaxivités de ces composés sont respectivement de $16,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $21,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à 25 °C et 20 MHz. L'augmentation de la taille du composé ainsi que la faible flexibilité, et une éventuelle agrégation expliquent cette augmentation.

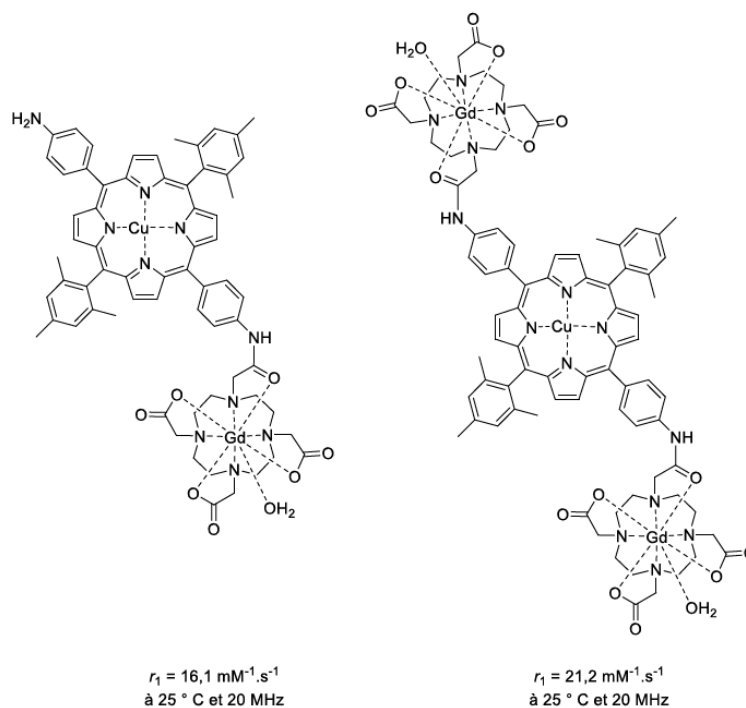


Figure 36 : Systèmes bimodaux pour les imageries PET et IRM composés d'une porphyrine de Cu(II) et d'un ou deux complexes de Gd(III) développé par le groupe de Gros⁶³

Les agents de contraste IRM d'avenir de type T₁ en complexe de Gd, doivent répondre aux principales caractéristiques suivantes⁶⁴:

- ✓ Des relaxivités élevées, même à haut champ, pouvant être apportées par un nombre d'hydratation $q > 1$, tout en gardant une bonne stabilité thermodynamique et cinétique, une flexibilité réduisant la dynamique de la molécule par la structure d'une taille moyenne de la molécule ou la fonctionnalisation avec un mouvement réduit (temps de corrélation rotationnel lent) à la surface d'une nanoparticule, une vitesse d'échange rapide avec l'eau
- ✓ Une stabilité thermodynamique et cinétique du complexe avec un faible relargage des ions Gd³⁺
- ✓ Une sélectivité des tissus par greffage de ligands de ciblage
- ✓ Une association avec des principes actifs
- ✓ Une possibilité d'activation selon un stimulus pH, enzymatique, ions ou température pour former des agents dits intelligents

5. Agents théranostiques moléculaires pour la PDT et l'IRM

La théranostique vise à combiner le diagnostic et la thérapie pour contrôler l'administration et la libération de médicaments, ainsi que l'efficacité du traitement. Cela est réalisé en associant des agents diagnostiques et thérapeutiques au sein du même système moléculaire ou nanoparticulaire, ce qui permet une biodistribution identique de ces composants. Aujourd'hui, la plupart des agents théranostiques sont basés sur des plateformes de taille nanométrique, telles que divers types de nanoparticules inorganiques^{65,66}, des conjugués polymériques^{67,68}, des liposomes et des micelles^{69,70}. Il est possible ainsi, de rassembler différentes modalités d'imagerie et de thérapie, avec différents stratégies d'assemblage, pour générer des agents théranostiques. Les agents théranostiques à base de nanoparticules constituent un domaine de développement thérapeutique prometteur et actif.

- **Agents nanothéranostiques PDT-IRM**

En 2007, Le Tsai et al.⁷¹ a conçu des nanoparticules polymériques sensibles au pH (poly(N-vinyl caprolactame)-g-PLA), pour encapsuler la protoporphyrine IX (PpIX) et les ont comparé à leurs homologues non sensibles au pH. Les études de PDT *in vitro* et *in vivo* sur des souris portant des xénogreffes A549 ont montré que ces nanoparticules sensibles au pH sont plus efficaces pour inhiber la croissance tumorale liée à la libération spécifique du photosensibilisateur dans l'environnement acide du milieu tumoral.

En 2005, Ross et al.⁷² a mis au point un nanosystème constitué d'un polyacrylamide (PAA), du **Photofrin** (PDT), d'oxyde de fer (IRM), d'un peptide pour le ciblage du système vasculaire, et de PEG pour augmenter la furtivité, et ont mis en évidence son efficacité theranostique *in vivo* sur modèle de tumeur murine.

Parmi les nanothéranostiques, dédiés à la photothérapie dynamique PDT et l'imagerie IRM et/ou optique, nous trouvons aussi les NP magnétiques de Huang et al.⁷³ (2012) constitués d'un photosensibilisant de deuxième génération, la chlorine (Ce6), lié de manière covalente à la surface des NP de fer, conduisant à une nanoparticule théranostique de ~20 nm de diamètre, en double modalité d'imagerie optique de fluorescence NIR et IRM. Elles présentent une non-cytotoxicité et une affinité pour les tissus cancéreux gastriques.

En 2011, Peng et al.⁷⁴ a développé une nanoparticule polymérique multifonctionnelle composée d'un copolymère dibloc de polycaprolactone PEG chargé d'un fluorophore l'IR-780, lui conférant une double propriété de fluorescence dans le proche infrarouge et de photosensibilisateur. Ces nanoparticules ont montré une accumulation accrue dans les tumeurs colorectales humaines HCT-116 implantées chez la souris et une inhibition de la croissance tumorale.

Plus récemment en 2017, Tillement et al. a démontré l'efficacité *in vivo* et *in vitro* du ciblage d'une nanoparticule contenant un polysiloxane AgulX pour l'IRM (Gd), une porphyrine pour la PDT et un peptide de ciblage sur modèle *in vivo* préclinique de glioblastome⁷⁵.

Les nanoplatformes jouent un rôle de plus en plus important dans les domaines de la thérapie contre le cancer. Toutefois, elles sont encore au stade initial du développement, avec quelques essais cliniques, avant qu'elles puissent être appliquées. Plus important encore, les nanotechnologies doivent répondre aux normes d'inocuités rigoureuses^{76,77}. Il faudra également surmonter les difficultés qui sont généralement associées à la fabrication à grande échelle²⁴. Néanmoins, l'amélioration de la pratique des nano- et biotechnologies souligne leur utilisation potentielle comme nouveaux outils attrayants pour de futures applications.

- **Agents moléculaires théranostiques PDT IRM**

Ainsi, le développement des formes moléculaires d'agents théranostiques constitue une autre voie d'avenir pour le développement de nouvelles thérapies bénéficiant du guidage par l'imagerie. Nous passons maintenant en revue les agents théranostiques combinant les applications de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) et de la PDT (la photothérapie dynamique), qui ont une structure moléculaire.

Jusqu'à présent, il n'y a eu que quelques articles dans la littérature sur des systèmes moléculaires multifonctionnels, combinant les caractéristiques appropriées pour l'activité PDT et la détection IRM. Une revue décrit les agents théranostiques moléculaires porphyriniques⁷⁸.

Les premiers composés bifonctionnels contenant des dérivés de porphyrine liés aux complexes de GdDTPA ont été synthétisés en 1993 par Hindre et al.⁷⁹. Le composé TPP-Gd₂(DTPA)₄, constitué d'un noyau de tétra-p-aminophénylporphyrine couplé à quatre ligands DTPA, présentait une relaxivité deux fois plus élevée que celle du GdDTPA à 20 MHz. De plus, les études *in vivo*, ont montré une amélioration spécifique du contraste au niveau de la tumeur et une efficacité thérapeutique comparable à celle de l'agent commercial (**Photofrin**®).

Plus tard, Pandey et al.^{80,81} a synthétisé et étudié plusieurs agents théranostiques qui combinent l'imagerie (IRM et fluorescence) et le traitement par PDT. Le groupe a démontré que le composé HPPH-3GdDTPA (voir Figure 37) **réhaussait** de manière **remarquable le signal** IRM dans la tumeur du côlon murin, ainsi qu'une efficacité dans le traitement PDT *in vitro* et *in vivo*.

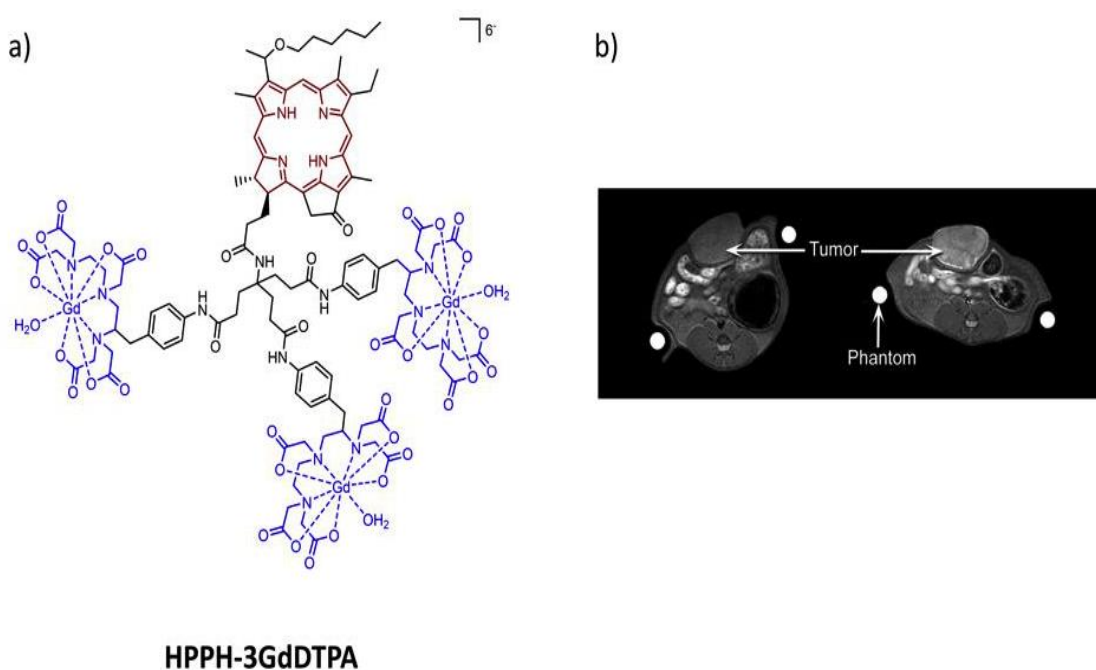


Figure 37. (a) Structure chimique du composé théranostique HPPH-3GdDTPA, (b) Images RM d'un rat (Fischer) portant des tumeurs du côlon Ward avant (à gauche) et 24 h après (à droite) l'injection du conjugué HPPH-3-Gd(III) (dose : 10,0 $\mu\text{mol/kg}$)⁸¹

En 2014, Luo et al. a synthétisé un agent théranostique possédant une relaxivité élevée ainsi qu'un bon rendement quantique d'oxygène singulet lors de l'exposition à une irradiation de lumière dans le proche infrarouge à 650 ± 20 nm, démontrant que ce

complexe Gd (III) -porphyrine (voir Figure 38) agit comme un agent potentiellement théranostique avec d'excellentes performances pour l'imagerie par résonance magnétique et la thérapie photodynamique *in vitro*⁸³.

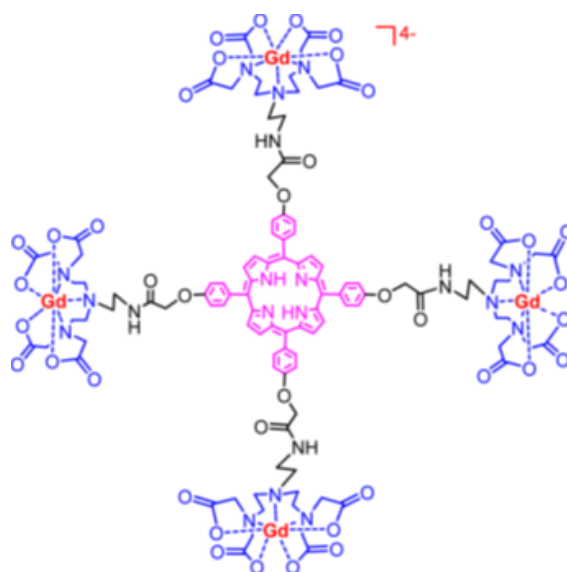


Figure 38 : Structure chimique du composé Gd(III)-DTTA⁸³

De même, les équipes de Tekdas et al.⁸⁴ décrit une phthalocyanine et une porphyrine de zinc(II) reliées à un ou plusieurs complexes de GdDO3A-amide (un analogue de GdDOTA dans lequel un bras acétate a été remplacé par un bras amide) (voir Figure 39).

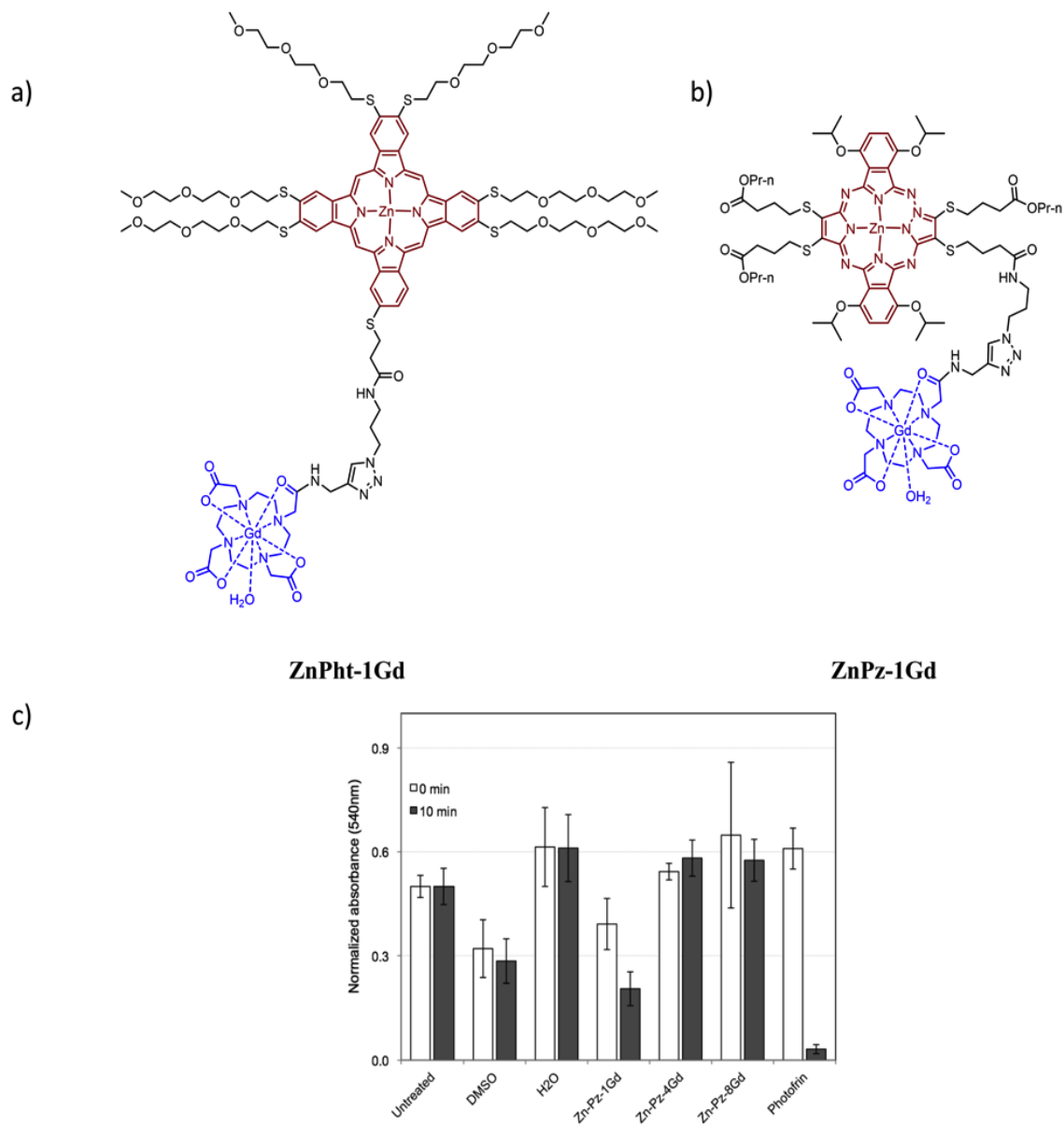


Figure 39. Structure chimique de (a) ZnPht-1Gd et (b) ZnPz-1Gd; (c) Effet phototoxique dans des cellules WI-38 VA13 incubées avec du Zn-Pz-nGd ($n = 1, 4, 8$ Gd ; 50 M, 24 h) et irradiées par une lumière blanche pendant 0 ou 10 min. Le même protocole a été réalisé avec **Photofrin** comme témoin positif⁸⁴

Le PS à base de phtalocyanine lié à un complexe GdDO3A-amide (ZnPht-1Gd) présentait une faible relaxivité ($1,43 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 128 MHz) mais a montré une bonne capacité à produire de l'oxygène singulet.

Le PS à base de porphyrine a été lié à un, quatre et huit complexes GdDO3A-amide pour donner le composé bifonctionnel ZnPz-nGd (avec $n = 1, 4, 8$)⁸⁴, ces composés ont montré une forte relaxivité (jusqu'à $12,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour ZnPz-8Gd à 60 MHz et 37°C) relié au nombre de complexes de gadolinium attachés au PS. La phototoxicité *in vitro* n'a été observée qu'avec les composés portant un complexe Gd (ZnPz-1Gd) (voir Figure 39c).

L'équipe de V. Heitz, A. Sour et al.⁸² du Laboratoire de Synthèse des Assemblages Moléculaires Multifonctionnels (LSAMM, institut Le Bel, Strasbourg), a conçu et étudié plusieurs agents thérapeutiques moléculaires permettant de réaliser la PDT et l'IRM. Une molécule constituée d'une porphyrine de zinc conjuguée à un groupement dicétopyrrolopyrrole, et reliée à un complexe GdDOTA, un dimère de porphyrine de zinc lié à deux complexes GdDOTA (GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA) et une (DPP-ZnP-2 GdDOTA), ainsi qu'une autre constituée d'une porphyrine simple reliée à quatre complexes de GdDOTA dont les études *in vitro* et *in vivo* sont détaillées dans les chapitres suivants.

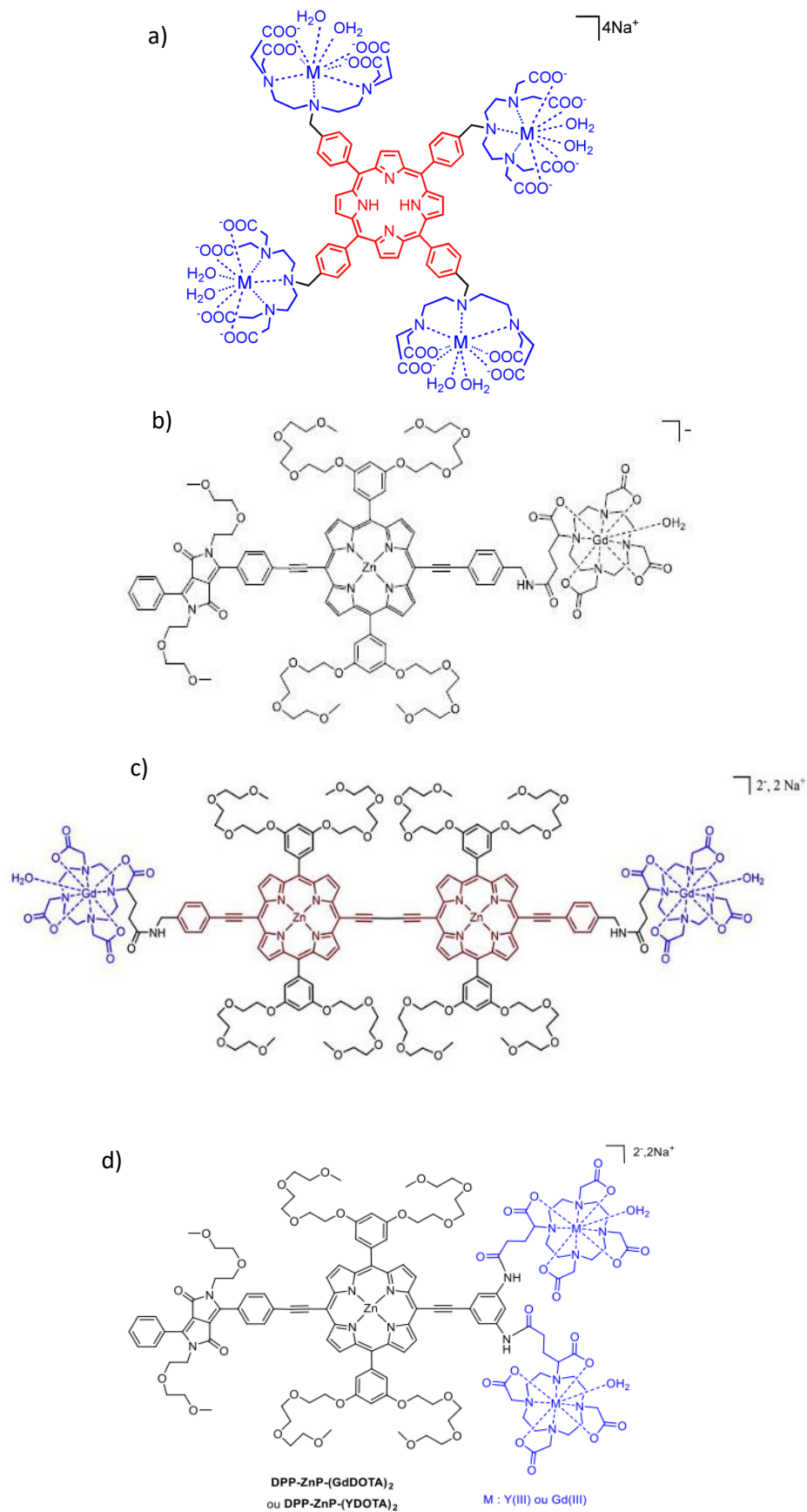


Figure 40. Structure du composé théranostique associant⁸² : a) une porphyrine reliée à quatre complexe GdDOTTA^{82a}, b) une porphyrine de zinc conjuguée à un dérivé de

dicétopyrrolopyrrole et reliée à un complexe GdDOTA^{82b}, c) GdDOTA-ZnP-ZnP-GdDOTA^{21c}, d) DPP-ZnP-2 GdDOTA^{82d}

Ces composés sont plus ou moins solubles, possèdent une très bonne valeur de relaxivité et un très bon rendement de formation d'oxygène singulet. Les études *in vitro* des composés dans des cellules HeLa ont montré une très bonne phototoxicité par excitation monophotonique et/ou biphotonique^{82,85}.

En 2020, l'équipe de Pereira et al.⁸⁶ a synthétisé de nouvelles entités chimiques multifonctionnelles, basées sur la molécule de triazine comme plate-forme de départ qui comporte trois bras portant des macrocycles de la famille des porphyrines et des chélates de type DOTA (DO3A) (voir Figure 41). Cette molécule présente des propriétés photophysiques et optiques intéressantes indiquant qu'ils ont un potentiel en tant qu'agents d'imagerie par fluorescence et par IRM si le ligand DO3A était par la suite complexé avec du Gd³⁺ et en tant que photosensibilisateur. Des études *in vitro* sont en cours et les développements futurs seront publiés ultérieurement⁸⁶.

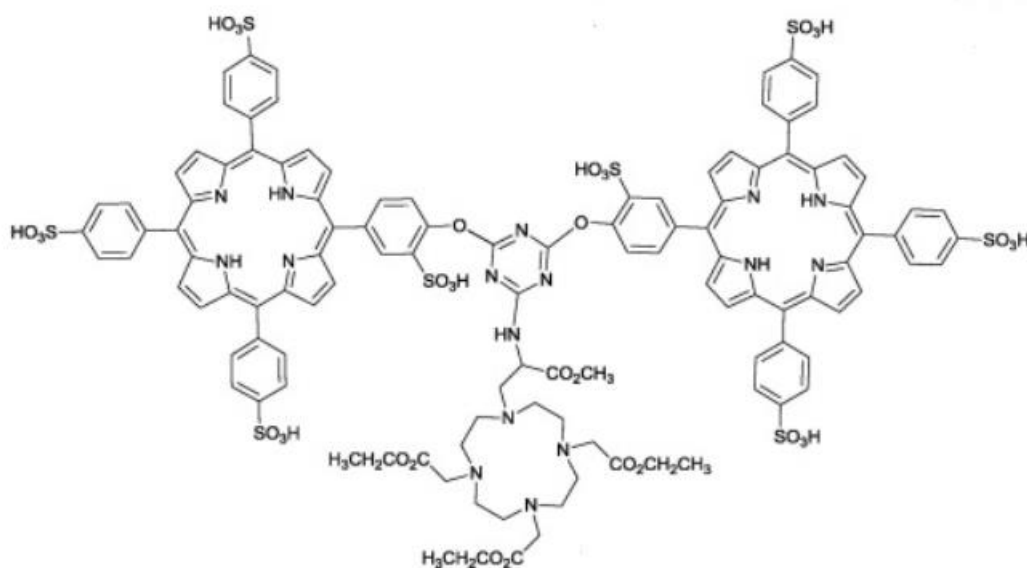


Figure 41 : Structure chimique du composé potentiellement théranostique (imagerie fluorescence et IRM)⁸⁶

Pour résumer, les agents actuels sont conçus pour des application en solution, *in vitro* et *in vivo* précliniques. Un bon agent théranostique PDT/IRM doit posséder une bonne relaxivité, un bon rendement quantique d'oxygène singulet, une longueur d'onde d'absorption comprise dans la fenêtre thérapeutique optique (proche infrarouge) pour une meilleure pénétration de la lumière, une bonne solubilité et une grande stabilité thermodynamique et cinétique. D'où l'importance de développer des agents théranostiques plus performants en améliorant ces propriétés physicochimiques et photophysiques pour une meilleure application préclinique, et par la suite clinique.

6. Description du projet

Problématique et stratégie thérapeutique générale

Les traitements actuels de cancer restent très éprouvants pour les patients avec des effets secondaires limitant les doses injectables. Le développement de nouvelles stratégies combinant thérapie, ciblage, activation locale et diagnostique reste une piste prometteuse qui permet de pallier ces effets secondaires. Les agents théranostiques sont idéaux pour la mise au point de telles stratégies car cela permet le suivi *in vivo* des molécules, de connaître leur cinétique de biodistribution ainsi que de vérifier le ciblage des principes actifs vers les tissus pathologiques afin d'optimiser l'efficacité du traitement.

Objectif du projet

Dans ce projet, nous proposons l'évaluation d'un premier agent théranostique dédié à la photothérapie dynamique conçu et synthétisé par nos collaborateurs du Laboratoire de Synthèse des Assemblages Moléculaires Multifonctionnels LSAMM à l'université de Strasbourg (Dr. Angélique Sour, Pr. Valérie Heitz) ainsi que la conception, la synthèse et l'évaluation d'un nouvel agent photosensibilisateur théranostique amélioré pour le traitement du cancer sur modèle tumoral préclinique.

Notre objectif à long terme étant de développer un nouveau traitement *in vivo*, nous proposons de montrer qu'il est possible de visualiser, traiter et suivre les effets du traitement d'une tumeur en utilisant un agent théranostique multifonctionnel constitué d'un agent de contraste pour l'IRM et un photosensibilisateur pour la PDT présentant les meilleures caractéristiques pour l'application du traitement *in vivo* chez des souris porteuses de tumeur, ici sur le modèle du colon CT26.

La stratégie consiste dans un premier temps à la conception et la synthèse et caractérisation du produit, puis dans un second temps au suivi *in vivo* de sa biodistribution par imagerie IRM pour déterminer le temps de rémanence du photosensibilisateur, pour connaître la fenêtre temporelle thérapeutique afin de procéder dans un troisième temps à la PDT : l'irradiation à des longueurs d'onde appropriées. Une fois le traitement appliqué nous suivrons la réponse thérapeutique par bioimagerie IRM, de bioluminescence *in vivo* ainsi que par histologie.

Conception

Notre système repose sur des agents théranostiques qui combinent un photosensibilisateur PS pour la photothérapie dynamique PDT et un agent de contraste pour l'imagerie IRM au sein du même édifice.

Ces PSs possèdent des systèmes π étendus permettant de déplacer l'absorption de l'irradiation vers la fenêtre thérapeutique optique et également permettre l'absorption biphotonique. Ils sont de plus conçus pour leur propriété amphiphile afin d'améliorer leur solubilité dans l'eau. Enfin, la fonctionnalisation de la porphyrine a été également réalisée en vue d'améliorer ses propriétés magnétiques pour augmenter sa relaxivité r_1 afin d'optimiser ses qualités de contraste par imagerie RM.

La mise en œuvre et le monitoring de la PDT nécessitent une connaissance précise de la localisation et de la taille de la tumeur. Il est donc intéressant d'utiliser les méthodes de biomageries permettant d'imager non seulement la biodistribution des photosensibilisateurs pour vérifier leur ciblage dans la tumeur ainsi que la fenêtre optimale de l'arrivée du photosensibilisateur, mais aussi pour établir un diagnostic de la tumeur et pour suivre l'efficacité du traitement. La modalité d'imagerie IRM, une technique d'imagerie 3D, à contraste excellent et non invasive, pour effectuer le suivi de l'agent théranostique *in vivo* ainsi que l'évaluation du traitement PDT constitue une modalité de bioimagerie de choix.

Plan de la thèse

Dans ce manuscrit, après un premier chapitre faisant l'état de l'art sur la photothérapie dynamique, les photosensibilisateurs et les agents théranostiques pour la PDT et l'IRM appliqués au cancer ainsi que la méthodologie en bioimagerie IRM, nous présentons dans un second chapitre la conception, la synthèse et la caractérisation chimiques et physicochimiques de deux agents théranostiques porphyriniques.

Nous exposons dans le troisième chapitre une étude *in vitro* de cytotoxicité et de phototoxicité, ainsi qu'une étude *in vivo* de biodistribution par IRM dynamique.

Puis, nous développons dans le quatrième chapitre la mise au point et l'application du traitement PDT ainsi que l'évaluation *in vivo* de son efficacité par bioimagerie IRM, de bioluminescence et par histologie.

Chapitre II

1. Synthèse et Caractérisation in vitro des agents théranostiques

Notre système repose sur des agents théranostiques qui combinent un photosensibilisateur porphyrinique pour la photothérapie dynamique et un agent de contraste pour l'imagerie IRM.

Ces PSs possèdent des systèmes π étendus permettant de déplacer l'absorption de l'irradiation vers la fenêtre thérapeutique optique autour de 650-700 nm et permettent également l'absorption biphotonique.

Toute la partie conception et synthèse à laquelle j'ai participé a été faite en collaboration avec le Dr. Angélique SOUR et le Dr. Alexis GOSSET au sein du Laboratoire de Synthèse des Assemblages Moléculaires Multifonctionnels LSAMM (Institut Lebel) dirigé par le Pr. Valérie HEITZ à l'université de Strasbourg.

1.1 Synthèse de PS1

La synthèse du premier agent théranostique étudié PS1 qui est constitué d'une base libre méso-tétraarylporphyrine reliée à quatre complexes Gd(III)DTTA (DTTA : diéthylènetriamine-N, N, N'', N''- tétraacétate) a déjà été publiée^{81 a}(voir Figure 42).

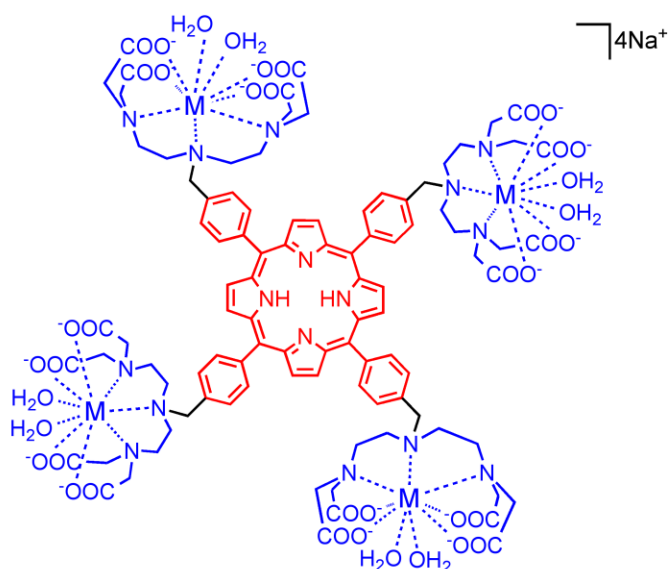


Figure 42: Structure chimique de l'agent théranostique PS1^{81 a}

1.2 Mode opératoire de la synthèse de PS2

Tous les réactifs et produits chimiques de départ provenaient du commerce avec la meilleure qualité disponible et ont été utilisés sans autre purification. Le tétrahydrofurane a été séché par distillation sur sodium et de la benzophénone. Le dichlorométhane sec a été obtenu par distillation sur CaH₂ sous argon. La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été réalisée sur des plaques de gel de silice 60 F254 sur support aluminium de Merck et la visualisation, si nécessaire, a été réalisée à l'aide de lumière UV. Des purifications par chromatographie sur colonne ont été effectuées sur de la silice (produits chimiques VWR, 60-200 mesh). La chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée à l'aide de Bio-Beads S-X1, 200-400 mesh (Bio-Rad). La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été effectuée sur un appareil Knauer équipé d'une colonne semi-préparative ou analytique C18 et d'un détecteur UV. Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide de spectromètres Bruker AVANCE 400 ou 500. Les déplacements chimiques sont indiqués en parties par million (ppm) par rapport au pic résiduel du solvant et les constantes de couplage (J) sont indiquées en Hertz (Hz). Pour obtenir une attribution complète des signaux, les techniques de RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) ont été utilisées. Dans les assignations, le déplacement chimique (d en ppm) est donné en premier, suivi, entre parenthèses, par la multiplicité du signal (s : singulet, d : doublet, t : triplet, m : multiplet, br s : signal large), le nombre de protons impliqués, la valeur des constantes de couplage en Hertz le cas échéant, et enfin l'assignation. Le spectrophotomètre UVIKON XL a été utilisé pour enregistrer les spectres UV-vis. Les spectres de masse ont été obtenus en utilisant un spectromètre MicroTOF de Bruker (ES-MS). La dialyse a été effectuée à l'aide d'appareils Spectrum Float-A-Lyzer G2 avec un seuil de poids moléculaire cut-off MWCO de 0,5 ou 1 kD. La diisopropylamine (Merck, 99 %), le CuI (Sigma-Aldrich, 99 %), le Pd(PPh₃)₄ (Strem Chemicals, 99 %), le TBTU (Fluka, 97 %), la N,N-diisopropyléthylamine (Sigma-Aldrich, 99 %) et le DO3AtBu-N-(2-aminoéthyl)éthanamide (Chematech, 97 %) ont été utilisés sans purification. Les composés 3-(triisopropylsilyl)propionaldéhyde, 4-iodo-3-hydroxybenzoate de méthyle, 9-méthoxy-1,4,7-trioxanoyltosylate, [5,10,15,20-tétrakis triisopropyléthynylporphyrine] zinc(II) et l'acide 2',2''-(10-(2-(2-aminoéthyl) amino)-2-oxoéthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl) triacétique ont été préparés conformément à la littérature.

