



Nouveaux biomatériaux photosensibles pour des applications antimicrobiennes

Abdechakour El Kihel

► To cite this version:

Abdechakour El Kihel. Nouveaux biomatériaux photosensibles pour des applications antimicrobiennes. Chimie organique. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0048 . tel-03702495

HAL Id: tel-03702495

<https://theses.hal.science/tel-03702495>

Submitted on 23 Jun 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.



Université de Limoges

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

Laboratoire PEIRENE- EA 7500

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Chimie organique

Présentée et soutenue par
Abdechakour ELKIHIL

Le 4 avril 2022

**Nouveaux biomatériaux photosensibles pour des applications
antimicrobiennes**

Thèse dirigée par Pr. Vincent SOL et Dr. Tan-Sothea OUK

JURY :

Président du jury

M. **Vincent Chaleix**, Professeur, *Université de Limoges*

Rapporteurs

M. **Gilles Lemerrier**, Professeur, *Université de Reims Champagne-Ardenne*

M. **Nicolas Joly**, Professeur, *Université d'Artois*

Examineurs

M. **Laurent Picot**, Maître de Conférences - HDR, *Université de La Rochelle*

M. **Vincent Sol**, Professeur, *Université de Limoges*

M. **Tan-Sothea Ouk**, Maître de Conférences - HDR, *Université de Limoges*

Invité

M. **Romain Villéger**, Maître de Conférences, *Université de Poitiers*



Dédicace

A mes parents, mes frères et ma sœur

“Bacteria have been around for billions of years. Then we steal some antibacterial drugs from fungi and think we can do us in for good.”

❖ Stephen Jay Gould (1941-2002; Evolutionary biologist)

Remerciements

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

Je suis très sensible de l'honneur que m'ont fait Messieurs les Professeurs Gilles Lemerrier et Nicolas Joly en acceptant d'être rapporteur de ces travaux de thèse. Veuillez trouver, ici les marques de ma profonde reconnaissance. Je remercie également, M. Laurent Picot et M. Vincent Chaleix d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs. Enfin, toute ma gratitude va à M. Romain Villéger pour avoir accepté notre invitation.

Je voudrais remercier le professeur Vincent Sol, en tant que directeur du laboratoire PEIRENE, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. De plus, je souhaite aussi le remercier en tant qu'encadrant pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour son investissement total, pour savoir toujours trouver le temps de m'accompagner dans ce travail, pour sa patience et sa disponibilité. Tout au long de ce projet, vous m'avez apporté vos compétences scientifiques, votre aide et vos critiques constructives qui m'ont aidée précieusement à me construire. Merci pour me donner l'opportunité de réaliser ce projet dans un environnement de confiance où mes idées ont été écoutées et appréciées.

J'adresse également mes remerciements chaleureux à docteur Tan-Sothea OUK, pour avoir codiriger cette thèse. Merci de m'avoir formé, et de m'avoir initié à la microbiologie. Grâce à vous, j'ai pu gagner en autonomie.... Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre gentillesse. Merci de m'avoir donné la chance de découvrir le monde de la microbiologie

Un grand merci pour toute l'équipe de l'IUT- Génie biologie, pour votre accueil, votre disponibilité et votre convivialité. Je pense à toi Charlotte, tout particulièrement. Merci pour le temps que vous avez consacré à la réalisation des tests biologiques sur mes produits, merci d'avoir été patient devant la délicatesse de mes hydrogels, et surtout merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Merci infiniment Charlotte !

Je n'oublie pas de remercier Romain Lucas pour les essais rhéologiques. Merci pour le temps que vous avez consacré à l'analyse de mes produits. Merci également pour les corrections attentives de mes écrits, pour tous les conseils précieux et l'aide que vous m'avez apporté dans ce domaine.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Yann LAUNEY pour le temps passé à réaliser les images MEB, pour son expertise et sa gentillesse. Je tiens également à remercier vivement, Monsieur Yves CHAMPAVIER pour les caractérisations par RMN et Monsieur Cyrille COLAS pour les caractérisations par spectroscopie de masse.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse, leur sympathie et leur bonne humeur. Je pense à Dorothée, Sylvie, Michelle, Thierry...

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

Je pense bien entendu à mes collègues au sein du laboratoire. Jérémy, Véronica, Daire, Bhavya, Mark-Arthur et Nidia, ces doctorants et anciens doctorants qui ont été des soutiens inestimables ou des modèles pour mon travail. Merci pour votre gentillesse, vos conseils et votre aide.

À mes stagiaires, Léa, Dimitri, Chloé, Chaimae et Abir je vous remercie d'avoir contribué à ce travail et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un merci tout particulier à toi Soukaina, tu as été là dans les meilleurs et les pires moments. Tu m'as toujours encouragé, soutenu et poussé à aller de l'avant... Merci d'avoir été là à mes côtés !

Merci à Zineb et Abdelali. Vous avez été très présents lors de mon arrivée en France. Je vous souhaite plein de bonnes choses.

Mes parents... Vous avez toujours cru en moi. Je vous dédie tout simplement ce travail. Je vous remercie de l'encouragement inébranlable que vous m'avez apporté. C'est grâce à vous que j'ai pu arriver jusque-là, je vous en serai éternellement reconnaissant. J'associe mes profonds remerciements à mes frères et ma sœur et tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu.

Une pensée émue pour Robert Granet qui nous a quitté.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



Table des matières

Remerciements	4
Droits d'auteurs	7
Table des matières	8
Table des illustrations	12
Table des tableaux	17
Liste des abréviations	18
Introduction générale	1
Chapitre I. État de l'art	4
A. Les infections bactériennes	4
I. Les bactéries	4
I.1. Structures des bactéries	4
I.2. Parois bactériennes	6
I.3. La croissance bactérienne	7
I.4. Pathogénèse bactérienne	10
II. Les moyens de lutte contre les infections bactériennes	11
II.1. Les premiers traitements	11
II.2. L'âge d'or des antibiotiques	13
II.3. L'émergence des souches résistantes aux antibiotiques	14
II.4. Les nouveaux agents antibactériens	16
B. La thérapie photodynamique	19
I. Bref historique	19
II. Chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT)	22
III. Mécanisme photochimique	24
III.1. Les réactions de type I	25
III.2. Les réactions de type II	26
III.3. Les ERO au contact des organismes vivants	27
IV. Les photosensibilisateurs	29
IV.1. Les photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques	29
IV.1.1. Les PS d'origine naturelle	29
IV.1.2. Les PS synthétiques	34
IV.2. Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques	38
IV.2.1. Structure des porphyrines, chlorines et bactérochlorines	38
IV.2.2. Les propriétés photophysiques	40
IV.2.3. Obtention de PS tétrapyrroliques d'origine naturelle	42
IV.2.4. Les méthodes de synthèse des porphyrines	45
IV.2.5. Les phtalocyanines	53
V. Nouvelles stratégies en PACT	54
V.1. L'interaction électrostatique non spécifique	56
V.2. La perméabilisation membranaire	58
V.3. Le ciblage spécifique	61
V.3.1. La conjugaison d'un PS avec un antibiotique	62
V.3.2. Maltooligosacharides : agents potentiels de ciblage spécifique pour la PACT	65

Objectif du travail.....	70
Chapitre II. Optimisation de la PACT par couplage des PS avec des maltooligosaccharides	73
I. Introduction	73
II. Stratégie de synthèse.....	73
III. Synthèse des précurseurs	75
III.1. Synthèse de la 5-(<i>p</i> -carboxyphényl)tritolyldiporphyrine	75
III.2. Synthèse du bras espaceur amino-azoturé (4).....	76
III.2.1. Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane (2)	76
III.2.2. Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundécane (3)	77
III.2.3. Synthèse du 1-amino-11-azoturo- 3,6,9-trioxaundécane (4)	77
III.3. Synthèse de la porphyrine porteuse du bras espaceur (5)	78
III.4. Métallation de la porphyrine (5).....	80
III.5. Propargylation du maltooligosaccharide.....	81
III.5.1. Acétylation du maltotriose.....	82
III.5.2. Propargylation des maltooligosaccharides.....	82
IV. Couplages des précurseurs finaux.....	84
IV.1. Couplage de la porphyrine (6) sur les maltooligosaccharides propargylés (8) et (9) par réaction de CuAAC	84
IV.2. Désacétylation des unités glucidiques	87
V. Evaluation de l'activité antibactérienne des conjugués porphyrine-maltooligosaccharides.	89
V.1. Photoinactivation des bactéries	89
V.2. Cytométrie en flux.....	92
V.3. Essai d'inhibition de la formation des biofilms chez les bactéries à Gram positif.....	94
VI. Conclusion.....	97
Chapitre III. Élaboration d'hydrogels à base de xylane pour une application en PACT....	99
I. Les hydrogels.....	99
I.1. Définition d'un hydrogel	99
I.2. Propriétés notables des hydrogels	100
II. Hydrogels antimicrobiens	101
II.1. Hydrogels pour le relargage contrôlé d'agents antimicrobiens	103
II.2. Hydrogels composites antimicrobiens	104
II.3. Hydrogels élaborés par immobilisation des agents antimicrobiens.....	104
II.4. Incorporation de polysaccharides antimicrobiens dans des hydrogels synthétiques.....	106
II.5. Hydrogels possédant une activité antimicrobienne intrinsèque	107
II.5.1. Les polymères naturels	107
II.5.2. Les polymères synthétiques	108
II.5.3. Hydrogels à base de peptide	109
III. Objectif du chapitre.....	110
IV. Élaboration des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon non covalente.....	111
IV.1. Structure et caractérisation du xylane étudié	112
IV.1.1. Les xylanes	112
IV.1.2. Caractérisation du 4- <i>O</i> -méthyl-glucuronoxylane du bois de hêtre utilisé	113

IV.2. Préparation et caractérisation d'hydrogels à base de xylane	114
IV.3. Morphologie des hydrogels.....	116
IV.4. Propriétés de gonflement.....	117
IV.5. Gonflement de l'hydrogel xyl-2 en fonction du pH.....	118
IV.6. Chargement de l'hydrogel avec TMPyP.....	119
IV.7. Comportement rhéologique de l'hydrogel.	121
IV.8. Relargage du PS <i>in vitro</i> et photoinactivation bactérienne.	122
IV.9. Conclusion.....	124
V. Élaboration des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon covalente ..	124
V.1. Stratégie de synthèse.....	124
V.2. Fonctionnalisation du xylane par la tri(4-pyridyl)porphyrine	125
V.2.1. Synthèse de la 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (14) ...	125
V.2.2. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (15)	126
V.2.3. Fixation du bras espaceur sur la porphyrine (14).....	127
V.2.4. N-méthylation de la porphyrine (16)	127
V.2.5. Greffage de la porphyrine (17) sur le xylane.....	129
V.3. Préparation des hydrogels.....	133
V.4. Détermination de la quantité de porphyrine dans les hydrogels.....	134
V.5. Morphologie des hydrogels.....	135
V.6. Propriétés de gonflement.....	136
V.7. Comportement rhéologique des hydrogels	137
V.8. Evaluation de l'activité antibactérienne des hydrogels	138
V.9. Conclusion.....	139
VI. Élaboration d'hydrogels par réticulation directe du xylane par les porphyrines.....	140
VI.1. Préparation et caractérisation de l'hydrogel xyl-TCPP	140
VI.2. Propriétés de gonflement des hydrogels xyl-TCPP-1, xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3...143	
VI.3. Morphologie et comportement rhéologique de l'hydrogel xyl-TCPP-3.....	144
VI.4. Evaluation de l'activité antibactérienne l'hydrogel xyl-TCPP-3	146
VI.5. Conclusion.....	146
Conclusion et perspectives.....	148
Chapitre IV. Matériel et méthodes	151
I. Matériel	151
I.1. Réactifs et solvants.....	151
I.2. Chromatographie	151
I.2.1. Chromatographie sur couche mince analytiques (CCM).....	151
I.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative	151
I.2.3. Chromatographie sur colonne	151
II. Analyses	152
II.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	152
II.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	152
II.3. Spectroscopie d'absorption UV-Visible	152
II.4. Spectrométrie de Masse	152
II.5. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	152
II.6. Comportement rhéologique.....	153
II.7. Test de gonflement	153
III. Essais biologiques	153

III.1. Cultures bactériennes.....	153
III.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	154
III.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des conjugués porphyrine-maltooligosaccharides.....	154
III.2.2. Cytométrie en flux.....	154
III.2.3. Essai d'inhibition de la formation des biofilms.....	155
III.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel de xylane chargé par TMPyP.....	155
III.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des hydrogels de xylane fonctionnalisés par des porphyrines liées de manière covalente.....	156
IV. Synthèses.....	157
IV.1. Synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tri(<i>p</i> -tolyl)porphyrine (1).....	157
IV.2. Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane (2).....	158
IV.3. Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundécane (3).....	159
IV.4. Synthèse du 1-amino-11-azoturo-3,6,9-trioxaundécane (4).....	160
IV.5. Synthèse de la 5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-azoturo)phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine (5).....	161
IV.6. Métallation de la 5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-azoturo)phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine (6).....	162
IV.7. Synthèse du maltotriose peracétylé (7).....	163
IV.8. Synthèse des maltooligosaccharides propargylés (8) et (9).....	164
IV.9. Synthèse des composés (10) et (11).....	166
IV.10. Synthèse des composés (12) et (13).....	168
IV.11. Réticulation du xylane.....	170
IV.12. Synthèse de 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (14).....	171
IV.13. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (15).....	172
IV.14. Synthèse du composé (16).....	173
IV.15. <i>N</i> -méthylation des porphyrines.....	174
IV.15.1. Synthèse du composé (17).....	174
IV.15.2. Tétraiodure de 5,10,15,20-tétrakis(1-méthylpyridinium-4-yl)porphyrine (TMPyP).....	175
IV.16. Greffage de la porphyrine (17) sur le xylane.....	176
IV.17. Elaboration d'hydrogels à base de xylane portant des PS liés de manière covalente.....	177
IV.18. Réticulation directe du xylane par les porphyrines.....	178
Références bibliographiques.....	179