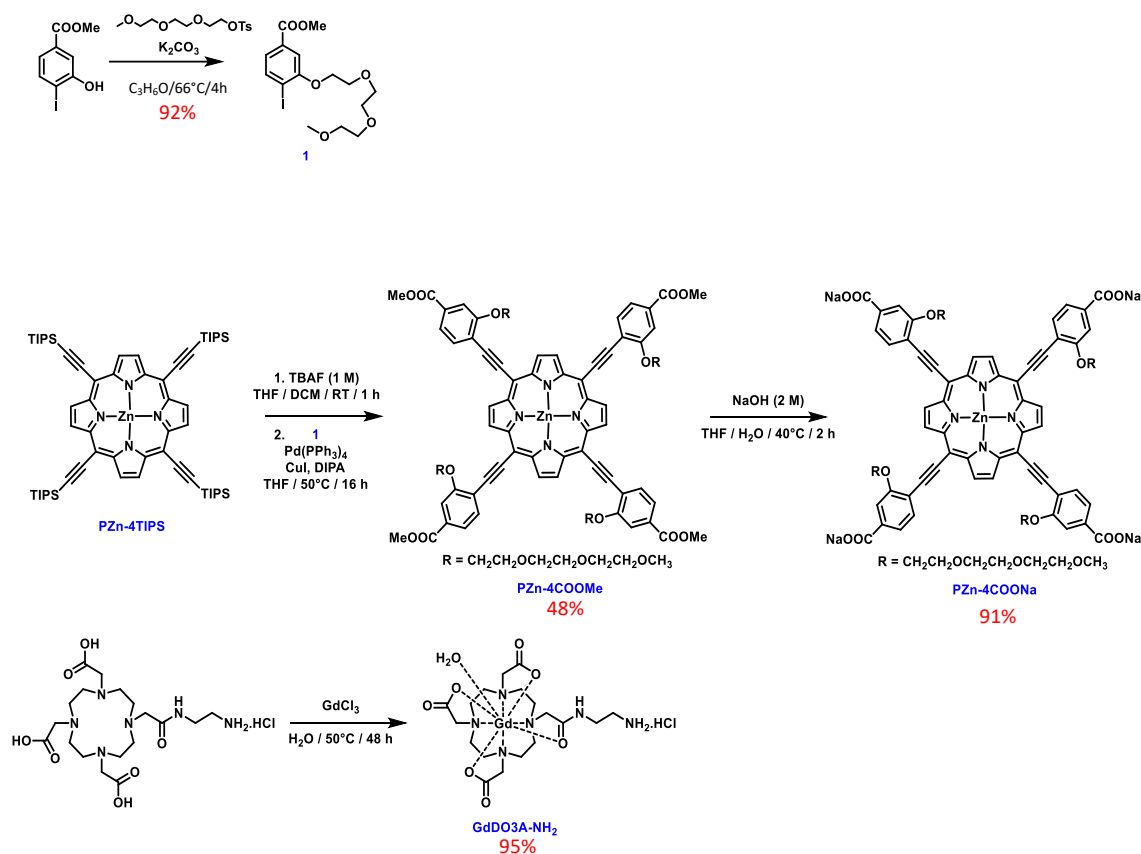
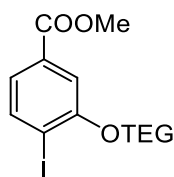


Figure 43: Schéma de synthèse de PS2

- *Méthyl 4-iodo-3-(2-(2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)benzoate (1)*



Formule chimique : $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{INO}_6$

Au méthyl 3-hydroxy-4-iodobenzoate (303 mg, 1,089 mmol) dégazé par trois cycles vide/argon, a été ajouté de l'acétone (1 ml), du K_2CO_3 (151 mg) et une solution du BrTEG (247 mg dans 1 ml d'acétone). Le mélange a été agité à 66°C pendant 4 heures, lavé avec de l'eau (0,8 ml) puis une extraction a été réalisé avec du DCM (3x1,5 ml).

Le produit résultant a été séchée sur du Na_2SO_4 et purifié par chromatographie flash (DCM / MeOH, 0 à 3%) pour donner une huile jaune pâle avec un rendement de 92% (426 mg).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₉), 7.45 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H₈), 7.36 (dd, $J = 8.1$ and 1.7 Hz, 1H, H₁₀), 4.23 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, H₇), 3.94 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, H₆), 3.90 (s, 3H, H₁₁), 3.83 – 3.80 (m, 2H, H₅), 3.71 – 3.64 (m, 4H, H_{3/4}), 3.56 – 3.53 (m, 2H, H₂), 3.37 (s, 3H, H₁). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 166.6, 157.7, 139.6, 131.6, 123.6, 112.5, 93.4, 72.1, 71.4, 70.9, 70.7, 69.5, 69.4, 59.2, 52.5. HRMS (ESI): de $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{INaO}_6$, m/z (calc) = 447.0275, m/z (found) = 447.0240 ($[\text{M}+\text{Na}^+]^+$, 100%).

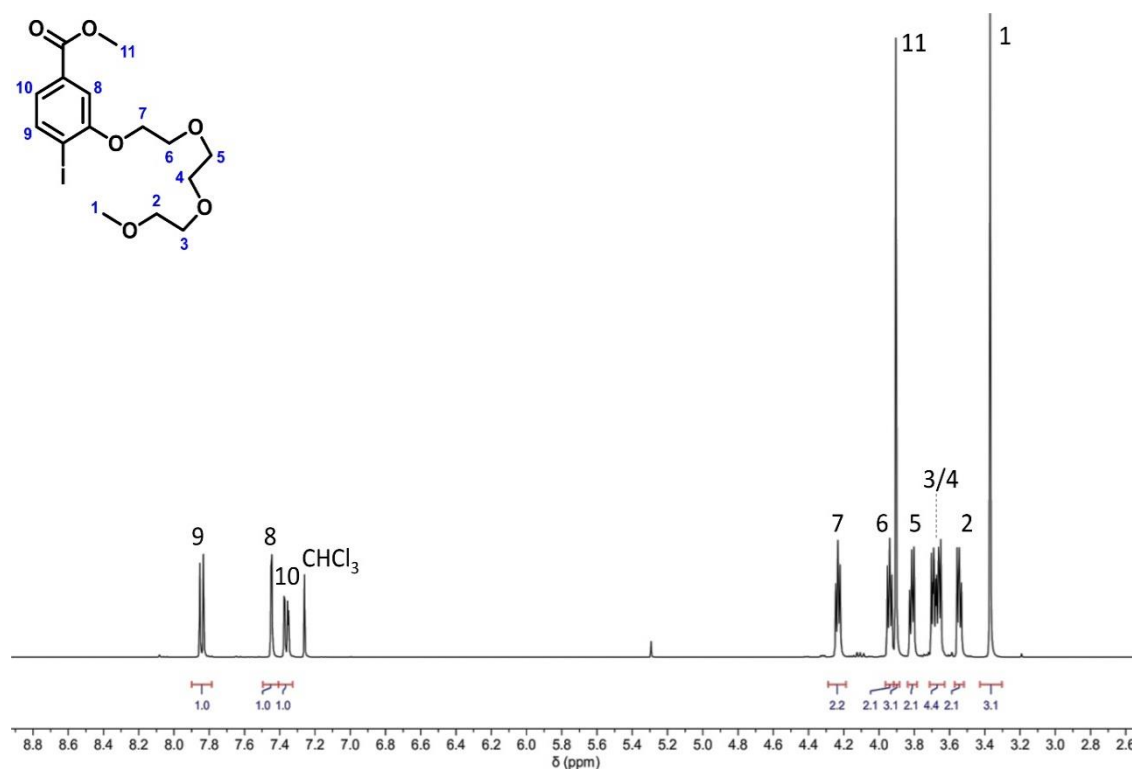


Figure 44: Spectre $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé 1

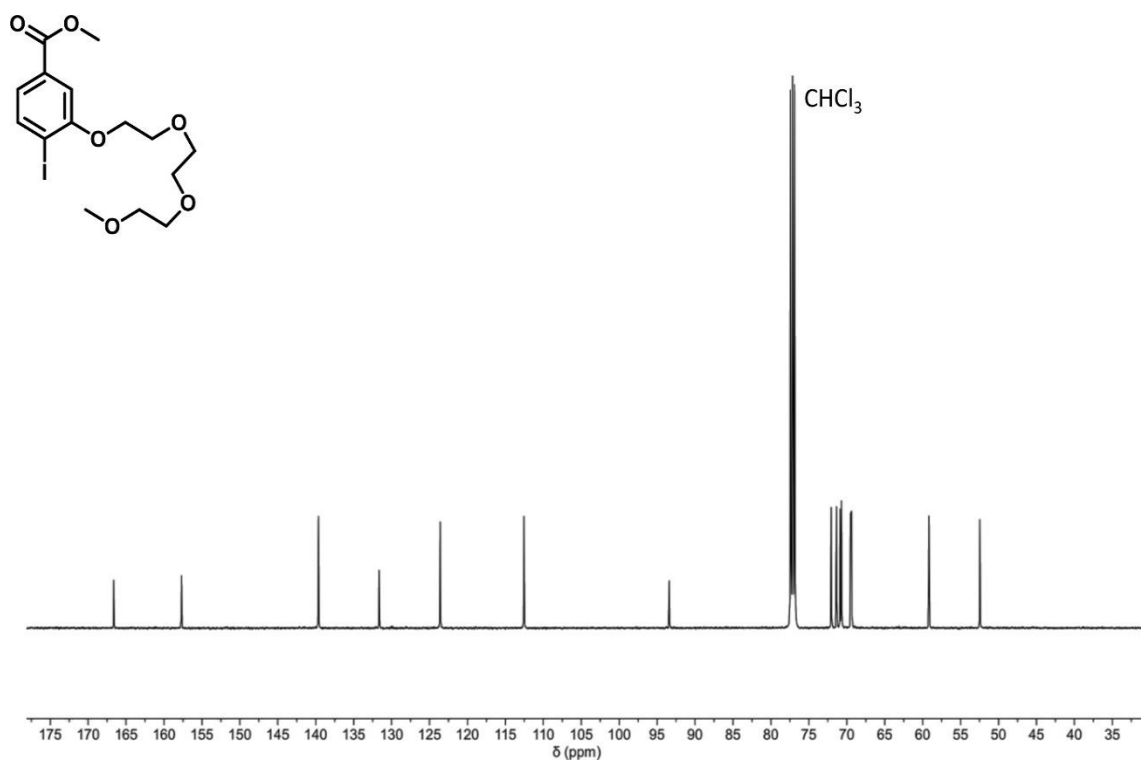


Figure 45: Spectre ^{13}C NMR (125 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé 1

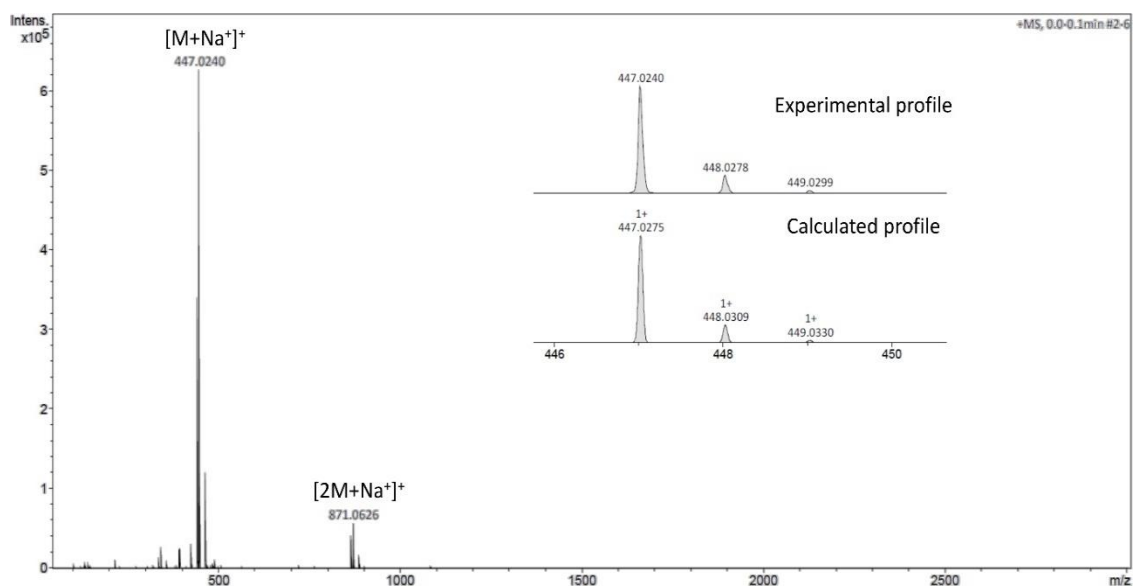
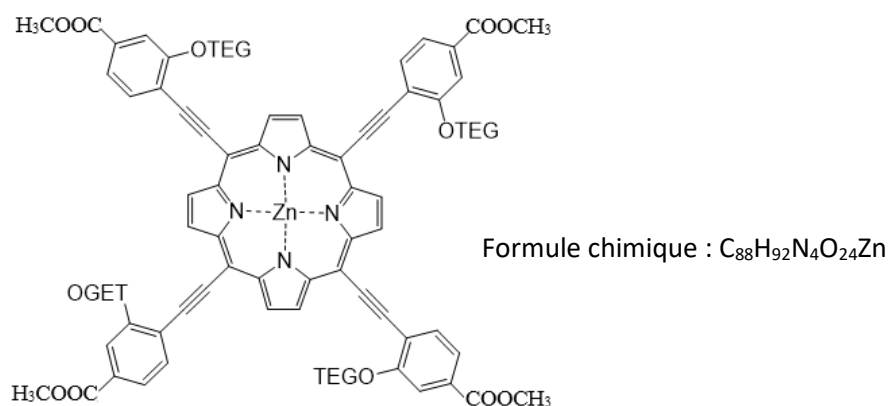


Figure 46: Spectre HR ES-MS du composé 1 et le profil calculé correspondant pour $[M+\text{Na}]^+$

- ***PZn-4COOMe***



À une solution de PZn-4TIPS (190 mg, 0,17 mmol) dégazée par trois cycles vide/argon, a été ajouté du THF (8,5 ml), du DCM (19,6 ml) et une solution de TBAF (1M, 0,46 ml). Le mélange a été agité à température ambiante pendant 30mn puis filtré après avoir ajouté 30ml d'eau et 30 ml d'éthanol. Au précipité, a été ajouté le produit 1 (172 mg), du $Pd(PPh_3)_4$ (42 mg), du CuI (8,7 mg), du $i(Pr)_2NH$ (1,6 ml) et du THF (8 ml). La solution résultante a été agitée pendant 3h à 50°C puis purifiée par chromatographie flash (DCM /PYR1%/MeOH1%) pour donner un solide violet avec un rendement de 48% (137 mg).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm) = 9.02 (s, 8H, H_{12}), 7.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, H_9), 7.68 (dd, $J = 7.8$ and 1.1 Hz, 4H, H_{10}), 7.62 (s, 4H, H_8), 4.53 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_7), 4.26 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_6), 4.04 (s, 12H, H_{11}), 3.82 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_5), 3.46 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_4), 2.94 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_3), 2.58 (t, $J = 5.0$ Hz, 8H, H_2), 2.39 (s, 12H, H_1). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm) = 166.4, 159.2, 150.8, 132.6, 130.7, 130.2, 130.2, 122.1, 118.6, 112.2, 102.0, 100.0, 92.6, 71.7, 71.0, 70.7, 70.4, 69.7, 68.2, 58.8, 58.8, 52.3, 47.9, 47.8, 19.1. HRMS (ESI): de $C_{88}H_{92}N_4O_{24}Zn$, m/z (calc) = 1677.5299, m/z (found) = 1677.5271 ($[M+Na]^+$, 100%).

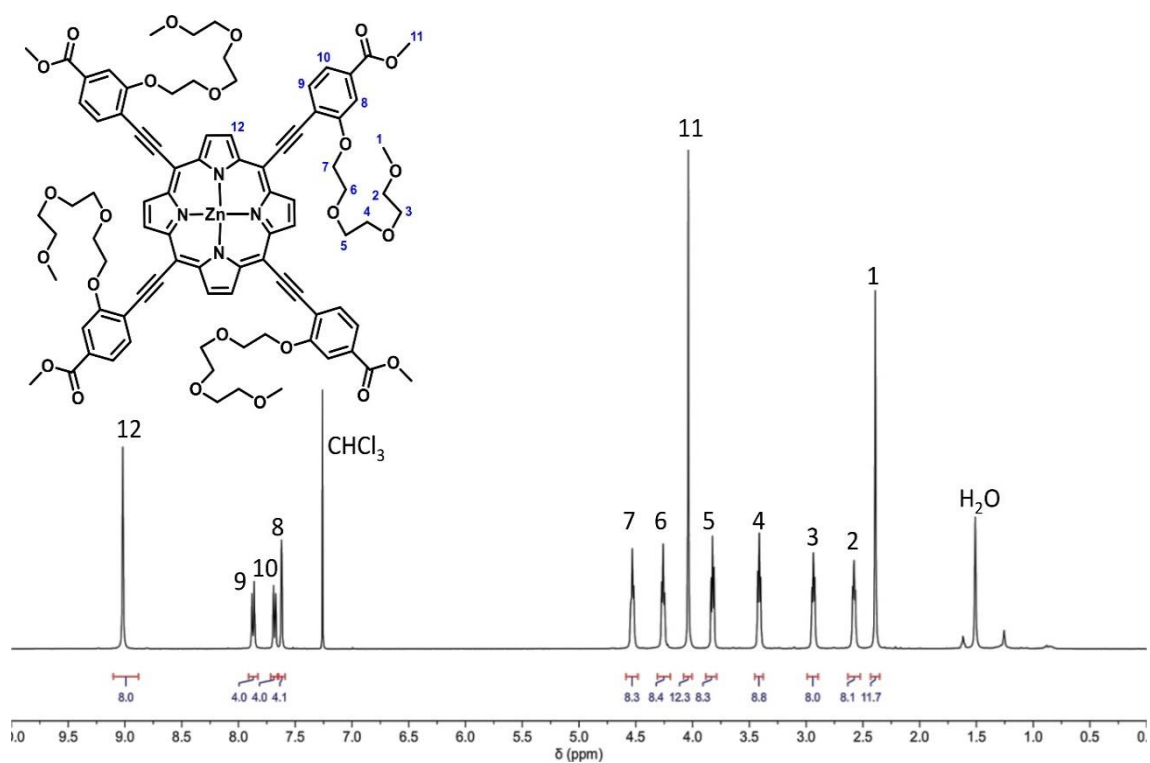


Figure 47: Spectre ^1H NMR (400 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé PZn-4COOMe

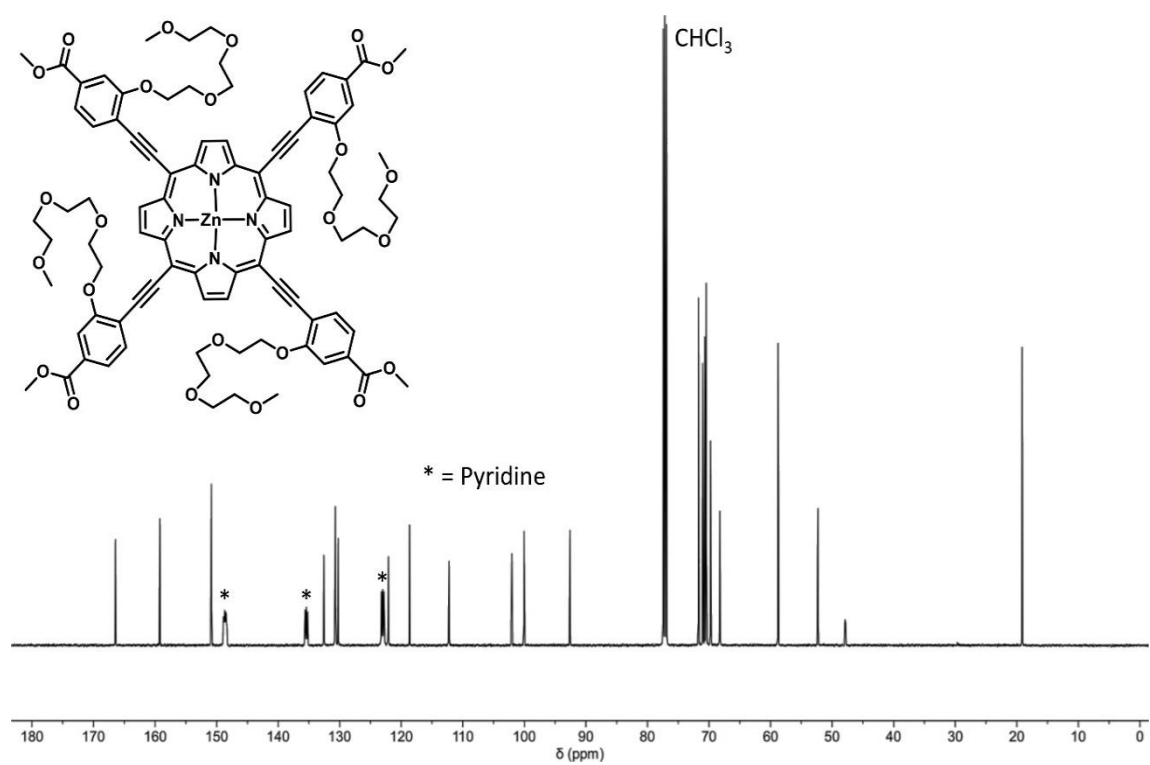


Figure 48: Spectre ^{13}C NMR (126 MHz, 298 K, $\text{CDCl}_3 + \text{Pyr-d}_5$) du composé PZn-4COOMe

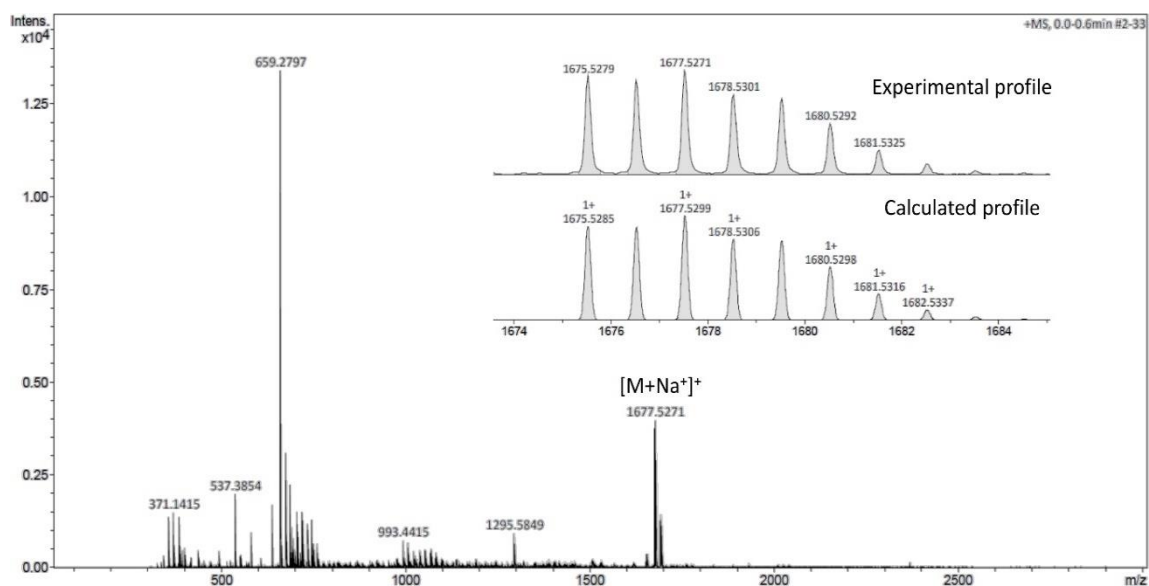
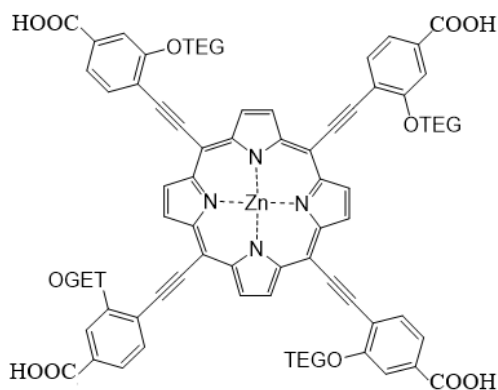


Figure 49: Spectre HR ES-MS du composé *PZn-4COOMe* et le profil calculé correspondant pour $[M+Na^+]^+$

- ***PZn-4COOH***



Formule chimique : $C_{84}H_{82}N_4O_{24}Zn$

À une solution de *PZn-4COOMe* (30 mg) dégazée par trois cycles vide/argon, a été ajouté du THF (5 ml) et du NaOH (2M, 0,9 ml). Le mélange a été agité à température ambiante pendant 2h 30mn. Après évaporation du THF, le mélange a été purifié par dialyse (3x2h, 800 ml eau milliQ) pour donner un solide violet avec un rendement de 91% (28 mg).

1H NMR (500 MHz, Pyr- d_5 , 298 K): δ (ppm) = 10.31 (s, 8H, H₁₁), 8.37 (s, 8H, H₉₋₁₀), 8.33 (s, 4H, H₈), 4.69 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₇), 4.45 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₆), 4.14 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₅), 3.85 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₄), 3.64 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₃), 3.44 (t, J = 5.0 Hz, 8H, H₂), 3.13 (s, 12H, H₁). ^{13}C NMR (126 MHz, Pyr- d_5 , 298 K): δ (ppm) = 168.5, 160.2, 152.3, 133.8, 133.2, 132.5, 117.7, 113.3, 103.7, 99.7, 94.3, 71.9, 71.1, 70.8, 70.5, 70.0,

68.7, 58.2, 40.8. **HRMS (ESI):** de $C_{84}H_{82}N_4O_{24}Zn$, m/z (calc) = 797.2311, m/z (found) = 797.2266 ($[M+2H]^{2+}$, 100%).

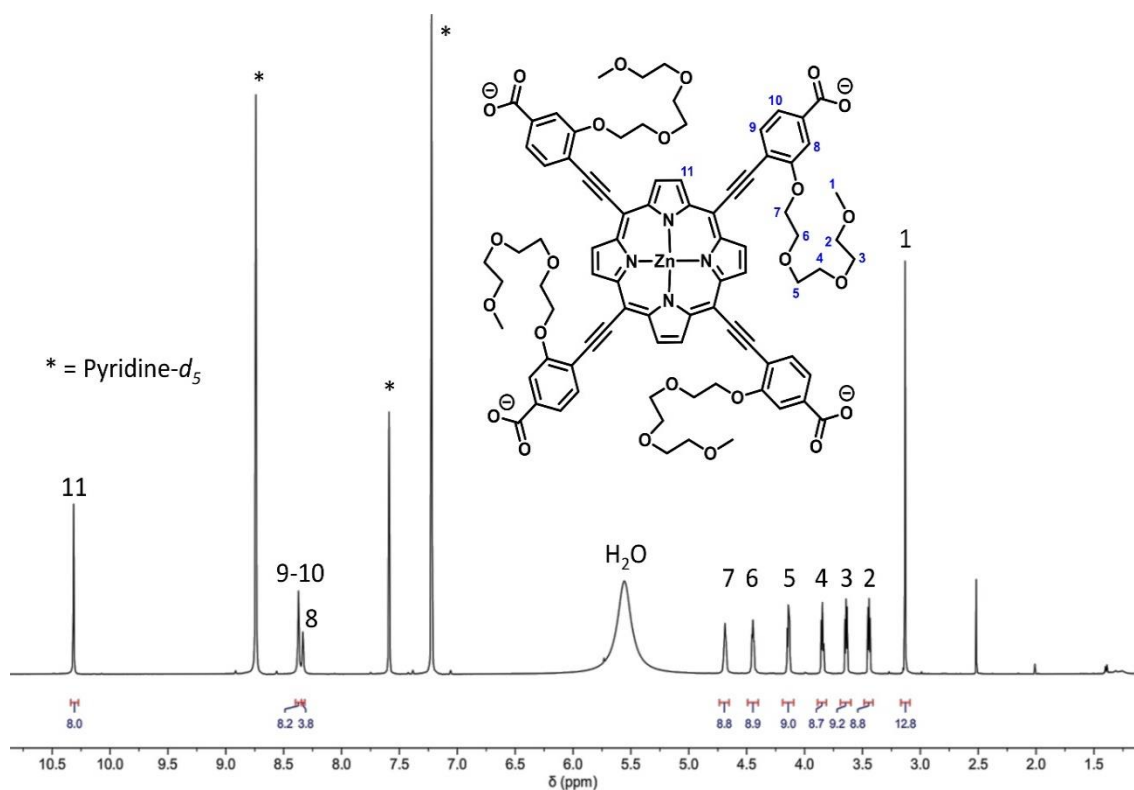


Figure 50: Spectre 1H NMR (500 MHz, 298 K, pyridine- d_5) du composé PZn-4COONa

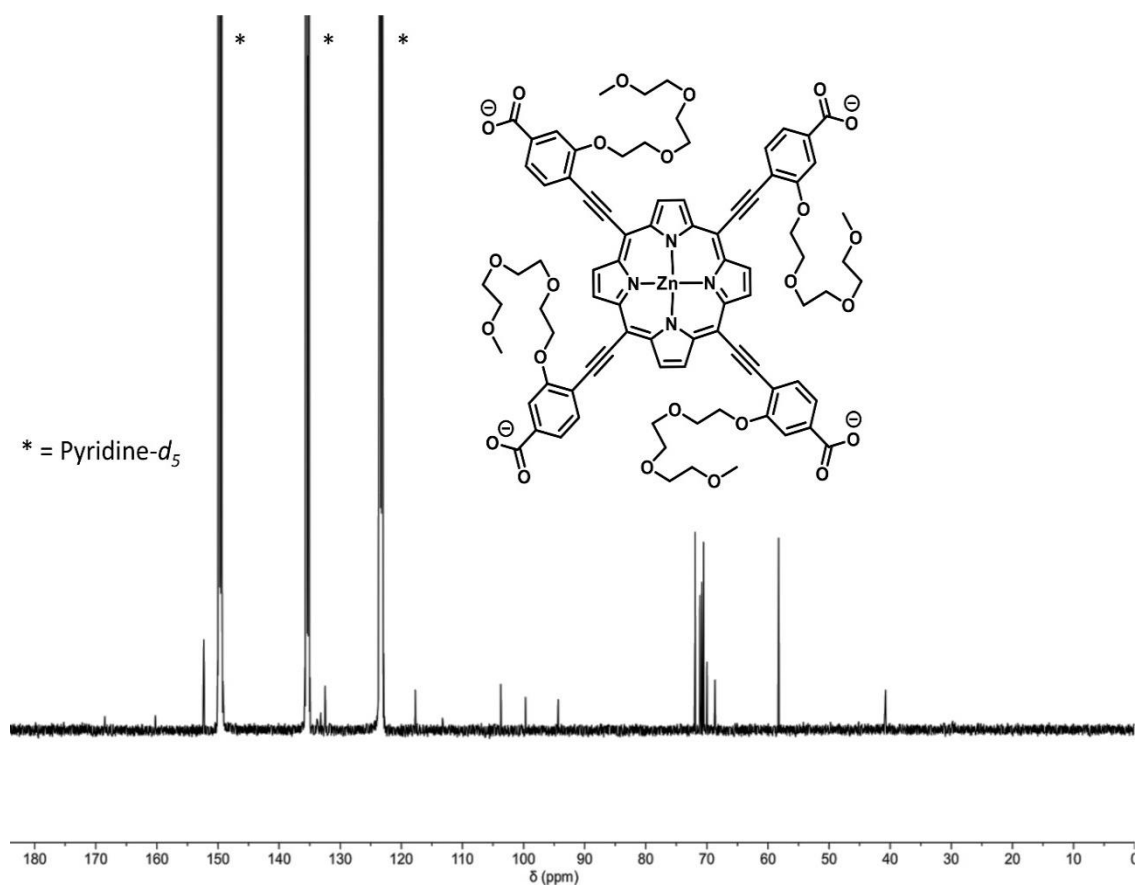


Figure 51: Spectre ^{13}C NMR (126 MHz, 298 K, pyridine- d_5) du composé PZn-4COONa

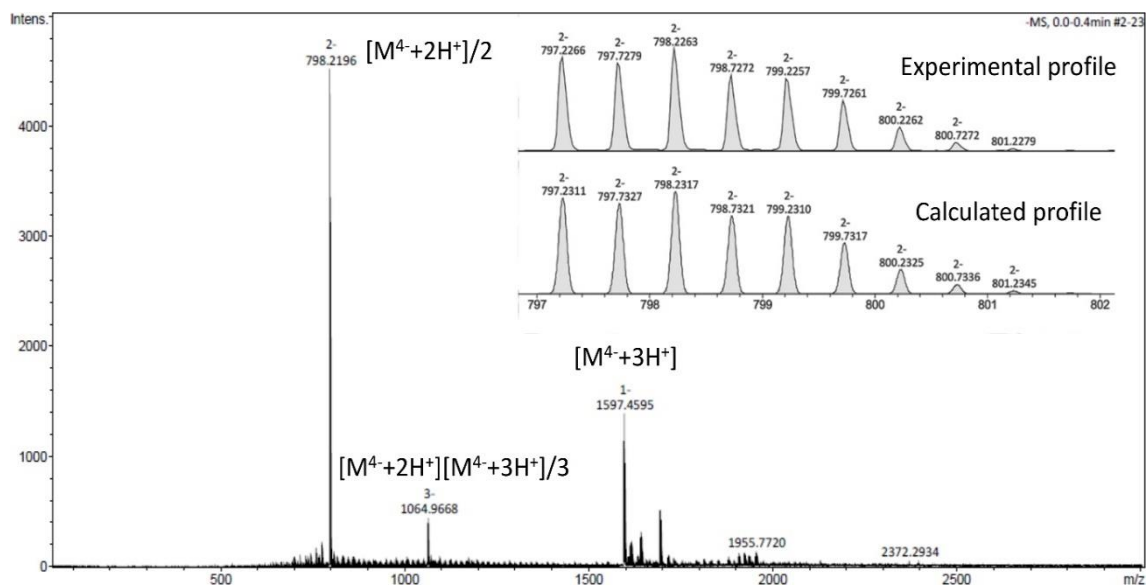
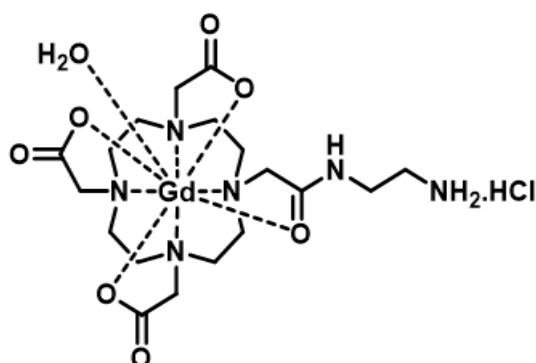


Figure 52: Spectre HR ES-MS de PZn-4COONa et le profil calculé correspondant pour $[\text{M}^4+2\text{H}^+]/2$

- **GdDO3A- NH₂**



Formule chimique : C₁₈H₃₂N₆O₇Gd

Le pH d'une solution de DO3A-N-(2-aminoéthyl)éthanamide (100 mg, 0,21 mmol, 1 eq. Société Chematech) dans H₂O (10 ml) a été ajusté à 6,5 avec une solution de NaOHaq (1 M) et le mélange a été ensuite agité à température ambiante pendant 20 minutes. Une solution aqueuse de GdCl₃ (57 mM, 3,50 ml, 0,23 mmol, 1,1 éq.) a été ajoutée goutte à goutte, et le pH a été ajusté à 6,5. Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 heures à 50°C, puis le pH a été réajusté à 6,5, et le mélange réactionnel a été à nouveau agité à 50°C pendant 48 heures. Les sels et l'excès de Gd ont été éliminés suite à trois dialyses dans de l'eau ultra pure à travers une membrane MWCO de 0,5 kDa, ce qui a donné le produit souhaité sous forme de solide blanc avec un rendement de 95 % (129 mg).