Table des illustrations

Figure 1 : Exemple d'une structure bactérienne [22].....	5
Figure 2 : Différentes formes de bactéries [23].	6
Figure 3 : Structures de la paroi protégeant la membrane plasmique chez les bactéries Gram négatif et Gram positif [24].....	7
Figure 4 : Courbe de la croissance bactérienne [26].....	9
Figure 5 : Cycle de formation d'un biofilm [28].	10
Figure 6 : Les étapes de la pathogénèse microbienne [19].....	11
Figure 7 : Structure du Rouge Trypan (a) et du Salvarsan (b).	12
Figure 8: structure du Prontosil.....	13
Figure 9 : a) Formule générale des Pénicillines b) Structure de la streptomycine	13
Figure 10 : Nombre d'agents antibactériens approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) par période de 5 ans [38].	15
Figure 11 : Structure de l'éosine (a) et l'acridine (b).	20
Figure 12 : Structure de l'hématoporphyrine (Hp).....	20
Figure 13 : Friedrich Meyer-Betz après une auto-injection d'hématoporphyrine a) avant exposition à la lumière du soleil et b) après exposition à la lumière du soleil [77].	21
Figure 14 : Dihématoporphyrine éther et ester.	22
Figure 15: Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique.	25
Figure 16 : Réactions primaires de composés photosensibles.	25
Figure 17 : Réactions photochimiques de l'oxygène (équations 1 et 6).....	26
Figure 18 : Réactions photochimiques de l'oxygène (équations 7 et 9).....	26
Figure 19 : Réaction du transfert énergétique entre le PS et O ₂	26
Figure 20 : Principales voies d'oxydation du cholestérol par l'oxygène singulet [102].	28
Figure 21 : Oxydation du tryptophane par l'oxygène singulet [104].....	28
Figure 22 : Exemples d'oxydation de la guanine par les deux catégories d'ERO [105].	29
Figure 23 : Structure de la curcumine.....	30
Figure 24 : Structure de l'hypéricine	31
Figure 25 : Structure de la riboflavine	31
Figure 26 : Structure du psoralène et du 8-méthoxypsoralène.....	32
Figure 27 : (a) Phénalénone, (b) Atrovénétine, (c) Lachnanthocarpone, (d) SAPYR, (e) Exemple d'un dérivé de phénalénone portant le groupe triazolium synthétisé par Godard et coll. [131].....	34
Figure 28 : Structure du bleu de méthylène	35
Figure 29 : Structure de l'érythrosine.....	35

Figure 30 : Structure du Rose de Bengale.....	36
Figure 31 : Structure d'un noyau BODIPY	36
Figure 32 : A : Structure du Buckminsterfullerène (C ₆₀), B : Dérivé de fullerène utilisé comme PS antimicrobien.	38
Figure 33 : (a) Porphyrine base libre ; (b) représentation du système de 18 électrons π aromatiques ; (c) Porphyrine métallée.	39
Figure 34 : Numérotation des positions d'une porphyrine.	39
Figure 35 : Différences structurales entre une porphyrine, une chlorine, une bactériochlorine et une isobactériochlorine.....	40
Figure 36 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres [150].	40
Figure 37 : Spectres d'absorbance d'une porphyrine base libre (rouge) et d'une métalloporphyrine (bleu).....	41
Figure 38 : Spectres d'absorbance de la pyropheophorbide a (vert) ainsi que la porphyrine (bleu) et la bacteriochlorine (rouge) correspondantes [151].....	41
Figure 39 : Structure de la protohème et ces dérivés obtenus après traitement.	43
Figure 40 : Synthèse du pyropheophorbide a et de la chlorine-e6 à partir de la chlorophylle a.	44
Figure 41 : Synthèse de la purpurine-18 à partir de la chlorophylle a.	45
Figure 42 : Porphyrines issus de la chlorophylle a.....	45
Figure 43 : Synthèse de la TPP selon Rothemund.	46
Figure 44 : Synthèse d'une tétraarylporphyrine selon Adler et Longo.....	47
Figure 45 : Méthode des aldéhydes mixtes.	47
Figure 46 : Les différentes porphyrines produites lors d'utilisation d'un mélange de deux aldéhydes.....	48
Figure 47: Synthèse de porphyrine selon Lindsey	49
Figure 48 : Structure des dipyrrométhanés et des dipyrrométhènes.....	49
Figure 49 : Synthèse de porphyrines utilisant des dipyrrométhènes.	50
Figure 50 : Synthèse de porphyrines selon Woodward et MacDonald [169,170].	51
Figure 51 : Synthèse de 5,15-diarylporphyrines à partir de dipyrrométhanés [171,172].....	51
Figure 52 : Synthèse de porphyrine selon Temelli et coll [173].....	52
Figure 53 : Synthèse de la porphyrine par la méthode « 3 +1 ».....	52
Figure 54 : synthèse "3+1" d'après Hatscher et Senge [175].....	53
Figure 55 : Voies de synthèse des métallophthalocyanines par tétramérisation de divers précurseurs.	54
Figure 56 : Les stratégies d'optimisation de la PACT [181].....	56

Figure 57 : Exemples de conjugués PS- peptides/ aminoacides polycationiques selon (a) : Meng <i>et coll.</i> [197] et Xu <i>et coll.</i> [198] (b) : Soukos <i>et coll.</i> [199] (c) : Zhou <i>et coll.</i> [200] (d) : Zhao <i>et coll.</i> [201].	58
Figure 58 : Les composés photosensibles conjugués à la polymyxine B développés au sein du laboratoire PEIRENE lors des travaux de Le Guern <i>et coll.</i> [3,205].	59
Figure 59 : Exemples de conjugués (KLAKLAK) ₂ -PS selon (a) : Johnson <i>et coll.</i> [206] (b) : Cheng <i>et coll.</i> [207].	61
Figure 60 : Liaison de la vancomycine à un peptide D-alanyl-D-alanine [212].	62
Figure 61 : Exemples de conjugués vancomycine -PS selon (a) : Xing <i>et coll.</i> [212] (b) : Zhai et Wang [216] (c) : Huang <i>et coll.</i> [217].	64
Figure 62 : Structure du conjugué gentamicine - porphycène synthétisé par Nonell <i>et coll.</i> [219].	65
Figure 63 : Modèle de transport de substrat pour MalFGK2 [222]	66
Figure 64 : Les sondes d'imagerie à base de maltodextrine selon Ning <i>et coll.</i> [11,12].	67
Figure 65 : Structure du conjugué phthalocyanine de silicium (IV) - maltohexaose synthétisé par Galstyan <i>et coll.</i> [225].	68
Figure 66 : les nanoagents multifonctionnels pour la détection et le traitement photodynamique des infections bactériennes [226].	69
Figure 67 : Structures chimiques des conjugués porphyrine-maltooligosaccharide obtenus au cours de ce travail.	70
Figure 68 : Les hydrogels à base de xylane portant des PS élaborés au cours de ce travail.	71
Figure 69 : Schéma rétrosynthétique des conjugués porphyrine-maltooligosaccharide (12) et (13) obtenus	74
Figure 70 : Synthèse de la 5-(<i>p</i> -carboxyphényl)-tritolyldiporphyrine (1) par la méthode des aldéhydes mixtes.	75
Figure 71 : Schéma général de la synthèse du composé (4)	76
Figure 72 : Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane (2)	76
Figure 73 : Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundécane (3)	77
Figure 74 : Réduction de Staudinger réalisée en milieu biphasique	78
Figure 75 : Synthèse du composé (5) par couplage peptidique	79
Figure 76 : Spectre RMN ¹ H de la porphyrine (5) dans CDCl ₃ .	80
Figure 77 : Métallation de la porphyrine (5) avec le diacétate de Zinc	81
Figure 78 : Spectres UV-Visible de la porphyrine (5) (rouge) et de la métalloporphyrine (6) (bleu).	81
Figure 79 : La peracétylation du matotriose	82
Figure 80 : Propargylation du maltooligosaccharides	82
Figure 81 : Mécanisme de propargylation des maltooligosaccharides	84

Figure 82 : Synthèse des composés (10) et (11) par CuAAC	85
Figure 83 : Les spectres IR des composés (6), (9) et (11).	86
Figure 84 : Spectre RMN ^1H du composé (11) dans CDCl_3	87
Figure 85 : Désacétylation des composés (12) et (13).	88
Figure 86 : Les spectres IR des composés (10), (11), (12) et (13).	89
Figure 87 : Etude par cytométrie en flux de l'internalisation de la porphyrine neutre seule (1) ou conjuguée avec le MT (12) ou le MH (13) dans : (a) <i>S. aureus</i> CIP76.25 ou (b) <i>E.coli</i> CIP53.126	93
Figure 88 : Images du biofilm coloré au cristal violet dans des plaques à 96 puits et densité optique (DO 595 nm) du biofilm coloré au cristal violet de : (a) <i>S. epidermidis</i> après irradiation, (b) <i>S. aureus</i> après irradiation, (c) <i>S. epidermidis</i> à l'obscurité et (d) <i>S. aureus</i> à l'obscurité.	96
Figure 89 : Schéma de formation d'hydrogels physiques et chimiques.	99
Figure 90 : Les trois principales approches employées pour développer des hydrogels antimicrobiens [262].	103
Figure 91 : Concept des hydrogels d'aminoglycosides intelligents selon Hu et coll. [277]. ...	106
Figure 92: (a) Structure du copolymère triséquencé synthétisé. (b) Schéma d'une structure proposée de l'hydrogel résultant et du mécanisme d'autocicatrisation inspiré des moules. Mécanisme d'auto-guérison inspiré des moules selon Li et coll. [304].	109
Figure 93 : Schéma général d'élaboration des hydrogels à base du xylane portant des PS.	111
Figure 94 : Procédure générale pour la formation de l'hydrogel à base du xylane portant des PS liés de façon non covalente	112
Figure 95 : Spectre RMN ^1H du xylane natif dans le D_2O	113
Figure 96 : Réticulation du xylane.	115
Figure 97 : Spectres IR des xylanes non modifiés, xyl-1 , xyl-2 et xyl-3	116
Figure 98 : Images MEB des sections transversales de (a) xyl-1 , (b) xyl-2 et (c) xyl-3 lyophilisés.	117
Figure 99 : (a) Taux de gonflement de xyl-1 , xyl-2 , et xyl-3 en fonction de du temps à température ambiante ; (b) Taux de gonflement à l'équilibre de xyl-1 , xyl-2 , et xyl-3 en fonction de la température ; photos de xyl-2 : (c) avant et (d) après gonflement	118
Figure 100 : Effet du pH sur le taux de gonflement à l'équilibre du xyl-2	119
Figure 101 : Images MEB de (a) l'hydrogel chargé de TMPyP (xyl-TMPyP) et (b) l'hydrogel non chargé (xyl-2) ; (c) : photographie de xyl-TMPyP	120
Figure 102 : Courbe d'étalonnage UV-Vis obtenue à partir de différentes concentrations de TMPyP libre dans de l'hydroxyde de sodium concentré (2M) ($\lambda_{\text{max}} = 451 \text{ nm}$).	120
Figure 103 : (a) Propriétés rhéologiques de la viscosité (η) du xyl-2 et du xyl-TMPyP en fonction du taux de cisaillement, et (b) module de conservation (G') et module de perte (G'') du xyl-2 et du xyl-TMPyP en fonction de la fréquence angulaire.	122

Figure 104 : Relargage <i>in vitro</i> de la TMPyP dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C.	123
Figure 105 : Inhibition de la croissance bactérienne due au relargage de TMPyP par les hydrogels.....	124
Figure 106 : Stratégie de synthèse des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon covalente.	125
Figure 107 : Synthèse de la 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (14) par la méthode des aldéhydes mixtes.....	125
Figure 108 : Synthèse de la porphyrine (15).....	126
Figure 109 : Synthèse de la porphyrine (16).....	127
Figure 110 : N-méthylation de la porphyrine (16).....	128
Figure 111 : Spectre RMN ¹ H du composé (17) dans DMSO _{d6}	129
Figure 112 : Greffage de la porphyrine (17) sur le xylane.	130
Figure 113 : Spectres IR du xylane (a) avant et (b) après fixation de la porphyrine (17).	131
Figure 114 : Spectre RMN ¹ H du xylane fonctionnalisé, dans DMSO-d ₆	132
Figure 115 : Réticulation du xylane fonctionnalisé.	133
Figure 116 : Spectres IR (a) du xylane natif, (b) du xyl-P5 et (c) de l'hydrogel formé à partir de xyl-P5	134
Figure 117 : Images MEB des sections transversales de (a) HG-xyl-P1 , (b) HG-xyl-P2 , (c) HG-xyl-P3 , (d) HG-xyl-P4 et (e) HG-xyl-P5 lyophilisés.....	136
Figure 118: Taux de gonflement de HG-xyl-P1 , HG-xyl-P2 , HG-xyl-P3 , HG-xyl-P4 et HG-xyl-P5 en fonction du temps.....	137
Figure 119 : Propriétés rhéologiques de HG-xyl-P1 , HG-xyl-P2 , HG-xyl-P3 , HG-xyl-P4 et HG-xyl-P5 : viscosité (η) en fonction du taux de cisaillement (a), tendance typique des valeurs du module de conservation (G') et du module de perte (G'') en fonction de la fréquence angulaire pendant l'essai de balayage effectué sur le HG-xyl-P4 (b).	138
Figure 120 : Synthèse des hydrogels par réticulation directe du xylane par TCPP	140
Figure 121 : (a) xyl-TCPP-1 gonflé dans l'eau directement après la réaction ; (b) xyl-TCPP-1 après lyophilisation ; (c) xyl-TCPP-1 après 48 h et (d) après 15 jours de regonflement dans l'eau	141
Figure 122 : Spectres IR du xylane natif, xyl-TCPP1 , xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3	142
Figure 123 : (a) : Photos de xyl-TCPP-1 , xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3 avant gonflement (à gauche) et après 72 h de gonflement (à droite) ; (b) : Taux de gonflement dans l'eau distillée de xyl-TCPP-1 , xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3 en fonction du temps.....	143
Figure 124 : Taux de gonflement dans le PBS de xyl-TCPP-1 , xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3 en fonction du temps.....	144
Figure 125 : Images de MEB des sections transversales de xyl-TCPP-3 lyophilisé	145
Figure 126 : Propriétés rhéologiques de xyl-TCPP-3 : la viscosité (η) du xyl-TCPP-3 en fonction du taux de cisaillement (a), module de conservation (G') et module de perte (G'') du xyl-TCPP-3 en fonction de la fréquence angulaire (b).	145