HRMS (ESI): de C₁₈H₃₂N₆O₇Gd, m/z (calc) = 602.1602, m/z (found) = 602.1572 ([M+H]⁺, 100%).

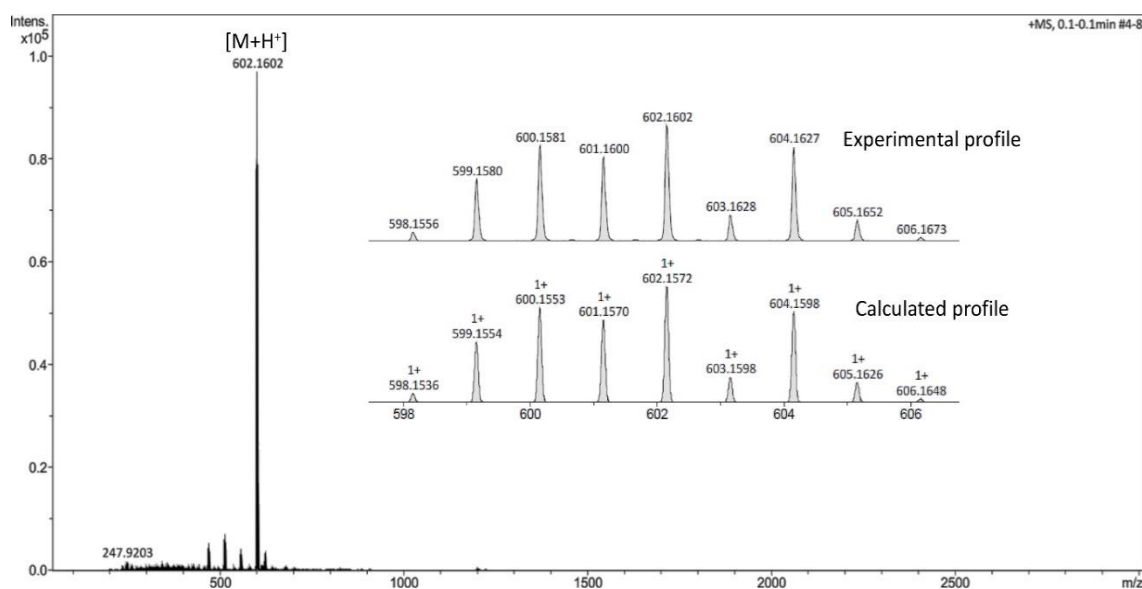
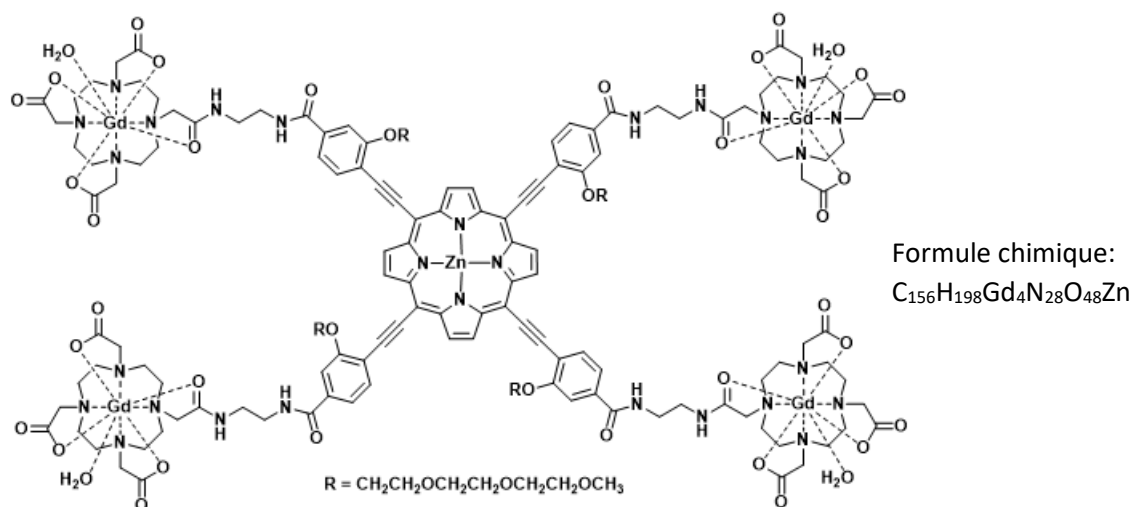


Figure 53: Spectre HR ES-MS de GdDO3A-NH₂ et le profil calculé correspondant pour [M+H]⁺

- *PZn-4[GdDO3A]*



Le composé a été obtenu par Alexis Gosset dans les conditions suivantes : une solution de PZn-4COONa dans du DMSO a été agitée en présence TBTU et de N,N-diisopropyléthylamine pendant une heure à température ambiante puis GdDO₃A-NH₂ (5equiv) a été ajouté, et le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 4 jours. Le PS2 a été obtenu après purification par HPLC avec un rendement de 59 %. Il a été caractérisé par HR-MS et ICP-MS. (4001g/mol)

1.3 Caractérisation photophysique

1.3.1 Mesures spectroscopiques

Les spectres d'absorption des échantillons ont été mesurés avec un spectromètre SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Les spectres d'émission ont été mesurés après irradiation de l'échantillon dans des cuves de quartz à fluorescence (largeur 1 cm) à l'aide d'un oscillateur paramétrique optique pompé NT342B Nd-YAG (Ekspla, Vilnius, Lituanie) à 510 nm. La luminescence a été focalisée et collectée à angle droit par rapport à la voie d'excitation et elle a été dirigée vers un monochromateur Princeton Instruments Acton SP-2300i. et détectée à l'aide d'une caméra CCD PI-Max 4 (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA)²⁰.

1.3.2 Mesures du rendement quantique de luminescence

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport du nombre de photons émis, au nombre de photons absorbés par un matériau.

Pour la détermination du rendement quantique de luminescence, les échantillons ont été préparés dans une solution de D₂O avec une absorbance de 0,1 à 510 nm. Cette solution a été irradiée à 510 nm et le signal d'émission a été détecté avec le même système de mesure spectroscopiques. Les rendements quantiques de luminescence ont été déterminés par comparaison avec la référence rose de bengale et le bleu de méthylène hydraté préparé dans les mêmes conditions que le photosensibilisateur à tester en appliquant la formule suivante²⁰:

$$\Phi_{em, \text{échantillon}} = \Phi_{em, \text{référence}} \times (F_{\text{référence}} / F_{\text{échantillon}}) \times (I_{\text{échantillon}} / I_{\text{référence}}) \times (n_{\text{échantillon}} / n_{\text{référence}})^2$$
$$F = 1 - 10^{-A}$$

Φ_{em} = rendement quantique de luminescence, F = fraction de lumière absorbée, I = intensités d'émission intégrées, n = indice de réfraction, A = absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde d'irradiation.

1.3.3 Mesures de la durée de vie de la luminescence

La durée de vie de fluorescence, τ_f , ou temps de déclin de fluorescence correspond à la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal (picoseconde). Cette durée est assimilable à la demi-vie de l'état excité.

Pour la détermination des durées de vie, les échantillons ont été préparés dans une solution saturée d'air par bullage d'air avec une absorbance de 0,1 à 510 nm. Cette solution a été irradiée dans des cuvettes de quartz de fluorescence (largeur 1 cm) en utilisant un oscillateur paramétrique optique pompé NT342B Nd-YAG (Ekspla, Vilnius, Lituanie) à 510 nm. Le signal d'émission a été focalisé et collecté à angle droit par rapport à la voie d'excitation et dirigé vers un monochromateur Princeton Instruments Acton SP-2300i puis détecté par un photomultiplicateur²⁰.

1.3.4 Mesures du rendement quantique de l'oxygène singulet

- **Mesure directe**

La mesure est dite directe car elle se base sur la luminescence de l'oxygène singulet formé après excitation avec une longueur d'onde appropriée.

Les échantillons ont été préparés dans une solution de CH₃CN ou D₂O selon la solubilité du photosensibilisateur testé, saturé d'air avec une absorbance de 0,2 à 510 nm. Cette solution a été irradiée dans des cuvettes de quartz à fluorescence (largeur 1 cm) à l'aide d'une LED, dont l'irradiation est centrée à 510 nm. L'intensité de l'irradiation a été mesurée avec un compteur de puissance et d'énergie optique. Un détecteur à diode au germanium refroidi à l'azote liquide sensible à l'IR a été utilisé. La luminescence de l'oxygène singulet à 1270 nm a été mesurée en enregistrant des spectres de 1100 à 1400 nm. Pour l'analyse des données, les pics de luminescence de l'oxygène singulet à différentes intensités d'irradiation ont été intégrés. Les zones résultantes ont été tracées en fonction du pourcentage de l'intensité d'irradiation et la pente de la régression linéaire a été calculée. L'absorbance de l'échantillon a été corrigée avec un facteur de correction d'absorbance. Comme référence, le bleu de méthylène hydraté et le rose de bengale ont été utilisés et les rendements quantiques d'oxygène singulet ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\Phi_{\text{échantillon}} = \Phi_{\text{référence}} \times \left(\frac{S_{\text{échantillon}}}{S_{\text{référence}}} \right) \times \left(\frac{I_{\text{référence}}}{I_{\text{échantillon}}} \right) I = I_0 * (1 - 10^{-A})$$

Φ = rendement quantique d'oxygène singulet, S = pente de la régression linéaire du tracé des zones des pics de luminescence d'oxygène singulet en fonction de l'intensité d'irradiation, I = facteur de correction d'absorbance, I₀ = intensité lumineuse de la source d'irradiation, et A = absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde d'irradiation.

- **Mesure indirecte**

Il existe de nombreuses sondes chimiques décrites pour réagir avec l'oxygène singulet dont le spectre d'absorption ou d'émission de fluorescence va être modifié après réaction

avec l'oxygène singulet. Parmi ces sondes, nous distinguons celles détectables par spectroscopie d'absorption UV, comme le *N,N*-diméthyl-4-nitrosoaniline (RNO) en présence d'imidazole²⁷.

Le test est basé sur le blanchiment (secondaire) de la *p*-nitrosodiméthylaniline (RNO) induite par la réaction de l' O_2 , avec l'imidazole ou l'histidine. Le produit intermédiaire de la réaction de l' O_2 avec le dérivé d'imidazole, un peroxyde, provoque le bleaching du RNO (-RNO, suivi à 440 nm). En l'absence de RNO, le peroxyde se réorganise ou se décompose en un produit final d'oxygénation AO₂.

Pour la mesure dans le solvant CH₃CN, les échantillons ont été préparés dans une solution CH₃CN saturée en air contenant le complexe avec une absorbance de 0,2 à la longueur d'onde d'irradiation, la *N,N*-diméthyl-4-nitrosoaniline aniline (RNO, 24 μM) et l'imidazole (12 mM). Pour la mesure dans la solution tampon PBS, les échantillons ont été préparés dans une solution PBS saturée d'air contenant le complexe avec une absorbance de 0,1 à la longueur d'onde d'irradiation, la *N,N*-diméthyl-4-nitrosoaniline aniline (RNO, 20 μM) et l'histidine (10 mM). Les échantillons ont été irradiés sur des plaques à 96 puits avec un irradiateur Atlas Photonics LUMOS BIO (Atlas Photonics, Fribourg, Suisse) pendant un intervalle de temps de 10 mn. L'absorbance des échantillons a été mesurée pendant cet intervalle de temps avec un lecteur de microplaques SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). La différence d'absorbance (A₀-A) à 510 nm pour la solution CH₃CN ou à 510 nm une solution tampon PBS a été calculée et tracée en fonction des temps d'irradiation. À partir du graphique, la pente de la régression linéaire a été calculée ainsi que le facteur de correction d'absorbance déterminé. Les rendements quantiques d'oxygène singulet ont été calculés en utilisant les mêmes formules que celles utilisées pour l'évaluation directe.

1.3.5 Photostabilité

L'échantillon a été préparé dans une solution d'eau saturée d'air. À l'aide d'un irradiateur Atlas Photonics LUMOS BIO, l'échantillon a été constamment irradié à 510 nm dans des intervalles de temps de 0 à 10 min (13,2 J cm⁻²). L'absorption de 350 à 700 nm a été enregistrée avec un lecteur de microplaque (SpectraMax M2 Lecteur) à chaque intervalle de temps²⁰.

1.3.6 Mesure de relaxivité

Des échantillons de PS-Gd1 et PS-Gd2 ont été dilués dans une solution d'injection (NaCl 0,108 M) à diverses concentrations de Gd (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 mM).

Des expériences de relaxivité *in vitro* ont été réalisées en enregistrant des cartographies T_1 et T_2 avec un spectromètre vertical de micro-imagerie IRM 7T équipé d'un aimant réfrigéré ultra-blindé (300WB, Bruker, Avance II, Wissembourg, France), d'une bobine RF birdcage quadrature d'un diamètre intérieur de 40 mm (Bruker) et d'un fourreau de gradient à blindage actif de $200 \text{ mT}\cdot\text{m}^{-1}$.



Figure 54 : Spectromètre vertical à 7 T, Plateforme IRM ENSCP, PIV, LIOPA.

Le logiciel Paravision 5.1 a permis les acquisitions avec les paramètres suivants: pour la cartographie T_1 : une séquence de saturation récupération avec TR variable, RARE; TE = 13 ms; TR = 15 s, 8 s, 3 s, 1,2 s, 0,8 s, 0,594 s, 0,3 s, 0,144 s, 0,05 s, 0,033 s, facteur RARE 2; pour la cartographie T_2 : une séquence MSME multi-échos à TE variable: impulsion hermitienne, TR / TE = 15 s / 11 ms, 32 échos de 11ms à environ 400ms. Des champs de vision de $3 \times 3 \text{ cm}^2$, une taille de matrice de 128 x 64 et une tranche d'une épaisseur de 1,5 mm ont été utilisés pour les deux cartographies⁸.

Les temps de relaxation T_1 et T_2 de chaque échantillon ont été calculés en ajustant l'intensité du signal S pondérée T_1 et T_2 avec la relation (pour T_1 : $y = A + B \times (1 - \exp^{-1/T_1})$) ; pour T_2 : $y = A + B \times (1 - \exp^{-1/T_2})$).

Les relaxivités molaires r_1 et r_2 en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ont été obtenues en utilisant l'équation suivante :

$$1/T_y = r_y \cdot [\text{Gd}] + 1/T_{y,0} \quad \text{avec } y: 1 \text{ ou } 2.$$

1.4 Résultats et discussions

1.4.1 Conception des agents théranostiques

- **PS1**

Le PS-Gd1 est constitué d'une base libre méso-tétraphénylporphyrine qui permet la PDT par excitation monophotonique, reliée à quatre complexes Gd(III)DTTA (DTTA : diéthylènetriamine-N, N, N'', N''- tétraacétate) qui apportent la fonction d'imagerie. Le DTTA étant un ligand heptadentate, deux molécules d'eau complètent la sphère de coordination de l'ion Gd(III) de chaque complexe. Un lien rigide court a été choisi pour connecter les agents de contraste et la porphyrine. Cela a pour but de limiter la flexibilité du système et optimise sa relaxivité.

- **PS2**

La stratégie de synthèse utilisée est de type modulaire à partir de trois composants. Le premier est une porphyrine de zinc conjuguée avec une triple liaison à un cycle benzoate afin d'étendre la conjugaison π pour déplacer l'absorption vers le proche infrarouge, formant ainsi le PS capable d'être activé par excitation mono-photonique à une longueur d'onde comprise dans la fenêtre thérapeutique optique. Le second est un espaceur permettant de relier les différents composés et qui contient une chaîne de TEG pour augmenter la solubilité dans l'eau, et le troisième est un agent de contraste pour l'IRM, un ligand octadentate GdDOTA pour assurer une grande stabilité vis-à-vis du relargage de l'ion Gd^{3+} toxique, et qui a été acheté pour faciliter la synthèse (Chematech). Le nombre de complexes de Gd (III) par PS permet non seulement l'augmentation de la relaxivité mais aussi la diminution de la concentration de produit utilisé sachant qu'un agent de contraste IRM est généralement utilisé, environ 100 fois plus concentré que le PS pour la PDT pour obtenir un bon contraste de l'image IRM (environ 10mM, dans un volume de 100ul) et une quantité suffisante pour induire un effet PDT (100 μM , 100ul).

1.4.2 Mesures spectroscopiques

Les propriétés d'absorption et d'émission des photosensibilisateurs 1 et 2 ont été examinées dans un tampon phosphate à un pH de 7, et les spectres sont indiqués à la figure 57.

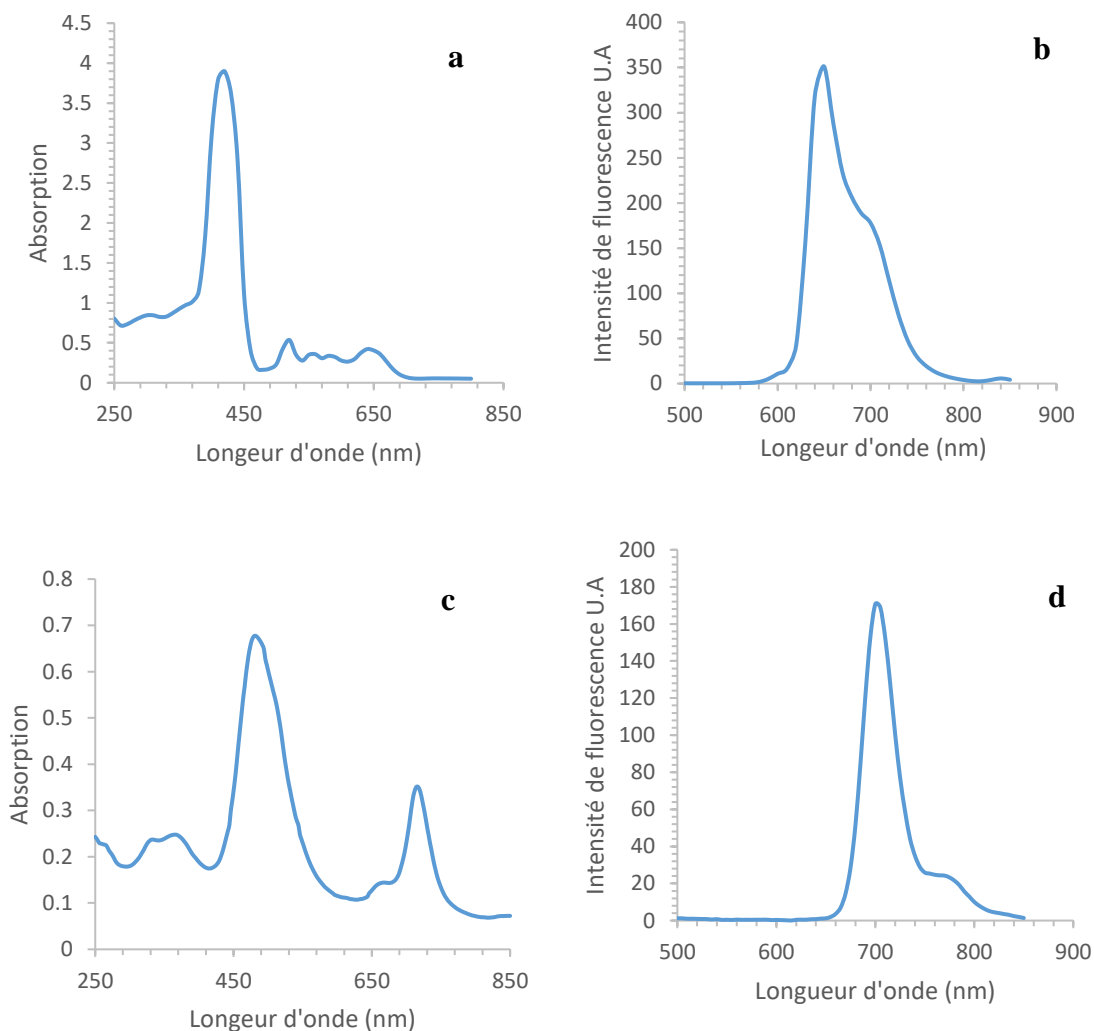


Figure 55 : Spectre d'absorption et d'émission des composés thérapeutiques dans l'eau (pH 7): a,b) PS1, c,d) PS2

Le spectre d'absorption du PS1 présente les caractéristiques typiques des tétraarylporphyrines, telles qu'une bande de Soret intense près de 430 nm et quatre bandes Q dans la gamme 515-655 nm.

Le spectre d'absorption du PS2 décalé vers le rouge dû à l'étendu du système de conjugaison d'électron pi présente une bande de Soret intense près de 500 nm et deux bandes Q dans la gamme 650-740 nm. Dans ce cas, l'absorbance du produit n'atteint pas le zéro, dû probablement à une éventuelle agrégation.

Le rendement quantique de fluorescence mesuré dans H₂O est de 7,2% pour le PS1 et 2% pour le PS2, et la durée de vie dans le même solvant est de 11 ns et 30 ns respectivement, ces valeurs sont comparables à celle d'autres porphyrines base libres (sans métal) ou métallées hydrosolubles^{87,85}. Ces valeurs sont indicatives de l'absence de phénomènes d'agrégation dans la gamme de concentration explorée (<5 μM) et montrent que la présence des quatre complexes de gadolinium (III) annexés n'est pas préjudiciable aux propriétés d'absorbance et de fluorescence de la porphyrine.

1.4.3 Mesures du rendement quantique de l'oxygène singulet

Le rendement quantique de formation de l'oxygène singulet a été déterminé par les méthodes directe et indirecte, en utilisant deux longueurs d'ondes d'irradiation (510 et 645 nm). Une valeur de $\phi\Delta = 0,42$ et $\phi\Delta = 0,39$ a été obtenue à 510 nm avec la méthode indirecte et directe respectivement pour le PS1, similaire à celle de la porphyrine de référence TPPS4 largement utilisée⁷, la méso-tétra (4-sulfonatophényl) porphine (TPPS4), un PS tétrapyrrolique hydrosoluble qui a une bande d'absorption autour de 640 nm, similaire à nos PS, et une valeur de $\phi\Delta = 0,24$ et $\phi\Delta = 0,28$ à 645 nm due à une plus faible absorption du produit à cette longueur d'onde comparé à la longueur d'onde de 510 nm. Il est important de noter que le même résultat a été obtenu pour le PS1 dans des études antérieures publiées par l'équipe du Pr. Valérie Heitz, où un rendement quantique de 45% à 510 nm dans l'eau a été mesuré.

Concernant les valeurs pour le PS2, une valeur de $\phi\Delta = 0,38$ a été obtenue en mesure indirecte à 510 nm dans l'eau.

Le rendement quantique obtenu avec les deux PS en milieu aqueux est très proche de celui des porphyrines obtenues dans un milieu organique, ce qui indique que les deux composés ont un potentiel de photosensibilisation efficace en solution aqueuse.

1.4.4 Photostabilité

L'expérience de photostabilité des porphyrines dans l'eau non déoxygénée a également démontré que les composés sont stables lors d'une irradiation à 510 nm dans des intervalles de temps de 0 à 10 min (13,2 J.cm⁻²) correspondant aux durées typiques utilisées lors d'expériences *in vivo*, comme le confirme l'invariance de son spectre d'absorption (voir Figure 58). Cette caractéristique est importante en vue de l'application *in vivo* comme photosensibilisateur.

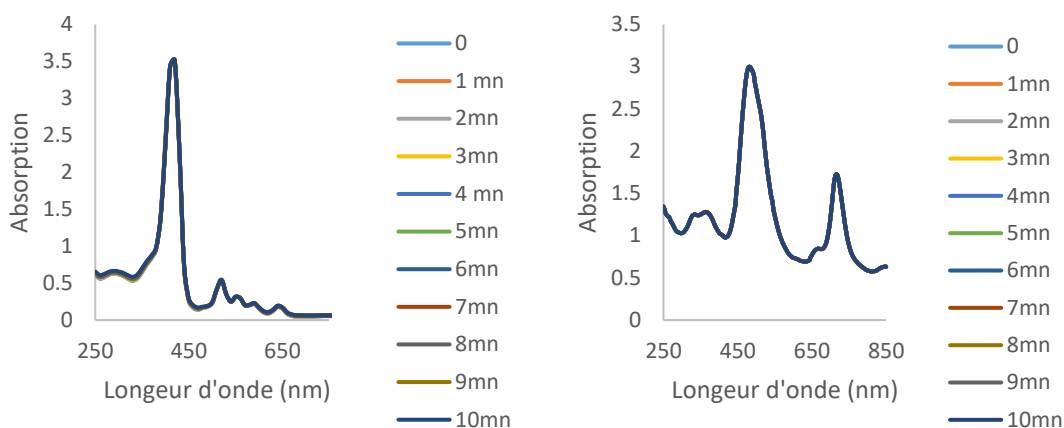


Figure 56: Etude de photostabilité dans l'eau : évolution du spectre d'absorption après irradiation du : a) PS1 et b) PS2

Encore une fois, l'absorbance du produit n'atteint pas le zéro, dû à une agrégation des molécules.

1.4.5 Mesure de relaxivités

Les relaxivités du PS1 et PS2 ont été mesurées dans la solution d'injection (NaCl 0,108M) à diverses concentrations de Gd (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 mM).

Nous avons enregistré une relaxivité (à 7T, 293K) de $r_1 = 7,5$ et $r_2 = 68,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le PS1, et $r_1 = 11$ et $r_2 = 77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le PS2 qui sont des valeurs supérieures à celles du DOTAREM commercial ($r_1 = 3,9$ et $r_2 = 4,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

L'augmentation de la relaxivité r_1 peut s'expliquer par l'augmentation de la taille des agents de contrastes liée à l'ajout des 4 complexes de gadolinium à un photosensibilisateur limitant ainsi la mobilité de la molécule. Le bras espaceur entre le PS et les complexes de gadolinium plus ou moins rigides influencent aussi sur la rotation et donc la relaxivité, en effet plus il est rigide plus la rotation est restreinte et la relaxivité r_1 élevée. De plus, le DTTA du PS1 étant un ligand heptadentate, deux molécules d'eau complètent la sphère de coordination de l'ion Gd(III) de chaque complexe, optimisant ainsi sa relaxivité.

Le PS1 est plus rigide que PS2, la relaxivité est certainement plus élevée à des champs magnétiques entre 20 et 120 MHz, en effet, la relaxivité des protons mesurés dans H₂O à 20 MHz et 25 °C effectuée dans des études antérieures par l'équipe de Pr. Valerie Heitz était de $r_1 = 43,7 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

A 7 T, la relaxivité est notamment gouvernée par la taille des molécules et donc par le temps de corrélation de rotation, la valeur plus élevée de la relaxivité du PS2 peut être due à la taille plus élevée du PS2 par rapport au PS1 ($M = 4001 \text{ g.mol}^{-1}$ à $M = 2616 \text{ g.mol}^{-1}$ respectivement) diminuant sa rotation et augmentant son temps de corrélation rotationnel τ_c . La valeur élevée de r_2 exprime un comportement macromoléculaire ou d'aggrégation à ces concentrations de l'ordre du mM. L'enregistrement des profils NMRD⁶⁴ qui fournit des profils de relaxivité RMN en fonction du champ magnétique, typiques d'un comportement moléculaire ou macromoléculaire, pourrait nous renseigner sur ce comportement dynamique macromoléculaire.

Ces photosensibilisateurs théranostiques se comportent donc comme des agents de contraste puissants à 7T, avec des propriétés magnétiques améliorées par rapport à l'agent commercial de référence DOTAREM.

Tableau 2: valeurs des relaxivités r_1 et r_2 en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ du PS1, PS2 et du DOTAREM à 7T 293K.

PS1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	PS2 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	DOTAREM® ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
$r_1 = 7,5$	$r_1 = 11$	$r_1 = 3.9$
$r_2 = 68,9$	$r_2 = 77$	$r_2 = 4.1$

2. Conclusion

Pour conclure, nous avons évalué en solution deux agents théranostiques contenant 4 complexes de gadolinium pour l'imagerie IRM et un photosensibilisateur porphyrinique pour la PDT. Nous avons développé le second photosensibilisateur théranostique. Cette alliance apporte une amélioration des propriétés d'agent de contraste en IRM comparé à celles d'un agent commercial (DOTAREM) avec une augmentation d'un facteur 2 environ à 7T de la relaxivité r_1 , et également une augmentation sensible de la valeur de relaxivité r_2 . Nous avons de plus observé une amélioration des propriétés photophysiques du photosensibilisateur, notamment en ce qui concerne les longueurs d'ondes d'absorption décalées vers le rouge dans 'la fenêtre thérapeutique optique' 650-800 nm qui permettra à l'irradiation lors de la réalisation de la PDT in vivo de pénétrer davantage dans les tissus et donc favorisera l'efficacité du traitement. Les mesures de relaxivité, du

rendement quantique d'oxygène singulet et de stabilité de ces agents théranostiques nous permettent d'envisager la suite des évaluations *in vitro* en cytotoxicité et photocytotoxicité.

Chapitre III

Suite à la conception et la synthèse des nouveaux agents théranostiques et leur caractérisation chimique et physicochimique, l'étape d'évaluation suivante concerne l'évaluation biologique avec la toxicité et la phototoxicité, l'internalisation cellulaire *in vitro*, puis leur biodistribution *in vivo*. Cette évaluation est indispensable pour pouvoir déterminer les paramètres nécessaires à la dernière étape qui est l'application du traitement *in vivo*.

1. Tests de cytotoxicité, phototoxicité et internalisation cellulaire

1.1. Réactifs

Tous les réactifs chimiques de base proviennent de sources commerciales et ont été utilisés sans purification. La 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline (98%) et le chlorure de fer (II) tétrahydraté (98%) ont été obtenus auprès d'Alfa Aesar (Schiltigheim, France). L'hydrate d'acide disodique-4,7-diphényl-1,10-phénantroline-4',4''-disulfonique (98%) et l'hydrate d'acide disodique-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline-3,8-disulfonique (98%) ont été obtenus auprès de Abcr GmbH (Karlsruhe, Allemagne). Le milieu modifié Eagles de Dulbecco (DMEM), le milieu modifié Eagles de Dulbecco complété avec un mélange de nutriments F-12 (DMEM / F-12), le sérum fœtal bovin (FBS), l'antibiotique pénicilline-streptomycine-glutamine (Penstrep) de Gibco, la solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco (PBS) ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Illkirch, France) et la résazurine auprès d'ACROS Organics (Noisy le Grand, France).

1.2. Culture de cellules

Pour évaluer la cytotoxicité et la phototoxicité de nos agents théranostiques, nous proposons d'étudier 4 lignées cellulaires dont deux lignées tumorales et deux non tumorales, murines et humaines.

Des cellules d'adénocarcinome du côlon murin (CT-26), d'adénocarcinome du côlon humain (HT-29), et d'hépatocytes murins (TIB-75) ont été cultivées en utilisant le milieu DMEM et des cellules de fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5) en utilisant le milieu DMEM / F-12 avec addition de 10% de sérum de veau fœtal FBS et 1% de l'antibiotique Penstrep (Dulbecco). Les cellules proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection), Elles ont été cultivées et maintenues dans un incubateur de culture cellulaire à 37°C avec une atmosphère de 5% de CO₂. Avant toute expérience, les cellules ont été repiquées trois fois.

Les cellules sont cultivées pour évaluer la cytotoxicité et phototoxicité des composés, ici nos photosensibilisateurs PS1 et PS2 ainsi qu'un photosensibilisateur de référence qui est la protoporphyrine IX (PpIX), en mesurant la viabilité cellulaire par un dosage fluorométrique à la résazurine expliqué dans le paragraphe suivant I.4. Les cellules cultivées ont étéensemencées en triplicat dans des plaques à 96 puits avec une densité de 4000 cellules par puits dans 100 μ L de milieu. Après 24 h, le milieu a été retiré et les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes du composé à tester, dilué dans les milieux cellulaires atteignant un volume total de 200 μ L.

1.3. Internalisation cellulaire

Cette étude nous permettra la localisation subcellulaire des PS qui déterminent les sites d'action primaires et leur sélectivité.

10⁶ cellules (4 types : CT26, TIB-75, MRC-5 et HT-29) ont étéensemencées dans des boîtes de Petri à 24 puits contenant des lamelles rondes et laissées pour adhésion pendant une nuit dans l'étuve (5% CO₂, 37°C). Les cellules ont été incubées avec l'échantillon (PPIX, PS1 et PS2, 1 μ M) pendant 4 h dans l'étuve. Après ce temps, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS puis fixées avec du PFA 4% pendant 10mn à température ambiante. Après lavage au PBS les lamelles ont été fermées avec du milieu de montage contenant du glycérol 90% et une solution de Hoechst 1/5000 dans du PBS 1X pour marquer les noyaux.

Des images ont été enregistrées avec un microscope confocal à balayage laser LSM 880 (Carl Zeiss, plateforme d'imagerie cellulaire de la Faculté de Pharmacie, Université de Paris) à divers grossissements. Les échantillons ont été détectés en utilisant leurs propriétés de fluorescence à 1 photon (λ_{ex} = 358-405-510 nm, λ_{em} = 461- 650- 700nm) respectivement pour détecter les fluorophores PpIX, PS1 et PS2.

Le microscope confocal est un microscope photonique qui permet l'excitation des fluorochromes par un laser avec les longueurs d'onde appropriées. Pour cela, le faisceau du rayon laser est balayé sur l'ensemble de l'échantillon grâce à un jeu de miroirs (scanner x/y). L'émission des fluorochromes, résultant de l'excitation, est captée par le photomultiplicateur (détecteur) et l'image est reconstituée point par point sur l'écran. De plus, grâce à la présence du pinhole (petit trou) devant le détecteur, seule la fluorescence provenant du plan focal est captée. La fluorescence hors focus est bloquée. Le microscope

confocal permet donc de n'obtenir que l'image du plan focal améliorant ainsi considérablement la résolution en Z.