Table des tableaux

Tableau 1 : Concentrations minimales inhibitrices sur <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>E. coli</i> dans deux conditions différentes à 37 °C ; 5 heures d'irradiation en lumière blanche (L) (4,83 mW / cm ²) et à l'obscurité (O).....	90
Tableau 2 : Concentrations minimales bactéricides sur <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>E. coli</i> dans deux conditions différentes à 37 °C ; 5 heures d'irradiation en lumière blanche (L) (4,83 mW / cm ²) et à l'obscurité (O).....	91
Tableau 3 : DS et nombres d'équivalents de la porphyrine (17) utilisés pour obtenir les différents xylanes fonctionnalisés.	133
Tableau 4 : Pourcentage massique en porphyrine déterminé pour chaque hydrogel.....	135
Tableau 5 : Valeurs moyennes des log(UFC/mL) dans deux conditions différentes à 37 °C; irradiation en lumière blanche (25 J/cm ²) et à l'obscurité	139
Tableau 6 : Pourcentage massique en TCPP déterminé pour les hydrogels xyl-TCPP1 , xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3	142
Tableau 7 : Valeurs moyennes des log(UFC/mL) dans deux conditions différentes à 37 ° C; irradiation en lumière blanche (25 J/cm ²) et à l'obscurité	146
Tableau 8 : Les quantités des réactifs utilisées pour fonctionnaliser le xylane.....	177

Liste des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALA : Acide 5-aminolévulinique

ATP : Adénosine TriPhosphate

C

CCM : Chromatographie sur Couche
Mince

CDI : N,N'-carbonyldiimidazole

Ce6 : Chlorine-e6

CI : Conversion Interne

CIS : Conversion Inter-Système

CMB : Concentration Minimale
Bactéricide

CMI : Concentration Minimale
Inhibitrice

CuAAC: Copper(I)-catalyzed Azide-
Alkyne Cycloaddition

D

DCM : Dichlorométhane

DIPEA : Diisopropyléthylamine

DHE : Dihématoporphyrine ester

DMF : N,N-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DP : Degré de polymérisation

DS : Degré de substitution

DTPA :Acide
diéthylènetriaminepentaacétique

E

EDC : 1-Ethyl-3-(3-
diméthylaminopropyl)carbodiimide

éq. : Equivalent

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

EtOH : Ethanol

Et₃N : Triéthylamine

F

FDA : Food and Drug Administration

H

Hp : Hématoporphyrine

HpD : Hematoporphyrin Derivative

HRMS : High Resolution Mass

Spectrometry (Spectrométrie de masse
haute résolution)

I

IR : Infrarouge

J

J : constante de couplage

L

LB : Luria-Bertani

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide lipotéichoïque

M

MDR : Multidrug resistant

MEB : Microscope Electronique à
Balayage

MeGA : Acide 4-O-méthyl-D-
glucuronique

MeOH : Méthanol

MeONa : Méthanolate de sodium

MS : Spectrométrie de masse

MsCl : Chlorure de mésyle

N

N.D : Non déterminé

NHS : N-hydroxysuccinimide

NPs : Nanoparticules

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PACT : Photodynamic antimicrobial chemotherapy

PAM : Peptide antimicrobien

PBS : Phosphate buffer solution

PDT : Photothérapie dynamique

PEG : Polyéthylène Glycol

ppm : partie par million

PS : Photosensibilisateur

R

R_f : rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SARM : *S. aureus* résistant à la méticilline

SASM : *S. aureus* sensible à la méticilline

T

TA : Température ambiante

TCPP : *meso*-Tetra(4-carboxyphenyl)porphine

T_f : Température de fusion

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TMPP : Tetrakis-(4-N-méthylpyridyl)-porphyrine

TMS : Tétraméthylsilane

TPP : *més*o-tétraphénylporphyrine

TS : Trypticase Soja

U

UFC : Unité Formant Colonie

UV-visible : Spectre d'absorbance dans les Ultraviolets et la lumière visible

X

Xyl : Xylane

ϵ : Coefficient d'absorption molaire

λ : Longueur d'onde

ν : Nombre d'onde

Φ_f : Rendement quantique de fluorescence

$\Phi\Delta$: Rendement quantique de production d'oxygène singulet

Introduction générale



Introduction générale

L'une des menaces émergentes les plus graves pour la santé humaine est la résistance aux traitements antimicrobiens, c'est-à-dire la capacité des micro-organismes à survivre à un traitement chimiotoxique auquel ils étaient initialement sensibles. L'exemple le plus frappant est la résistance des bactéries aux antibiotiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), au moins 700 000 personnes meurent chaque année d'infections causées par des bactéries multi-résistantes (MDR). Des estimations similaires indiquent que ce nombre pourrait atteindre 10 millions d'ici 2050 si aucune action n'est entreprise pour contrer ce problème d'antibiorésistance [1]. L'émergence de bactéries MDR est accompagnée avec un déclin progressif des programmes de recherche pour la découverte et le développement de nouveaux agents antimicrobiens [2]. Ainsi, le développement de thérapies alternatives immunisées contre la résistance bactérienne devient crucial.

Parmi les alternatives, la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT, *PhotoAntimicrobial ChemoTherapy*) est récemment apparue comme l'une des stratégies thérapeutiques qui pourraient permettre d'améliorer les traitements contre les bactéries multirésistantes. La PACT est une thérapie antimicrobienne très prometteuse qui s'est avérée efficace contre les micro-organismes, à savoir les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que les champignons, les virus et les parasites [3–6]. Dérivée de la thérapie photodynamique anticancéreuse (PDT, *PhotoDynamic Therapy*), la PACT nécessite la présence simultanée d'un photosensibilisateur (PS), d'une source de lumière et d'oxygène moléculaire. Lorsqu'il est irradié, le PS excité peut produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) par transfert d'énergie, ou des radicaux d'oxygène tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) par transfert d'électrons. Ces espèces cytotoxiques à courte durée de vie peuvent rapidement réagir avec différents substrats moléculaires (protéines, lipides, acides nucléiques, métabolites) et causer des dommages cellulaires, qui peuvent finalement conduire à la mort cellulaire. Le nombre et la diversité des cibles cellulaires limitent considérablement l'augmentation des souches bactériennes qui résistent à ce traitement [7,8]. La PACT est une stratégie thérapeutique non invasive, et a une action rapide. De plus, la PACT ne semble pas induire la mise en place de mécanismes de résistance par les bactéries, ce qui en fait une alternative attrayante, par exemple, aux traitements conventionnels des infections des plaies. Cependant, l'utilisation clinique de la plupart des PS existants a été gravement entravée par plusieurs facteurs, notamment leur faible solubilité dans l'eau et leur manque de sélectivité vis-à-vis des cellules bactériennes [9,10].

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont pour objectif d'approfondir les connaissances et les résultats obtenus en PACT, afin de valoriser cette technique en tant que solution viable face

aux infections bactériennes. Afin de pallier certains problèmes liés aux porphyrines en tant que photosensibilisateurs très étudiés dans la PACT, nous nous sommes intéressés, au cours de ce travail, à deux stratégies pour l'optimisation de cette thérapie. La première consiste à coupler une porphyrine à des dérivés de maltodextrines utilisés récemment comme agent de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale [11–13], afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis les cellules bactériennes. La deuxième stratégie vise à incorporer des porphyrines dans des hydrogels à base de xylane, un biopolymère naturel, non toxique, biocompatibles et biodégradable [14]. La capacité des hydrogels à absorber de grandes quantités d'eau ou de fluides biologiques, leur grande perméabilité à l'oxygène et la diversité de leurs structures en font une bonne formulation pour la PACT et ouvrent de nouvelles perspectives pour le traitement des infections dans les plaies, les procédures post-chirurgicales, les brûlures, les implants dentaires et orthopédiques [15–18].

Après un état de l'art relatif d'une part aux infections bactériennes et d'autre part à la PACT nous discuterons les différents travaux menés au cours de cette thèse sous la forme de deux chapitres. L'un est dédié à la synthèse, la caractérisation et l'évaluation biologique de deux conjugués, composé d'une mésoporphyrine reliée par une chaîne tétraéthylène glycol avec un maltooligosaccharide (maltohexaose ou maltotriose). L'autre chapitre porte sur l'incorporation des porphyrines dans des hydrogels à base de xylane. Pour cela, trois voies ont été explorées. Dans une première approche, l'hydrogel a été synthétisé d'abord par réticulation de xylane avant de le charger par une porphyrine cationique. Dans la deuxième approche, les porphyrines sont fixées d'abord par liaisons covalentes sur le xylane, puis les hydrogels ont été obtenus à partir de ces xylanes fonctionnalisés par un agent de réticulation. Dans la dernière méthode, l'hydrogel est obtenu directement par une réticulation directe du xylane par les porphyrines.

Chapitre I.

État de l'art

A. Les infections bactériennes

I. Les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires qui ne possèdent pas de noyau et dont le génome est constitué d'ADN. La plupart des bactéries ont une taille variant de 1 à 10 μm , un diamètre compris entre 0,5 et 1,5 μm et des volumes bactériens allant donc de 0,02 à 400 μm^3 [19]. Pourtant, des cas extrêmes existent comme *Thiomargarita namibiensis* dont la taille peut atteindre 750 μm , et peuvent donc être visibles à l'œil nu, ou à l'opposé *Francisella tularensis*, qui a une taille de 0,2 μm [20,21]. L'un des nombreux avantages de leur petite taille est la capacité à détecter immédiatement les changements environnementaux qui manquent aux grands organismes multicellulaires. Les bactéries doivent seulement avoir une taille pour contenir leurs enzymes, protéines et machineries génétiques vitales. Leur architecture simple permet une reproduction rapide, ce qui facilite leur adaptation aux changements environnementaux. Le métabolisme bactérien est un modèle d'efficacité en raison d'un grand rapport surface-volume [19]. Aucune partie d'une cellule bactérienne n'est très éloignée de la surface où les échanges nutritionnels ont lieu. La petite taille contribue ainsi au développement de populations bactériennes massives qui dépassent les populations de tout autre biote.

I.1. Structures des bactéries

Les bactéries sont entourées par une paroi qui leur donne une forme et les protège des agressions externes. Le contenu de la bactérie est appelé cytoplasme. On y retrouve notamment les protéines, les enzymes, les nutriments et toutes les molécules nécessaires à la survie de la bactérie. Ces procaryotes possèdent un matériel génétique généralement unique et circulaire qui porte la majorité des gènes. Certains gènes ayant des fonctions particulières comme la résistance aux antibiotiques ou pour l'adaptation physiologique au milieu par exemple, sont cependant localisés sur des petites sections d'ADN circulaire libres appelées plasmides. Dans le cytoplasme, on y retrouve les ribosomes participant à la traduction des ARNm (ARN messager) en protéines. Selon les bactéries, des flagelles (ou des cils) peuvent émaner du cytoplasme, permettant la mobilité de la bactérie (**Figure 1**).

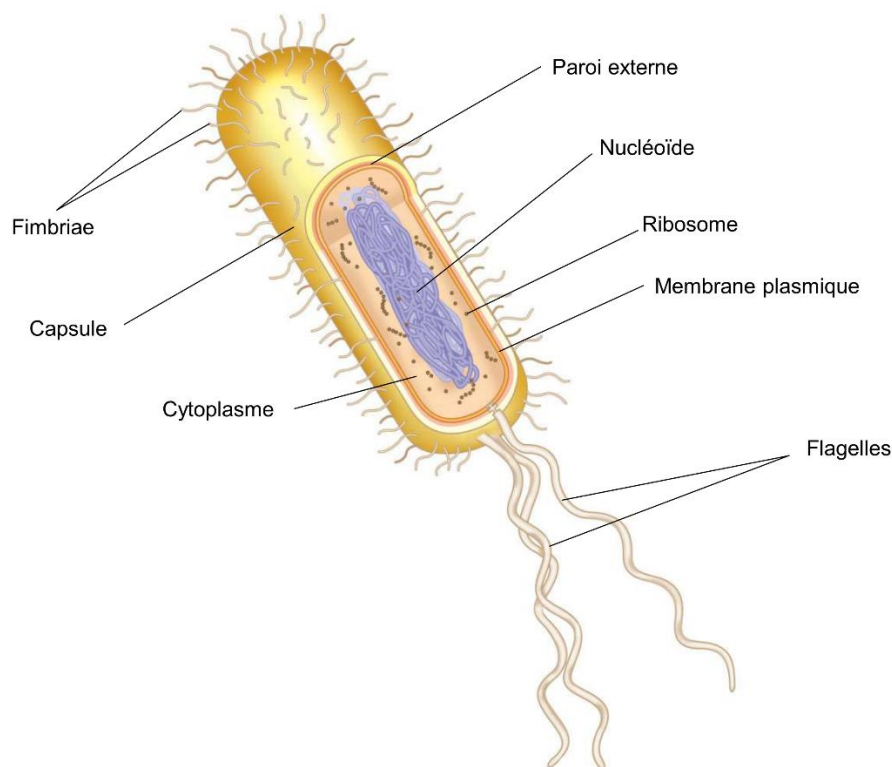


Figure 1 : Exemple d'une structure bactérienne [22].