1.4. Cytotoxicité

La cytotoxicité est évaluée par la mesure de la viabilité cellulaire fournie par l'IC₅₀ sur différentes lignées cellulaires des organes susceptibles d'interagir avec les composés après leur injection. Il est nécessaire de réaliser ces premières études de cytotoxicité avant toute expérience d'agents d'imagerie *in vivo*. Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes du composé à tester pendant 24h, Après ce temps, le milieu a été remplacé par un milieu frais contenant de la résazurine avec une concentration finale de 0,2 mg / ml. La résazurine (appellation chimique 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) est un indicateur coloré bleu, faiblement fluorescent jusqu'à ce qu'il soit réduit de manière irréversible en résorufine par les cellules métaboliquement actives (figure 58). Après 4 h d'incubation, la quantité de résorufine a été déterminée lors de l'excitation à 540 nm et la mesure de son émission à 590 nm en utilisant un lecteur de microplaques SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism en utilisant la fonction pour mesurer l'IC₅₀.

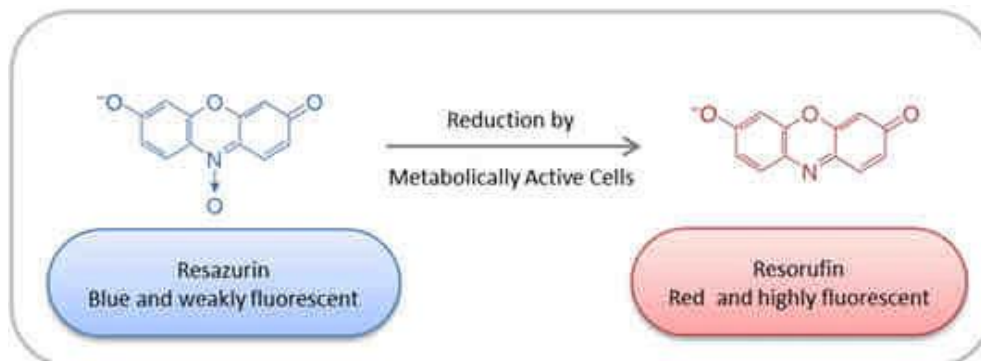


Figure 57: Principe de fonctionnement du test résazurine basé sur une réaction d'oxydo-réduction

1.5. Phototoxicité

La phototoxicité est définie comme une réaction toxique causée par des produits chimiques photoréactifs administrés par voie topique ou systémique, après exposition du corps à la lumière.

Le test de phototoxicité *in vitro* permet de déterminer le potentiel phototoxique d'un PS, induit par l'excitation du produit après exposition à la lumière. Cet essai évalue la photo-

cytotoxicité d'après la réduction relative de la viabilité des cellules exposées au PS, en présence ou absence de lumière.

- a) Détermination de la durée maximale d'irradiation qui correspond à la dose de lumière non cytotoxique pour les cellules (sans photosensibilisateur)

Les 4 types de cellules sont maintenues en culture pendant 24h dans des plaques à 96 puits (07 plaques/cellules, 4000 cellules/puits). Pour chaque type de cellules, une plaque est maintenue pendant 1h à 37°C puis remise dans l'incubateur, une plaque restée dans l'incubateur (37°C, 0,5% CO₂) et 5 autres plaques sont irradiées pendant 20, 30, 40, 50, et 60mn à une longueur d'onde appropriée pour chaque produits utilisé dans l'étude de phototoxicité (PS1 et PpIX : 645nm, PS2: 730nm). La viabilité cellulaire a été déterminée par le test de résazurine après 48h d'incubation (37°C, 0,5% CO₂).

- b) Détermination de l'IC₅₀ en présence du PS avec et sans irradiation pour le calcul de l'indice de phototoxicité qui reflète le potentiel phototoxique du PS

L'indice de phototoxicité est un paramètre qui reflète le potentiel phototoxique d'un PS, c'est le rapport de la cytotoxicité sur la phototoxicité, au même temps d'incubation avec le produit (4h), sans et avec irradiation respectivement.

Les cellules sont maintenues en culture pendant 24 heures jusqu'à formation de monocouches. Pour chaque produit chimique testé, 6 plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 4h avec 9 concentrations distinctes du produit chimique (de 0 à 300µM). Ensuite, après avoir changé de milieu, trois des six plaques ont été exposées à une dose de lumière déterminée dans la première étapes (par exemple 20mn, une durée non phototoxique) et à une longueur d'onde correspondante au produits testés (PS1 et PpIX : 645nm, PS2: 730nm, 10 J cm⁻²) en utilisant un irradiateur Atlas Photonics LUMOS BIO (Atlas Photonics, Fribourg, Suisse), tandis que les trois autres plaques ont été maintenues à l'obscurité. Après 48h d'incubation, le milieu de a été remplacé par un milieu de culture frais contenant de la résazurine avec une concentration finale de 0,2 mg / ml , et après une nouvelle période d'incubation de 4h, la quantité de résorufine de produit fluorescent a été déterminée avec une excitation à 540 nm et la mesure de son émission à 590 nm en utilisant un lecteur de microplaques SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Les données obtenues ont été analysées pour calculer l'IC₅₀ avec le logiciel GraphPad Prism.

1.6. Résultats et discussion

1.6.1 Internalisation cellulaire

L'absorption cellulaire et la colocalisation sont des facteurs importants pour évaluer le potentiel du nouveau conjugué en tant qu'agent théranostique. Les agents de contrastes à base de gadolinium sont pour la plupart extracellulaires, et la liaison de plusieurs complexes de gadolinium sur un photosensibilisateur PDT aura un impact sur l'absorption cellulaire, la localisation, la toxicité, l'activité PDT et la capacité d'imagerie du conjugué par rapport au photosensibilisateur seul ⁸⁵.

L'internalisation peut être mise en évidence en utilisant la microscopie confocale classique, en tirant partie des propriétés de fluorescence du produit. L'internalisation cellulaire de nos deux agents théranostiques ainsi que celle du PS commercial (PpIX) a été évaluée dans quatre types de cellules : CT26, HT29, TIB75 et MRC5 (voir Figure 60).

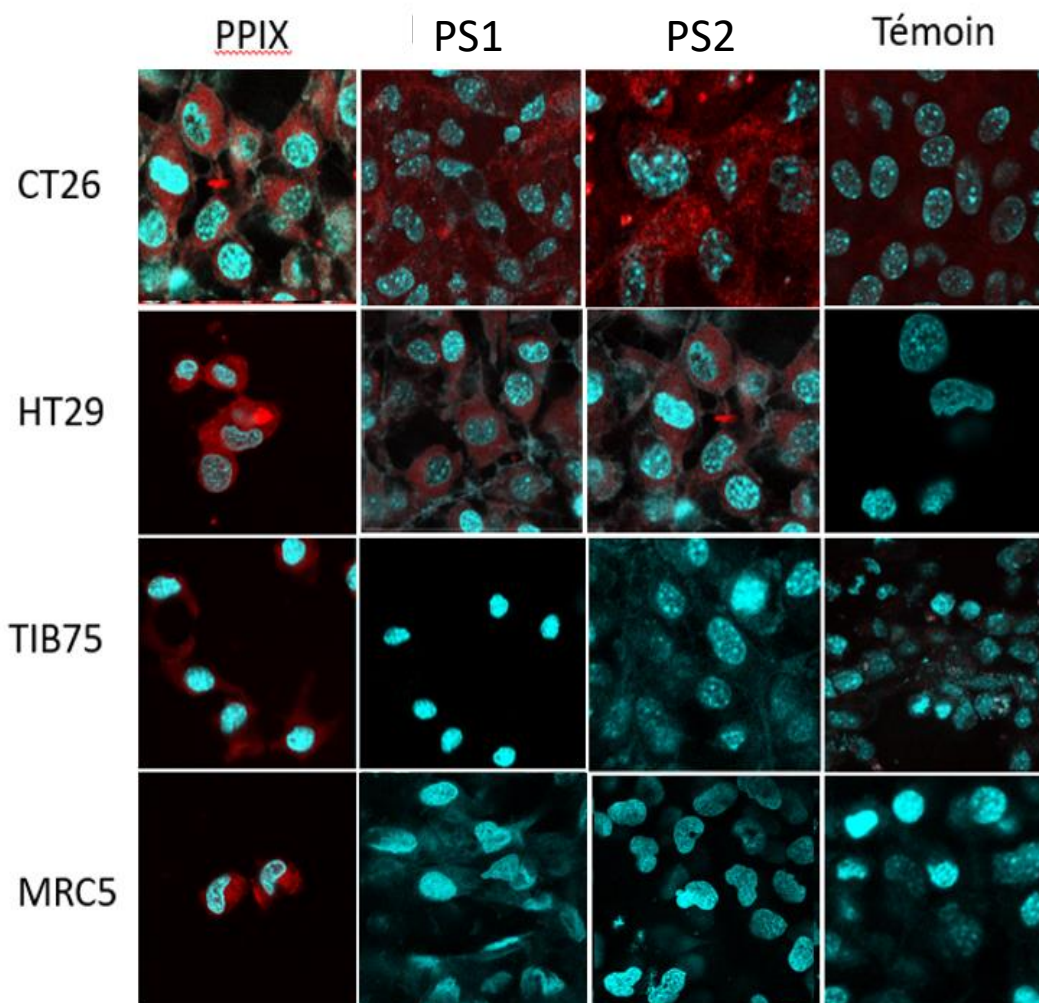


Figure 58: *Images de microscopie confocale des photosensibilisateurs et du contrôle dans quatre lignées cellulaires. En rouge le signal des photosensibilisateurs, en bleu, les noyaux cellulaires. (Plateforme d'imagerie cellulaire, Faculté de Pharmacie)*

Les deux molécules théranostiques PS1 et PS2 semblent s'accumuler à l'intérieur de la cellule (compartiment intracellulaire) avec une plus forte internalisation dans les cellules tumorales HT29 et CT26 comparées aux cellules saines MRC5 et TIB75 où on observe une très faible ou absence de signal fluorescent. Contrairement à nos agents théranostiques, le photosensibilisateur commercial PpIX semble s'accumuler aussi bien dans les cellules tumorales et saines, d'où une apparente spécificité de notre produit vis-à-vis des cellules tumorales, pendant les 4h d'incubation avec les cellules.

Cette sélectivité s'explique par le fait que nos produits possèdent à la fois des groupements hydrophiles, leur permettant une haute solubilité, et des groupements hydrophobes qui leur faciliteraient le passage à travers les membranes. La protoporphyrine PpIX est très peu soluble dans l'eau et donc très hydrophobe, ce qui expliquerait son affinité forte avec les membranes de toutes les cellules et son internalisation similaire dans les cellules saines et tumorales en plus forte prolifération. Les études comparatives d'internalisation des différents PS de Ball et al.⁸⁸ ont montré que le m-m-THPC (m-Tetra(hydroxyphényl)chlorine) et le PHP (polyhématoporphyrine) avaient une localisation cytoplasmique plus diffuse, tandis que les phtalocyanines avaient une distribution ponctuelle indiquant les lysosomes. De ce fait, la localisation subcellulaire initiale de chaque photosensibilisateur dépendait de l'hydrophobie et de la liaison aux protéines plasmatiques et ils ont proposé qu'une distribution cytoplasmique diffuse peut être un facteur déterminant d'une bonne activité photodynamique.

Chaque PS a sa propre internalisation cellulaire, la localisation est régie par ses caractéristiques physicochimiques, sa capacité de liaison aux protéines, son état d'agrégation, sa concentration extra et intracellulaire et sa durée d'incubation⁸⁹. Il a été montré qu'il est possible que les mécanismes d'absorption soient complexes, tels que la diffusion simple à travers la bicouche lipidique, l'endocytose résultante de l'association des PS avec les protéines plasmatiques tels que les LDL et le HSA, ainsi de multiples cibles cellulaires. De ce fait, des études plus poussées sont à faire pour étudier en détail la localisation de nos Ps, dans les différentes organelles de la cellule, comme la localisation au niveau des lysosomes.

1.6.2 Cytotoxicité

La cytotoxicité à l'obscurité des deux agents théranostiques ainsi que le PpIX dans les quatre mêmes types de cellules précédentes, à savoir CT26, HT29, TIB75 et MRC5 a été étudiée par le test de résazurine après 24h d'incubation.

Une faible cytotoxicité du PS1 a été évaluée pour des concentrations inférieures à 5 μM avec une viabilité cellulaire supérieure à 90 % (voir Figure 61).

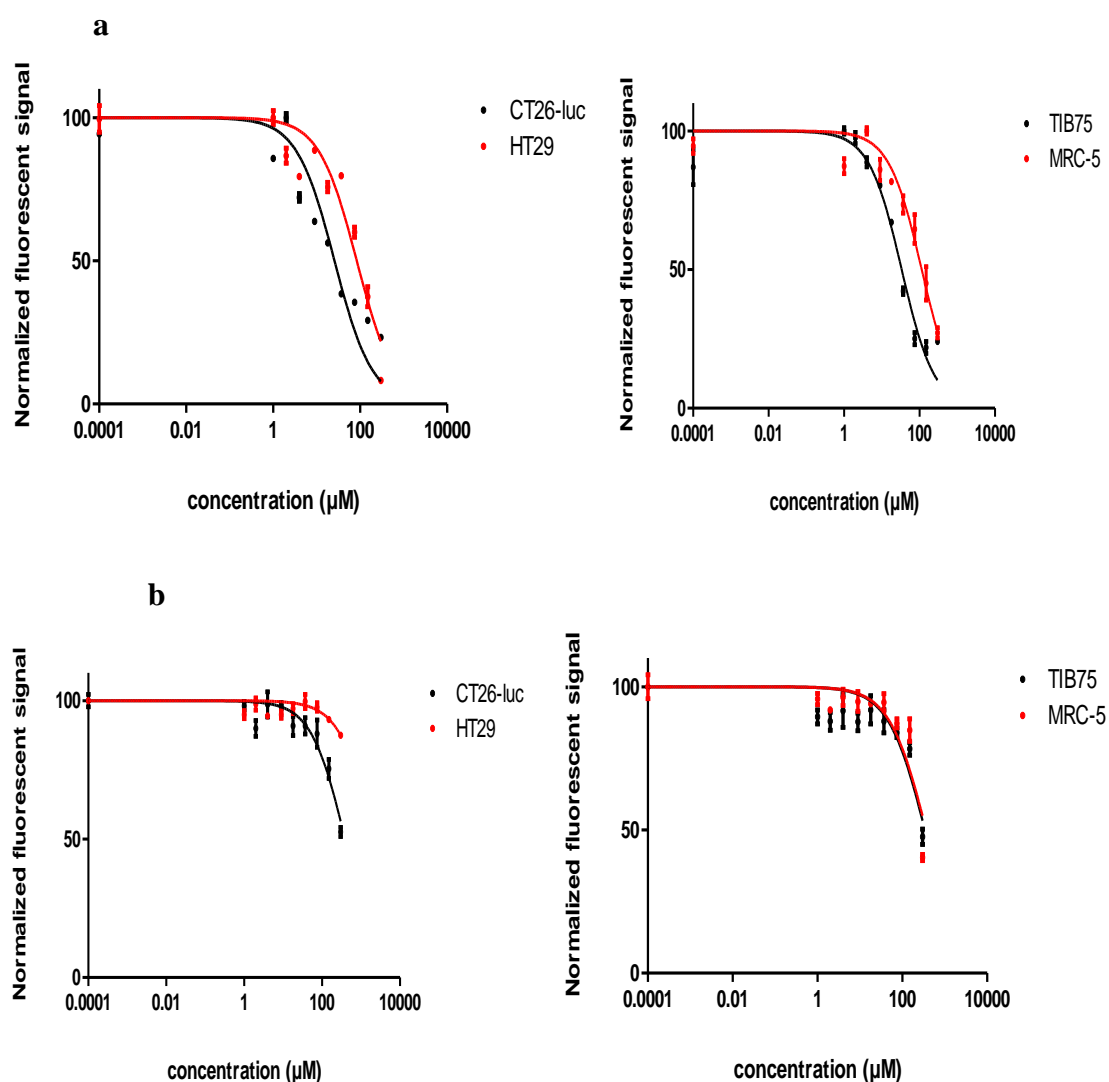


Figure 59 : Tests de cytotoxicité IC50 de : a) PS1 et b) PS2 pour les lignées de cellules tumorales CT26, HT29 et les lignées de cellules de référence TIB75 et MRC-5

La concentration du PS1 nécessaire pour tuer 50 % des cellules (IC50) a été estimée à environ 23 μM pour les CT26, 84 μM pour les TIB75, 334 μM pour les HT29 et 98 μM pour les MRC5.

Tableau 3: Tableau des résultats des tests de cytotoxicité IC50 du PS1 et PS2.

	Cellules murines		Cellules humaines	
	CT26	TIB75	HT29	MRC5
IC50 (µM) –PS1	23 ± 3	84 ± 15	>300	98 ± 17
IC50(µM) – PS2	>300	>300	>300	>300
IC50(µM) – PPIX	24,04± 2,9	44,5± 0,3	>300	>300

Les valeurs de l'IC50 pour la toxicité à l'obscurité du PS1 est plus proche de la fourchette signalée pour les porphyrines apparentées y compris la PpIX (1-30 µM)^{90,85}. Tandis que pour le PS2 nous avons enregistré une très faible cytotoxicité comparée au PS1, avec un IC50 supérieur à 300 µM et cela peut s'expliquer par le fait que les complexes DOTA à cycle fermé sont beaucoup plus stables vis-à-vis du relargage de l'ion Gd³⁺ toxique, comparé au complexe DTTA à cycle linéaire ouvert, ce qui est cohérent avec la diminution de la cytotoxicité. Une autre explication serait aussi que le nombre de molécules de PS2 internalisées dans les cellules serait plus faible. Une quantification de la teneur en Gd dans les cellules pourrait être effectuée par des méthodes d'analyse élémentaire quantitative et sensible (< ppb) par la technique d'ICP-MS, Ionisation Coupling Plasma Mass Spectrometry).

1.6.3 Phototoxicité

La phototoxicité du PS1, et PS2 a été évaluée sur les 4 types de cultures de lignées cellulaires (CT26, HT29, TIB75 et MRC5) incubées pendant 4h avec une concentration allant de 0 à 300 µM et irradiées par une lumière à une longueur d'onde à 645 nm ou 720 nm pendant 20 mn (10 J.cm⁻²). Comme référence comparative, nous avons utilisé le PS commercial PpIX. Le temps d'irradiation maximum ne générant pas de phototoxicité des cellules a été déterminé après les avoir irradiées sans incubation avec chaque produit à tester, à différents temps d'exposition à la lumière (voir Figure 62).

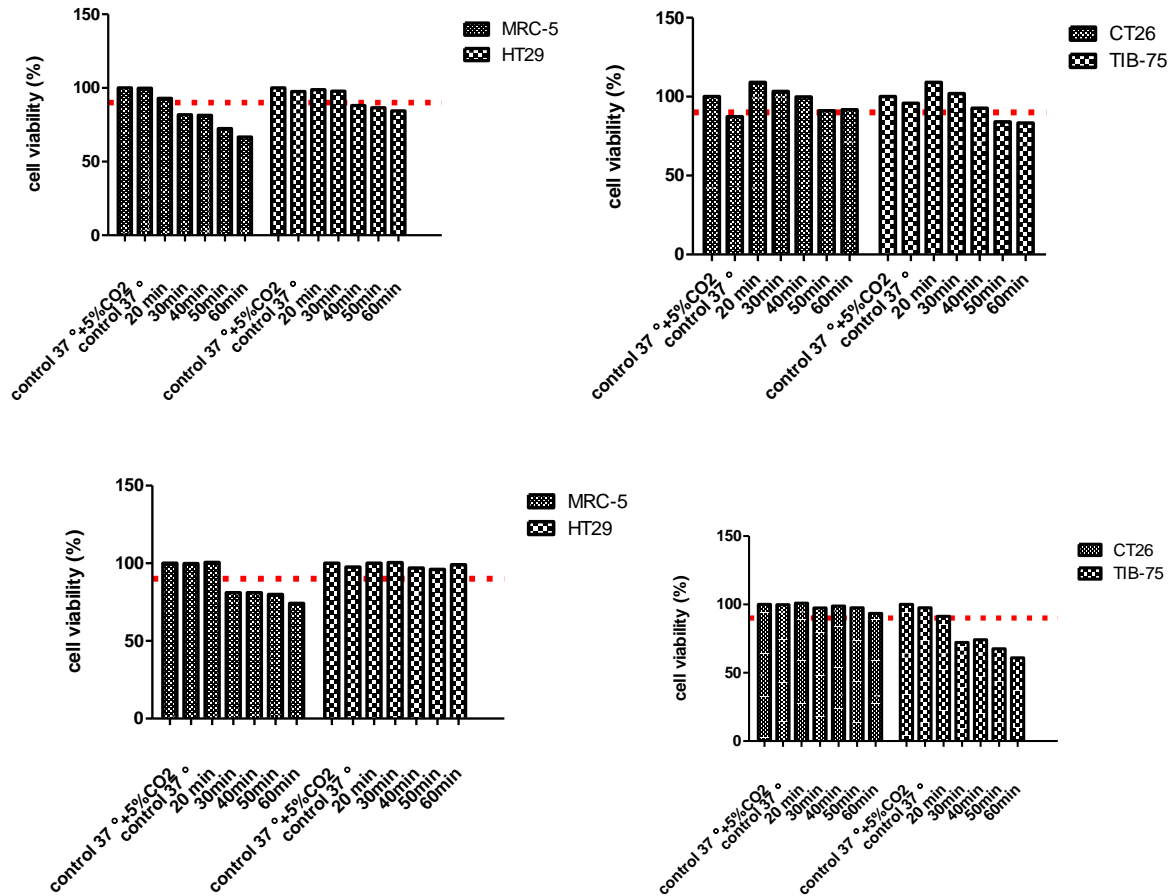


Figure 60 : Détermination de la viabilité cellulaire en fonction du temps d'irradiation à une longueur d'onde de : a) 645nm et b) 720 nm

- Résultats de phototoxicité pour le PS1

L'indice de phototoxicité du PS1 sur les cellules tumorales murines CT26 (PI=202) est dix fois supérieur à celui des cellules saines murine de référence TIB75 (PI=20). Tandis que pour les cellules saines humaines, nous n'avons pas enregistré de phototoxicité pour les concentrations utilisées contrairement aux cellules tumorales humaine HT29 où nous avons enregistré une phototoxicité avec un IC50 de 30 μ M (figure 63, tableau 2), ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en internalisation cellulaire, où une accumulation apparente accrue dans les cellules tumorales est observée.

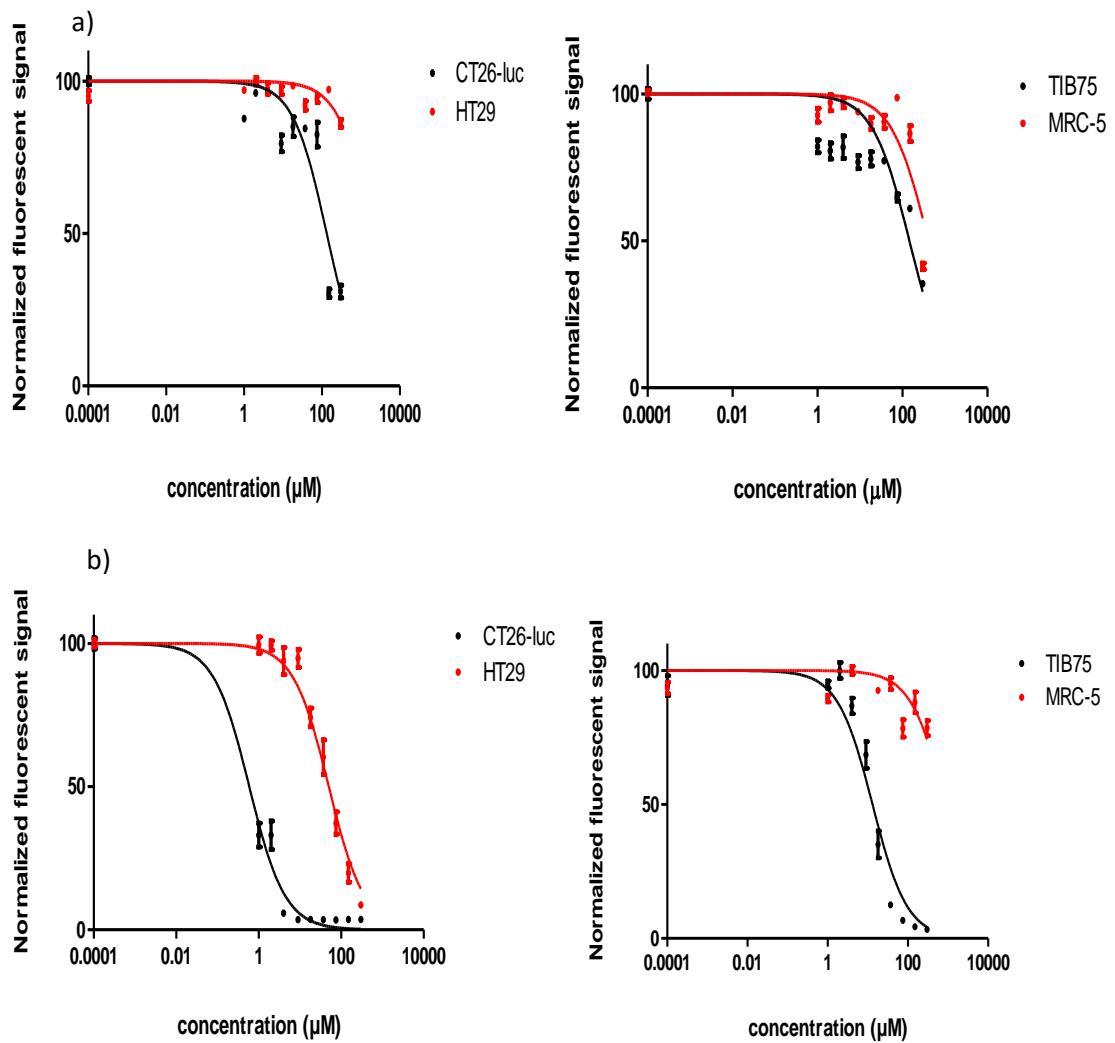


Figure 61 : Tests de phototoxicité de PS1 pour les lignées de cellules tumorales CT26 murines, HT29 humaines et les lignées de cellules de référence TIB75 murines et MRC-5 humaines : a) non irradié, b) irradié

Tableau 4 : résultats du test de phototoxicité du PS1

(µM)	PS1			
	Cellules murines		Cellules humaines	
	CT26	TIB75	HT29	MRC5
IC50 4H	142 ± 12	241 ± 98	>300	>300
IC50 4H + irradiation 20min	0,7 ± 0,1	12 ± 0,57	30 ± 17	>300
PI	202	20	>>10	indéterminé

- Résultats de phototoxicité pour le PS2

Pour le PS2, nous avons enregistré une phototoxicité à un IC₅₀ de 17 μM pour les cellules tumorales murines CT26 et 68 μM pour les cellules tumorales humaines HT29. Tandis que pour les cellules saines, le produit n'est pas phototoxique dans la gamme de concentrations utilisées dans cette étude (jusqu'à 300 μM), et nous n'avons pas enregistré d'IC₅₀ à 4h d'incubation, la valeur est supérieure à 300 μM (voir Figure 64, tableau 6), ce qui peut être expliqué par la présence des chélates cycliques DOTA octadentates plus stables comparés aux chélates linéaires DTTA heptadentate du PS1 ou aussi une plus faible internalisation dans les cellules.

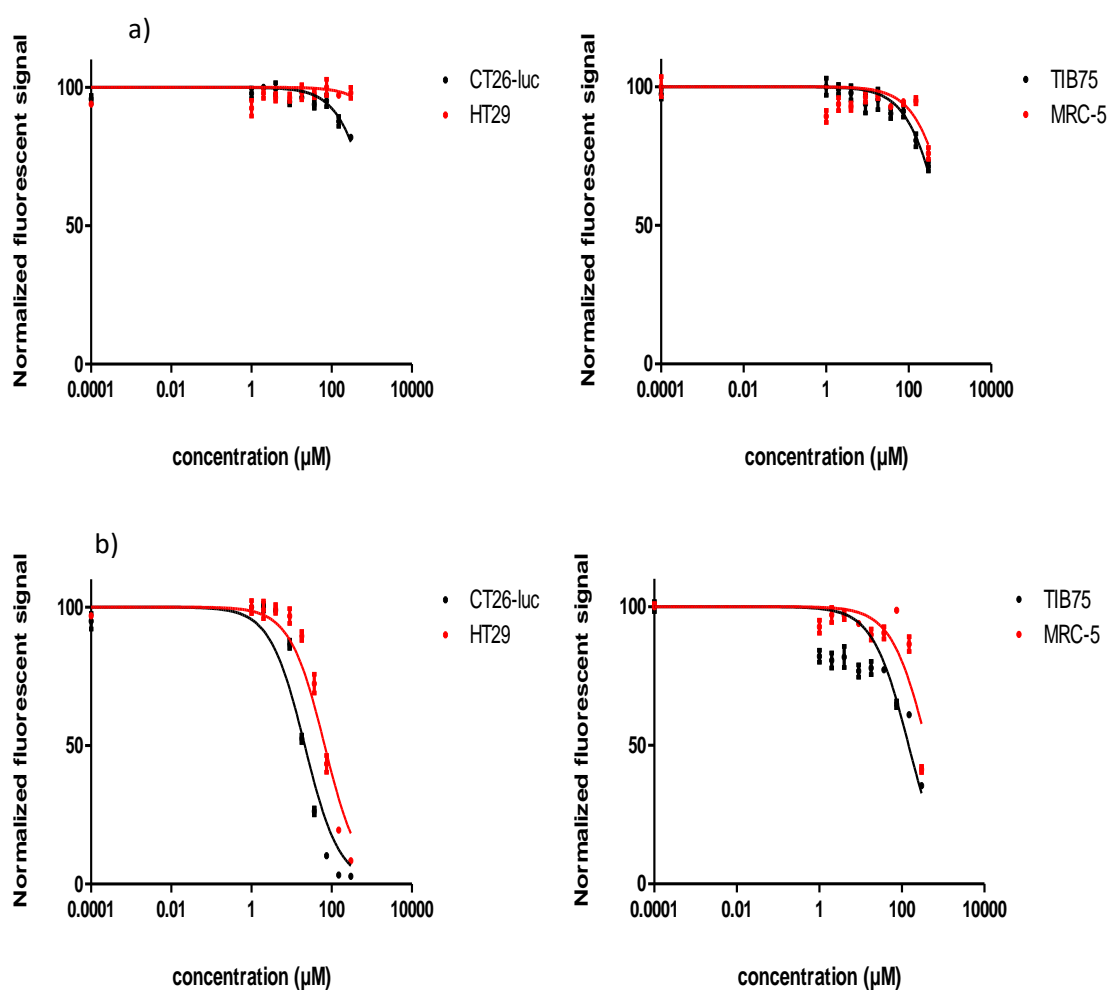


Figure 62 : Test de phototoxicité de PS2 pour les lignées de cellules tumorales CT26, HT29 et les lignées de cellules de référence Tib75 et MRC-5, respectivement murines et humaines : a) non irradié, b) irradié

Tableau 5 résultats du test de phototoxicité du PS2

	PS2			
(μM)	Cellules murines		Cellules humaines	
	CT26	TIB75	HT29	MRC5
IC50 4H	>300	>300	>300	>300
IC50 4H + irradiation 20min	17 ± 3	>300	68 ± 4	>300
PI	>>18	indéterminé	>>4,41	indéterminé

Il est frappant de constater que les composés PS1 et PS2 de cette étude se sont avérés non toxiques dans l'obscurité à des concentrations encore plus élevées (IC50, dark > 300 pour PS-Gd2 et IC50, dark > 100 pour le PS1) par rapport au PpIX disponible dans le commerce (IC50, dark < 100 μM), tout en étant hautement phototoxique car présentant des IC50 après irradiation dans la gamme de faibles concentrations micromolaires (IC50,720 nm = 17 ± 3 μM pour CT26-luc, IC50,720 nm = 68 ± 4 μM pour HT29) pour le PS2 et (IC50,645 nm = 0,7 ± 0,1 μM pour CT26-luc, IC50,645 nm = 30 ± 17 μM pour HT29) pour le PS1.

Il est important de noter que dans des conditions expérimentales identiques, le traitement avec la PpIX a montré un effet photototoxique fort pour les deux lignées tumorales et de référence (IC50 = 0,4-0,7 μM pour les cellules tumorales et IC50 = 7-10 μM pour les cellules saines) (tableau 7), ce résultat peut être expliqué par l'internalisation importante et non sélective de la porphyrine commerciale dans les cellules saines et tumorales observée dans l'étude d'internalisation cellulaire précédente par microscopie confocale.

Tableau 6 : résultats du test de phototoxicité du PpIX

	PpIX			
(μM)	Cellules murines		Cellules humaines	
	CT26	TIB75	HT29	MRC5
IC50 4H	166 ± 15	84 ± 15	>300	>300
IC50 4H + irradiation 20min	0,38 ± 0,09	0,44 ± 0,14	7 ± 0,5	10 ± 1
PI	436	200	>>43	>>30

Les valeurs élevées de phototoxicité du PpIX comparées au PS1 et PS2, pourraient s'expliquer par le caractère liposoluble et la taille qui est plus petite, ce qui lui conférerait une affinité plus élevée pour les membranes cellulaires et une internalisation plus facile qui induirait un effet phototoxique plus fort que ces deux derniers, amphiphiles et dont la solubilité dans l'eau est élevée⁹¹.

Ces résultats nous montrent que nos PS1 et le PS2 semblent plus sélectifs et capables d'agir en PDT *in vitro* à de faibles doses par rapport à un composé tétrapyrrolique qui possède un PI >200. De ce fait, doté d'une excellente solubilité en milieu aqueux, ce sont des agents théranostiques prometteurs dans la perspective d'une application thérapeutique préclinique et par la suite clinique.

1.7. Conclusion

Pour conclure sur ces études cellulaires *in vitro*, nous avons montré que la toxicité des deux photosensibilisateurs théranostiques est peu élevée. En effet, les valeurs des IC50 obtenus en cytotoxicité sont supérieures 300µM.

Dans les futures conditions *in vivo*, les concentrations d'agents théranostiques injectées doivent être de l'ordre de 10mM à 100ul de volume injecté pour un suivi par IRM. Ce qui correspond à une teneur dans le sang (v :1,2ml pour une souris) de moins de 1mM. Les IC50 en cytotoxicité étant très supérieures à 300uM, nous pouvons considérer que les deux photosensibilisateurs étudiés ne sont pas toxiques pour cette utilisation préclinique. Les résultats obtenus en phototoxicité, montrent l'efficacité et une meilleure sélectivité de nos agents par rapport à des cellules tumorales *in vitro* post 4h d'incubation. Ce qui est prometteur pour une application future en photothérapie dynamique *in vivo*. En effet, nous avons enregistré une haute phototoxicité après irradiation dans la gamme de faibles concentrations micromolaires (IC50,720 nm = 17 ± 3 µM pour CT26-luc, IC50,720 nm = 68 ± 4 µM pour HT29) pour le PS2 et (IC50,645 nm = $0,7 \pm 0,1$ µM pour CT26-luc, IC50,645 nm = 30 ± 17 µM pour HT29) pour le PS1.

Ces résultats sont donc prometteurs pour passer à l'étape suivante *in vivo*.