Les bactéries présentent une grande diversité de morphologies cellulaires. La plupart des bactéries ont une forme soit sphérique, appelées coques (du grec *kókkos*, grain), soit en forme de bâtonnet, appelées bacilles (du latin *baculus*, bâton), soit en forme hélicoïdale, appelées spirilles. Il existe également des formes intermédiaires appelés les coccobacilles. Le mode d'arrangement des cellules bactériennes est aussi une caractéristique qui permet de distinguer les bactéries. Plusieurs espèces bactériennes peuvent être observées sous forme unicellulaire isolée, alors que d'autres espèces sont associées entre elles. Ces dernières peuvent être associées en paires (diplocoques) comme les *Neisseria*, en chaîne comme les streptocoques ou en amas comme les staphylocoques. La grande diversité de forme est déterminée par la paroi cellulaire et le cytosquelette (**Figure 2**).

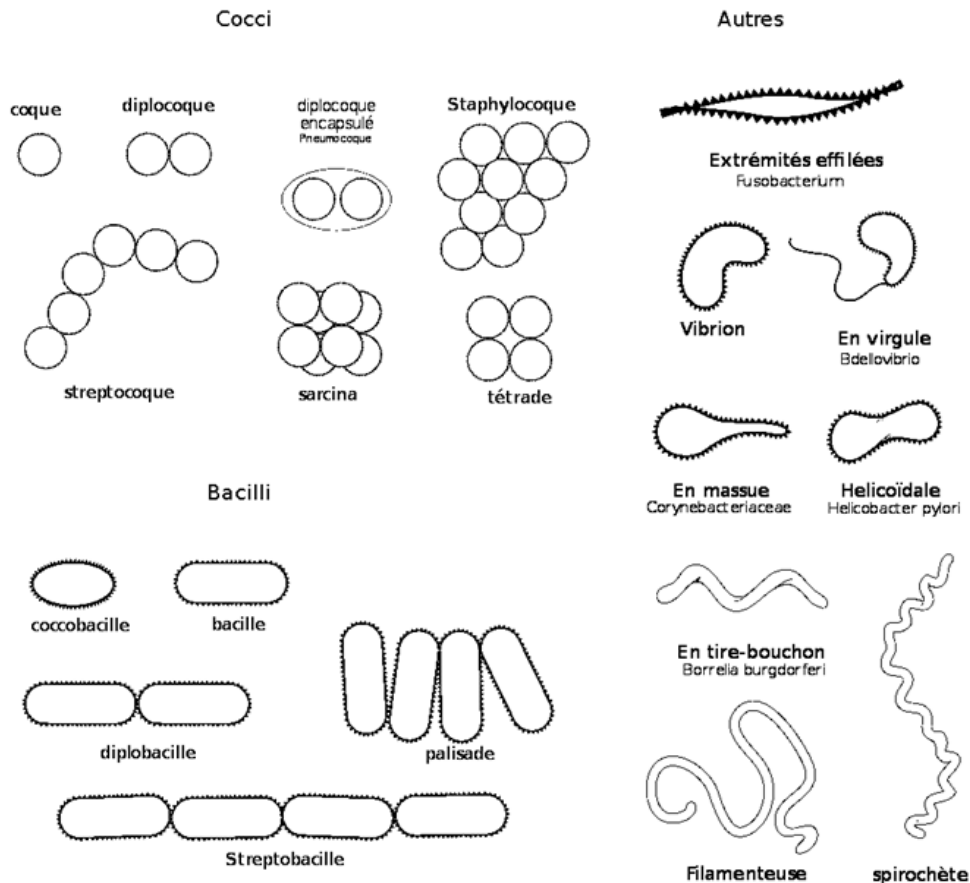


Figure 2 : Différentes formes de bactéries [23].

I.2. Parois bactériennes

Un élément important de la structure des bactéries est leur paroi cellulaire, qui leur confère leur forme et les protège des variations de pression osmotique. La paroi cellulaire est notamment formée d'un polymère appelé peptidoglycane constitué de 2 éléments principaux : une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique. Le polysaccharide est un polymère fait d'une alternance de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. La partie peptidique est constituée de chaînes peptidiques composées de 4 acides aminés : une L-alanine en position 1, un D-glutamate en position 2, un acide diamino-pimélique, une lysine ou un autre acide aminé en position 3, et la D-alanine en position 4. Ces deux parties sont liés par des ponts interpeptidiques.

La distinction entre les bactéries Gram positif et Gram négatif repose sur la différence de composition pariétale (**Figure 3**). La paroi des bactéries Gram positif est essentiellement constituée de peptidoglycanes (entre 15 et 80 nm d'épaisseur) dans lesquels sont présents des polymères amphiphiles spécifiques aux bactéries Gram positif : les acides téichoïques

(TA) et les acides lipotéichoïques (LTA). Chez les bactéries Gram négatif, une deuxième membrane phospholipidique est présente. Sur cette dernière, de nombreux polymères dont des lipopolysaccharides (LPS) sont greffés. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance antigénique et offrent un fort caractère anionique à la bactérie. De plus, la lyse de la bactérie permet le relargage de LPS qui, en tant qu'endotoxines, peuvent être à l'origine de réactions inflammatoires.

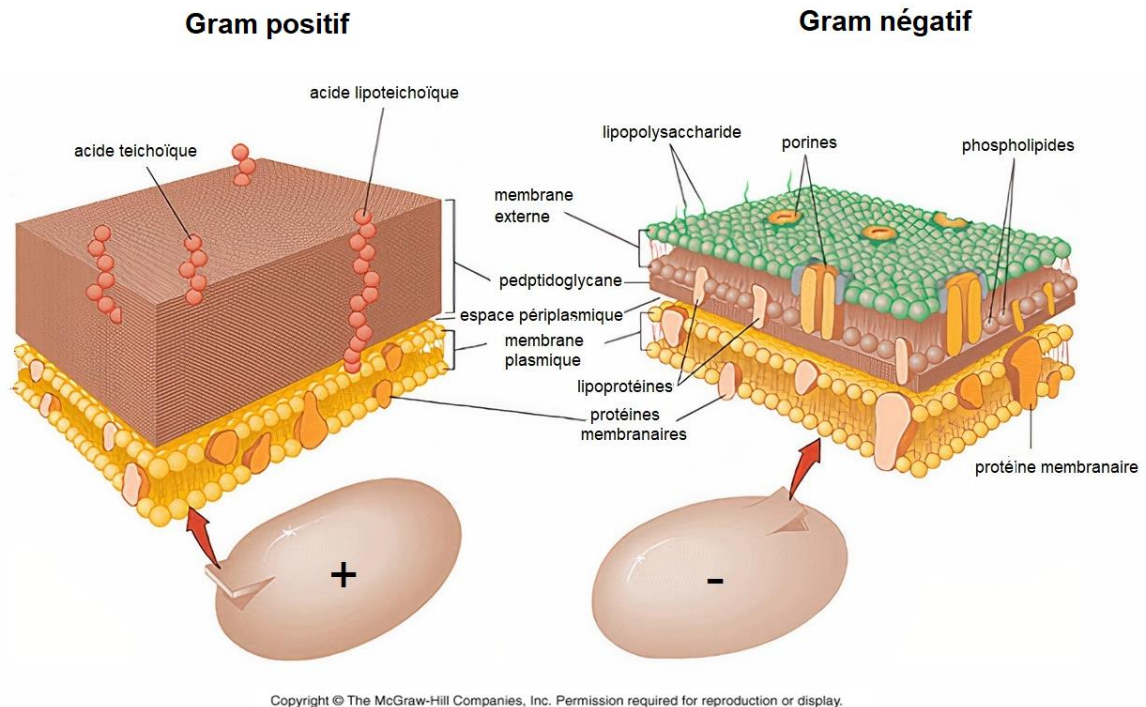


Figure 3 : Structures de la paroi protégeant la membrane plasmique chez les bactéries Gram négatif et Gram positif [24].

La présence de la protection supplémentaire offerte par la membrane externe et d'un espace périplasmique plus large constitue une barrière pour les molécules hydrophiles comme les bêta-lactamines ou fluoroquinolones. En effet, certaines souches Gram négatif se sont montrées insensibles à des traitements efficaces sur les bactéries Gram positif [25].

I.3. La croissance bactérienne

La notion de croissance bactérienne recouvre à la fois l'augmentation du volume de la cellule bactérienne, et le phénomène de division cellulaire (population). On assimile souvent la croissance à la division cellulaire. Les bactéries se multiplient par scissiparité : deux bactéries sont obtenues à partir d'une cellule mère et sont identiques à cette dernière. La croissance bactérienne est fortement influencée par les conditions physicochimiques de l'environnement

(présence de nutriments, d'agents antibactériens, température, pH, luminosité, atmosphère, ...).

In vitro, la croissance bactérienne dans un milieu nutritif peut être caractérisée par 6 phases (Figure 4) :

- **Phase de latence** : Durant cette phase, le taux de croissance correspondant au nombre de division par unité de temps est nul. La bactérie s'adapte au milieu de culture en synthétisant les enzymes adaptées aux nutriments du nouveau substrat de culture.
- **Phase d'accélération** : les bactéries métabolisent les nutriments apportés par le milieu de culture et elles commencent à se diviser.
- **Phase exponentielle de croissance** : les bactéries se multiplient à grande vitesse.
- **Phase de décélération ou ralentissement** : la croissance ralentit progressivement à cause de la saturation de bactéries ou d'un manque de nutriments.
- **Phase stationnaire** : le taux de croissance devient nul. Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.
- **Phase de déclin** : le nombre d'organismes viables diminue à cause de l'épuisement du milieu de culture et une accumulation des déchets.

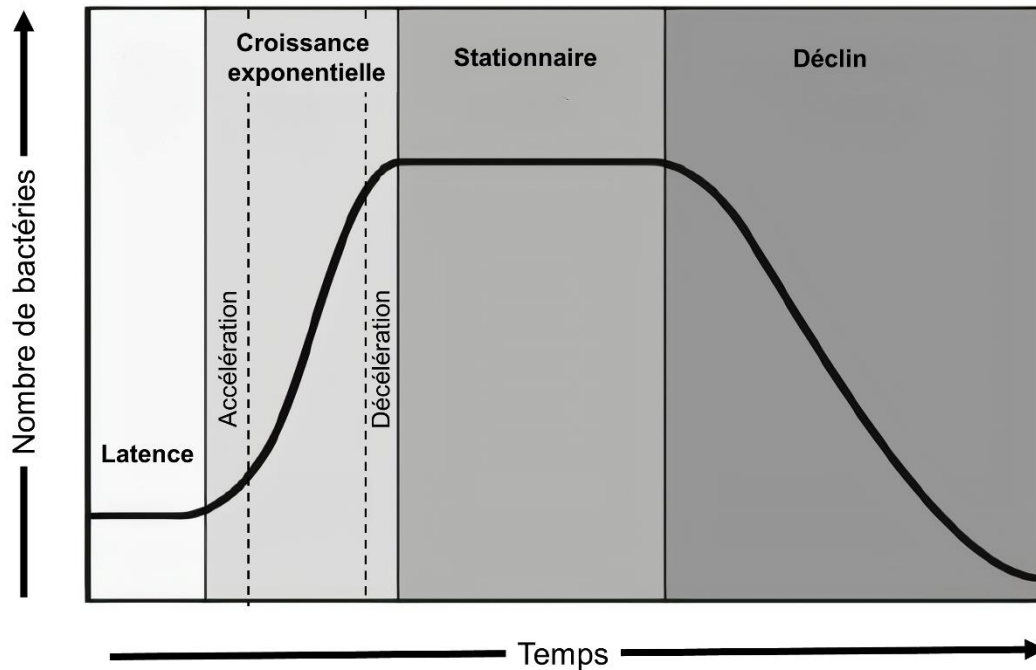


Figure 4 : Courbe de la croissance bactérienne [26].

Dans la nature, les bactéries alternent entre deux modes de croissance : une phase de vie unicellulaire, dans laquelle les cellules « nagent » librement (état planctonique), et une phase de vie multicellulaire, dans laquelle les cellules sont sessiles et vivent dans une structure communautaire appelée « biofilm ». Le biofilm peut être défini sous forme de structures microbiennes hétérogènes associées à la surface comprenant différentes populations de micro-organismes entourées d'une matrice auto-produite (matrice d'exopolysaccharides ou EPS) qui permet leur adhésion sur des surfaces inertes ou organiques. Alors qu'une phase de vie unicellulaire permet la dispersion bactérienne et la colonisation de nouveaux environnements, les biofilms permettent aux cellules sessiles de vivre de manière coordonnée et plus permanente favorisant leur prolifération [27]. La formation d'un biofilm se déroule en 5 étapes (**Figure 5**) :

- **Adhérence réversible (1)** : les bactéries planctoniques adhèrent à la surface.
- **Adhésion irréversible (2)** : l'adhésion devient irréversible grâce à la production de protéines spécifiques et/ou de la formation de structures telles que les *pili*.
- **Formation de micro-colonies (3)** : les bactéries se multiplient fortement afin de pouvoir sécréter activement le biofilm.
- **Maturation du biofilm (4)** : La sécrétion de la matrice extracellulaire offre un milieu propice à la croissance bactérienne, et le biofilm devient ainsi macroscopique.