Ils sont compatibles avec ceux de la littérature sur l'internalisation de dérivés de porphyrines *in vitro*.

Ces tests cellulaires restent très différents de la complexité du milieu *in vivo*. En effet, les cellules ne forment pas un tissu mais adhèrent au fond de puits. Le micro-environnement tumoral est beaucoup plus complexe du fait de la forme des vaisseaux sanguins, des flux dynamiques, de tissus potentiellement endommagés ou encore de la présence de protéines

variées. De ce fait, nous allons commencer l'étude *in vivo* par l'exploration de la biodistribution du produit dans les différents organes.

2. Biodistribution in vivo des agents théranostiques par bioimagerie IRM

2.1. Modèle animal

Une souris portant une tumeur CT26 sous-cutanée a été sacrifiée 14 jours après l'implantation ; la tumeur a été prélevée puis immergée dans un milieu de culture DMEM et coupée en fragments de 3 mm³ selon la procédure de la littérature⁹².

Trente souris Balb-C/JRJ femelles de 8 semaines d'un poids moyen de 20 g (Janvier, Saint Genest de l'Isle, France) ont été implantées avec un fragment de tumeur CT26 par voie sous-cutanée dans les deux flancs (n =30).

La lignée cellulaire CT26 (ATCC; normes LGC, Molsheim, France) provenait d'un carcinome du côlon indifférencié induit chimiquement. Après l'implantation, la croissance de la tumeur et le poids des souris ont été suivis par un pied à coulisse et une balance respectivement.

Tous les travaux sur les animaux ont été effectués conformément aux directives institutionnelles du protocole animal en place à l'Université Paris Descartes, saisine Apafis #11698, 17-055 et approuvées par le Comité d'éthique 34, auquel la plateforme est rattachée.

2.2. Biodistribution par bioimagerie IRM

Des études de biodistribution *in vivo* ont été réalisées par IRM, une méthode de bioimagerie non invasive, pour évaluer l'absorption, la rémanence et l'élimination du produit par la tumeur, les reins, la rate et le foie.

Des souris tumorales BALB / c JRJ femelles de type sauvage de 9 semaines ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane gazeux (1,5% air / O₂ 0,5 / 0,25 L.min⁻¹) et placées dans un berceau aimantique dédié. La fréquence respiratoire a été surveillée pendant toute la durée de la procédure ainsi que la température grâce à des détecteurs spécifiques. 150 µL du produit PS1 ou PS2 dans une solution saline NaCl à 0,9% avec une concentration optimisée de 10 mM en Gd (une concentration de Gd de 50 µmol.kg⁻¹) ont été injectés par voie intraveineuse via la veine caudale à travers un cathéter 30G, avec une solution héparinée (500UI) dans le cathéter caudal immédiat, avec n = 6 souris pour la reproductibilité de chaque produit.

Les images ont été acquises sur le spectromètre de micro-imagerie IRM 7 Tesla (300 MHz) (Bruker, Karlsruhe Allemagne) comme décrit précédemment⁹³. Le protocole d'acquisition a été développé à l'aide du logiciel Paravision 5.1.

Après avoir positionné les coupes anatomiques enregistrées dans la direction axiale pour localiser les différents organes des souris, des images avec des séquences DCE Intragate Flash (Dynamic Contrast Enhanced) pour s'affranchir des artéfacts de mouvement ont été acquises : durant 40 min, à la résolution temporelle de 3min (13 images) avec une injection des agents théranostiques 3 min post démarrage des séquences DCE.

Les images de séquences multi coupes pondérées T_1 ont été enregistrées. Les paramètres d'acquisition sont : (IG FLASH, 5 coupes axiales de 2 mm, TR / TE : 100/4 ms, FOV : 3x3 cm, matrice 128x128, flip angle : 80 °, Time frame : 13, NR : 190, Résolution pixel : 236 μm / pixel)

Les images finales ont une résolution spatiale de 117 μm x 117 μm dans un plan après zero filling. La durée de chaque séquence élémentaire est de l'ordre de 3 minutes 14 s par image qui a été séquentiellement enregistrée avant et après l'injection de l'agent. Le suivi dynamique est mesuré lors d'une première période d'acquisition de 40 min, puis à 3 h, 6 h, 24 h et 48 h après l'injection.

Pour étudier la biodistribution de notre agent théranostique, le post-traitement des images dynamiques consiste à délimiter et surveiller plusieurs régions d'intérêt (ROI) dans les images IRM corporelles de souris, le foie, la tumeur, la rate, le muscle et le rein. Les intensités IRM correspondantes liées à la quantité de l'agent de contraste de la molécule théranostique ont été tracées en fonction du temps pour visualiser l'absorption et la clairance du produit dans les organes. Une comparaison avec le DOTA-Gd commercial (**Dotarem**® Guebert, France) comme référence a également été réalisée à la concentration correspondante de Gd (10 mM). Les temps d'absorption, de rémanence et de clairance ont été évalués visuellement, et les paramètres cinétiques semi-quantitatifs ont été mesurés à partir des courbes dynamiques.

Des cartographies T_1 ont été enregistrées pré injection puis à 1h, 3h, 6h et 24h pour quantifier le contenu en Gd *in vivo* (séquence RAREVTR : Impulsion hermitienne, angle de bascule de 90°, TE=11/22/33/44/55/66/88 ms, TR=5/2/1,2/0,8/0,6/0,5/0,25/ 0,19 s. Un champ de vue de 3x3 cm², une taille de matrice de 256x128 correspondants à 117 μm x234 μm).

2.3. Résultats et discussion

La biodistribution du PS1 et PS2 a été étudiée *in vivo* sur des souris BALB/c par IRM à contraste adapté à 7T. Plusieurs régions d'intérêt (ROI) ont été suivies (tumeur, foie, rate, rein) et les intensités dynamiques d'IRM des régions ont été tracées avant et après injection du produit. Une comparaison avec la molécule commerciale de DOTA-Gd Dotarem (Guerbet) comme référence a été effectuée à la même concentration de Gd.

L'analyse visuelle de la biodistribution du PS1 et PS2 mesurée par IRM montre une croissance puis décroissance du signal IRM pondéré T_1 qui traduit l'arrivée puis la rétention et l'élimination des photosensibilisateurs dans les différents organes, mesurés *in vivo* de manière qualitative.

- **Résultat de biodistribution pour le PS1**

Dans les zones tumorales, l'analyse visuelle de la biodistribution du PS1 mesurée par IRM DCE montre une nette augmentation du signal IRM (voir Figure 65) jusqu'à un temps de 40 min à l'intensité maximale, une rémanence de l'intensité IRM à 6h et un temps de clairance de 24h (tableau 7).

Dans les autres organes (foie, rate, rein) le profil DCE montre un comportement pharmacocinétique similaire. Pour la rate, on observe un inversement de contraste hypersignal de type T_1 à signal diminué lié à l'effet T_2^* , et cela est dû à une concentration plus élevée du gadolinium ou aussi l'agrégation qui occasionne un contraste T_2^* . Au niveau de la cinétique de biodistribution, les pics de rehaussement ont été observés, dans le foie et le rein, dans une phase de croissance jusqu'à environ 40 min. Les valeurs absolues à 40 minutes après l'injection sont les plus élevées. Ensuite, une phase de décroissance a lieu jusqu'à environ 3h post injection pour revenir vers un état initial à 6h et 24h.

Nous pouvons ainsi évaluer qualitativement le temps de circulation et la rémanence dans les différents organes par IRM DCE (tableau 8).

Ces résultats nous renseignent également sur la circulation du produit dans le sang car la croissance et décroissance des courbes dans les organes traduit une circulation complémentaire dans le sang pour être finalement éliminé.

Il est possible dans certains cas de pouvoir détecter la zone d'un vaisseau sanguin grâce à la bonne résolution de l'image IRM⁹³ mais il a été difficile de le réaliser dans notre cas.

Concernant les niveaux de réhaussement, à 40min, le signal dans la tumeur augmente de 75% et varie de 10 à 25 % pour le foie et le rein.

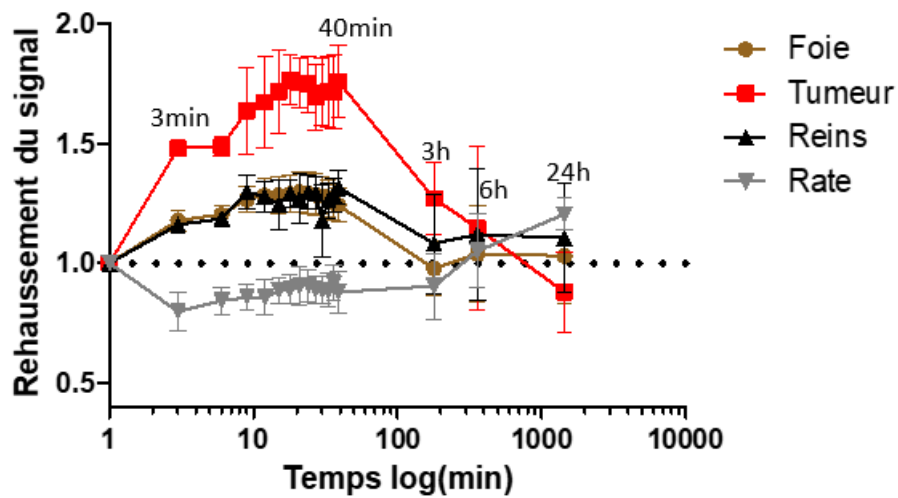
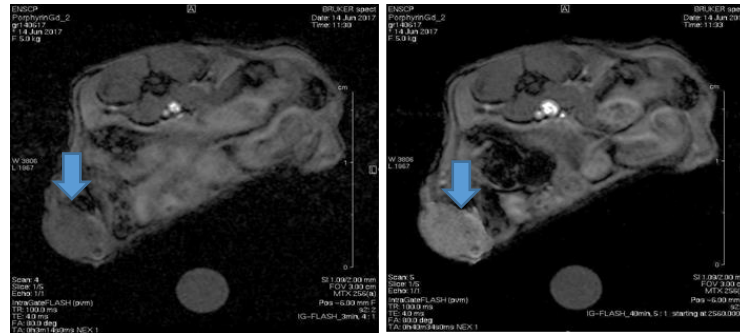


Figure 63 : Études de biodistribution par DCE du PS1 (Dynamic Contrast Enhanced MRI) sur des souris Balbc/JRJ tumorales n=6

Tableau 7 : résultats de l'étude de biodistribution par DCE du PS1

Organes	Taux de capture	Temps de capture maximale	Temps de rémanence	Temps de clairance totale
Tumeur	3 min	40min	6h	24h
Reins	3 min	40 min	6h	24h
Foie	3 min	40 min	3h	24h
Rate	3min	40 min	3h	24h

- **Résultats de biodistribution pour le PS2**

Dans la zone tumorale, l'analyse visuelle de la biodistribution du PS1 mesurée par IRM montre une nette augmentation du signal IRM (voir Figure 66) jusqu'à un temps de 40 min à l'intensité maximale, une rémanence de l'intensité IRM à 3h et jusqu'à un temps d'environ 6h (tableau 9), puis une clairance à 24h.

Dans le foie et la rate, le profil IRM DCE montre un comportement pharmacocinétique similaire à savoir une décroissance du signal maximal jusqu'à 40min, suivie d'une phase de retour au niveau de signal initial (voir Figure 66) pendant 3 à 6h post injection, interprété comme une rémanence du produit dans ces organes pour revenir vers un état initial à 48h. Le profil DCE dans les organes du foie et de la rate montre un comportement pharmacocinétique similaire mais avec un inversement de contraste hypersignal de type T_1 à signal diminué lié à l'effet T_2^* , et cela est dû à une concentration plus élevée du gadolinium ou aussi l'agrégation qui occasionne un contraste T_2^* .

Pour le rein, le profil montre une variation du signal durant 24h, démontrant la circulation sanguine complémentaire et la clairance finale à 48h du produit.

Nous pouvons ainsi évaluer qualitativement le temps de circulation et la rémanence dans les différents organes par IRM DCE.

Ces résultats nous renseignent également sur la circulation du produit dans le sang car la croissance et décroissance des courbes dans les organes traduit une circulation complémentaire dans le sang pour être au final éliminé.

Concernant les niveaux de réhaussement, à 40min, le signal dans la tumeur augmente de 40% et varie de 10% à pour le foie et le rein, 40% pour la rate.

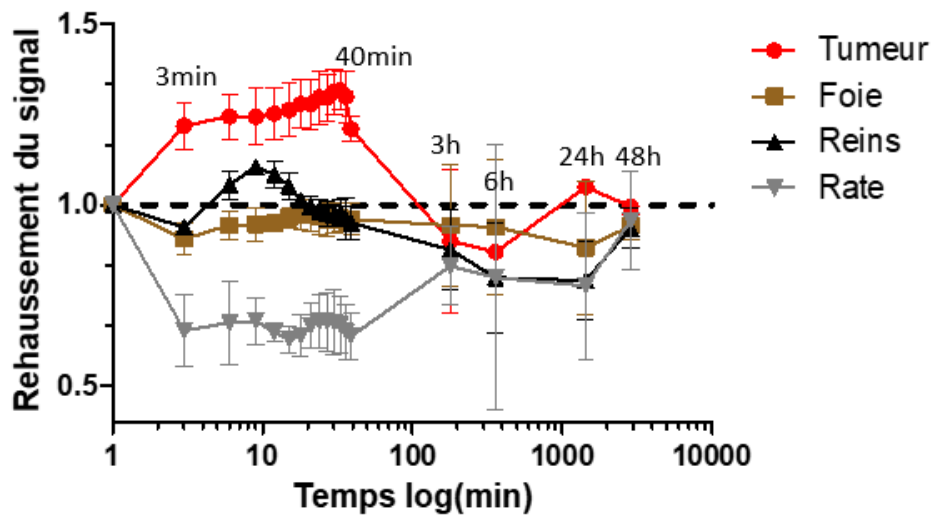
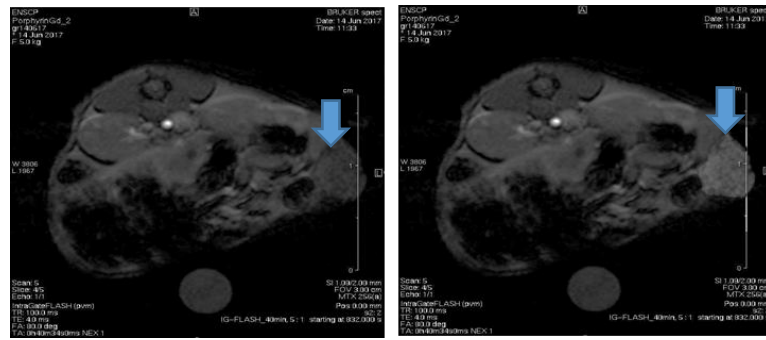


Figure 64 : Études de biodistribution par DCE du PS2 (Dynamic Contrast Enhanced MRI) sur des souris Balbc/JRJ tumorales n=6

Tableau 8 : résultats de l'étude de biodistribution par DCE du PS2

Organes	Taux de capture	Temps de capture maximale	Temps de rémanence	Temps de clairance totale
Tumeur	3 min	40min	24h	48h
Reins	3 min	10 min	24h	48h
Foie	3 min	40 min	24h	48h
Rate	3 min	40 min	24h	48h

- **Bilan des biodistributions**

Les deux PS sont excrétés via les reins comme prévu par rapport à leur taille inférieure à 5 nm (M= 3 à 4kD, soit moins de 1nm environ).

Dans les tumeurs, les niveaux de signal par IRM DCE de PS1 et PS2 sont augmentés durant environ 3 à 6h, puis reviennent à leur position initiale vers 24h.

Pour PS1, après 24h, les niveaux dans les différents organes sont revenus à leurs valeurs pré-contraste.

Pour PS2, après 48h, les niveaux dans les différents organes sont revenus à leurs valeurs pré-contraste.

Voici les résultats de l'évolution des valeurs de T1 dans les cartographies T1 enregistrées dans les tumeurs également pré, 40min, 3h, 6h, 24 et 48h qui viennent confirmer les résultats de biodistribution. (voir Figure 67).

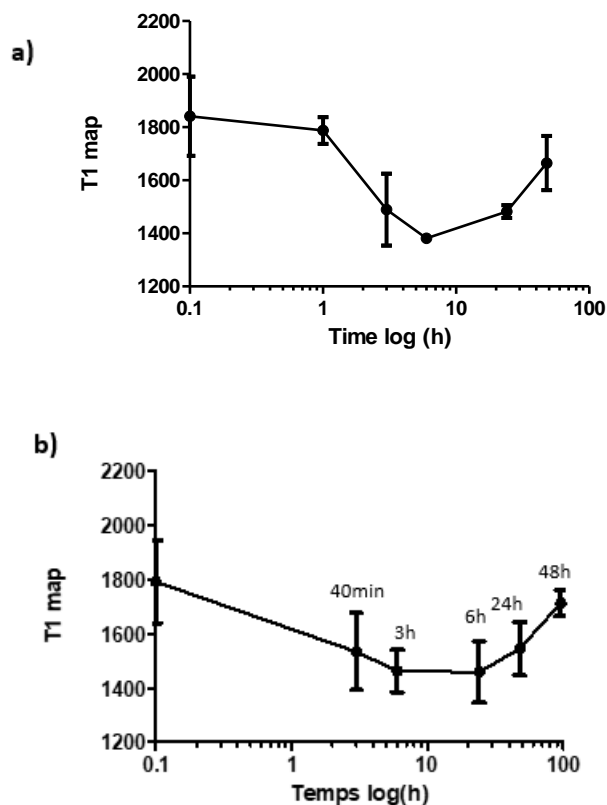


Figure 65 : Evolution des valeurs de T1map pré et post contraste mesurées in vivo dans les tumeurs par IRM T1 quantitative et pendant 48h : a) PS1, b) PS2

La concentration de Gd, 1h après le contraste peut être calculée :

$$(1/T1^{\circ} - 1/T1) / r1 = \text{Concentration}$$

Les résultats quantitatifs de la cartographie T1map qui fournissent une mesure quantitative des concentrations en Gd, donc des deux agents théranostiques, nous montrent bien la présence du produit dans la tumeur durant environ 3h et viennent confirmer les résultats obtenus en biodistribution qualitative par les séquences DCE pondérées T₁ (Figure 67).

Comparés aux quelques agents theranostiques de la littérature^{80,94}, Pandey et al. a synthétisé un HPPH-aminobenzyl-Gd(III)-DTPA et enregistré un rehaussement du signal IRM durant 8h post injection , ce qui traduit une circulation longue dans le sang.

Yuzhakova et al. a observé sur leur deux produits de cation gadolinium (III) chélatés par des macrocycles tétrapyrroliques (GdPz1 et GdPz2) une rémanence de plus de 3h post injection dans des tumeurs CT26 *in vivo*²⁷.

Nos produits ont présenté un rehaussement du signal IRM 3mn après injection, un maximum à 40 min post injection, et une rétention élevée d'environ 3 à 6h, ce qui présente un intervalle de temps suffisant pour l'application de l'irradiation en PDT, ainsi que pour l'acquisition IRM. En effet, dans la littérature, le Magnevist [complexe Gd(III) du DTPA], un agent IRM standard que les cliniciens utilisaient presque quotidiennement, présentant une « fenêtre » temporelle pour l'imagerie par résonance magnétique très brève (5 à 10 minutes)²⁷.

De plus, l'élimination plus rapide de la circulation sanguine de nos PS contribueront à diminuer les effets secondaires liés à l'exposition aux rayons solaires⁸⁰.

2.4. Conclusion

Pour conclure, les deux agents théranostiques présentent un temps de circulation d'environ 3h, inférieur à celui des photosensibilisateurs commerciaux (de l'ordre de quelques jours) du fait de l'augmentation de leur taille par un facteur environ 5 ; ceci représente un grand avantage pour pallier les effets secondaires issus du rayonnement solaire lorsque le photosensibilisateur circule durant plusieurs jours.

Un réhaussement important de 50% de PS1 et PS2, comparés au réhaussement d'environ 25% dans les autres organes reins, foie, rate, est observé.

Les PS s'accablent dans les tumeurs avec un maximum de capture et rémanence de 40mn après leur injection intraveineuse, et durant environ 3h, ce qui va nous permettre d'appliquer l'irradiation pour la PDT durant cette période post injection. La clairance dans les tumeurs est de l'ordre de 24h. Les reins et la rate interviennent dans la filtration des agents du sang avec une clairance de l'ordre de 24h, rapide comparé au PS commercial, et plus lente par rapport aux agents de contraste commerciaux IRM (**Magnevist, Dotarem**) ce qui est idéal pour l'acquisition IRM.

Cette étude de biodistribution par imagerie IRM indique que ces deux agents présentent des contrastes améliorés sur toute la période observée. Il convient de noter que le PS1 et PS2 sont des agents de contraste pour l'IRM qui présentent une efficacité deux fois plus élevée en termes de relaxivité à 7T, se traduisant par un renforcement du signal supérieur à concentration identique à celle de l'agent de contraste commercial **Dotarem**. Ainsi, ils améliorent les propriétés d'imagerie tout en démontrant une élimination biocompatible à 24h environ sans l'inconvénient de l'absorption hépatique d'agents nanoparticulaires par exemple où les durées d'élimination peuvent se compter en jours⁹⁵ voire en mois.

Chapitre IV

1. Elaboration du montage pour la PDT *in vivo*

Après plusieurs échanges et réunions avec les commerciaux et spécialistes pour déterminer nos besoins et attentes, et étudier la faisabilité et réalisation du projet, Le système d'irradiation *in vivo* pour réaliser le traitement PDT en préclinique a été entièrement construit en utilisant deux lasers diode continue et fibrés de 645nm et de 720nm, à 20mW (Qphotonics ; niveau 2b), de diamètre 2mm, avec monture de type Butterfly, pilotés par un générateur de la société Optoprim.

Des collimateurs spécifiques pour élargir le faisceau de 2 mm à 8mm pour chaque longueur d'onde sont à disposition si besoin.

Sur un plan de travail pour systèmes optiques appelé breadbord de 63 cm, les lasers fibrés sont montés sur un support 3 axes qui permet la mobilité selon les trois axes 'x,y,z' (figure 68), et protégés par un boîtier de protection laser à porte coulissante Thorlabs.

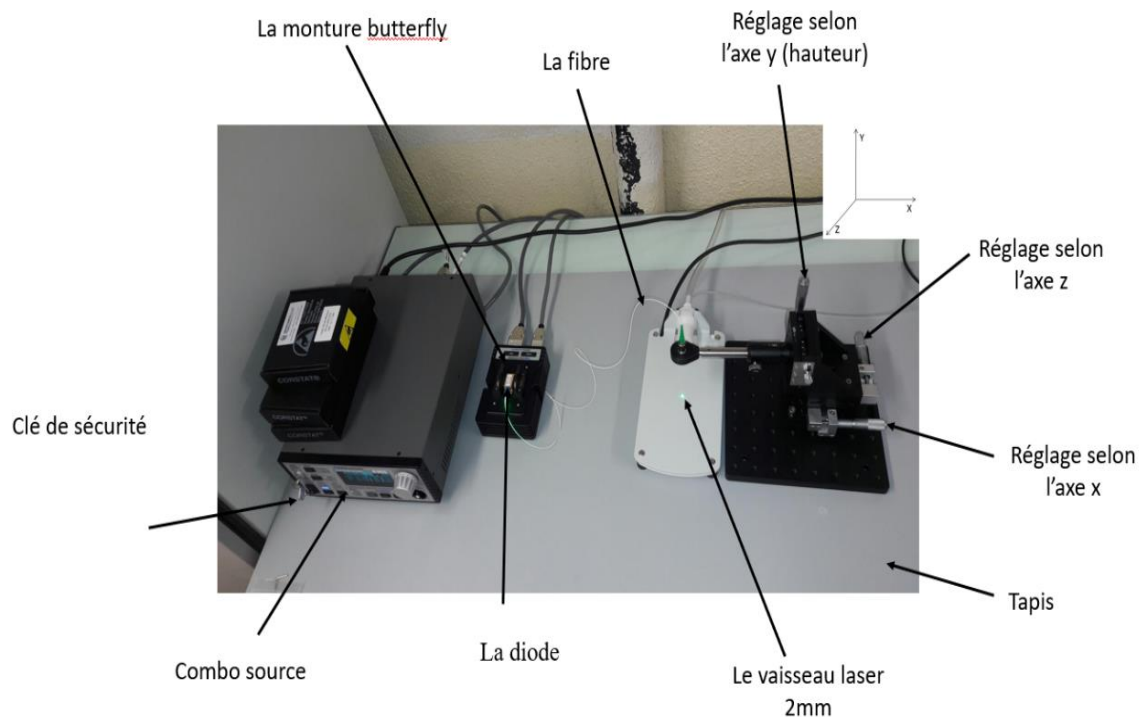


Figure 66 : Montage de la diode laser fibrée pour les expériences de PDT *in vivo*

La salle d'expérimentation a été entièrement protégée par des rideaux de sécurité laser (société Laser 2000), un boîtier de protection adhoc avec porte coulissante (Thorlabs) de taille 60 cm posé sur un breadboard en aluminium de 63cm et d'épaisseur 5mm adapté ainsi que les équipements optiques de protection associés (lunettes de protection laser, Optoprim).

Un système de tapis chauffant relié à un poste d'anesthésie gazeuse à l'isoflurane a été installé.

2. Application du traitement PDT

Vingt souris Balb-C femelles portant des tumeurs CT26 (Elevage Janvier, France) ont été séparées au hasard en quatre groupes, ce qui a donné cinq souris pour chaque groupe.

Dix jours après l'implantation de la tumeur, le traitement (PS1 et PS2) a été injecté par injection de 100ul à 10mM Gd, en intraveineuse avec un cathéter (30 G) placé dans la veine caudale pour les groupes 3,4. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane gazeux à 1,5% dans un mélange air / O₂ à 0,5 L / min et 0,2 L / min respectivement, comme contrôle nous avons utilisé le PS commercial PPIX.

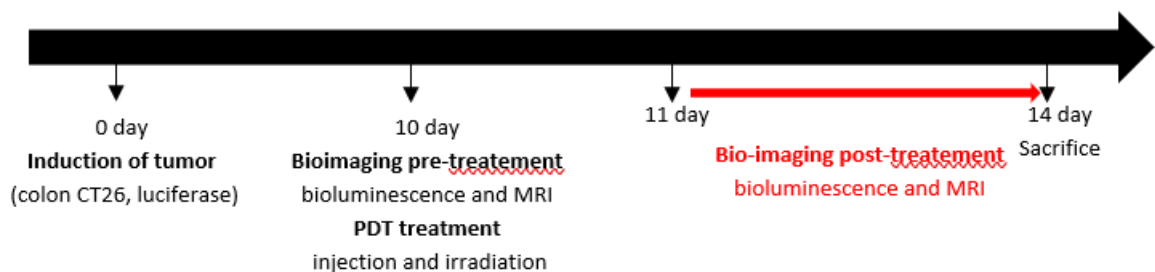


Figure 67 : Protocole expérimental de l'expérience in vivo de PDT

Après avoir été anesthésiées, les tumeurs droites des souris du groupe 2 et 3 ont été exposées à une lumière 1P d'un laser fixé dans un support à trois axes (coupled fiber diode laser, Qphotonics). Avant l'irradiation, le site de la tumeur a été désinfecté avec de l'éthanol. Un cache noir apposé sur la souris permet de n'exposer que la tumeur à l'irradiation.

Groupe 1: souris naïves;

Groupe 2: souris non injectées et irradiées avec un laser à 645 nm pour le PS1 et 720 nm pour le PS2 (3 x 5min, 100 mW, 191 J cm⁻²);

Groupe 3: souris injectées (10mM eq Gd, 100 µL) par voie intraveineuse et irradiées à une longueur d'onde de 645 nm pour le PS1 et 720 nm pour le PS2 (3 x 5 min, 100 mW cm⁻², 191 J cm⁻²) 40mn après l'injection;

Groupe 4: souris injectées (10mM eq Gd, 100 µL) par voie intraveineuse et non irradiées

Groupe 5 : souris injectées avec la protoporphyrine PpIX, 2,5mM/100ul avec prédissolution dans 50ul de DMSO.

Le volume de la tumeur et le poids corporel ont été mesurés et enregistrés tous les jours. Le volume de la tumeur a été calculé par la formule standard suivante :

$$\text{Volume} = (\text{Longueur} \times \text{Largeur}^2) / 2$$

3. Evaluation du traitement par Imagerie IRM

a. Acquisitions IRM

Les images ont été acquises avec un spectromètre de micro-imagerie 7 Tesla (300 MHz) (Bruker, Wissembourg, France) comme décrit précédemment. Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane gazeux à 1,5% dans un mélange air / O₂ à 0,5 L / min et 0,2 L / min respectivement. La fréquence respiratoire a été surveillée pendant toute la durée de la procédure ainsi que la température.

Pour suivre le volume de la tumeur et l'apparition de nécrose et/ou inflammation dûe au traitement PDT, des images IRM pondérées T₂* et T₂ ont été acquises avant traitement, puis 24, 48 et 72h post-traitement.

Les images T₂* sont enregistrées avec une séquence FLASH : Pulse hermitien de 2ms, TR / TE = 350/5 ms, angle de basculement de 40 °, synchronisée sur la respiration. Un champ de vision de 3 x 3 cm², une taille de matrice de 256 x 256 correspondant à 117 µm x 117 µm en résolution plane et 19 à 23 coupes d'une épaisseur de 1 mm ont été utilisées, pour un temps d'acquisition d'environ 7 min.

Les images pondérées T_2 sont enregistrées avec la séquence RARE : (TR / TE = 2500s/22 ms, 21 tranches à 1,5mm, RARE factor =4, scan time : 16mn, Matrix : 256x256, FOV : 3cmx3cm).

b. Analyse des données IRM

Le volume de la tumeur a été mesuré à partir des images pondérées en T_2 : chaque tranche a été ouverte dans le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda) à l'aide du plugin BrukerOpener et la région d'intérêt (ROI) de la tumeur a été délimitée manuellement pour fournir dans chaque tranche une surface exprimée en mm^2 . Sachant que l'épaisseur de la tranche était de 1 mm, le volume tumoral a été obtenu en ajoutant le volume calculé pour chaque tranche pour fournir un volume final en mm^3 . Le volume normalisé de la tumeur a ensuite été calculé à chaque instant en divisant le volume de la tumeur par celui de la tumeur à J0.

Pour évaluer l'efficacité du traitement et comparer les différents groupes de souris, la méthodologie de post-traitement percentile %p25 et %p75 précédemment a été utilisée⁹⁶.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney disponible dans le logiciel de biostatistique Graphpad Prism, 2016) a été utilisé pour comparer deux par deux groupes les valeurs obtenues.

c. Résultats et discussions

i. Nécrose et inflammation

Pour l'évaluation de la nécrose et l'inflammation par IRM, nous avons utilisé une méthodologie post-traitement d'images pour évaluer l'efficacité du traitement PDT à partir d'images IRM pondérées T_2 et T_2^* et des histogrammes des intensités de l'image reliées soit à la nécrose de type hémorragique (pixel d'intensité basse ou nulle) et de type inflammatoire (pixel d'intensité élevée)⁹⁶.

Des régions d'intérêt ROIs délimitant la tumeur sur chaque coupe de ces images ont été sélectionnées manuellement et les histogrammes de distribution en intensité de chaque coupe sont obtenus dans ImageJ.

La compilation de ces histogrammes permet d'obtenir une distribution en intensité du signal pour chaque tumeur et déduire ainsi les percentiles p25 et p75, la limite d'intensité IRM au percentile 25 ou percentile 75, attribué respectivement à la nécrose hémorragique (zone inférieure au percentile 25) ou à l'inflammation (zone supérieure au percentile 75) (voir Figure 70).

Sur les images pondérées T2* et T2, la distribution de l'intensité des pixels a été mesurée afin de calculer le %p0,25 et le %p0,75 qui a été pris comme paramètre de référence pour comparer les différents groupes. En bref, la distribution de l'intensité de chacun des pixels inférieurs à la valeur $I_{0,25} = 0,25 \times (\text{Intensité}_{\max} - \text{Intensité}_{\min})$ a été calculée et notée %p25, la distribution de l'intensité de chacun des pixels supérieurs à la valeur $I_{0,75} = 0,75 \times (\text{Intensité}_{\max} - \text{Intensité}_{\min})$ a été calculée et notée %Ap75. Correspondant respectivement au % de pixel des zones hémorragiques et au % de pixel des zones inflammatoires.

Une condition de validité de cette méthode réside dans le fait que pour ces histogrammes de répartition des intensités, les limites inférieures et supérieures doivent être similaires en intensité minimales et maximales.

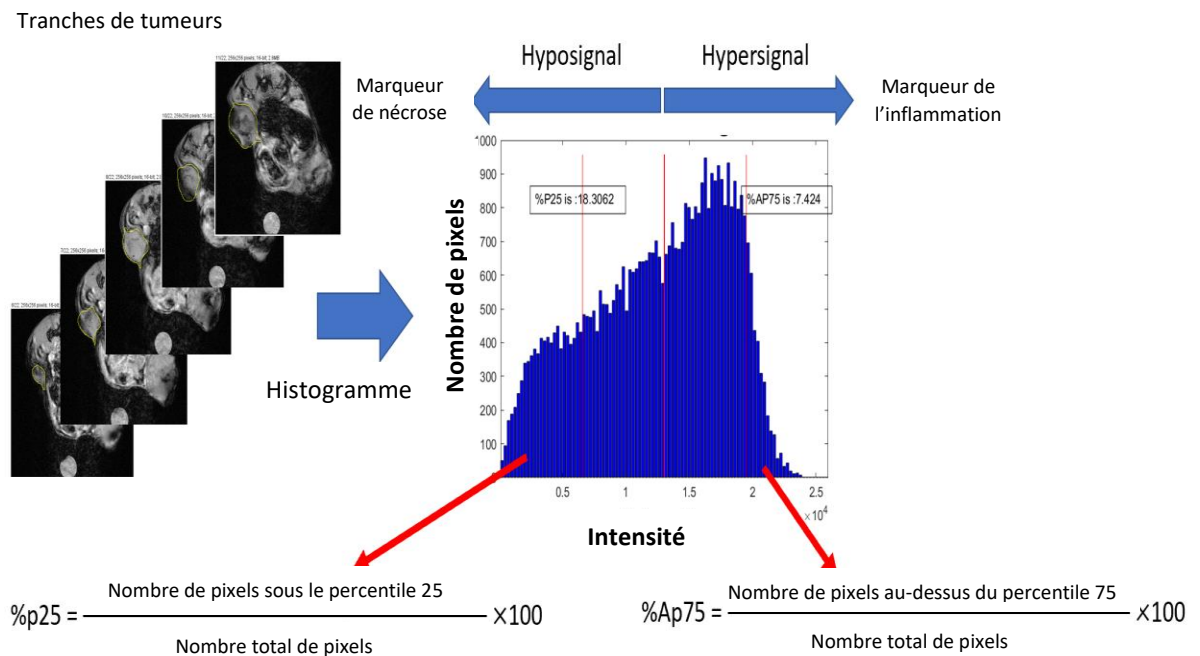


Figure 68 : Méthode d'évaluation IRM des zones supposées nécrotiques et inflammatoires par la méthode du percentile 25 et Above 75 : %p25 et %Ap75⁹⁶

- **PS1**

Pour le PS1, le %p25 et le %Ap75 dans la tumeur traitée étaient plus élevés par rapport aux groupes contrôles (Voir Figures 71 et 72).

24h après l'injection de PS-Gd1 et l'irradiation PDT, le %p25 a significativement augmenté, reflétant la nécrose qui est l'effet du traitement PDT. Tandis que pour le %Ap75 reflétant l'inflammation, nous avons enregistré une augmentation significative au bout de 72h post traitement. En effet, l'irradiation de la tumeur après injection du PS1 a induit la photoactivation du photosensibilisateur et une libération des ROS qui induit la mort des cellules provoquant la nécrose qui est l'effet direct de la photothérapie dynamique accompagnée d'une inflammation.

Nous n'avons enregistré aucune augmentation des deux paramètres étudiés pour les groupes contrôles, en particulier pour les groupes qui ont reçu que le produit ou l'irradiation seule, suggérant que le traitement peut être détecté par IRM *in vivo* (T_2 et T_2^* reflétant la nécrose et l'inflammation des tissus) et serait donc efficace seulement en présence des deux conditions réunies, PS et lumière.

Cette technique des %p25 et %Ap75 nous a donc permis d'évaluer l'efficacité du traitement et ainsi déterminer le mode d'action de la PDT qui serait dans notre cas, la nécrose et l'inflammation.

Pour conforter ces observations et hypothèses biologiques, nous devons réaliser des expériences complémentaires *in vivo* par imagerie de bioluminescence et par histologie.

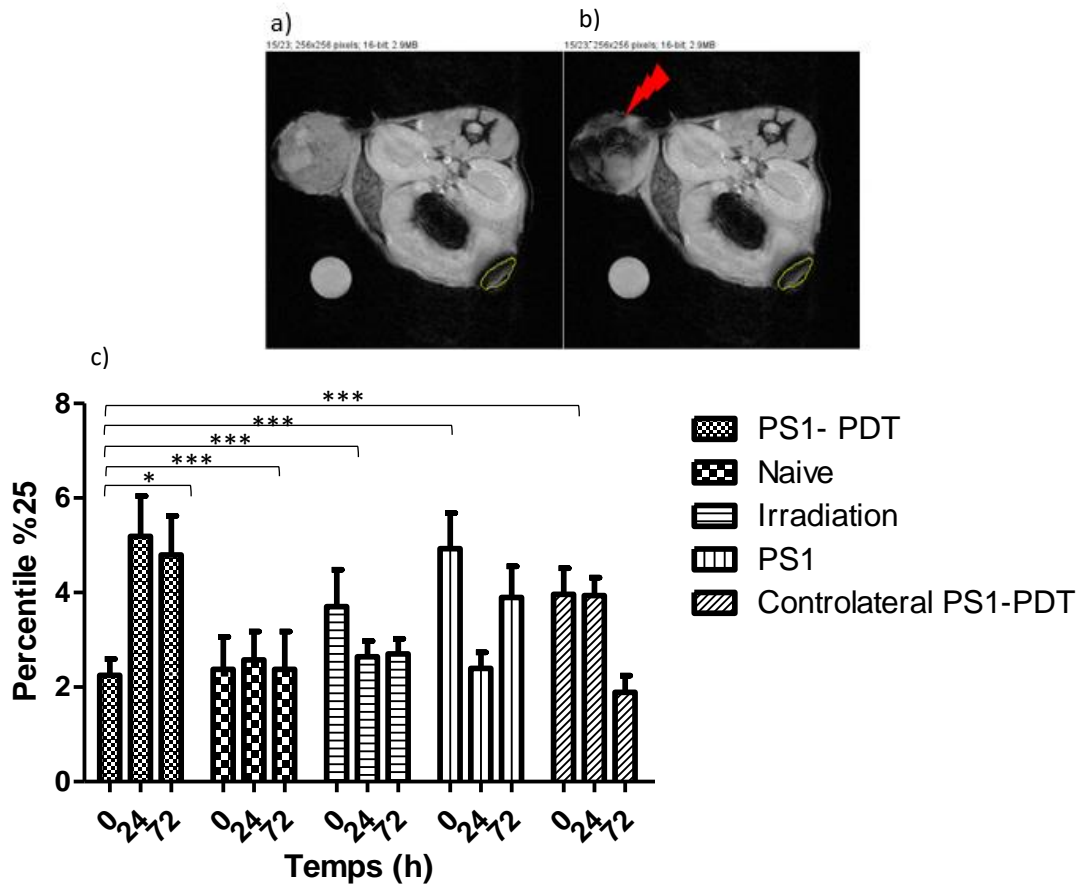


Figure 69 : Analyse de l'histogramme des images pondérées T_2 , représentant l'évolution du pourcentage sous le percentile 25 %p25 induite par le traitement PS1-PDT, en relation avec la nécrose hémorragique. a) pré-traitement, b) post-traitement, c) histogramme, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

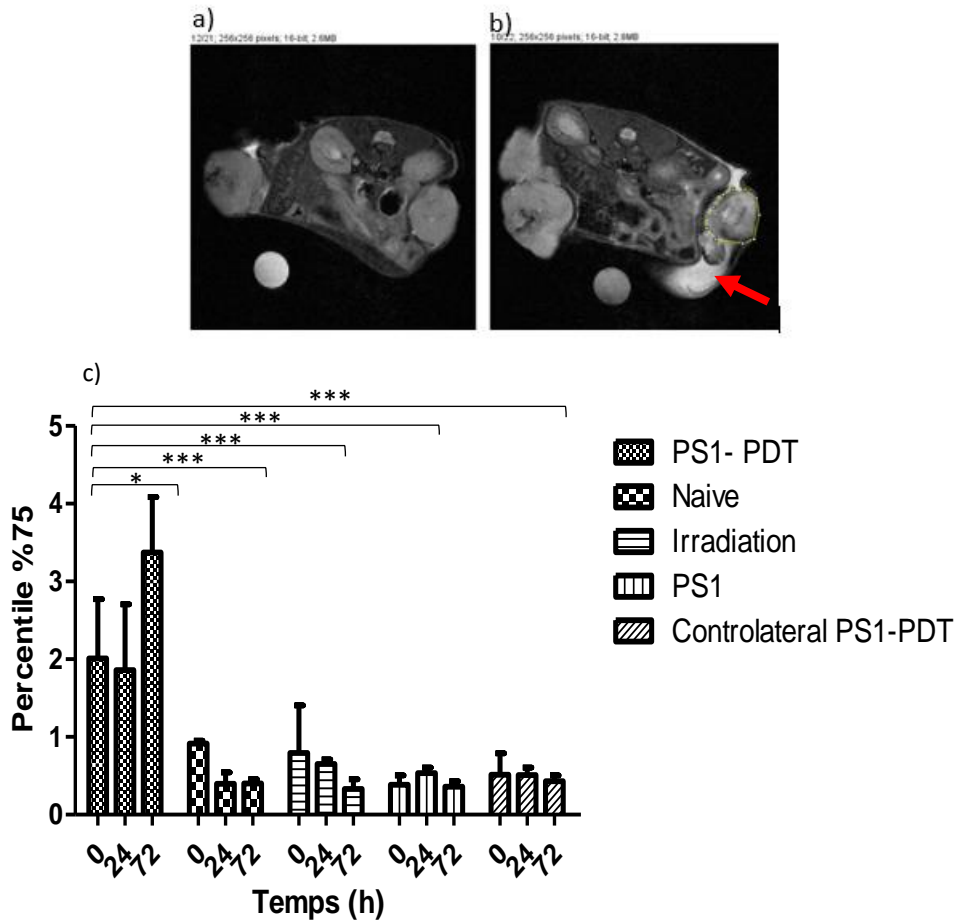


Figure 70 : Analyse de l'histogramme des images pondérées T_2 , représentant l'évolution du pourcentage au-dessus percentile 75, %Ap75, induite par le traitement PS1-PDT, en relation avec l'inflammation. a) pre-traitement, b) post-traitement, c) histogramme, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

- **PS-Gd2**

Pour le PS2, le %p25 et le %pAp75 dans la tumeur traitée étaient plus élevés par rapport aux groupes contrôles à 24h et 72h post traitement (voir Figures 73 et 74). Les mêmes résultats ont été obtenus pour le PS commercial PpIX, indiquant une fois de plus, comme pour le PS1, l'efficacité du traitement PDT. En effet, l'irradiation de la tumeur en présence du PS a induit une nécrose qui, à son tour, provoque l'inflammation.

Aucune augmentation significative n'a été enregistrée pour les groupes contrôle, confirmant ainsi la spécificité du traitement et la nécessité de réunir les deux conditions (PS et irradiation) en photothérapie dynamique.

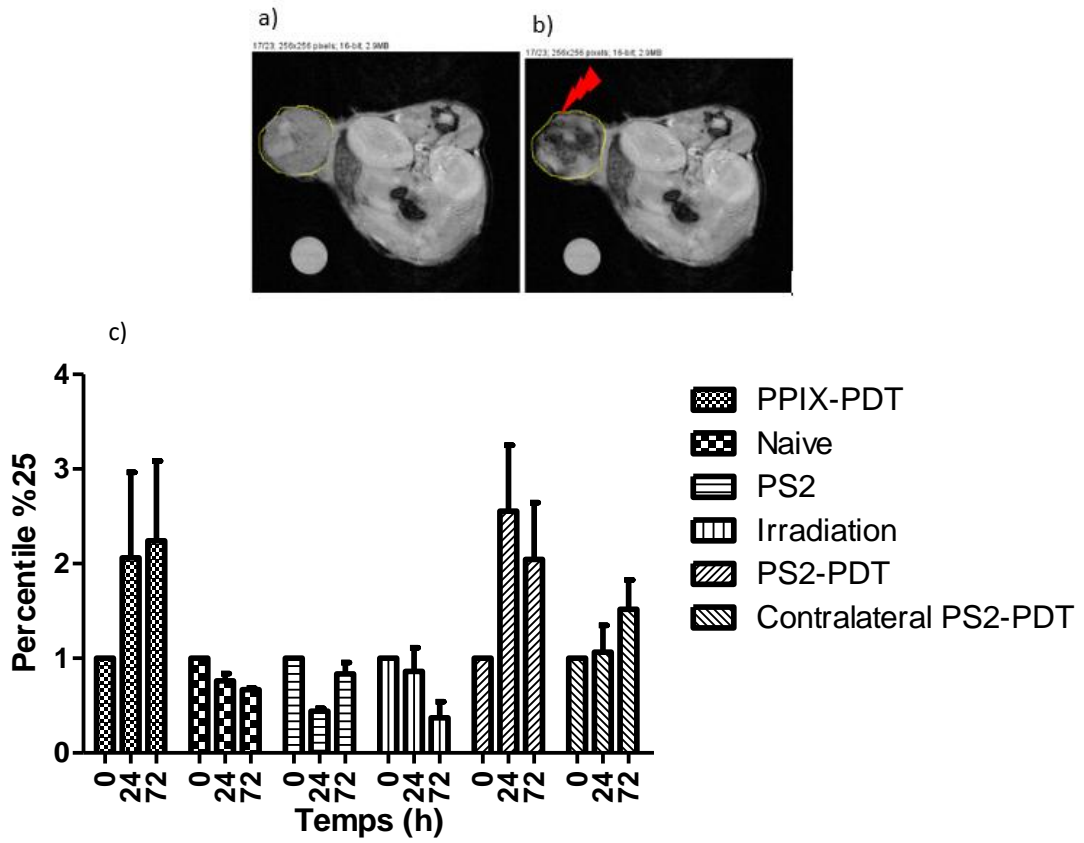


Figure 71 : Analyse de l'histogramme des images pondérées T_2 , exprimant l'évolution du pourcentage sous le percentile 25 %p25 induite par le traitement PS2-PDT, en relation avec la nécrose hémorragique. a) pré-traitement, b) post-traitement, c) histogramme, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

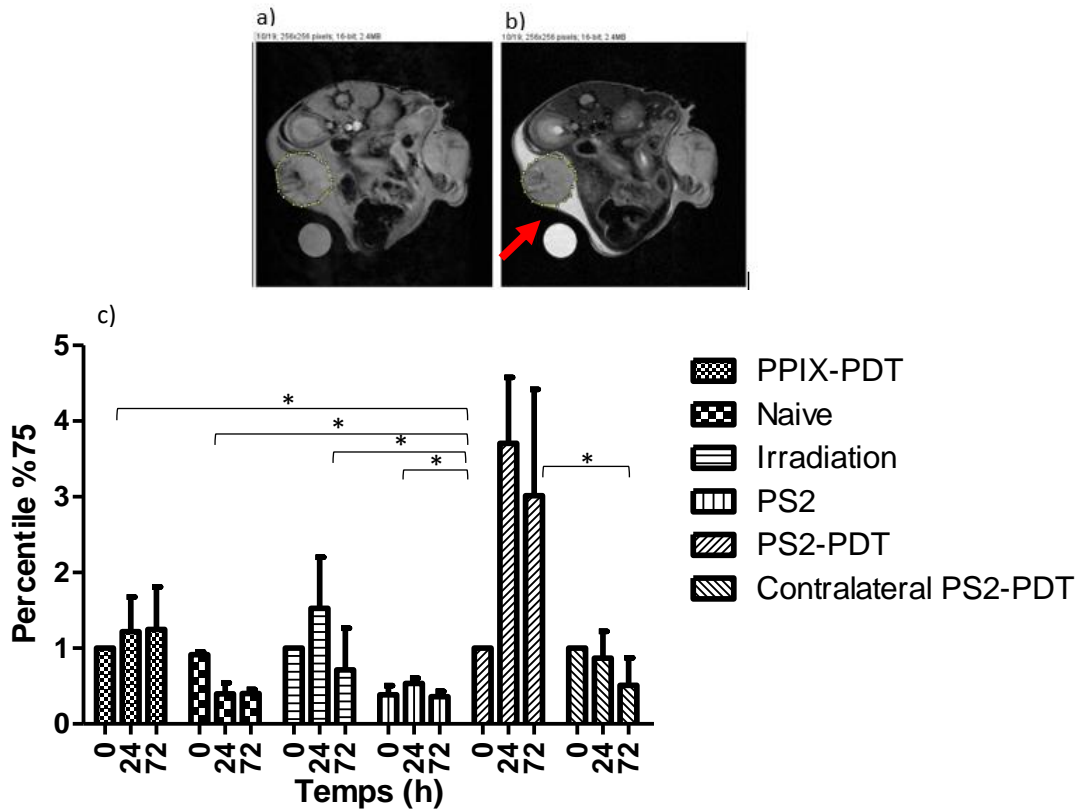


Figure 72 : Analyse de l'histogramme des images pondérées T_2 , en évolution du pourcentage au-dessus du percentile 75 %Ap25 induite par le traitement PS2-PDT, en relation avec l'inflammation. a) pré-traitement, b) post-traitement, c) histogramme, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

ii. Volume tumoral

Le volume des tumeurs est mesuré à partir d'images IRM acquises par une séquence FLASH pondérée T_2^* et synchronisée avec le cycle respiratoire de la souris. La résolution de $117 \times 117 \mu\text{m}^2/\text{pixel}$ permet de calculer un volume beaucoup plus précis qu'au pied à coulisse qui est opérateur dépendant. Ces acquisitions sont réalisées le jour du traitement J0 puis 24, et 72 h plus tard. Le volume de chaque tumeur est normalisé par son volume à J0.

- **PS1**

A 24h après le traitement, nous observons que le traitement complet PS1 avec irradiation, montre un effet important avec une régression tumorale significative observée à 24 h post traitement. De plus, le suivi longitudinal décrit une légère baisse du volume tumoral avec une différence significative encore présente 4 jours après ce traitement complet.

La tumeur controlatérale présente un développement tumoral ralenti par rapport aux tumeurs contrôle des souris tumorales « naïves ». Ce ralentissement est connu dans la littérature⁹⁷ et peut s'expliquer par le développement d'un effet immunitaire (ajouter la référence) que nous allons étudier par d'autres biomarqueurs.

Les tumeurs recevant juste l'injection du produit ou juste une irradiation, enregistrent un léger ralentissement de l'évolution tumorale, non significatif (voir Figure 75).

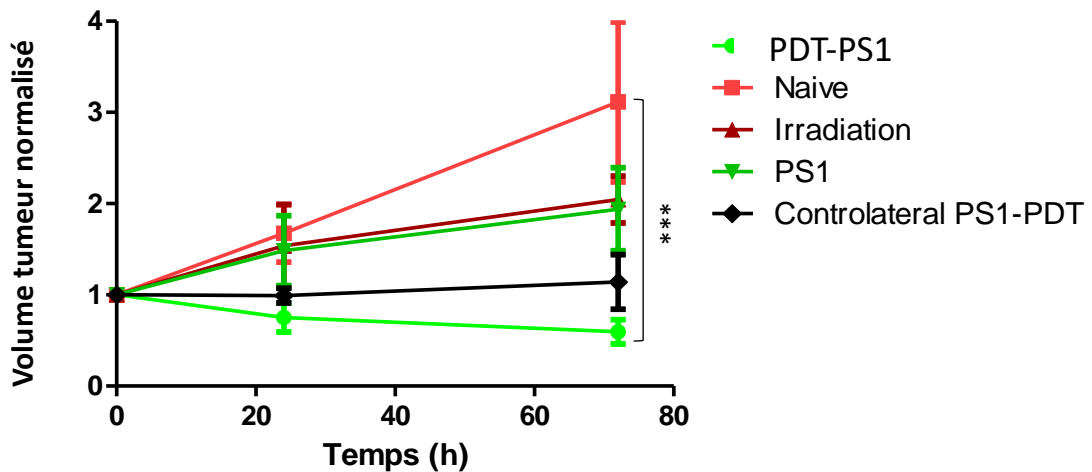


Figure 73 : Evolution du volume tumoral normalisé par rapport à la taille initiale (mm^3) mesuré par IRM après traitement PS1 et PDT (PS1-PDT), Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

- **PS2**

Comme pour le PS1, à 24h post-traitement, le traitement complet PS1 avec irradiation, montre un effet important avec un ralentissement, voire l'arrêt de l'évolution tumorale significative observée à 24 et 72h post traitement. Nous observons également un effet du traitement sur la tumeur controlatérale avec un développement tumoral ralenti par rapport aux tumeurs contrôle.

Tandis que pour les tumeurs recevant juste du produit ou juste une irradiation, nous avons enregistré un léger ralentissement de l'évolution tumorale, certes non significatif.

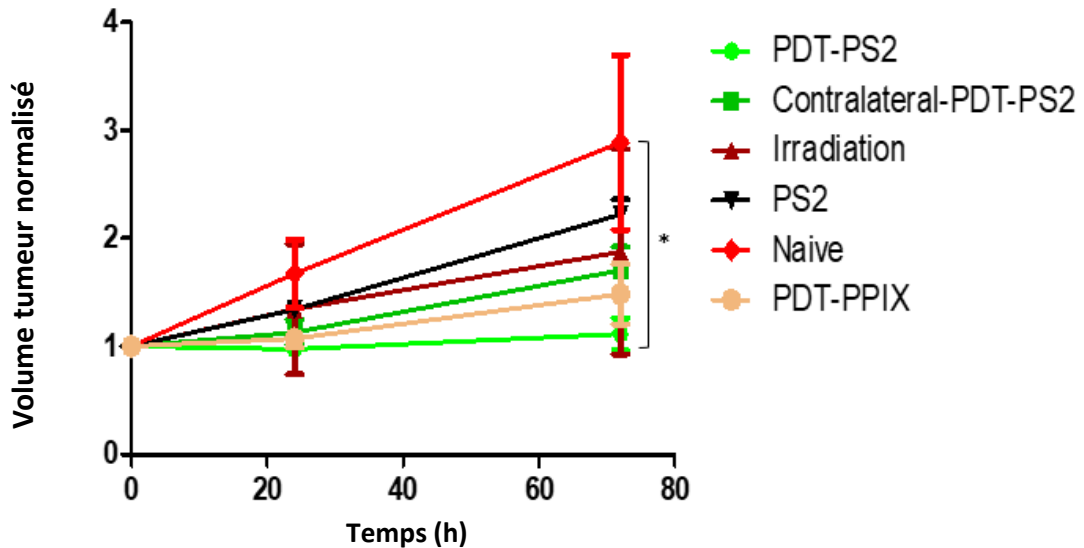


Figure 74 : Evolution du volume tumoral normalisé par rapport à la taille initiale (mm^3) mesuré par IRM après traitement PS2 et PDT (PS2-PDT), Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

Le développement tumoral est donc ralenti significativement à J4 par le traitement avec PS2 et irradiation.

Pour comparaison avec un photosensibilisateur commercial, nous avons utilisé le PS commercial PpIX. L'efficacité du traitement PS2- PDT est alors comparée à ce traitement PpIX-PDT, et les résultats d'évolution du volume tumoral (IRM) montrent qu'il présente une moins bonne efficacité.

Ainsi, notre stratégie de traitement permet d'avoir de meilleurs résultats sur l'impact de la croissance du volume tumoral que pour les traitements décrits jusqu'à présent²⁷ et, ceci, avec une unique dose d'injection et une unique séance d'irradiation.

Nous avons donc apporté ici la preuve de concept de l'efficacité de la stratégie de traitement associant les deux nouveaux PS et l'irradiation.

Afin de vérifier et d'interpréter l'impact des traitements sur les tumeurs, nous avons effectué d'autres expériences complémentaires par imagerie optique de bioluminescence *in vivo* et par histologie.

4. Evaluation du traitement par bioluminescence

Les tumeurs CT26-Luc implantées étant transfectées avec le gène reporteur de la luciférase, nous pouvons ainsi effectuer un suivi de la croissance tumorale (fonctionnalité tumorale) par imagerie optique de bioluminescence, une modalité plus facile à l'usage, indicative en 30min de la fonctionnalité tumorale, et plus rapide avec l'étude simultanée de 5 souris. Du sel potassique de la luciférine (D-luciférine, Fluoprobes sel K⁺, Interchim) dilué dans du PBS a été injecté par voie ip à 2 mg par souris de 20g, ce qui est en grand excès par rapport à la quantité de luciférase. L'imagerie optique a été réalisée avec une caméra refroidie hautement intensifiée (Biospace, Optima Paris, France).



Figure 75 : Caméra Biospace Optima (plateforme LIOPA, Faculté de Pharmacie, Paris)

L'acquisition de la luminescence a été initiée 20 min après l'injection de luciférine avec une durée de 10 min (logiciel Photoacquisition). Le niveau de luminescence a été évalué par le choix de régions d'intérêt ROI délimitant la zone tumorale (logiciel de traitement d'image M3 Vision + Biospace Measure, Paris, France). Chaque groupe de souris a subi le même protocole avant le traitement (pré-traitement) et 24h, 48h, 72h post-traitement.

a. Résultats et discussions

- **PS1**

Afin d'évaluer la charge tumorale (activités), le signal de bioluminescence lié à la tumeur du CT26-Luc+, a été mesuré (voir Figure 78). Le résultat montre que le traitement PS1

PDT, diminue significativement la bioluminescence tumorale au 4ème jour après la PDT par rapport aux groupes de souris témoins (PS seulement, irradiation seule, naïve).

Il faut noter que la tumeur controlatérale PDT (pas d'irradiation de la tumeur) a tendance à se stabiliser, ce qui suggère un effet immunitaire comme décrit dans la littérature⁹⁷.

Ce résultat vient confirmer nos observations dans le suivi de l'évaluation du volume tumorale par IRM.

Tandis que pour le groupe de souris qui n'ont reçu que l'injection du produit, une stabilisation du signal a été enregistrée jusqu'à 48h post traitement puis il repart à la hausse à 72h post traitement.

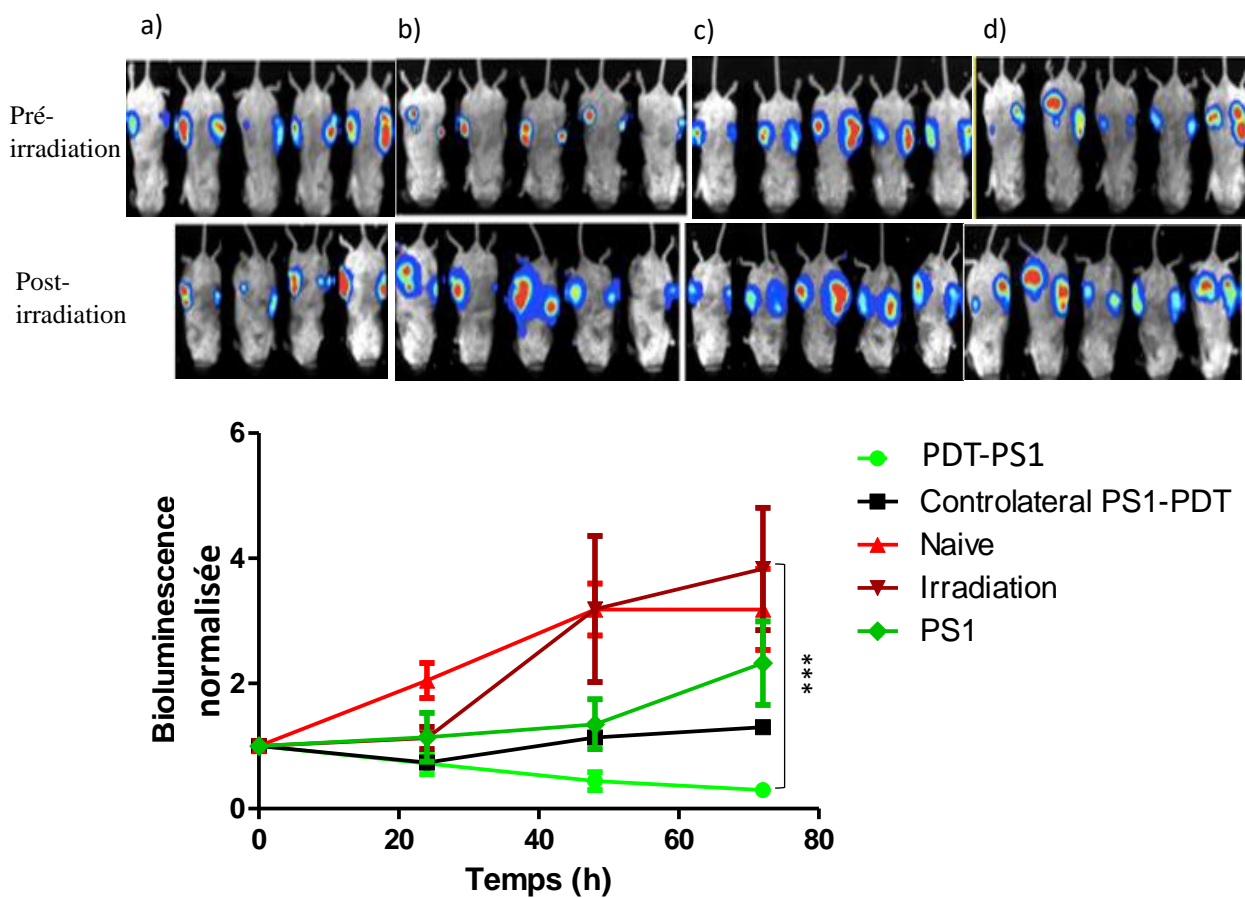


Figure 76 : Évolution du signal de bioluminescence (ph/s/cm²/sr) des souris porteuses de la tumeur CT26 24h, 48, 72 h post PDT. a) PS1-PDT : PS1 + irradiation, b) Naïve, c) irradiation seule, d) PS1 seule, n=5, Test de Mann-Whitney, n=5, *P<0.05

- **PS2**

Comme pour le PS1, les niveaux de bioluminescence ($\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$) ont été tracés en fonction du temps (voir Figure 79) et nous avons observé une stabilisation, voire une légère diminution, significative la bioluminescence tumorale au 3ème jour après la PDT par rapport aux groupes de souris contrôle (PS seulement, irradiation seulement, naïve) Une fois de plus, la tumeur controlatérale PDT (pas d'irradiation de la tumeur) a tendance à se stabiliser, même si l'évolution n'est pas significative pour appuyer notre suggestion de présence d'un effet immunitaire⁹⁷.

Tandis que pour les autres groupes contrôle qui n'ont reçu que l'injection du produit, ou juste l'irradiation, ou les souris naïves, une augmentation du signal a été enregistrée jusqu'à 48h post traitement.

Comme témoin positif, nous avons appliqué le même traitement en utilisant un PS commercial utilisé en clinique, la PpIX. Nous avons enregistré un impact significatif sur la croissance tumorale, comme pour notre traitement PS PDT à 24h post traitement et une légère augmentation à 48h non significative. Ces résultats nous montrent l'efficacité de notre produit vu la similarité de l'évolution des niveaux de bioluminescence avec celle du produit commercial.

De manière intéressante, nous observons une tendance à un impact de la croissance tumorale après irradiation seule, présageant un effet thermique possible sur les tissus tumoraux (fluence 191 J.cm^{-2} déposée).

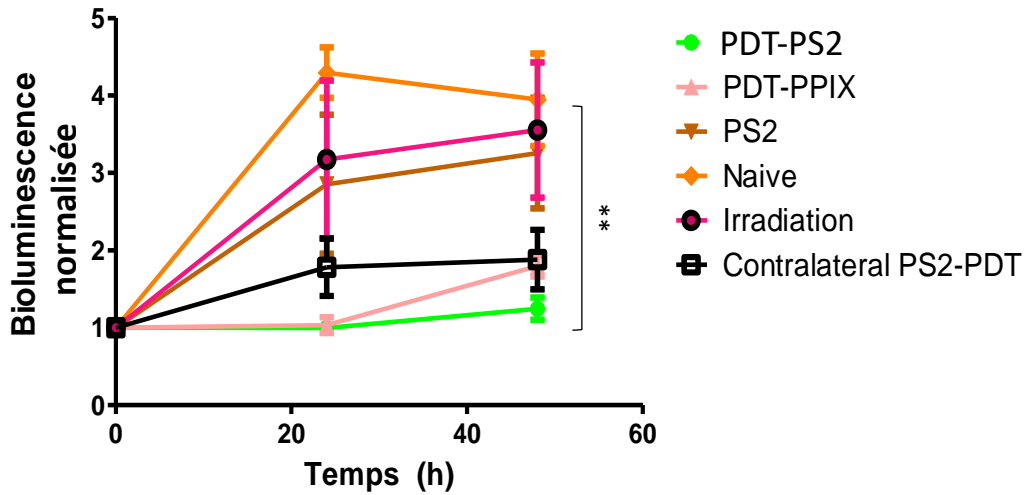


Figure 77 : Évolution du signal de bioluminescence (ph/s/cm²/sr) de souris porteuses de la tumeur CT26 24h, 48 h post PDT. a) PS2-PDT : PS2 + irradiation, b) Naïve, c) irradiation seule, d) PS2 seule, n=5, Test de Mann-Whitney, n=5, *P<0.05

Nous avons également vérifié la température en surface de la tumeur grâce à l'imagerie temporelle par une caméra thermique (FLIR).

Les résultats montrent une augmentation légère d'environ 3°C après 5 min d'irradiation (voir Figure 80).

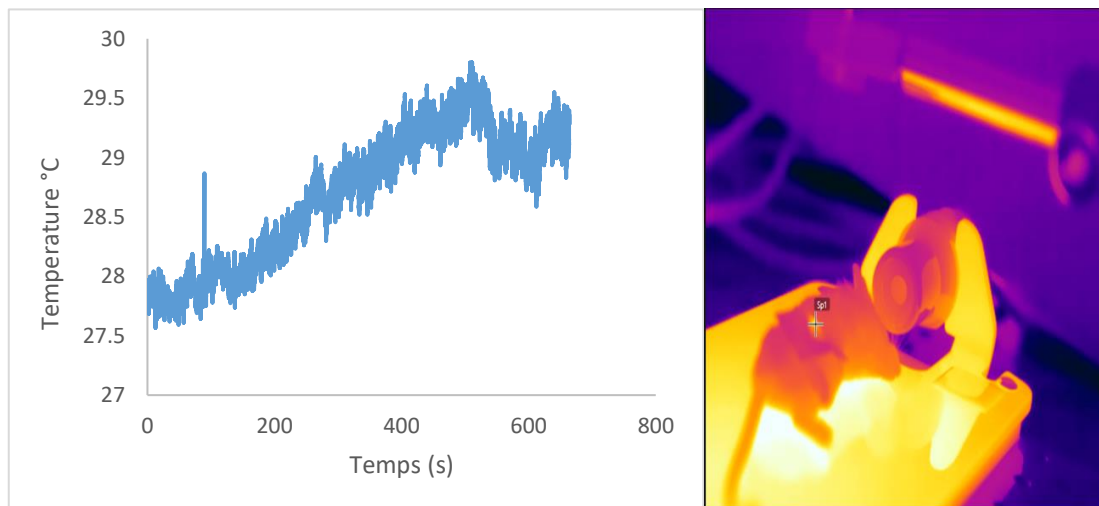


Figure 78 : Courbe d'évolution de la température pendant l'irradiation en surface de la tumeur (n=10)

Discussion

Dans la littérature, en 2017, Yuzhakova et al.²⁷ a utilisé cette même stratégie d'évaluation *in vivo* et *in vitro* pour l'évaluation de 2 porphyrines théranostiques greffées avec des complexes linéaires de DTTA de porphyrine Gd GdPz1 et GdPz2. Par imagerie de fluorescence, et par IRM à 9,4T, le groupe a observé un signal notable par fluorescence, et une rémanence de plus de 3h par IRM et jusqu'à 96h par imagerie de fluorescence *in vivo*, avec une plus grande accumulation à 24h dans les tissus tumoraux par rapport aux autres tissus : peau, abdomen, poumons. Les relaxivités r1 obtenues à 4T sont plus faibles que l'agent commercial Dotarem, alors que les relaxivités r2 mesurées par cette équipe sont extrêmement élevées, en raison du champ magnétique de 9,4T utilisé plus élevé que dans notre étude, et l'interaction avec les polymères de solubilisation. En effet, La présolubilisation de ces agents dans une solution à 5% en PEG polyimide a été nécessaire.

Le traitement par PDT des tumeurs CT26 avec l'un des GdPz1 n'a eu aucun impact sur leur croissance, alors que le second GdPz2, a provoqué une inhibition modérée de la croissance tumorale, avec des différences plus prononcées par rapport aux tumeurs non traitées au jour 21 après l'inoculation de la tumeur (11 jours après le traitement).

L'absorption et l'irradiation à 600 nm utilisée moins efficace à la pénétration de l'irradiation *in vivo* que nos molécules (650 et 720 nm) pourraient aussi expliquer cet impact plus modéré de la PDT avec ces molécules.

Li, Pandey et al.⁸¹ a également évalué jusqu'à l'étape *in vivo* leur photosensibilisateur théranostique, Le HPPH-aminobenzyl-Gd(III)-DTPA a produit une augmentation remarquable du signal IRM 8h après l'injection iv et une activité tumoricide significative, 50% de régression tumorale mesuré par pied à coulisse avec disparition de la tumeur chez 80 % des souris au bout de 90 jours.

D'autres études *in vivo* ont été réalisées pour évaluer l'efficacité des PS en PDT, telles que les études de Thomas, Barberi et al.⁹⁴ sur des PS de type chlorine où ils ont enregistré un retard de croissance tumorale statistiquement significatif.