- **Propagation du biofilm (5) :** Certaines bactéries se séparent du biofilm, à cause de leur vieillissement ou de différents stress physiques, et retournent à l'état planctonique. Ces dernières peuvent ainsi coloniser de nouvelles surfaces.

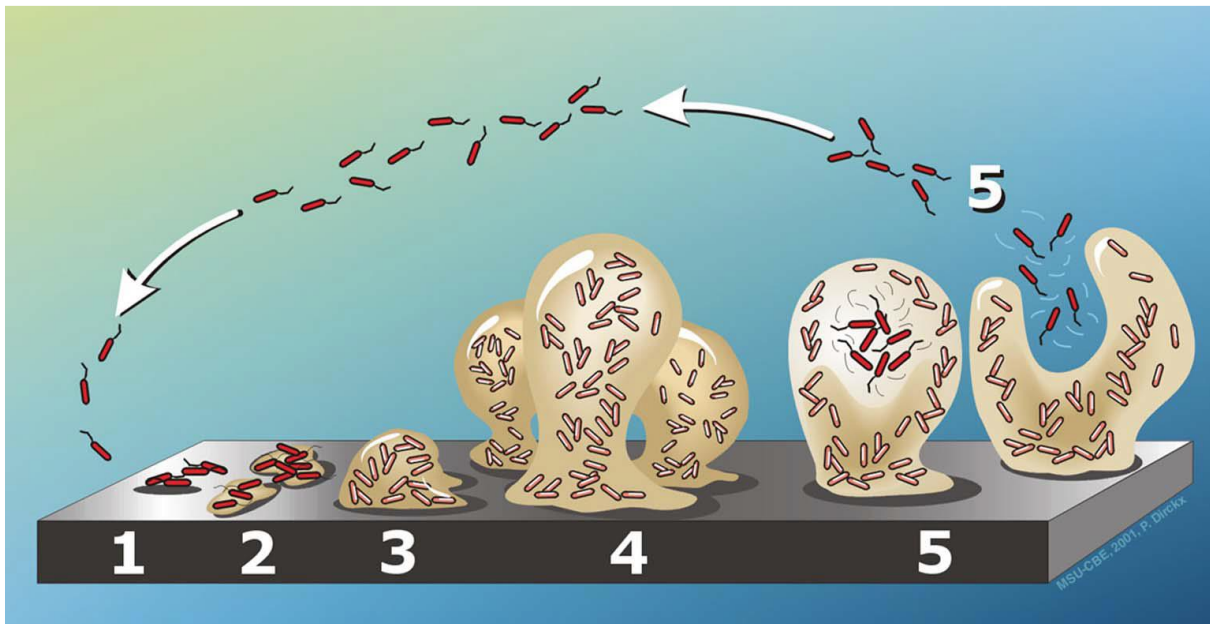


Figure 5 : Cycle de formation d'un biofilm [28].

Les biofilms ont suscité un intérêt tout particulier lorsqu'il a été démontré qu'ils étaient impliqués dans près de 60% des infections bactériennes [29]. Ils sont particulièrement résistants grâce à la matrice composée d'exopolysaccharides, de protéines et glycoprotéines. En effet, cette agrégation de bactéries est dix à mille fois moins sensible à la majorité des antibiotiques et autres biocides que les bactéries à l'état planctonique [30,31].

I.4. Pathogénèse bactérienne

Toutes les bactéries ne sont pas pathogènes, mais de nombreuses maladies bien connues sont causées par des infections bactériennes. La tuberculose, le choléra, la peste, la gonorrhée, la syphilis, la fièvre rhumatismale, le typhus et la fièvre typhoïde, etc. font partie des maladies très graves causées par des bactéries pathogènes. La capacité d'un agent microbien à provoquer une maladie est appelée « pathogénicité », et le degré auquel un organisme est pathogène est appelé « virulence ». La relation hôte-bactérie dépend de la souche microbienne, de sa virulence, de sa résistance, de la quantité d'agents et du système de défense de l'hôte. Elle peut aussi être considérée comme une compétition par rapport aux ressources disponibles.

Pour provoquer une maladie, la bactérie pathogène doit pouvoir pénétrer dans l'hôte, se rendre à l'endroit où il peut établir une infection, échapper ou surmonter la réponse immunitaire de l'hôte et provoquer des dommages pour l'hôte. Dans de nombreux cas, le cycle est terminé lorsque l'agent pathogène quitte l'hôte et est transmis à un nouvel hôte. La pathogenèse microbienne (**Figure 6**) commence par l'exposition et l'adhérence puis l'adhésion des micro-organismes sur un tissu organique. Une fois l'adhésion réussie, l'invasion peut se poursuivre. L'invasion implique la pénétration et la dissémination d'un agent pathogène dans les tissus locaux ou dans le corps. Après l'invasion, une multiplication réussie de l'agent pathogène conduit à une infection. En plus de cette colonisation, certaines bactéries produisent des substances toxiques appelées bactériotoxines, induisant une cytotoxicité chez les cellules de l'hôte. On distingue les exotoxines, sécrétées par les bactéries, principalement par des bactéries Gram positif et les endotoxines comme les LPS, constituants de la paroi des bactéries Gram négatif.

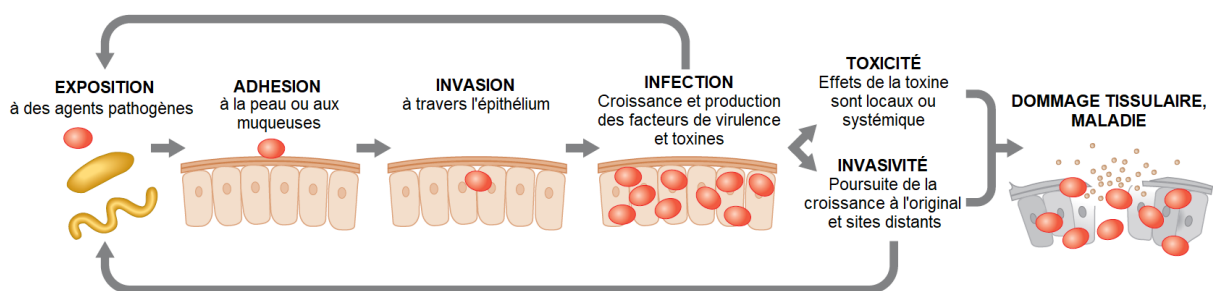


Figure 6 : Les étapes de la pathogenèse microbienne [19].

II. Les moyens de lutte contre les infections bactériennes

Les antimicrobiens en général et les antibactériens en particulier sont probablement l'une des formes de chimiothérapie les plus efficaces de l'histoire de la médecine. Il n'est pas nécessaire de répéter ici combien de vies ils ont sauvé et dans quelle mesure ils ont contribué à la lutte contre les maladies infectieuses qui étaient les principales causes de morbidité et de mortalité humaines pendant la plus grande partie de l'existence humaine. Dans cette partie, nous nous proposons de suivre le cheminement de l'évolution des antibactériens jusqu'aux dernières actualités.

II.1. Les premiers traitements

Il existe de bonnes preuves historiques que les civilisations anciennes utilisaient une variété de traitements naturellement disponibles contre les infections bactériennes, par exemple des herbes, du miel et même des excréments d'animaux. Dans l'ancienne Serbie, la Chine et la

Grèce, du vieux pain moisi était pressé contre les plaies pour prévenir l'infection. En Egypte, des croûtes de pain de froment moisies ont été appliquées sur les infections pustuleuses du cuir chevelu [32].

La découverte de petites créatures vivantes ou « animalcules » par Antonie van Leeuwenhoek en 1673 - à l'aide d'un microscope qu'il a conçu - a permis de débiter l'étude de la bactériologie [33]. À la fin des années 1800, Robert Koch et Louis Pasteur ont pu établir l'association entre les espèces individuelles de bactéries et la maladie par propagation sur des milieux artificiels et chez les animaux. La propagation de la gonorrhée et de la syphilis a incité à davantage d'expérimentation de traitements possibles, en particulier parmi les classes supérieures. Les métaux lourds tels que l'arsenic, le bismuth et le mercure ont tous été essayés, ils étaient administrés soit par voie systémique, soit localement [34]. Bien que les symptômes se soient améliorés, l'administration et les effets secondaires se sont souvent avérés pires que la maladie.

Ce n'est que lorsque Paul Ehrlich commença à travailler sur les effets antibactériens des colorants que l'ère moderne de la chimiothérapie antimicrobienne a vraiment commencé. Son premier succès (1907) fut l'utilisation d'un colorant, le Rouge Trypan (**Figure 7-a**), dans le traitement de la trypanosomiase (Maladie du sommeil) provoquée par une infection par un trypanosome transmis par la piqûre de la mouche tsé-tsé. Ce fut là le premier médicament résultant d'une recherche planifiée. Il synthétisa et expérimenta plus de neuf cents dérivés. Le dérivé 606 (nom commercial Salvarsan) (**Figure 7-b**) fut introduit en 1911 pour traiter la syphilis. Il se révéla d'une très grande efficacité. Son produit resta pendant une dizaine d'années le traitement de référence [35].

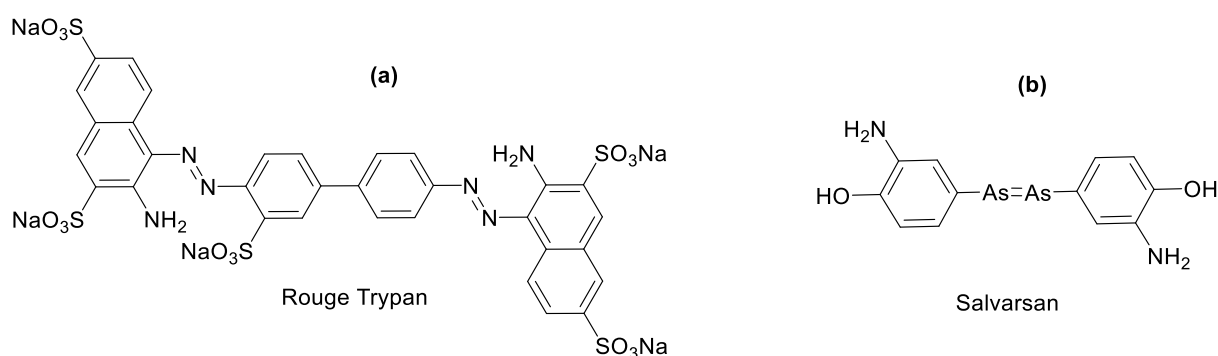


Figure 7 : Structure du Rouge Trypan (a) et du Salvarsan (b).

En 1935, le Prontosil (**Figure 8**) a été découvert par Gerhard Domagk. Cet agent sulfamidé a été le premier médicament efficace contre les infections dues aux bactéries Gram positif (dont les streptocoques et les méningocoques) et a eu un succès commercial. Ce succès a également conduit à la découverte d'autres médicaments basés sur le groupe sulfonamide.

En plus de la classe des sulfamides elle-même, cela comprend des antimycobactériens importants tels que les classes de sulfones et de thiosemicarbazides, respectivement pour la maladie de Hansen et la tuberculose [36].

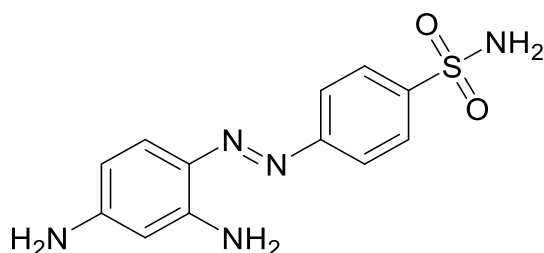


Figure 8: structure du Prontosil.

II.2. L'âge d'or des antibiotiques

Initialement, les antibiotiques étaient définis comme des substances produits par des micro-organismes capables de tuer ou d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes. Après leur découverte et leur commercialisation, ils peuvent être d'origine naturelle, modifiés chimiquement (semi-synthétique) ou totalement synthétisés [19].

Le premier antibiotique identifié fut la pénicilline (**Figure 9-a**) par Sir Alexander Fleming qui s'aperçut en 1928 que certaines de ses cultures bactériennes dans des boîtes oubliées avaient été contaminées par les expériences de son voisin de pailleuse étudiant le champignon *Penicillium notatum* et que celui-ci inhibait leur croissance. Il émit l'hypothèse que ce champignon sécrétait une substance antibactérienne, appelée Pénicilline. Mais l'importance de cette découverte, ses implications et ses utilisations médicales ne furent pas comprises et élaborées car l'antibiotique était impur, instable et difficile à produire. Il fallut attendre les travaux de Chain et Florey en 1938 pour obtenir la cristallisation de la pénicilline.