5. Evaluation du traitement par Histologie

Le même protocole de traitement expérimental de la PDT décrit précédemment a été appliqué sur 20 souris sacrifiées 24h après le traitement, les tumeurs destinées à l'histologie sont prélevées et congelées rapidement dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. Les échantillons sont alors conservés à -80 °C avant d'être coupés en tranches de 10 µm d'épaisseur avec un Cryotom (Thermo) puis déposés sur des lames de verre SuperfrostPlus (Polysine®,CML, Nemours, France) et conservées congelées avant coloration.

a. Nécrose /HE

La quantification de la nécrose a été réalisée en utilisant la coloration Hématoxyline-Eosine réalisée en une seule étape comme décrit précédemment⁸. La quantification de la nécrose par millimètre carré (mm²) a été calculée à l'aide du logiciel QuPath⁹⁸. Les régions tumorales nécrosées représentatives correspondant à une absence de cellules dans les images ont été annotées par Gautier Beitz sur les lames colorées H & E, à l'aide des outils d'annotation manuels de QuPath qui nous donnera par la suite le pourcentage des surfaces en nécrose.

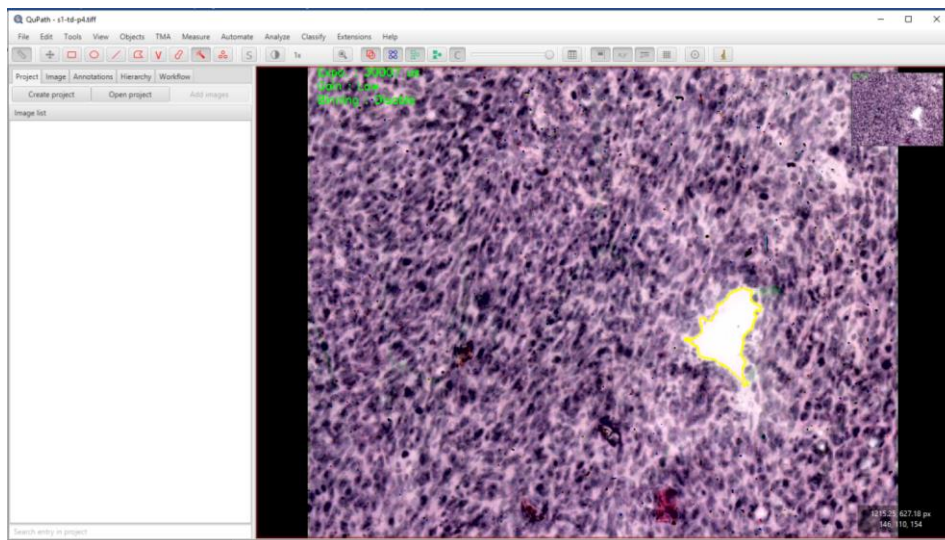


Figure 79 : Annotation des nécroses dans le logiciel QuPath (<https://qupath.github.io/>)

b. Vascularisation /CD31

Le marquage des vaisseaux sanguins est réalisé par immunohistochimie en ciblant la protéine membranaire CD31 qui est exprimée par toutes les cellules endothéliales vasculaire avec l'anticorps primaire CD31. Un anticorps secondaire biotinylé cible ce premier anticorps CD31, puis un complexe avidine-peroxydase marque la biotine. Il est aussi possible d'utiliser un anticorps secondaire déjà marqué par la peroxydase. La réaction de diaminobenzidine (DAB) avec la peroxydase permet de former un précipité marron qui augmente notablement le contraste et donc la détection des vaisseaux pour une meilleure analyse.

La quantification du nombre de vaisseaux par millimètre carré (mm²) a été réalisée sur 10 images situées au centre (n=5) et en périphérie (n=5) à un grossissement x20 et calculée avec une macro spécifique sous le logiciel ImageJ comme décrit précédemment^{96,99}.

c. Réponse immunitaire /CD3

Contre de nombreux agents pathogènes tels qu'un virus ou des cellules tumorales ; une réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense. Une batterie de biomarqueurs enzymatiques, d'anticorps ou de cellules de défense sont mises en jeu dans cette réponse immunitaire. Parmi eux, les lymphocytes T jouent un grand rôle. Ils expriment tous le marqueur membranaire CD3.

C'est pourquoi, la détection de ce marqueur CD3⁺ T des lymphocytes a été recherchée dans les tumeurs étudiées pour vérifier si la réponse immunitaire était activée davantage avec le traitement PS PDT.

Le marquage CD3 a été réalisé par Olivia Bawa, ingénieur dans le service PETRA (Pathologie expérimentale et translationnelle) équipe B2M, à l'hôpital GUSTAVE ROUSSY, Villejuif.

La quantification de la densité des cellules CD3 a été réalisée sur 10 images enregistrées sur un microscope photonique Zeiss, situées au centre (n=5) et en périphérie (n=5) dans la tumeur avec un grossissement x20 après un calcul effectué avec une macro spécifique sous le logiciel ImageJ (Annexe 2).

d. Analyses statistiques

Le résultat histologique a été exprimé en moyenne \pm SEM, une analyse de variance unidirectionnelle et le test de comparaison multiple de Bonferroni (à l'aide du logiciel Graphpad Prism) a été appliqué pour déterminer la signification du résultat, valeur P. Résumé : $<0,001$ Extrêmement significatif ***; $0,001$ à $0,01$ Très significatif **; $0,01$ à $0,05$ Significatif *; $> 0,05$ Non significatif.

e. Résultats et discussions

➤ Vascularisation et nécrose

L'observation *ex vivo* des tissus permet, grâce à des techniques de coloration, de relever différents paramètres tels que la densité en vaisseaux sanguins et la nécrose. Les vaisseaux sanguins sont mis en évidence à l'aide d'un marquage immunohistologique avec l'anticorps CD-31 spécifique des cellules vasculaires qui seront colorées en marron (voir Figure 82).

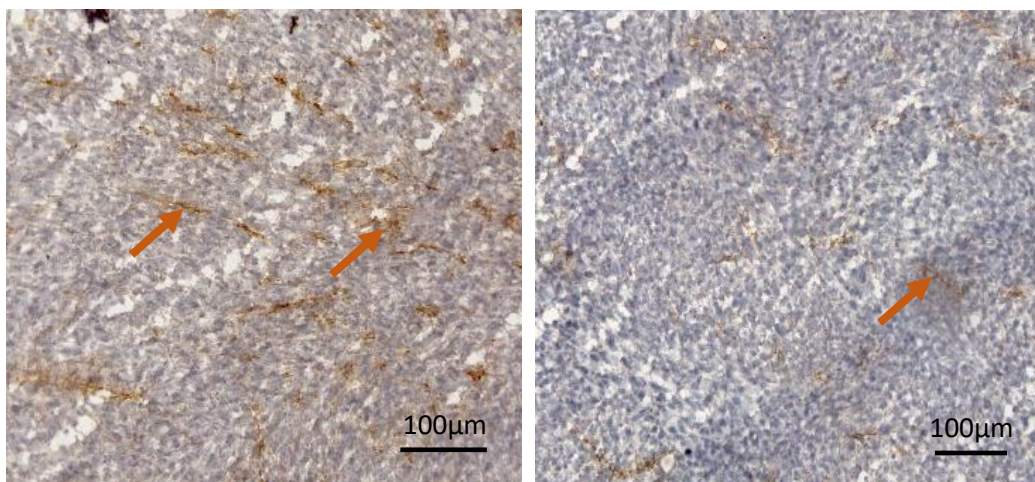


Figure 80 : Marquage CD31, vascularisation de la tumeur sans et avec traitement (flèche marron)

La nécrose est mise en évidence par la coloration Hématoxyline/Eosine. L'absence de cellules liée à la nécrose est quantifiée comme un marqueur de nécrose (voir Figure 83).

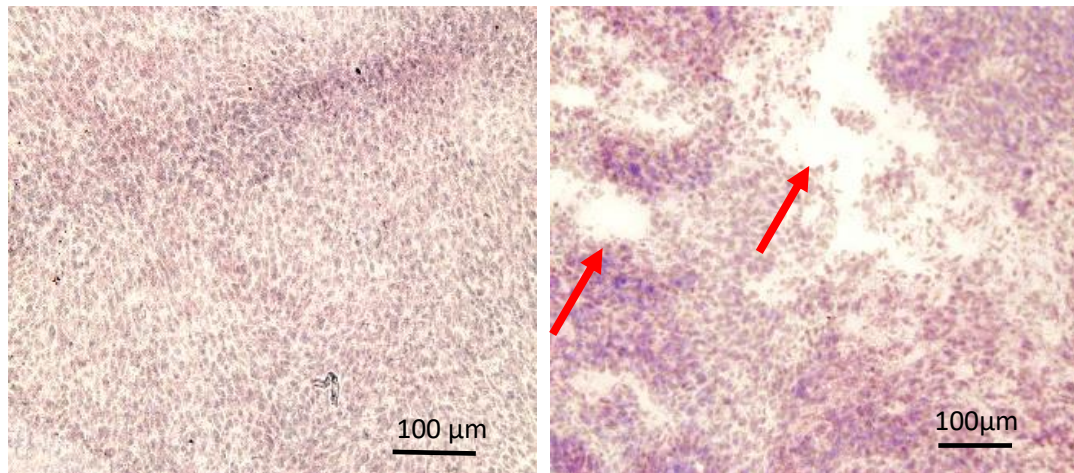


Figure 81 Coloration HE, nécrose de la tumeur sans et avec traitement PS-PDT. (flèches rouges)

- **PS1**

Afin de confirmer les observations obtenues par IRM et par imagerie de bioluminescence *in vivo*, des analyses histologiques des tumeurs ont été réalisées pour les différentes conditions expérimentales 24h après le traitement. Une coloration histologique de la vascularisation (CD31) et des nécroses (HE) a été réalisée. Les figures 84 et 85 présentent les résultats obtenus en termes de densité microvasculaire (Figure 84, MVD, Mean Vascular Density, exprimée en nombre de vaisseaux /mm²) et de nécrose (voir Figure 85).

La diminution de la MVD pour le traitement PDT était significative par rapport aux groupes contrôles. En effet, les dommages vasculaires en thérapie photodynamique anticancéreuse sont considérés comme étant un phénomène majeur contribuant largement à l'efficacité du traitement. En outre, dans la Figure 85, une augmentation significative de la nécrose a été observée également pour le traitement PDT par rapport aux groupes contrôle, qui sont en concordance avec les résultats obtenus par IRM.

Pour la tumeur controlatérale, en accord avec les résultats en IRM, aucun effet significatif sur la vascularisation ni la nécrose n'a été enregistré. Cela confirme qu'il n'y a pas d'effet direct dû au traitement, mais le ralentissement de l'évolution du volume de la tumeur et la stabilisation de son activité observée en bioluminescence nous laisse supposer qu'il y a bien un effet du traitement PDT supplémentaire qui pourrait être lié à la réponse, qui est un effet indirect du traitement PDT, et que nous allons étudier avec le marquage CD3.

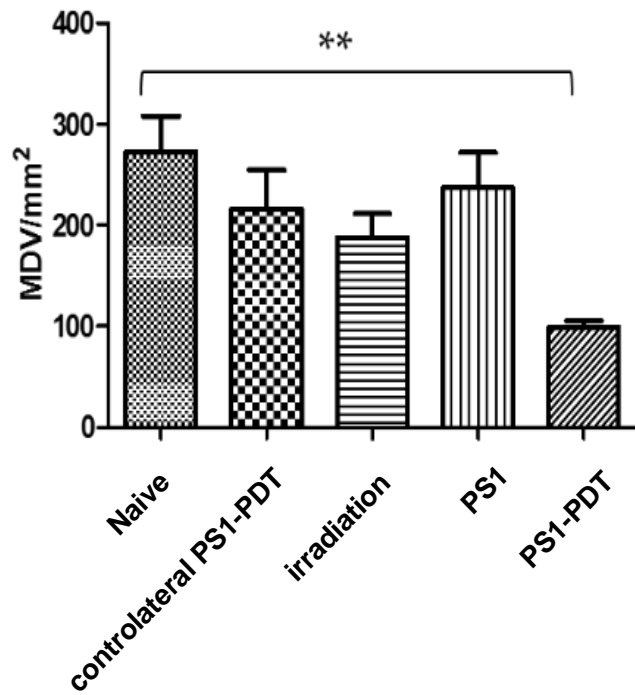


Figure 82 : Densité microvasculaire après traitement PS1 - PDT, Test de Mann-Whitney, n=5, *P<0.05

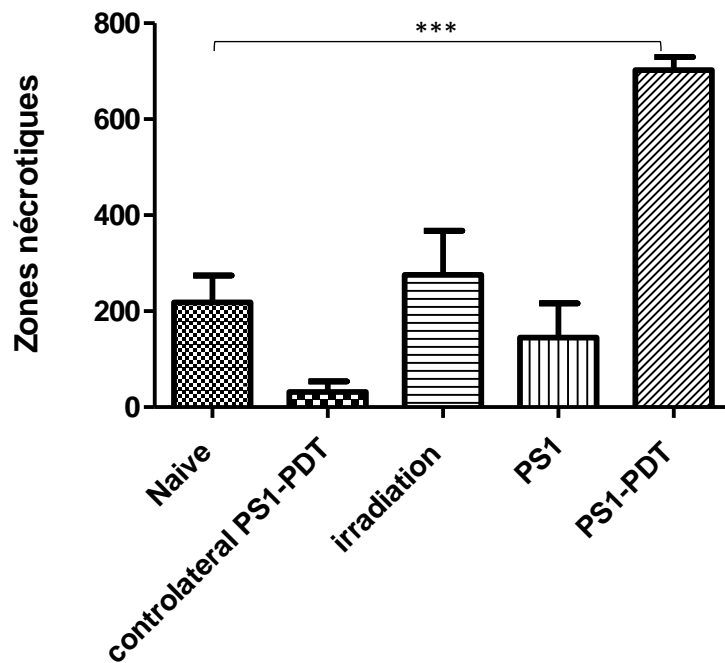


Figure 83 : Nécrose après traitement PS1 -PDT, Test de Mann-Whitney, n=5, *P<0.05

- **PS2**

Comme pour le traitement avec le PS1, nous avons enregistré une diminution significative de la MVD pour le traitement PDT par rapport aux groupes contrôle et une augmentation significative de la nécrose, qui sont aussi en concordance avec les résultats obtenus par IRM. Ainsi, le type de mort cellulaire impliqué après PDT est mixte, une combinaison de l'effet direct qui est la nécrose et l'effet indirect, les dommages vasculaires, les deux conduisant à une inflammation voire une potentielle réponse immunitaire.

En effet, en PDT, l'augmentation de la dose en PS et de l'intensité de la dose de lumière, qui est dans notre cas de 190 J/cm², favorise la mort par nécrose^{100,101} et elle est aussi prédominante dans le cas de PDT médiée par des PS à localisation membranaire¹⁰¹⁻¹⁰⁵

Comme témoin positif, nous avons appliqué le même traitement en utilisant un PS commercial utilisé en clinique qui est la PpIX. Nous avons enregistré une augmentation de la nécrose et une diminution de la vascularisation non significative. Des études ont montré que le mécanisme majoritaire de la réponse thérapeutique PpIX-PDT est l'apoptose vu sa localisation dans les mitochondries, ce qui peut expliquer les résultats obtenus dans cette étude. En effet, la PpIX possède une affinité pour les récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) qui sont présents au niveau de la membrane interne des mitochondries.

De façon générale, un photosensibilisateur localisé dans les mitochondries induit l'apoptose alors qu'une localisation dans les lysosomes ou la membrane plasmique aura tendance à conduire à une mort cellulaire par nécrose¹², ce qui est le cas de nos produits.

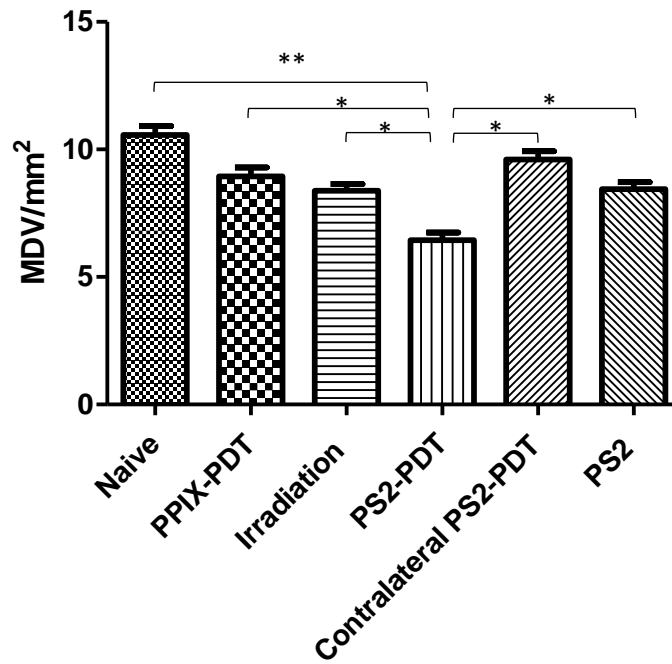


Figure 84 : densité microvasculaire après traitement PS2 -PDT, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

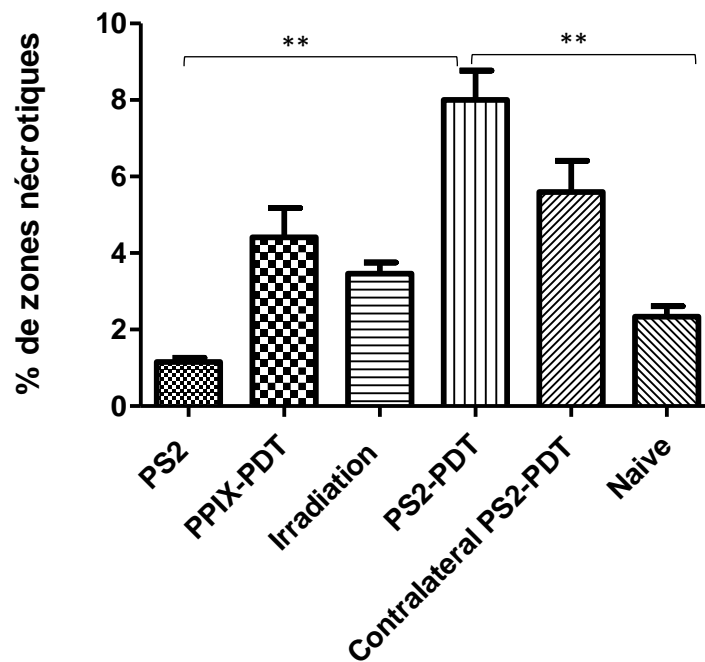


Figure 85 : Nécrose après traitement PS2 -PDT, Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$

➤ Réponse immunitaire

• PS1

Afin d'analyser l'environnement immunitaire 24h post-traitement, l'infiltration lymphocytaire via le biomarqueur exprimé CD3, ont été analysés par immunohistochimie et la quantification a été réalisée à l'aide du logiciel Image J. Le script Image J utilisé était une macro créée par Gautier BEITZ, (Master 2 Biomedical Engineering, PSL, U Paris) qui est dédiée à la segmentation des paramètres histologiques sur la base du contraste et de la couleur (voir annexe).

Nous avons observé une augmentation significative de la densité des cellules CD3 sur les tumeurs traitées par rapport aux souris Naïve. Une augmentation non significative sur la tumeur juste irradiée et une légère augmentation sur les tumeurs controlatérales des souris traitées qui peut expliquer les résultats obtenus en bioluminescence et la mesure du volume par IRM. Pour les tumeurs des souris ne recevant que le produit, il n'y avait pas de différence sur la densité des cellules CD3 (voir Figure 88).

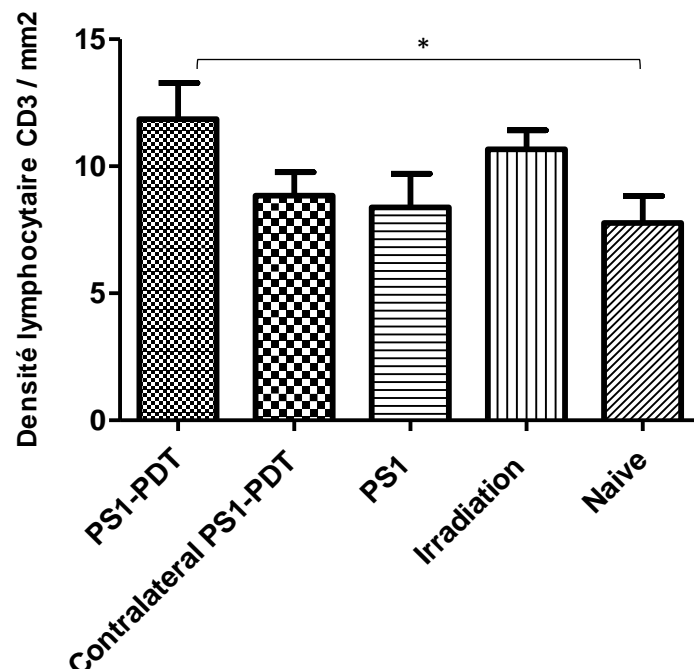


Figure 86 : Quantification de la densité des lymphocytes sur la tumeur en utilisant la macro-image J. Test de Mann-Whitney, $n=5$, $*P<0.05$.

Ces résultats montrent la présence d'un effet immunitaire localisé au niveau du traitement, et léger effet généralisé sur l'autre tumeur controlatérale. En effet, un certain nombre d'études pré-cliniques sur différents modèles animaux démontre qu'en plus de l'effet cellulaire direct et de l'effet vasculaire, la PDT montre des effets pro-inflammatoires capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale^{97,106}.

Des faits récents aussi ont suggéré que l'occlusion des vaisseaux, l'ischémie et la destruction directe des cellules tumorales, provoqués par la PDT, conduisent à une importante réaction inflammatoire locale^{106,107}. Ces dommages génèrent divers signaux d'alarmes (production de médiateurs de l'inflammation) qui vont être détectés par l'immunité innée¹⁰⁸. La dégradation par photo-oxydation des lipides membranaires et la production des métabolites causée par la nécrose constituent en eux-mêmes d'importants médiateurs de l'inflammation¹⁰⁷. Ce phénomène combiné avec la libération d'histamine et de sérotonine par les vaisseaux endommagés, conduit alors à l'infiltration de la tumeur par diverses populations de cellules immunitaires (lymphocytes et phagocytes).

Les dommages vasculaires et la nécrose tumorale induisent l'activation de médiateurs de l'inflammation¹⁰⁹. Ces résultats expliquent l'inflammation observée en IRM.

Il est important de noter que l'irradiation crée aussi, certes non significative, un effet inflammatoire local vu l'augmentation de l'infiltration des CD3, et cela est dû certainement à un léger chauffage localisé au niveau de l'irradiation.

6. Conclusion

Pour conclure, nous avons proposé un nouveau traitement antitumoral appliqué sur des tumeurs murines CT26, par la photothérapie dynamique qui consiste en l'injection de deux agents théranostiques PDT/IRM et l'application d'une irradiation à une longueur d'onde appropriée dans la fenêtre optique thérapeutique du proche infrarouge. Le ciblage passif de ces agents dans la tumeur suivi de l'irradiation déclenchant l'effet direct (nécrose) et indirect (destruction vasculaire, inflammation et réponse immunitaire) localement apporte des résultats encourageants et démontre la pertinence de cette approche. En effet, 72h après le traitement, cette stratégie a montré des résultats positifs sur la stabilisation et/ou régression du volume tumoral. De plus, cette stratégie a permis de mettre en évidence des effets du traitement à plus long terme avec un volume tumoral

stable sans croissance jusqu'à quatre jours après le traitement contrairement aux groupes de référence.

Conclusion générale et perspectives

Le développement des agents théranostiques est un domaine de recherche et d'applications en plein essor pour améliorer les traitements de patients atteints de cancer. Ces objets « deux-en-un » présentent de nombreuses propriétés permettant la thérapie mais également le diagnostic et le suivi de ces agents *in vivo* par imagerie médicale. Dans cette optique, nous avons développé et caractérisé de nouveaux agents théranostiques PDT/IRM pour le traitement de tumeurs colorectales CT26 en modèle préclinique. Notre stratégie est d'injecter ces agents par voie intraveineuse puis d'appliquer le traitement PDT et suivre ces effets par IRM, mais aussi par imagerie de bioluminescence et histologie. L'application d'une irradiation focalisée, d'une longueur d'onde et une fluence appropriée dans la tumeur permet en présence de nos agents de déclencher un processus de génération d'oxygène singulet et des ROS conduisant à la mort cellulaire. L'imagerie IRM multiparamétrique, en particulier, nous a permis de suivre la biodistribution et l'accumulation des produits dans la tumeur et de mesurer l'efficacité du traitement.

Les agents théranostiques ont été sélectionnés et optimisés pour être efficaces en PDT *in vivo* : Ils ont été synthétisés dans l'équipe de nos collaboratrices en combinant un agent de contraste pour l'IRM et un photosensibilisateur pour la PDT. La caractérisation physico-chimique ainsi que les études *in vitro* de cyto et phototoxicité réalisée nous ont permis d'envisager leur injection *in vivo* par voie intraveineuse et l'application de la PDT. Leur taille leur confère une relaxivité r_1 multipliée par 2 jusqu'à 3 par rapport aux agents de contraste commerciaux à base de gadolinium, idéale pour l'imagerie pondérée T1 en IRM 7T. Ainsi, ces molécules sont des agents théranostiques prometteurs avec l'association de propriétés thérapeutiques apportées par le photosensibilisateur et de propriétés d'imagerie des complexes de gadolinium. L'association des deux molécules pour l'IRM et la PDT a donc présenté des avantages, du fait de l'augmentation de la relaxivité mais également du décalage de la longueur d'onde d'absorption vers le proche infrarouge, et être ainsi dans une meilleure zone de la fenêtre thérapeutique optique.

Leurs propriétés physico-chimiques amphiphiles leur confèrent la possibilité de traverser les membranes cellulaires, de les utiliser autant qu'agent de contraste en IRM et de photosensibilisateur en PDT. En effet, nous avons démontré *in vitro* et *in vivo* une accumulation préférentielle dans la tumeur, une toxicité limitée et une forte phototoxicité pour les cellules tumorales à de faibles concentrations.

L'application de l'irradiation sur les cellules tumorales en présence de nos molécules a dévoilé *in vitro* une efficacité du traitement, avec des concentrations très faibles, de l'ordre de 0,7 à 17 μ M pour les cellules tumorales murines CT26 et de 30 à 68 μ M pour les cellules tumorales humaines HT29.

Le suivi par imagerie dynamique IRM DCE des agents injectés par voie intraveineuse chez la souris tumorale permet d'étudier les cinétiques de biodistribution dans l'organisme et notamment dans les cellules tumorales grâce au choix adapté des temps de mesure à partir de l'injection de l'agent, de connaître le temps d'accumulation et de rétention tumorale recherchée de ces agents. Cette méthode d'IRM dynamique met en avant une circulation de ces molécules pendant environ 24h, avec un optimum à environ 1h post injection, avant d'être éliminé par les reins. 3 min post injection, nous avons enregistré un réhaussement du signal IRM avec une accumulation maximale et une rétention de 40 mn à 1h, un intervalle idéal pour l'application de la PDT.

Une irradiation à 191 J/cm² a été ensuite appliquée sur des tumeurs CT26 implantées dans des souris Balb-c et l'efficacité du traitement a été évaluée par IRM multiparamétrique, imagerie de bioluminescence et histologie pour suivre le volume, l'inflammation, la nécrose et un potentiel effet immunitaire dû à la PDT. A 24h après traitement, nous avons montré des résultats similaires à un traitement par un PS commercial PpIX, voire plus efficaces. De plus, nous avons observé des effets à plus long terme sur le développement tumoral avec un volume des tumeurs stable jusqu'à 4 jours après le traitement alors que la taille de la tumeur augmente exponentiellement sans thérapie.

Nous avons présenté dans ce manuscrit des résultats d'études histologiques sur les tumeurs 24h après le traitement mettant en évidence l'apparition de la nécrose, une destruction vasculaire, et un effet immunitaire local accompagné d'un léger effet généralisé à l'autre tumeur controlatérale qu'il serait intéressant d'amplifier.

Les résultats préliminaires *in vitro* de l'étude d'internalisation cellulaire, où nous avons enregistré une internalisation accrue dans les cellules tumorales soulèvent de nouvelle question sur la localisation plus précise des PS pour mieux comprendre les phénomènes entrant en jeu dans l'efficacité du traitement proposé, ces études seront à poursuivre pour conclure quant à l'effet du traitement.

Perspectives :

Dans ce projet, nous avons utilisé des agents théranostiques moléculaires pour une application en IRM et PDT qui présentent une affinité pour les sites tumoraux.

Il serait intéressant de rendre ciblante de manière active ces molécules en y greffant des ligands de ciblage telles des peptides RGD, ou autres.

Il serait également intéressant de formuler des agents théranostiques nanoparticulaires en les encapsulant dans des nanoobjets, permettant ainsi d'accroître davantage l'accumulation par effet EPR dans les cellules tumorales.

Nous avons montré, dans ce travail de thèse, la stabilisation du volume tumoral à la suite d'un unique traitement PDT. Pour la suite de ce projet, l'étude de traitements répétés dans le temps pourrait être envisagée pour obtenir une régression tumorale totale ou plus conséquente. De plus, nous avons montré que les agents théranostiques restaient 24h dans la tumeur. Une autre stratégie pourrait alors être de réaliser des séances d'irradiation répétées après l'injection.

Enfin, si ces traitements répétés ne sont pas suffisants, une thérapie combinée pourrait être envisagée avec l'association d'un agent antitumoral. En effet, les thérapies combinées permettent de s'attaquer aux tumeurs suivant différentes voies d'action. Ainsi, la combinaison de la PDT, qui a causé une destruction vasculaire à une molécule anti-angiogénique ciblerait le système sanguin de la tumeur par la destruction des vaisseaux existants et par la diminution de la formation de nouveaux vaisseaux. Cela impliquerait donc la co-encapsulation de ces agents théranostiques, et de cet autre agent antitumoral. La plateforme liposomale est idéale pour une encapsulation multiple de par son cœur aqueux et sa membrane lipidique, permettant l'encapsulation de molécules hydrophiles ou lipophiles.

Références

1. Global Cancer Observatory-International Agency for Research on Cancer. Published 2020. <https://gco.iarc.fr/today>
2. Thews O, Riemann A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38:113-129. doi:<https://doi.org/10.1007/s10555-018-09777-y>
3. Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB Journal.* 1991;5:2280-2286. doi:10.1096/fasebj.5.9.1860619
4. Venere E. New direction urged to improve cancer nanotechnology. Published online 2016. <https://medicalxpress.com/news/2016-03-urged-cancer-nanotechnology.html>
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine.* 1995;1(1):27-30. doi:10.1038/nm0195-27
6. Folkman J. What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent? *Journal of the National Cancer Institute.* 1990;82:8-11. doi:10.1093/jnci/82.1.4
7. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and Tissue Research.* 2003;314:107-117. doi:10.1007/s00441-003-0784-3
8. C. Thebault. Liposomes théranostiques pour le ciblage magnétique et le relargage d'un antitumoral par ultrasons focalisés , suivis par IRM multiparamétrique. Published online 2017.
9. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-364. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7
10. Couleaud P. Fonctionnalisation par des peptides de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour la thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1. Published online 2011.
11. Jablonski A. Introduction à la thérapie photodynamique (PDT). *Nature.* 1933;131:839-840. doi:doi.org/10.1038/131839b0
12. Dougherty T, Kaufman J, Goldfarb A WK, Boyle D MA. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. *Cancer Research.* 1978;38:2628-2635.
13. Seguin J. Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée. Published online 2013.
14. Thong P, Lee K, Toh H, Dong J, Tee C, Low KP, Chang PH, Bhuvaneshwari R, Tan NC SK. Early assessment of tumor response to photodynamic therapy using combined diffuse optical and diffuse correlation spectroscopy to predict treatment outcome. *Oncotarget.* 2017;8:19902–19913. doi:10.18632/oncotarget.15720
15. Al Sabbagh C, Seguin J, Agapova E, Kramericha D, Boudy V, Mignet N. Thermosensitive hydrogels for local delivery of 5-fluorouracil as neoadjuvant or adjuvant therapy in colorectal cancer. *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics. 2020;157:154-164. doi:10.1016/j.ejpb.2020.10.011

16. Thibaut G. La photothérapie dynamique : principe et applications. Published online 2016.
17. Alam MM, Bolze F, Daniel C, Flamigni L, Gourlaouen C, Heitz V, Jenni S, Schmitt J, Sour A, Ventura B. π -Extended diketopyrrolopyrrole–porphyrin arrays: one- and two-photon photophysical investigations and theoretical studies. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;12:21954–21965. doi:10.1021/acs.inorgchem.6b00381
18. Reflexion de lumière. Published 2017. <https://images.app.goo.gl/k59Btzt5AkUUH8Dm8>
19. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2009;85:1053-1074. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x
20. Karges J, Kuang S, Maschietto F, Blacque O, Ciofini I, Chao H, Gasser G. Rationally designed ruthenium complexes for 1- and 2-photon photodynamic therapy. *Nature Communications*. 2020;11(1):1-13. doi:10.1038/s41467-020-16993-0
21. Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 1998;54(17):4151-4202. doi:10.1016/S0040-4020(98)00015-5
22. Calixto GMF, Bernegossi J, De Freitas LM, Fontana CR, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*. 2016;21(3):1-18. doi:10.3390/molecules21030342
23. Spectres d'absorption des principaux composants des tissus. Published 2017. <https://images.app.goo.gl/JKFCRXSjY8zbTV8H8>
24. Kunjachan S, Ehling J, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chemical Reviews*. 2015;115(19):10907-10937. doi:10.1021/cr500314d
25. Penon O, Marin MJ, Amabilino DB, Russell DA, Perez-Garcia L. Iron oxide nanoparticles functionalized with novel hydrophobic and hydrophilic porphyrins as potential agents for photodynamic therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015;462:154-165. doi:10.1016/j.jcis.2015.09.060
26. Sengar P, Juárez P, Verdugo-Meza A, Arellano DL, Jain A, Chauhan K, Hirata G, Fournier GJ. Development of a functionalized UV-emitting nanocomposite for the treatment of cancer using indirect photodynamic therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(1):19. doi:10.1186/s12951-018-0344-3
27. Yuzhakova D V., Lermontova SA, Grigoryev IS, et al. In vivo multimodal tumor imaging and photodynamic therapy with novel theranostic agents based on the porphyrazine framework-chelated gadolinium (III) cation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2017;1861(12):3120-3130. doi:10.1016/j.bbagen.2017.09.004
28. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *Cancer Management in Small Animal Practice*.