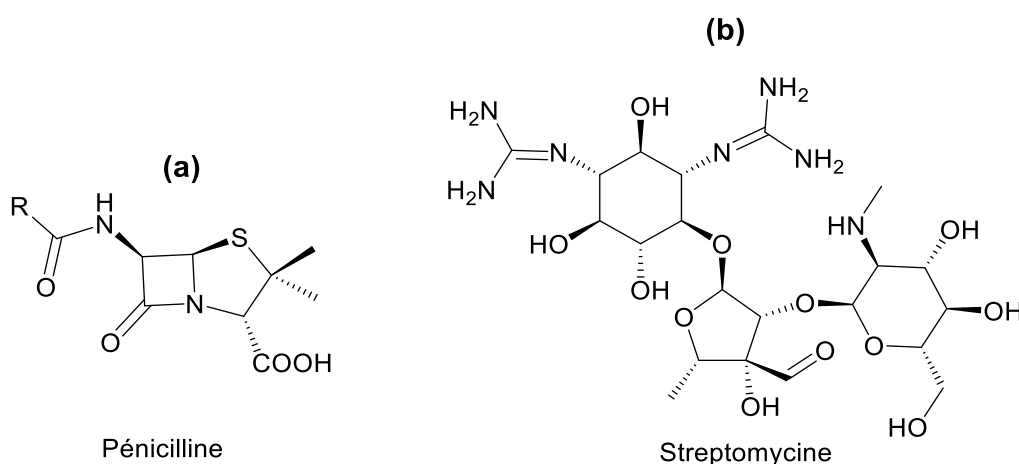


Figure 9 : a) Formule générale des Pénicillines b) Structure de la streptomycine

La découverte de cette molécule a stimulé la recherche d'autres antibiotiques. En 1944, Selman Waksman a pu isoler une nouvelle substance, la streptomycine (**Figure 9-b**), produite par l'actinomycète *Streptomyces griseus* puis démontrer une efficacité sur les bactéries Gram positif et certaines bactéries Gram négatif, insensibles à la pénicilline. Cette molécule fut également le premier antibiotique capable de traiter avec succès la tuberculose. Ces deux antibiotiques ont marqué le début de « l'ère des antibiotiques ». Moins d'une décennie après la Seconde guerre mondiale, un certain nombre d'antibiotiques importants ont été découverts et développés à des fins thérapeutiques. Ils sont devenus la base du traitement des maladies infectieuses. Combiné à l'introduction d'une meilleure hygiène, ceci a conduit à une réduction spectaculaire de la morbidité et de la mortalité dues aux infections bactériennes dans le monde.

Ainsi, la période de 1950 à 1960 est considérée comme l'âge d'or de la découverte d'antibiotiques, car la moitié des médicaments couramment utilisés aujourd'hui ont été découverts au cours de cette période. Malheureusement, l'utilisation croissante et excessive d'antibiotiques à des fins humaines et non thérapeutiques chez les animaux a conduit très tôt à l'émergence de souches bactériennes résistantes [37].

II.3. L'émergence des souches résistantes aux antibiotiques

Dès le début de l'utilisation clinique des antibiotiques, des souches bactériennes résistantes à ces substances sont apparues. En effet, Sir Fleming lançait déjà un avertissement face à une utilisation excessive de la pénicilline dès 1945 lors de son discours d'acceptation du prix Nobel. Pour chaque nouvelle classe d'antibiotiques développée et commercialisée, des souches bactériennes résistantes ont émergé. Ce phénomène a été amplifié par l'utilisation abusive des antibiotiques depuis plus d'un demi-siècle.

Paradoxalement, en concomitance avec l'émergence et de la diffusion de résistances aux antibiotiques, la découverte de nouveaux antibiotiques a considérablement ralenti (**Figure 10**). Presque toutes les grandes sociétés pharmaceutiques se sont retirées ou ont considérablement réduit leurs programmes de recherche et développement d'antibiotiques au cours des deux dernières décennies, et la sortie du marché se poursuit activement.

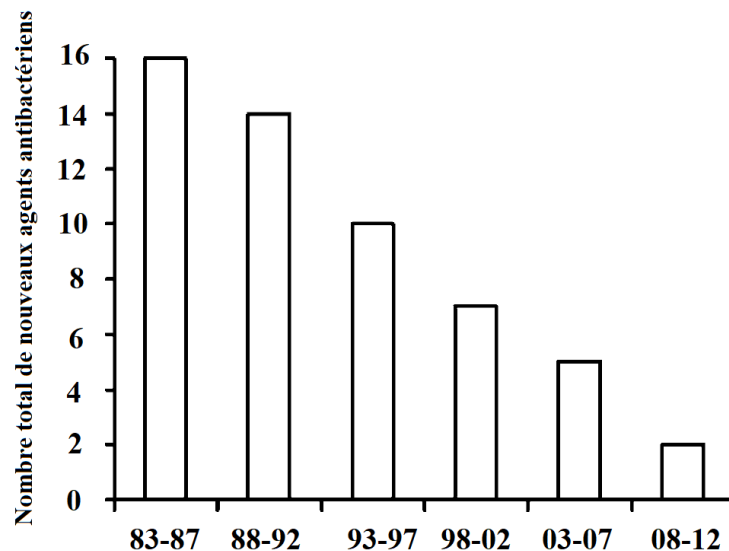


Figure 10 : Nombre d'agents antibactériens approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) par période de 5 ans [38].

Les bactéries peuvent ainsi être naturellement ou devenir résistantes à un ou à plusieurs antibiotiques. Si la bactérie devient résistante à au moins trois classes majeures d'antibiotiques, nous parlons donc de souche multi-résistante (MDR, *Multi Drug Resistant*) [39]. Ce problème de multi-résistance est particulièrement présent dans les hôpitaux. Découvertes en 1961, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM ou MRSA, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), sont responsables d'infections pulmonaires, osseuses et de septicémies [40]. La vancomycine a montré une efficacité contre les SARM, jusqu'à ce que, à son tour, des souches résistantes à la vancomycine furent identifiées à partir de 1997 [41]. En fait, la résistance à la vancomycine fut découverte pour la première fois en 1986 avec les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV ou VRE, *Vancomycin Resistant Enterococcus*) [42]. Les ERV sont une cause fréquente d'infections nosocomiales et sont également associés à des infections des voies urinaires, des infections de la circulation sanguine nosocomiales, à une endocardite, des abcès abdominaux et pelviens et une parodontite chronique [43]. En 2010, l'enzyme MBL (Metallo- β -lactamases) est découverte chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* qui la protège contre la plupart des antibiotiques connus [44].

On estime que d'ici 2050, il n'y aura plus d'antibiotique efficace disponible, si aucun nouveau médicament n'est développé ou découvert [45]. Il est donc nécessaire d'explorer de nouvelles stratégies antimicrobiennes alternatives efficaces contre les bactéries multi-résistantes qui si possible n'encourageront pas le développement de résistances.

II.4. Les nouveaux agents antibactériens

Plusieurs alternatives aux traitements antibiotiques ne sont pas nouvelles, mais leur utilisation a été éclipsée principalement pour deux raisons : une compréhension insuffisante des chercheurs de leur potentiel au moment de sa découverte et l'avènement des antibiotiques. Nous nous proposons de présenter brièvement quelques exemples des stratégies alternatives aux antibiotiques.

Les bactériophages : Les bactériophages ont été identifiés pour la première fois en 1915 et ont été utilisés comme agents antimicrobiens à partir de 1919 [46]. Malgré leurs succès initiaux et leur application généralisée, leur efficacité est restée controversée. Bien qu'ils aient été remplacés par des antibiotiques dans les pays occidentaux, les bactériophages sont restés une approche thérapeutique courante dans certaines parties de l'Europe de l'Est (notamment en Géorgie), où ils sont toujours utilisés [47]. Les bactériophages sont des virus qui infectent uniquement les bactéries et se multiplient en utilisant les métabolites bactériens. Une fois, l'hôte microbien infecté, les bactériophages entraînent la lyse de la bactérie ou un cycle lysogénique qui peut conduire aussi à la destruction de la bactérie en cas de stress ou de dommage cellulaire. Il a été bien établi que les phages peuvent tuer les bactéries qui sont résistantes à la plupart ou à tous les antibiotiques modernes à large spectre. Cet effet a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* et reflète le fait que les mécanismes de destruction des bactéries par les phages diffèrent radicalement de ceux des antibiotiques [48,49]. Ces virus sont très spécifiques à certaines bactéries ce qui en fait des armes très intéressantes dans le cas d'infections. Malheureusement, une de leurs limites est leur difficulté à cibler des souches spécifiques, car le spectre d'activité d'un bactériophage est très réduit et il est donc nécessaire d'identifier la souche infectieuse avant tout traitement.

Les peptides antimicrobiens (PAM) : Les PAM sont de petites molécules biologiques (<10 kDa) avec une activité antimicrobienne directe fournissant une défense microbienne efficace pour tous les organismes, des bactéries jusqu'aux mammifères [50]. Les bactériocines sont un sous-groupe spécifique de PAM qui sont produites par les bactéries elles-mêmes et qui sont actives contre d'autres bactéries [50]. En plus d'avoir des spectres d'activité intéressants, les PAM ont montré un effet synergique avec certains antibiotiques et une efficacité sur les biofilms. On peut citer le peptide LL-37 (ou CAP-18, *Cathelicidin Antimicrobial Peptide 18*), membre de la famille des cathélicidines retrouvées chez les vertébrés. Ce peptide produit par les macrophages, les cellules NK (*Natural Killer*), et les cellules épithéliales de la peau a montré la capacité d'inhiber la formation des biofilms de *Francisella novicida*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* et *Listeria monocytogenes* [51–54]. Ce PAM a également montré une activité contre les biofilms préformés de *P. aeruginosa*. Il a réduit

l'épaisseur du biofilm de 60% et a détruit les structures des microcolonies des biofilms traités [53]. Cependant la nature protéinique des PAM les rend vulnérables aux enzymes protéolytiques réduisant leur activité. Par exemple, *S. aureus* sécrète une métalloprotéase, l'auréolysine, qui inactive par clivage la cathélicidine humaine LL-37 [55]. De même, *Yersinia pestis* et *Streptococcus pneumoniae* libèrent des protéases pouvant participer à leur protection contre les PAM cationiques. De plus, l'existence d'une activité hémolytique pourrait être un frein majeur au développement de ces molécules [56,57]. Pour contourner ces problèmes, les chercheurs encapsulent ou modifient chimiquement les PAM afin d'éviter l'action des protéases [58].

Les nanoparticules (NP) métalliques et d'oxyde métallique : Différents types de NP à base de métal ont démontré une activité antimicrobienne au cours des dernières années. Nous pouvons citer les NP d'argent, considérées comme l'une des NP métalliques antimicrobiennes les plus intéressantes en raison de leur haute efficacité contre les bactéries, les champignons et les virus [59,60]. Leur activité antimicrobienne élevée permet une utilisation dans les industries pharmaceutique, alimentaire, textile et de l'emballage [61,62]. Bien que leur mécanisme d'action antimicrobien ne soit pas complètement compris, il semble impliquer la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS, *Reactive Oxygen Species*) et la liaison aux membranes des cellules bactériennes, entraînant des dommages membranaires. De plus, les ions d'argent relargués par les NP peuvent également exercer une action antimicrobienne de manière indépendante [63]. Les NP de cuivre également sont des nanomatériaux présentant une bonne stabilité chimique, une bonne résistance à la chaleur et d'excellentes propriétés antimicrobiennes en raison d'un rapport surface/volume élevé. Leurs excellentes propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires ont incité leur application dans de nombreux domaines, tels que l'emballage alimentaire et l'industrie pharmaceutique [62]. D'autre part, les nanoparticules d'oxyde métallique sont des nanomatériaux inorganiques qui ont également présenté des propriétés antimicrobiennes pertinentes contre plusieurs micro-organismes pathogènes. L'oxyde de zinc, le dioxyde de titane, l'oxyde de cuivre et l'oxyde de nickel sont les NP d'oxyde métallique les plus typiques avec des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales potentielles [64]. Ces oxydes ont été appliqués dans l'industrie de l'emballage alimentaire et également dans le domaine médical [65]. Le ZnO est un oxyde métallique semi-conducteur doté de propriétés antimicrobiennes importantes qui peuvent être encore améliorées lorsqu'il est appliqué en tant que nanomatériau. Les NP de ZnO ont une application potentielle dans la conservation des aliments ainsi que d'importantes propriétés antibactériennes contre les bactéries résistantes aux médicaments en raison de leur taille et leur forme. Le dioxyde de titane est également un matériau inorganique largement utilisé dans plusieurs produits, notamment les cosmétiques et

les composites orthodontiques, en raison de ses excellentes propriétés blanchissantes, photocatalytiques et antimicrobiennes [65]. Lorsque la taille du dioxyde de titane (TiO_2) est réduite à l'échelle nanométrique, sa propriété photocatalytique est grandement améliorée, générant plus d'ERO endommageant les cellules bactériennes, les chaînes d'ADN et d'autres structures cellulaires par le biais du stress oxydatif. Par conséquent, l'utilisation des NP de TiO_2 s'est orientée vers la désinfection de l'eau, les emballages alimentaires [66]. Une autre catégorie spéciale de NP métalliques est constituée des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques, par exemple, les NP de magnétite (Fe_3O_4) et de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dont l'activité antimicrobienne augmente lors de l'application d'un champ magnétique externe [67]. Bien que les NP présentent plusieurs avantages et avancées dans la lutte contre les bactéries pathogènes, il existe des défis probables dans l'utilisation de ces agents antimicrobiens, comme les effets inconnus sur la santé des NP libérées à la suite de leur utilisation et l'impact nocif des NP sur les cellules saines et l'agglomération des NP en raison de laquelle la taille pourrait être modifiée [68].

Nous aborderons dans ce manuscrit une autre alternative très importante qui consiste à appliquer la photothérapie dynamique (PDT) pour la lutte contre les micro-organismes pathogènes. Cette stratégie est appelée la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT).

B. La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) est une méthode de traitement médical non invasive, basée sur l'action simultanée d'une molécule photoactivable appelée le photosensibilisateur (PS), d'une lumière de longueur d'onde appropriée et de l'oxygène présent naturellement dans le milieu biologique. Sous l'effet d'une irradiation lumineuse du PS, un transfert d'énergie à l'oxygène entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS, *Reactive Oxygen Species*), conduisant à la destruction du tissu cible. Elle est à ne pas confondre de la photothérapie qui utilise uniquement les effets intrinsèques de la lumière de la photochimiothérapie qui n'implique pas l'oxygène [69]. Cette technique est déjà utilisée seule ou comme traitement complémentaire des traitements conventionnels notamment dans les domaines de la cancérologie, de la dermatologie, de l'ophtalmologie [70].