- 2009;90(12):163-166. doi:10.1093/jnci/90.12.889
29. Kessel D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Letters*. 1986;33(2):183-188. doi:10.1016/0304-3835(86)90023-6
 30. Moan J, Rimington C, Western A. The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*. 1985;145(3):227-236. doi:10.1016/0009-8981(85)90028-2
 31. Snyder SH, Verma A, Trifiletti RR. The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *The FASEB Journal*. 1987;1(4):282-288. doi:10.1096/fasebj.1.4.2820823
 32. Kongshaug M. Distribution of tetrapyrrole photosensitizers among human plasma proteins. *International Journal of Biochemistry*. 1992;24(8):1239-1265. doi:10.1016/0020-711X(92)90200-K
 33. Cohen S, Margalit R. Binding of porphyrin to human serum albumin. Structure-activity relationships. *Biochemical Journal*. 1990;270:325-330. doi:10.1042/bj2700325
 34. Tsuchida T, Zheng G, Pandey RK, Potter WR, Bellnier DA, Henderson BW, Kato H, Dougherty TJ. Correlation between Site II-Specific Human Serum Albumin (HSA) Binding Affinity and Murine in vivo Photosensitizing Efficacy of Some Photofrin® Components. *Photochemistry and Photobiology*. 1997;66:224-228. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb08647.x
 35. Pandey RK, Sumlin AB, Constantine S, Aoudia M, Potter WR, Bellnier DA, Henderson BW, Rodgers MA, Smith KM, Dougherty TJ. Alkyl ether analogs of chlorophyll-a derivatives: Part 1. Synthesis, photophysical properties and photodynamic efficacy. *Photochemistry and Photobiology*. 1996;64(1):194-204. doi:10.1111/j.1751-1097.1996.tb02442.x
 36. Shujiro, Goya. Akira, Takadate. Hiroyuki, Fujino. Kaneto U. New fluorescence probes for drug albumin interreaction studies. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. Published online 1970:2091. doi:doi.org/10.1248/cpb.30.1363
 37. Brault D, Vever-Bizet C, Le Doan T. Spectrofluorimetric study of porphyrin incorporation into membrane models - evidence for pH effects. *BBA - Biomembranes*. 1986;857(2):238-250. doi:10.1016/0005-2736(86)90352-4
 38. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*. 1975;11:824-832. Consulté le mai 2, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1207674>
 39. Bonneau S, Vever-Bizet C, Mojzisoava H, Brault D. Tetrapyrrole-photosensitizers vectorization and plasma LDL: A physico-chemical approach. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;344:78-87. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.019
 40. Barrett AJ, Kennedy JC, Jones RA, Nadeau P, Pottier RH. The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: A volumetric titration study. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 1990;6:309-323. doi:10.1016/1011-1344(90)85101-2
 41. Smidt PC, Versluis AJ, van Berkel TJC. Properties of Incorporation,

- Redistribution, and Integrity of Porphyrin–Low-Density Lipoprotein Complexes. *Biochemistry*. 1993;32:2916-2922. doi:10.1021/bi00062a023
42. Bonneau S. Thèse : Dynamique d'interaction de tetrapyrroles avec des membranes et des lipoprotéines. Published online 2007.
 43. Reyftmann JP, Morliere P, Goldstein S, Santus R, Dubertret L, Lagrange D. Interaction of Human Serum Low Density Lipoproteins With Porphyrins: a Spectroscopic and Photochemical Study. *Photochemistry and Photobiology*. 1984;40:721-730. doi:10.1111/j.1751-1097.1984.tb04643.x
 44. Candide C, Morlière P, Mazière JC, Goldstein S, Santus R, Dubertret L, Reyftmann JP, Polonovski J. In vitro interaction of the photoactive anticancer porphyrin derivative photofrin II with low density lipoprotein, and its delivery to cultured human fibroblasts. *FEBS Letters*. 1986;207(1):133-138. doi:10.1016/0014-5793(86)80026-6
 45. Bloch F, Hanse WW, Packard M. The Nuclear Experiment. *Physical Review*. 1946;70:474-485. doi.org/10.1103/PhysRev.70.474
 46. Kastler B, Vetter D, Germain P, Zoltan P. *Comprendre l'IRM*. 8ème édition (Elsevier Masson SAS, éd.); 2018.
 47. Lauffer RB. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chemical Reviews*. 1987;87:901-927. doi:10.1021/cr00081a003
 48. Bottrill M, Kwok L, Long NJ. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chemical Society Reviews*. 2006;35:557-571. doi:10.1039/b516376p
 49. Aime S, Botta M, Fasano M, Terreno E. Lanthanide(in) chelates for NMR biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 1998;27(1):19-29. doi:10.1039/A827019Z
 50. Kim J, Piao Y, Hyeon T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(2):372-390. doi:10.1039/b709883a
 51. Merbach A, Helm L, Tóth É. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Second Edition*. (Merbach A, Helm L, Tóth É, éd.). John Wiley & Sons, Ltd; 2013. doi:10.1002/9781118503652
 52. Rogosnitzky M, Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals*. 2016;29:365-376. doi:10.1007/s10534-016-9931-7
 53. Idée JM, Port M, Robic C, Medina C, Sabatou M, Corot C. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:1249-1258. doi:10.1002/jmri.21967
 54. Hermann P, Kotek J, Kubíček V, Lukeš I. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: Ligand design and properties of the complexes. *Dalton Transactions*. 2008;23(23):3027-3047. doi:10.1039/b719704g
 55. Port M, Idée JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their

- possible clinical consequences: A critical review. *BioMetals*. 2008;21:469-490. doi:10.1007/s10534-008-9135-x
56. Bloembergen N. Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *The Journal of Chemical Physics*. 1957;27:572-573. doi:10.1063/1.1743771
 57. Bloembergen N, Morgan LO. Proton relaxation times in paramagnetic solutions. Effects of electron spin relaxation. *The Journal of Chemical Physics*. 1961;34(3):842-850. doi:10.1063/1.1731684
 58. Woessner DE. Spin relaxation processes in a two-proton system undergoing anisotropic reorientation. *The Journal of Chemical Physics*. 1962;36(1):1-4. doi:10.1063/1.1732274
 59. Costa J, Tóth É, Helm L, Merbach AE. Dinuclear, bishydrated GdIII polyaminocarboxylates with a rigid xylene core display remarkable proton relaxivities. *Inorganic Chemistry*. 2005;44:4747-4755. doi:10.1021/ic0500309
 60. Moriggi L, Aebischer A, Cannizzo C, Sour A, Borel A, Bunzli JC, Helm L. A ruthenium-based metallostar: Synthesis, sensitized luminescence and ¹H relaxivity. *Dalton Transactions*. 2009;12:2088-2095. doi:10.1039/b818599a
 61. Livramento JB, Helm L, Sour A, O'Neil C, Merbach AE, Tóth É. A benzene-core trinuclear GdIII complex: Towards the optimization of relaxivity for MRI contrast agent applications at high magnetic field. *Dalton Transactions*. 2008;(9):1195-1202. doi:10.1039/b717390c
 62. Livramento JB, Weidensteiner C, Prata MI, Allegrini PR, Geraldes CFGC, Helm L, Kneuer R, Merbach AE, Santos AC, Schmidt P, Toth E. First in vivo MRI assessment of a self-assembled metallostar compound endowed with a remarkable high field relaxivity. *Contrast media & molecular imaging*. 2006;1(1):30-39. doi:10.1002/cmml.92
 63. Eggenstill A, Michelin C, Desbois N, Richard P, Barbe JM, Denat F, Licon C, Gaidon C, Sayeh A, Choquet P, Gros CP. Design of porphyrin-dota-like scaffolds as all-in-one multimodal heterometallic complexes for medical imaging. *European Journal of Organic Chemistry*. 2013;(29):6629-6643. doi:10.1002/ejoc.201300678
 64. Andre M, Helm L, Eva T. *Front Matter*. 2eme éd. John Wiley & Sons, Ltd; 2013. doi:10.1002/9781118503652.fmatter
 65. Kim J, Piao Y, Hyeon T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chemical Society Reviews*. 2009;38:372-390. doi:10.1039/b709883a
 66. Jesse V, Jokerst SS. Molecular Imaging with Theranostic Nanoparticles. *Bone*. 2008;23:1-7. doi:10.1021/ar200106e.Molecular
 67. Cheng Y, Morshed RA, Auffinger B, Tobias AL, Lesniak MS. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;(773):42-57. doi:10.1016/j.addr.2013.09.006.
 68. Mhatre V. Ho, Ji-Ann Lee and KCM. Contrast-enhanced MRI-guided photodynamic cancer therapy with a pegylated bifunctional polymer conjugate Anagha. *Bone*. 2012;23:1-7. doi:10.1038/jid.2014.371

69. Al-jamal WT, Kostarelos K. Liposomes : From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine. *Acc Chem Res.* 2011;44:1094-1104. doi:10.1021/ar200105p
70. Muthu MS, Leong DT, Mei L, Feng S. Theranostics Nanotheranostics - Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics. *Theranostics.* 2014;4:660-677. doi:10.7150/thno.8698
71. Tsai HC, Tsai CH, Lin SY, Jhang CR, Chiang YS, Hsiue GH. Stimulated release of photosensitizers from graft and diblock micelles for photodynamic therapy. *Biomaterials.* 2012;33(6):1827-1837. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.014
72. Kopelman R, Lee Koo YE, Philbert M, Moffat BA, Reddy GR, McConville P, Hall DE, Chenevert TL, Bhojani MS, Buck SM, Rehemtulla A, Ross BD. Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2005;293(1):404-410. doi:10.1016/j.jmmm.2005.02.061
73. Wang LS, Chuang MC, Ho J an A. Nanotheranostics - A review of recent publications. *International Journal of Nanomedicine.* 2012;7:4679-4695. doi:10.2147/IJN.S33065
74. Peng CL, Shih YH, Lee PC, Hsieh TMH, Luo TY, Shieh MJ. Multimodal image-guided photothermal therapy mediated by 188Re-labeled micelles containing a cyanine-type photosensitizer. *ACS Nano.* 2011;5(7):5594-5607. doi:10.1021/nn201100m
75. Thomas E CL, Gries M, Peterlini T, Mathieu C, Thomas N, Boura C, Frochot C, Vanderesse R, Lux F, Barberi-Heyob M TO. Ultrasmall AGulX theranostic nanoparticles for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of glioblastoma. *International Journal of Nanomedicine.* 2017;12:7075-7088. doi:10.2147/IJN.S141559
76. Carter KA, Shao S, Hoopes MI, Luo D, Ahsan B, Grigoryants VM, Song W, Huang H, Zhang G, Pandey RK, Geng J, Pfeifer BA, Scholes CP, Ortega J, Karttunen M, Lovell JF. Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light. *Nature Communications.* 2014;5:3546. doi:10.1038/ncomms4546
77. Di Corato R, Béalle G, Kolosnjaj-Tabi J, Espinosa A, Clément O, Silva AKA, Ménager C, Wilhelm C. Combining magnetic hyperthermia and photodynamic therapy for tumor ablation with photoresponsive magnetic liposomes. *ACS Nano.* 2015;9:2904-2916. doi:10.1021/nn506949t
78. Jenni S, Sour A. Molecular theranostic agents for photodynamic therapy (PDT) and magnetic resonance imaging (MRI). *Inorganics.* 2019;7:10. doi:10.3390/inorganics7010010
79. Hindré F, Plouzenec M Le, Certaines JD, Foultier MT, Patrice T, Simonneaux G. Tetra-p-aminophenylporphyrin conjugated with Gd-DTPA: Tumor-specific contrast agent for MR imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 1993;3:59-65. doi:10.1002/jmri.1880030111
80. Goswami LN, White WH, Sperryak JA, Ethirajan M, Chen Y, Missert JR, Morgan J, Mazurchuk R, Pandey KA. Synthesis of tumor-avid photosensitizer-Gd(III)DTPA conjugates: Impact of the number of gadolinium units in T1/T2

- relaxivity, intracellular localization, and photosensitizing efficacy. *Bioconjugate Chemistry*. 2010;21:816-827. doi:10.1021/bc9005305
81. Li G, Slansky A, Dobhal MP, Goswami LN, Andrew Graham A, Chen Y, Kanter P, Alberico RA, Spornyak J, Morgan J, Mazurchuk R, Oseroff A, Grossman Z, Pandey RK. Chlorophyll-a analogues conjugated with aminobenzyl-DTPA as potential bifunctional agents for magnetic resonance imaging and photodynamic therapy. *Bioconjugate Chemistry*. 2005;16(1):32-42. doi:10.1021/bc049807x
 82. (a) Sour A, Jenni S, Ortí-Suárez A, Schmitt J, Heitz V, Bolze FR, Sousa PL, Po C, Bonnet CS, Pallier A, Toth E, Ventura B. Four Gadolinium(III) Complexes Appended to a Porphyrin: A Water-Soluble Molecular Theranostic Agent with Remarkable Relaxivity Suited for MRI Tracking of the Photosensitizer. *Inorganic Chemistry*. 2016;55:4545-4554. doi:10.1021/acs.inorgchem.6b00381
 - (b) Schmitt J., Heitz V., Sour A., Bolze F., Kessler P., Flamigni L., Ventura B., Bonnet C., Tóth E., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2775-2786. doi : 10.1080/10610278.2017.1377837. J.
 - (c) Schmitt J., Jenni S., Sour A., Heitz V., Bolze F., Pallier A., Bonnet C.S., Tóth É. and Ventura B., *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 3726–3738. doi: doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00634
 - (d) Jenni S. , Bolze, F. Bonnet C. S., Pallier A., Sour A., Tóth E., Ventura B. , Heitz, V. *Inorg. Chem.*, **2020**, *59*,14389-14398. doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c02189
 83. Luo J, Chen L, Hu PCZ. Complexe de porphyrine tétranucléaire gadolinium (III) comme agent théranostique pour l'imagerie multimodale et la thérapie photodynamique. *InorgChem*. 2014;53:4184-4191. doi:doi.org/10.1021/ic500238s
 84. Tekdaş AD, Garifullin R, Şentürk B, Zorlu Y, Gundogdu U, Atalar E, Tekinay AB, Chernonosov AA, Yerli Y, Dumoulin F, Guler MO, Ahsen V, Gürek AG. Design of a Gd-DOTA-Phthalocyanine Conjugate Combining MRI Contrast Imaging and Photosensitization Properties as a Potential Molecular Theranostic. *Photochem Photobiol.* 2014;90:1376-1386. doi:10.1111/php.12332
 85. Song Y, Zong H, Trivedi ER, Vesper BJ, Waters EA, Barrett AGM, Radosevich JA, Hoffman BM, Meade TJ. Synthesis and characterization of new porphyrazine-Gd(III) conjugates as multimodal MR contrast agents. *Bioconjugate Chemistry*. 2010;21:2267-2275. doi:10.1021/bc1002828
 86. Calvete MJF, Pinto SMA, Burrows HD, Castro MMCA, Galdes CFGC, Pereira MM. Multifunctionalization of cyanuric chloride for the stepwise synthesis of potential multimodal imaging chemical entities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(1):2517-2525. doi:10.1016/j.arabjc.2018.06.005
 87. Varchi G, Benfenati V, Pistone A, Ballestri M, Sotgiu G, Guerrini A, Dambrosio P, Liscio A, Ventura B. Core-shell poly-methylmethacrylate nanoparticles as effective carriers of electrostatically loaded anionic porphyrin. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2013;12(5):760-769. doi:10.1039/c2pp25393c
 88. Ball DJ, Mayhew S, Wood SR, Griffiths J, Vernon DI, Brown SB. A Comparative Study of the Cellular Uptake and Photodynamic Efficacy of Three Novel Zinc Phthalocyanines of Differing Charge. *Photochemistry and Photobiology*.

1999;69(3):390. doi:10.1562/0031-8655(1999)069<0390:acsotc>2.3.co;2

89. Berrahmoune S. Thèse : Étude des mécanismes régissant l'efficacité photodynamique sélective de l'Héxyl- aminolévulinate-Protoporphyrine IX dans le traitement du cancer de la vessie. Application dans le cadre de la prévention de ses récurrences. Published online 2009.
90. Gómez-Vidales V, Borja-Miranda A, Cortez-Maya S, Amelines-Sarria O, Rivera M, Martínez-García M. Send Orders for Reprints to reprints benthamscience.ae Open Chemistry Journal Design and Synthesis of a Multi Cu(II)-porphyrin Array. *Open Chemistry Journal*. 2016;3:25-34. doi:10.2174/1874842201603010025
91. Bugaj A, Morlière P, Santus R, Haigle J DS. Phototoxicity of protoporphyrin IX, diarginine diprotoporphyrinate and N,N-diphenylalanyl protoporphyrin toward human fibroblasts and keratinocytes in vitro: effect of 5-methoxypsoralen. *Photochem Photobiol*. 2004;80:486-491. doi:10.1562/00318655
92. Seguin J, Doan B-T, Latorre Ossa H, Jugé L, Gennisson JL, Tanter M, Scherman D, Chabot GG, Mignet N. Evaluation of Nonradiative Clinical Imaging Techniques for the Longitudinal Assessment of Tumour Growth in Murine CT26 Colon Carcinoma. *International Journal of Molecular Imaging*. 2013;1-13. doi:10.1155/2013/983534
93. Fredy JW, Scelle J, Ramniceanu G, Doan BT, Bonnet CD, Toth E, Ménand M, Sollogoub M, Vives G, Hasenknopf B. Mechanostereoselective One-Pot Synthesis of Functionalized Head-to-Head Cyclodextrin Rotaxanes and Their Application as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Organic Letters*. 2017;19(5):1136-1139. doi:10.1021/acs.orglett.7b00153
94. Thomas N, Bechet D, Becuwe P, Tirand L, Vanderesse R, Frochot C, Guillemain F, Barberi-Heyob M. Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009;96(2):101-108. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.04.008
95. Ramniceanu G, Doan BT, Vezignol C, Graillet A, Loubat C, Mignet N, Berret JF. Delayed hepatic uptake of multi-phosphonic acid poly(ethylene glycol) coated iron oxide measured by real-time magnetic resonance imaging. *RSC Advances*. 2016;6:63788-63800. doi:https://doi.org/10.1039/C6RA09896G
96. Thébault CJ, Ramniceanu G, Boumati S, Michel A, Seguin J, Larrat B, Mignet N, Ménager C, Doan BT. Theranostic MRI liposomes for magnetic targeting and ultrasound triggered release of the antivascular CA4P. *Journal of Controlled Release*. 2020;322. doi:10.1016/j.jconrel.2020.03.003
97. Mroz P, Szokalska A, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response. *PLoS ONE*. 2010;5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015194
98. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-7. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
99. Seguin J, Mignet N, Latorre Ossa H, Tanter M, Gennisson JL. Evaluation of Antivascular Combretastatin A4 P Efficacy Using Supersonic Shear Imaging

- Technique of Ectopic Colon Carcinoma CT26. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2017;43(10):2352-2361. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.05.013
100. Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66:1651-1659. doi:10.1016/S0006-2952(03)00539-2
 101. Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with ZnPthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. *Cancer Research*. 2001;61:7495-7500.
 102. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following photofrin® photosensitization: Influence of the incubation protocol. *Photochemistry and Photobiology*. 1996;64(1):182-187. doi:10.1111/j.1751-1097.1996.tb02440.x
 103. Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2005;433:435-446. doi:10.1016/j.abb.2004.09.025
 104. Kessel D, Luo Y, Deng Y CC. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy. *Physiology & Behavior*. 2016;176:139-148. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb08581.x
 105. Hsieh YJ, Wu CC, Chang CJ, Yu JS. Subcellular localization of photofrin® determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. *Journal of Cellular Physiology*. 2003;194(3):363-375. doi:10.1002/jcp.10273
 106. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(7):535-545. doi:10.1038/nrc1894
 107. Pizova K, Tomankova K, Daskova A, Binder S, Bajgar R KH. Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012;156:93-102. doi:dx.doi.org/10.5507/bp.2012.056
 108. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2012;61:250-281. doi:10.3322/caac.20114.
 109. Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. 1996;14(5):329-334. doi:10.1089/clm.1996.14.329

Annexes

Annexe 1: Scripts Matlab pour le calcul du %p25 et %AP75

Les scripts présentés ci-dessous ont été écrits par Caroline THEBAULT et Yusuke KAGA (Master 2 BME) pour le logiciel MATLAB (R2015a).

```
prompt='nom fichier excel';%fichier dans lequel les résultats seront exportés
r=input(prompt);

for w=1:4

%%
prompt='nom du tableau de données';% Tableau avec les digrammes de distribution de chaque slide de
la tumeur
intensity=input(prompt);

%%
n=numel(intensity)/2;

for i=1:n
    I1(i)=intensity(i,1);
    I2(i)=intensity(i,2);
end

M=max(I1);%intensité max
m=min(I1);%intensité min
bin=(M-m)/100;%valeur d'un bin pour 100 bins
%%

for i=0:99

    j=i+1;
    F1= binrange(m,i,bin);%m+i*bin
    F2= binrange(m,j,bin);%m+(i+1)*bin
    x=0;%variable de calcul du nb de pixel pour chaque bin pour le remplissage de A1

    for k=1:n
        if (F1<=I1(k))&&(I1(k)<F2)
            x=x+I2(k);
        end
    end
    A1(j)=x;%colonne contenant les nb de pixels
    A2(j)=(F1+F2)/2;%colonne contenant la médiane de chaque bin
    A3(j,w)=x;
    A4(j,w)=(F1+F2)/2;
end
A5=A1';
A6=A2';

A=table(A1,A2);
%%

nbpix(w)=sum(A1);% nb totale de pixels
nbmaxpix(w)=max(A1);
```

```

nbmaxpix(w)=nbmaxpix(w)+50;
median(w)=m+(M-m)/2;%médiane
percentile25(w)=m+0.25*(M-m);%percentile 25
percentile75(w)=m+0.75*(M-m);%percentile75

nbpixper25=zeros(4,1);
nbpixmedian=zeros(4,1);
nbpixper75=zeros(4,1);

for k=1:99
    D(k)=A1(k)*A2(k);
end
mean(w)=sum(D)/nbpix(w);

for i=1:99% calcul du nb de pixels sous le percentile25, la médiane et le percentile75
    if A2(i)<=percentile25(w)
        nbpixper25(w)=nbpixper25(w)+A1(i);
    end
    if A2(i)<=median(w)
        nbpixmedian(w)=nbpixmedian(w)+A1(i);
    end
    if A2(i)<=percentile75(w)
        nbpixper75(w)=nbpixper75(w)+A1(i);
    end
end

pourcpixmedian(w)=nbpixmedian(w)*100/nbpix(w);%calcul du pourcentage de pixel sous la médiane
pourcpixper25(w)=nbpixper25(w)*100/nbpix(w);%calcul du pourcentage de pixel sous le percentile25
pourcpixper75(w)=nbpixper75(w)*100/nbpix(w);%calcul du pourcentage de pixel sous le percentile75

%%
statname={'mean' ; 'median' ; 'percentile25' ; 'percentile75' ; '% pixel under median' ; '% pixel under
percentile25' ; '% pixel under percentile75' ; 'nb pixel'};
statvalue=[mean(w);median(w);percentile25(w);percentile75(w);pourcpixmedian(w);pourcpixper25(w);
pourcpixper75(w); nbpix(w)];

stat=table(statname,statvalue);

%%
prompt='title graph';
s=input(prompt);%demande à l'utilisateur d'écrire le titre du graphe souhaité (à remplir entre ')

bar(A2,A1,'FaceColor',[0,0,1]),xlabel('intensity'), ylabel('pixel number'),title(s)
hold on
bar(median(w),nbmaxpix(w),'edgeColor',[1,0,0])
bar(percentile25(w),nbmaxpix(w),'edgeColor',[1,0,0])
bar(percentile75(w),nbmaxpix(w),'edgeColor',[1,0,0])
hold off
axis([0,inf,0,nbmaxpix(w)])

t=w;

mkdir('C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\',r);%chemin du dossier où le fichier Excel et les
figures seront enregistrés
fichier=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\ r '.xls'];
figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\ s '.png'];

```

```

H=gcf;
saveas(H,figure);

distribution=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r \' s '.txt'];

writetable(stat,fichier,'Sheet',t,'Range','D25:E33');

xlswrite(fichier,{s},t,'D23');

xlswrite(fichier,{'data'},t,'D34')
xlswrite(fichier,A6,t,'D35');
xlswrite(fichier,A5,t,'E35');
xlswrite(fichier,intensity,t,'A35');

end
%%
P25=array2table(pourcpixper25);
PM=array2table(pourcpixmedian);
P75=array2table(pourcpixper75);
Med=array2table(mean);

xlswrite(fichier,{'TG'},5,'C10');
xlswrite(fichier,{'TD'},5,'D10');
xlswrite(fichier,{'TG+30min'},5,'E10');
xlswrite(fichier,{'TD+30min'},5,'F10');
writetable(Med,fichier,'Sheet',5,'Range','C12');
writetable(P25,fichier,'Sheet',5,'Range','C14');
writetable(PM,fichier,'Sheet',5,'Range','C16');
writetable(P75,fichier,'Sheet',5,'Range','C18');

prompt='légende1';
legend1=input(prompt);
prompt='légende2';
legend2=input(prompt);
prompt='légende3';
legend3=input(prompt);
prompt='légende4';
legend4=input(prompt);

TG1=A3(1:99,1:1);
TG2=A4(1:99,1:1);
TD1=A3(1:99,2:2);
TD2=A4(1:99,2:2);
TG11=A3(1:99,3:3);
TG21=A4(1:99,3:3);
TD11=A3(1:99,4:4);
TD21=A4(1:99,4:4);

width1 = 0.5;
bar(TG2,TG1,width1,'FaceColor',[0,0,1],'EdgeColor',[0,0,1]);
xlabel('intensity');
ylabel('pixel number');
hold on
width2 = width1/2;
bar(TG21,TG11,width2,'FaceColor',[1,0,0],'EdgeColor',[1,0,0]);
hold off

```

```

legend(legend1,legend3)

figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\TG.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

width1 = 0.5;
bar(TD2,TD1,width1,'FaceColor',[0,0,1],'EdgeColor',[0,0,1]);
xlabel('intensity');
ylabel('pixel number');
hold on
width2 = width1/2;
bar(TD21,TD11,width2,'FaceColor',[1,0,0],'EdgeColor',[1,0,0]);
hold off

legend(legend2,legend4)

figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\TD.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

bar(mean);
xlabel('tumor');
ylabel('mean');
figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\mean.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

bar(pourcpixper25);
xlabel('tumor');
ylabel('%pixel percentile25');
figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\per25.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

bar(pourcpixper75);
xlabel('tumor');
ylabel('%pixel percentile75');
figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\per75.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

bar(pourcpixmedian);
xlabel('tumor');
ylabel('%pixel median');
figure=['C:\Users\Caroline\Documents\IRM\traitement\' r '\median.png'];
H=gcf;
saveas(H,figure);

```

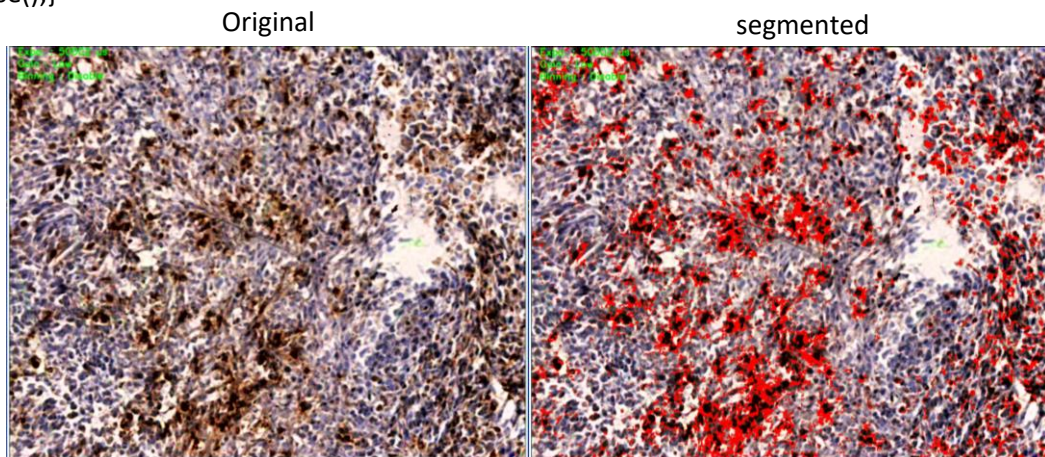
Annexe 2: Macro ImageJ pour la mesure de l'infiltration lymphocytaire par marquage CD3 et de la densité vasculaire par CD31

Les deux macros présentées ci-dessous ont été écrites par Gautier Beitz (ENSCP) pour leur utilisation et Johanne Seguin (UTCBS) respectivement sur le logiciel ImageJ.

- **Calcul du marquage CD3**

Cette macro permet de calculer de la densité des cellules CD3 à partir de photographie de coupes histologiques marquées au CD3 observées avec un objectif x20. L'échelle de l'image doit préalablement être renseignée à 100 µm pour 396 pixels.

```
dir = getDirectory("Control");
list = getFileList(dir);
for(i=0;i<list.length;i++){
path = dir+list[i];
open(path);
run("Enhance Contrast", "saturated=4 equalize");
run("Subtract Background...", "rolling=100 light");
run("Despeckle");
run("Color Threshold...");
beep();
title = "binarization of vessels";
msg = "If necessary, use the \"Threshold\" tool to adjust the threshold, then click \"OK\".";
waitForUser(title, msg);
run("8-bit");
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=0-infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines summarize");
close();
close();}
```



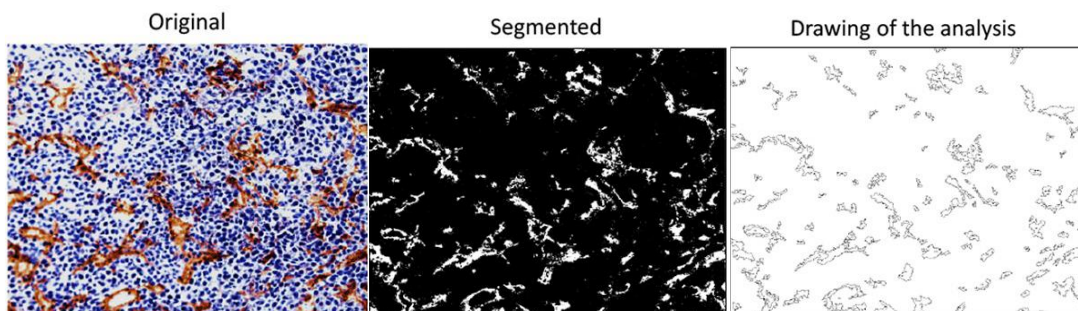
- **Calcul de la densité vasculaire**

Cette macro permet de calculer la densité vasculaire à partir de photographie de coupes histologiques dont les vaisseaux sont marqués à l'anticorps CD31 et observées avec un objectif x20. L'échelle de l'image doit préalablement être renseignée à 100 µm pour 396 pixels.

```

dir = getDirectory("images histo ct26");
list =getFileList(dir);
for(i=0;i<list.length;i++){
path = dir+list[i];
open(path);
run("Enhance Contrast", "saturated=4 equalize");
run("Subtract Background...", "rolling=100 light");
run("Despeckle");
run("Color Threshold...");
beep();
title = "binarization of vessels";
msg = "If necessary, use the \"Threshold\" tool to adjust the threshold, then click \"OK\".";
waitForUser(title, msg);
run("8-bit");
//run("Threshold...");
beep();
title = "Process AdjustThreshold color";
msg = "If necessary, use the \"Threshold\" tool to adjust the threshold, then click \"OK\".";
setMinAndMax(69, 255);
run("8-bit");
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines summarize");
close();
close();}

```



Pour la nécrose, le logiciel Qpath a été utilisé

*Bankhead, P. et al. **QuPath: Open source software for digital pathology image analysis.** Scientific Reports (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>*

RÉSUMÉ

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre le cancer est aujourd'hui essentiel. En effet, certaines chimiothérapies induisent des effets secondaires très importants et certains traitements impliquent un mauvais pronostic. Des thérapies alternatives sont donc nécessaires. Ce projet vise à développer de nouveaux agents théranostiques sous forme moléculaire conçus pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la photothérapie dynamique (PDT) *in vivo*. L'objectif est d'optimiser un traitement en montrant qu'il est possible de traiter et de surveiller par bioimagerie les effets du traitement *in vivo* en préclinique. Ces agents théranostiques associés à la PDT présentent un intérêt clinique considérable car ils sont susceptibles de réaliser un traitement localisé activable temporellement, avec un dosage optimisé, peu invasif et avec des effets secondaires limités. Nous nous concentrerons sur le cas du cancer du côlon sur modèle murin, le troisième cancer en incidence. De ce fait, nous avons évalué l'efficacité *in vitro* et *in vivo* d'un premier agent PS-Gd1 déjà synthétisé. Nous avons ensuite développé un nouveau composé moléculaire bifonctionnel PS-Gd2 contenant quatre complexes macrocycliques de gadolinium DOTA (III) fonctionnalisés à un dérivé de la porphyrine. Les relaxivités r_1 et r_2 mesurées à 7T des deux molécules ont montré une nette augmentation comparée aux agents de contraste commerciaux correspondant. Ils présentent aussi un bon rendement quantique d'oxygène singulet. Sur cellules saines et tumorales (murines tumorales CT26) la cytotoxicité est faible alors que la phototoxicité est remarquable sur les cellules tumorales notamment. Des études de biodistribution *in vivo* ont été réalisées sur des souris Balb-C après une injection IV de 100 μ L de molécule à 10 mM de Gd et un suivi pendant 48h par IRM (Bruker, 7T) avec une acquisition dynamique à contraste renforcé de type DCE développée où nous avons observé l'accumulation de nos molécules préférentiellement dans les tumeurs pendant environ 6 heures. L'application et l'évaluation du traitement PDT *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs du colon CT26, a montré l'efficacité de nos molécules avec une augmentation du taux de la nécrose, l'apparition de dommages vasculaires ainsi qu'une inflammation et une réponse immunitaire conduisant à une absence de croissance du volume tumoral.

MOTS CLÉS

Imagerie, Biologie, Théranostique

ABSTRACT

The development of new therapeutic strategies to fight cancer is essential today. Indeed, some chemotherapies induce very important side effects and some treatments imply a bad prognosis. Alternative therapies are therefore necessary. This project aims to develop new molecular theranostic agents designed for magnetic resonance imaging (MRI) and photodynamic therapy (PDT) *in vivo*. The objective is to optimize a treatment by showing that it is possible to treat and monitor by bioimaging the effects of the treatment *in vivo* in preclinical studies. These theranostic agents associated with PDT are of considerable clinical interest as they are likely to achieve a localized treatment that can be activated temporally, with an optimized dosage, minimally invasive and with limited side effects. We will focus on the case of colon cancer in a mouse model, the third most common cancer. Therefore, we have evaluated the *in vitro* and *in vivo* efficacy of a first PS-Gd1 agent already synthesized. We then developed a new bifunctional molecular compound PS-Gd2 containing four macrocyclic gadolinium DOTA (III) complexes functionalized to a porphyrin derivative. The r_1 and r_2 relaxivities measured at 7T of both molecules showed a clear increase compared to the corresponding commercial contrast agents. They also show a good quantum yield of singlet oxygen. On healthy and tumor cells (murine tumor CT26) the cytotoxicity is low while the phototoxicity is remarkable on tumor cells in particular. *In vivo* biodistribution studies were performed on Balb-C mice after an IV injection of 100 μ L of molecule at 10 mM Gd and a follow-up for 48h by MRI (Bruker, 7T) with a dynamic contrast-enhanced acquisition of the developed DCE type where we observed the accumulation of our molecules preferentially in tumors for about 6 hours. The application and evaluation of the PDT treatment *in vivo* on mice with CT26 colon tumors showed the efficacy of our molecules with an increase in the rate of necrosis, the appearance of vascular damage as well as inflammation and an immune response leading to an absence of tumor volume growth.

KEYWORDS

Biology, Imaging, Theranostics