I. Bref historique

Les premières utilisations de la lumière comme agent thérapeutique remontent à l'Antiquité. Elle a été utilisée par les Égyptiens, les Chinois et les Indiens dans le traitement de nombreuses maladies, notamment les maladies de peau comme le vitiligo, le psoriasis et même le cancer de la peau [71]. Cependant, ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que la photothérapie est devenue une science et popularisée par le médecin danois Niels Finsen qui a initié l'utilisation d'une concentration de radiations lumineuses pour la traitement du lupus vulgaris [72].

Au cours de cette même période, l'utilisation de photosensibilisateurs à des fins thérapeutiques a également commencé à être étudiée. Le premier rapport a été fait en 1900 par Prime, un neurologue français qui a découvert que les patients épileptiques traités par l'éosine (**Figure 11-a**) par voie orale développaient une dermatite dans les zones exposées au soleil [73]. Le concept de photosensibilisation est apparu la même année, lorsqu'Oscar Raab a observé pour la première fois la toxicité de l'acridine (**Figure 11-b**), en présence de lumière sur des paramécies [74].

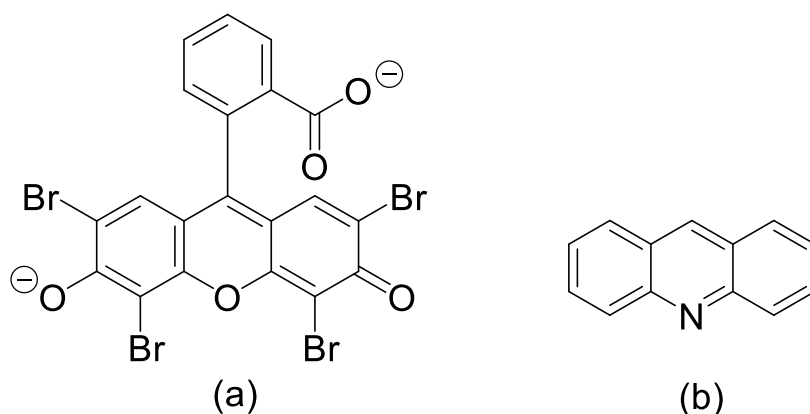


Figure 11 : Structure de l'éosine (a) et l'acridine (b).

En 1903, les médecins allemands Hermann von Tappeiner et Albert Jesionek traitent un cancer de la peau par l'action combinée de l'éosine et de la lumière solaire. Un an plus tard, en 1904, von Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique » [75]. Quatre ans plus tard, Haussmann a montré l'effet photosensible de l'hématoporphyrine Hp (un dérivé de l'hème) (**Figure 12**) après l'avoir injectée à des souris, suivi d'une exposition à la lumière [76].

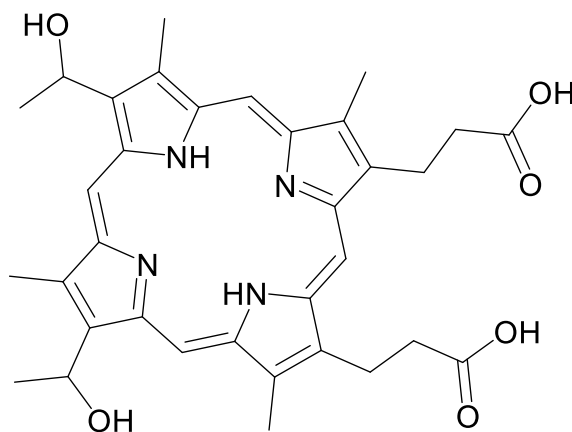


Figure 12 : Structure de l'hématoporphyrine (Hp)

En 1913, Friedrich Meyer-Betz a réalisé le premier essai de ce produit sur l'Homme, en s'injectant lui-même 200 mg d'hématoporphyrine. Tant qu'il est resté non exposé au soleil, rien de spectaculaire ne se produisit, mais lors de l'exposition à la lumière solaire, il a observé une photosensibilisation qui s'est traduite par une hyperpigmentation de la peau et un œdème généralisé, dont il souffrira pendant deux mois (**Figure 13**) [77].

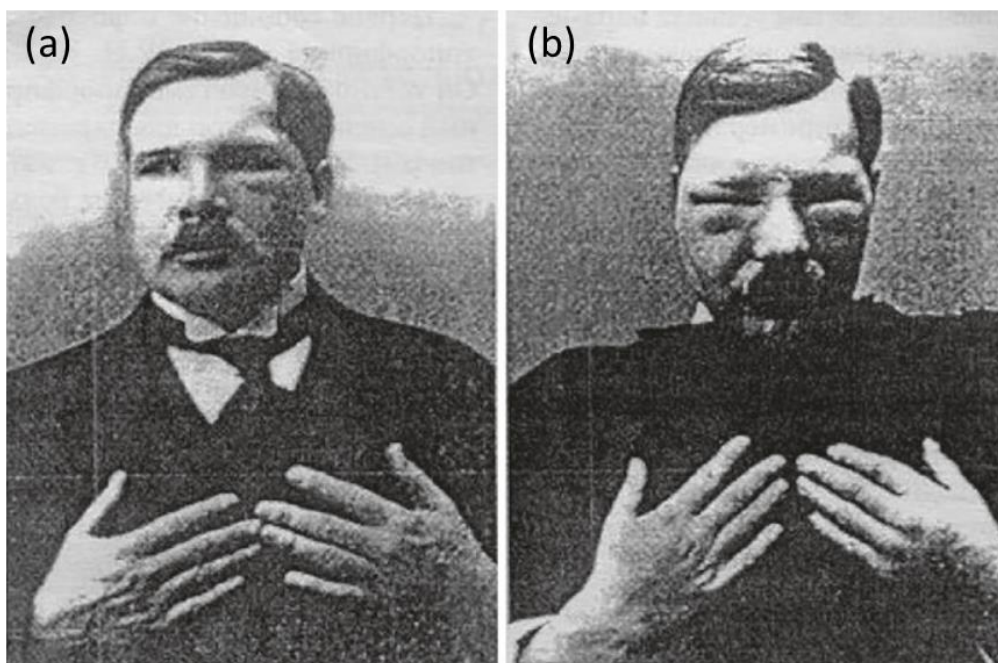


Figure 13 : Friedrich Meyer-Betz après une auto-injection d'hématoporphyrine a) avant exposition à la lumière du soleil et b) après exposition à la lumière du soleil [77].

En 1924, Albert Policard a attribué la fluorescence rouge des tumeurs observée sous lumière ultraviolette à l'accumulation de porphyrines endogènes (Hp) dans les cellules cancéreuses [78]. En 1942, Auler et Banzer ont décrit pour la première fois l'accumulation préférentielle de l'Hp dans les tissus tumoraux sur un modèle tumoral de rat [79]. Six ans plus tard, Figge *et coll.* ont confirmé cette affinité en utilisant la fluorescence intrinsèque de l'Hp, et ont suggéré la possibilité de l'utiliser pour localiser les zones tumorales chez l'homme [80].

En 1955, Schwartz *et coll.* ont mené une étude sur la nature de l'hématoporphyrine commerciale qui a montré qu'il s'agissait d'un mélange variable et brut de nombreuses porphyrines, dont beaucoup avaient des propriétés différentes. Avec une purification partielle, l'Hp isolé était le moins sélectif par rapport au résidu habituellement rejeté [81]. En 1961, Lipson a développé un dérivé de l'hématoporphyrine appelé Hematoporphyrin Derivative (HpD) par action d'un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique suivi d'une hydrolyse alcaline. Ce produit sera utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs cancéreuses du poumon [82].

Dix ans après sa mise au point, l'HpD a contribué au véritable essor de la PDT, grâce aux travaux de Dougherty. En effet, en 1975, il démontre l'éradication totale de tumeurs mammaires implantées chez la souris par l'action de l'HpD et de la lumière rouge d'une lampe à Xénon [83]. Puis, trois ans plus tard, il publie les résultats des premiers essais cliniques [84]. A la même période, Weishaupt montre que la photocytotoxicité de l'HpD est due à la production intracellulaire d'oxygène singulet après absorption de l'énergie lumineuse [85].

Entre 1983 et 1985, pour avoir une plus grande pénétration de la lumière dans les tissus, Dougherty remplace la lampe à arc par un laser. Il identifie également la fraction active de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisantes de ce mélange complexe. Il s'agit de l'éther ou l'ester de dihématoporphyrine (DHE) (**Figure 14**) [86].

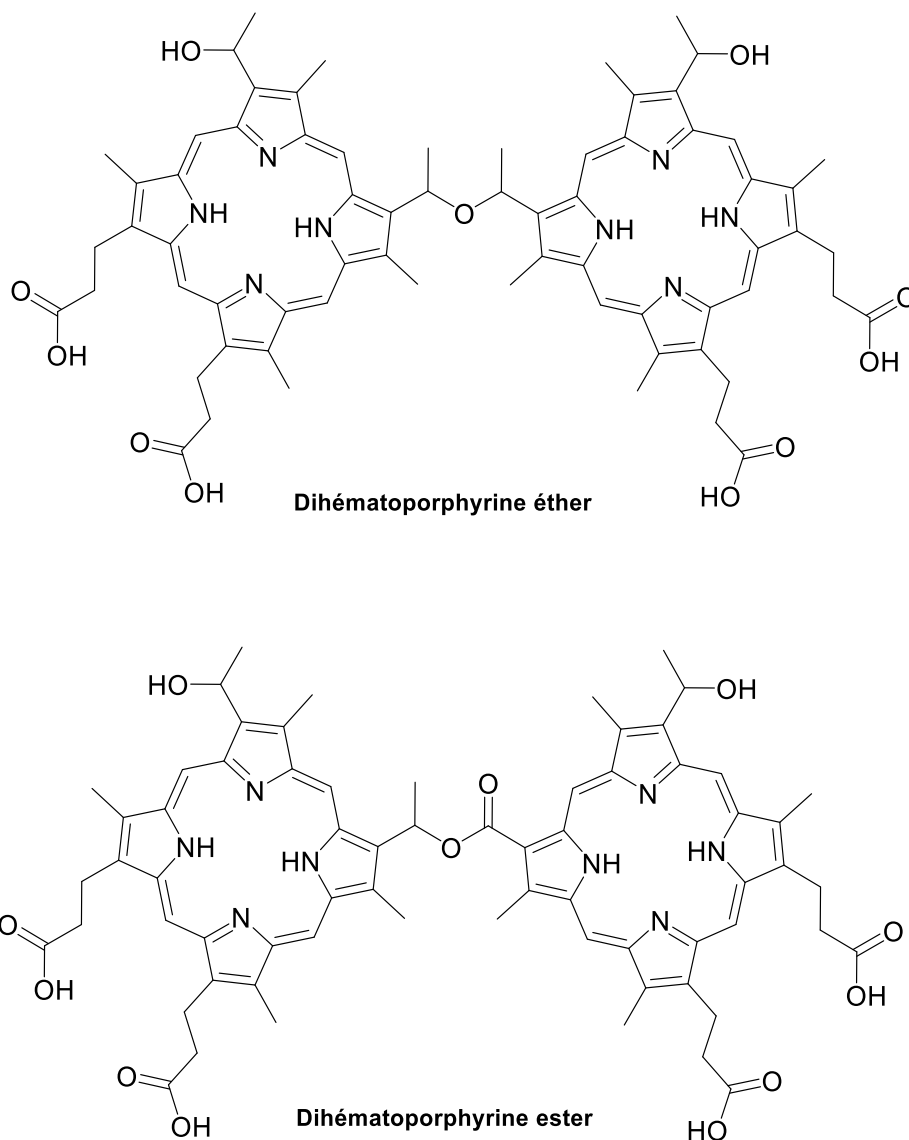


Figure 14 : Dihématoporphyrine éther et ester.

Actuellement, cette fraction active est commercialisée sous le nom de Photofrin II® est utilisée cliniquement pour soigner différents types de cancers tel que le cancer de la peau, du poumon, de l'œsophage, de la vessie, de l'estomac, ou encore du col de l'utérus.

II. Chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT)

Comme la PDT, la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT) utilise des photosensibilisateurs et de la lumière visible ou ultraviolette afin d'induire une réponse

phototoxique pour les bactéries, les virus, les parasites, etc. Les premiers résultats ont été obtenus au début du XX^{ème} siècle par Raab et von Tappeiner qui ont utilisé l'acridine comme premier PS vis-à-vis d'un microorganisme : *Paramecium caudatum* [74]. Vers la fin des années 80, les effets antimicrobiens de la PDT suscite un intérêt croissant avec l'apparition des souches multi-résistantes aux antibiotiques. En effet, certains photosensibilisateurs possèdent un spectre d'action relativement large, une inactivation photodynamique efficace de souches multi-résistantes, un potentiel mutagène très faible et à ce jour aucune forme de résistance n'a été constatée de la part des bactéries contre l'action de ces PS [8]. Depuis 1992, La Croix-Rouge suisse et allemande utilise le bleu de méthylène comme photosensibilisateur pour la décontamination des unités de plasma fraîchement congelées. Connu pour son absence de toxicité pour l'homme, le colorant est efficace pour détruire les virus à enveloppe extracellulaire. Malheureusement, les enzymes cellulaires réduisent son activité photodynamique, limitant ainsi son utilisation comme photosensibilisateur *in vivo* [87].

Actuellement, de nombreuses recherches basées sur cette technique sont menées afin de résoudre les problèmes causés par les bactéries infectieuses et plus particulièrement les infections localisées [8,88]. Cette technique pourrait permettre de lutter contre de nombreuses infections telles que les infections nosocomiales, les infections buccales et dentaires ainsi que les ulcères de la peau et gastriques. L'une des applications cliniques les plus appropriées de la PACT est la possibilité de traiter des infections cutanées et/ou des plaies superficielles localisées et la possibilité de réduire la colonisation de bactéries multi-résistantes sur la peau. Hamblin *et coll.* ont rapporté pour la première fois que l'application topique de chlorure-e6 conjugué à la poly-L-lysine sur un modèle animal pouvait rapidement détruire les bactéries *E. coli* qui infectent les plaies, sans détruire le tissu hôte environnant [89]. En 2012, des essais cliniques de phase II d'un dérivé de bleu de tétra-butyl méthylène utilisé en PACT pour traiter des ulcères chroniques ont montré une réduction considérable de la charge bactérienne (*S. aureus* résistant à la méticilline SARM, *S. aureus* sensible à la méticilline SASM, *P. aeruginosa*...) de l'ulcère [90].

Les traitements thérapeutiques photodynamiques les plus développés sont les traitements contre les infections responsables de l'acné et en odontologie. L'acné est une maladie cutanée du follicule pilo-sébacé partiellement causée par la présence de *Cutibacterium acnes*. Cette bactérie accumule naturellement des PS de type porphyrine et peut être tuée par la lumière sans photosensibilisateur exogène [91]. Donc, la photothérapie sans PS ajouté (en utilisant des lasers ou de la lumière bleue seule) a commencé à être utilisée dans les années 1990 pour éliminer les lésions et améliorer les cicatrices récentes et anciennes [8]. Afin d'augmenter la quantité de PS au sein des bactéries, un traitement basé sur l'acide 5-aminolévulinique

(ALA) (ou sa forme estérifiée le méthyl aminolévulinate « MAL ») a été utilisé et depuis l'année 2000, l'ALA-PDT est reconnu comme un traitement spécifique et efficace de l'acné [92].

Des traitements par PDT ont aussi été développés contre la parodontite chronique. Cette infection responsable de la perte de dents causée par un biofilm bactérien (plaque dentaire). Ce biofilm complexe constitué d'une centaine de souches bactériennes différentes est généralement retiré de façon mécanique. L'utilisation du bleu de méthylène comme photosensibilisateur, accompagné d'une lumière rouge (~670 nm), a permis d'améliorer le traitement de ces infections dont le nettoyage mécanique était insuffisant. La combinaison du bleu de Toluidine (dérivé du bleu de méthylène) et d'une lumière rouge est autorisée pour le traitement des parodontites et le traitement des plaies dentaires en Europe sous le nom d'HELBO® [88,93].

III. Mécanisme photochimique

La thérapie photodynamique est basée sur l'interaction entre la lumière et le photosensibilisateur conduisant à différents processus photophysiques et photochimiques. Ces processus peuvent être décrit par le diagramme de Perrin-Jablonski (**Figure 15**). Ainsi le photosensibilisateur à son état normal est caractérisé par une paire d'électrons dont la somme des spins correspond à un état singulet (S_0). Lorsque le photosensibilisateur absorbe un photon provenant d'une source de lumière de longueur d'onde appropriée il passe à un état électronique excité ($S_1, S_2, \dots, S_n$). Par des conversions internes (CI), comme des relaxations vibrationnelles, le PS descend à son niveau d'excitation le plus bas (S_1). Afin de se débarrasser de ce surplus d'énergie le PS peut retrouver son état fondamental (S_0), soit par une désactivation non radiative ou soit par émission d'un photon (fluorescence). Cependant, à partir de son état excité (S_1), une conversion intersystème (CIS) peut entraîner une inversion de spin ce qui donne l'état triplet du PS (T_1). À ce stade, le retour à l'état fondamental s'effectue par une désactivation non radiative ou par la phosphorescence. La durée de vie à l'état triplet est plus longue (de l'ordre de la microseconde) que l'état singulet (quelque nanosecondes) ce qui permet les interactions avec d'autres molécules environnantes, selon deux types de réactions (I et II).

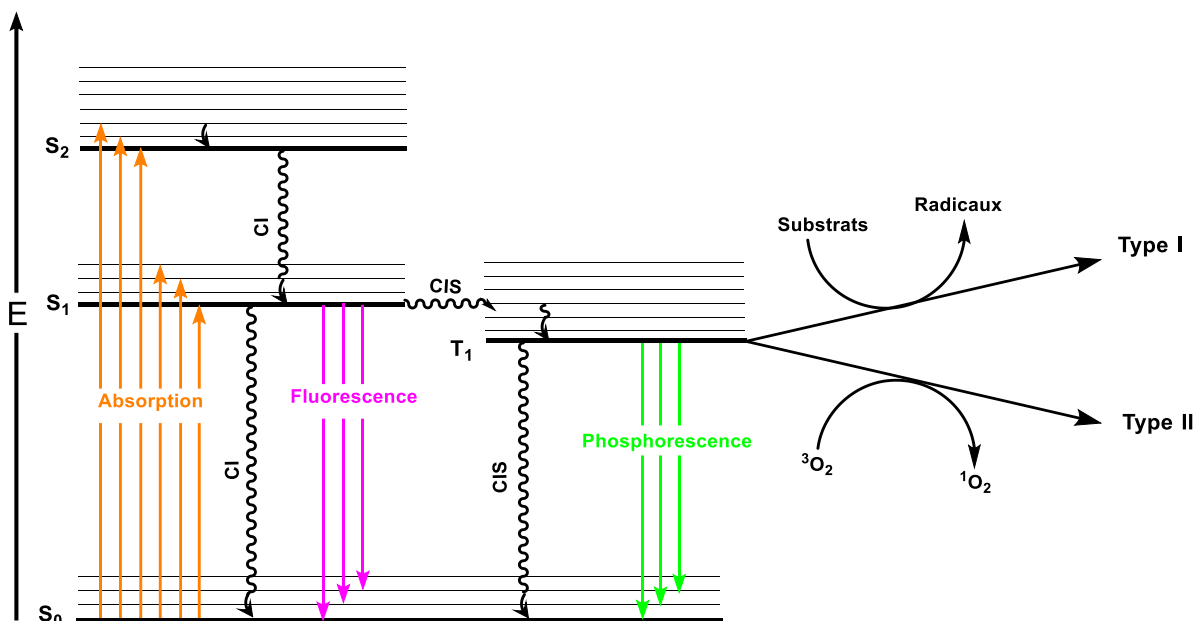


Figure 15: Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski du processus photophysique.

III.1. Les réactions de type I

Selon Foote [94], les réactions de type I sont les réactions photochimiques impliquant un transfert d'électrons ou d'hydrogène entre le PS à l'état excité triplet ($^3\text{PS}^*$) et des substrats biologiques (SH), produisant des radicaux ou des ions radicaux selon les équations suivantes (**Figure 16**) :

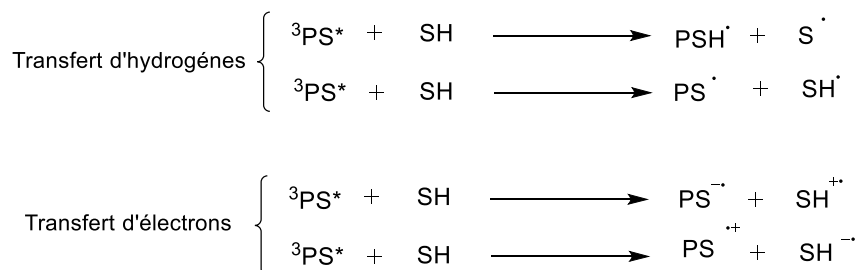


Figure 16 : Réactions primaires de composés photosensibles.

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

Les radicaux libres formés peuvent ensuite réagir avec l'oxygène moléculaire présent et former respectivement des radicaux peroxydes à l'origine d'une chaîne d'auto-oxydation (**Equation 1 à 4, Figure 17**) et de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (**équations 5 et 6, Figure 17**).

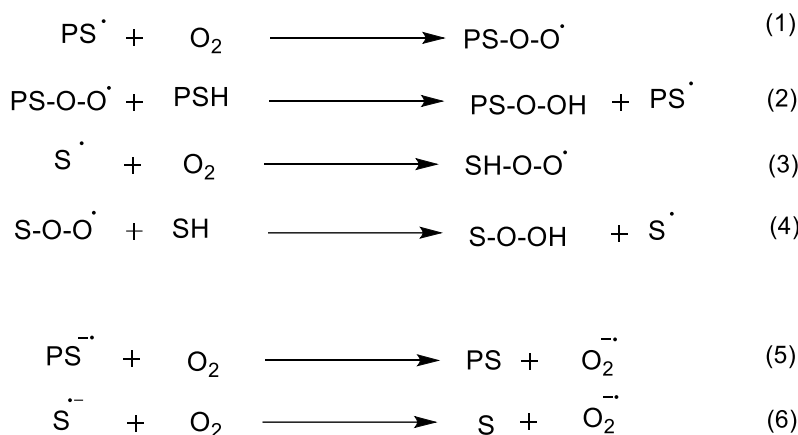


Figure 17 : Réactions photochimiques de l'oxygène (équations 1 et 6).

Une fois formé, l'anion superoxyde peut réagir avec d'autres substrats pour former d'autres espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle $\text{OH}^\cdot$ (Equation 7 à 9, Figure 18).

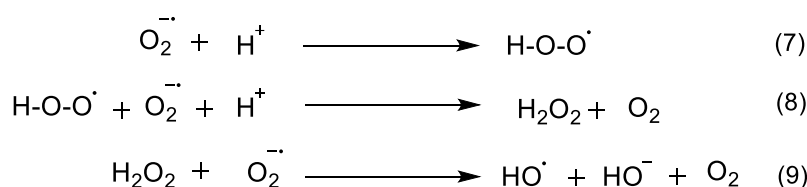


Figure 18 : Réactions photochimiques de l'oxygène (équations 7 et 9).

Malgré le fait que l'oxygène ne soit pas impliqué dans la première étape du mécanisme, sa présence influence fortement les réactions chimiques qui induisent la formation de ces ERO qui sont de puissants oxydants pour de nombreuses biomolécules.

III.2. Les réactions de type II

Les réactions de type II, quant à elles, nécessitent la présence de l'oxygène moléculaire à proximité du photosensibilisateur. Elles impliquent un transfert de l'énergie d'excitation depuis le PS à l'état triplet ($^3\text{PS}^*$) vers le dioxygène à l'état fondamental ($^3\text{O}_2$) induisant le retour du PS à son état fondamental et la formation d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) selon l'équation suivante (Figure 19) :

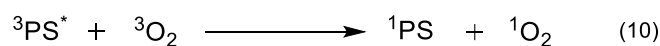


Figure 19 : Réaction du transfert énergétique entre le PS et O_2 .

Le transfert d'énergie entre le $^3\text{PS}^*$ et $^3\text{O}_2$ est possible, car ils ont tous les deux des états de même multiplicité. Cependant, la réaction présentée dans l'équation (10) n'est possible que si la différence d'énergie entre l'état triplet et l'état singulet du PS est supérieure à l'énergie

nécessaire à l'oxygène pour passer à l'état singulet, soit 94,5 kJ/mol [95]. La durée de vie de l'oxygène singulet est très variable, d'environ 4 μ s dans l'eau et 25 à 100 μ s dans des milieux organiques apolaires, qui sont des modèles pour les régions lipidiques de la cellule [96]. Il a également une faible constante de diffusion dans les cellules ($1,4 \times 10^{-5}$ cm²/s), sa réactivité est délimitée par une sphère de 30 nm autour de son point de production [97,98]. Cependant, l'oxygène singulet est très réactif, il peut réagir avec un grand nombre de substrat cellulaire, tels que les protéines, les acides gras membranaires, et les acides nucléiques [99].

La compétition entre les deux types de réactions photochimiques (I et II) dépend de plusieurs paramètres, les plus influents étant la nature du PS utilisé et la concentration en dioxygène. Pour la majorité des PS utilisés dans la PDT, les réactions de type II sont prédominantes. Les ERO (oxygène singulet et espèces radicalaires) formées peuvent interagir avec les cellules à proximité et induisent l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, ce qui va entraîner leur mort cellulaire.

III.3. Les ERO au contact des organismes vivants

Une fois générées, les ERO peuvent attaquer une gamme variée de cibles cellulaires, ce qui explique leur polyvalence et leur efficacité contre une large gamme d'agents pathogènes. La plupart des ERO sont formées par la réduction partielle de l'oxygène moléculaire. On peut distinguer quatre ERO majeures ayant des cinétiques et des niveaux d'activité différents : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) et l'oxygène singulet (1O_2). Les deux premiers sont beaucoup moins réactifs et peuvent être éliminés par des antioxydants endogènes (à la fois enzymatiques et non enzymatiques) induits par le stress oxydatif. En effet, ces entités sont déjà naturellement présentes dans les organismes, et sont des produits secondaires issus de l'oxygénation des cellules. En revanche, aucune enzyme ne peut neutraliser le radical hydroxyle et l'oxygène singulet ce qui les rend extrêmement cytotoxiques et létaux [7]. Bien que certains microorganismes comme les bactéries soient particulièrement préparés aux différents stress oxydatifs, l'oxygène singulet a montré une grande efficacité, car son état dû à un transfert d'énergie est considéré comme un élément « non naturel » par les cellules. La production d'oxygène singulet est donc un facteur déterminant pour le choix du PS car cette ERO est l'agent cytotoxique principal en PDT bien que sa production soit extrêmement difficile à quantifier dans les milieux biologiques.

Les ERO peuvent intervenir à différents niveaux de la cellule par l'oxydation de nombreuses biomolécules, dont :

- L'oxydation des triglycérides [100], les phospholipides ou le cholestérol des membranes constituent une grande partie des substrats de l'oxygène singulet (**Figure 20**) [101,102].

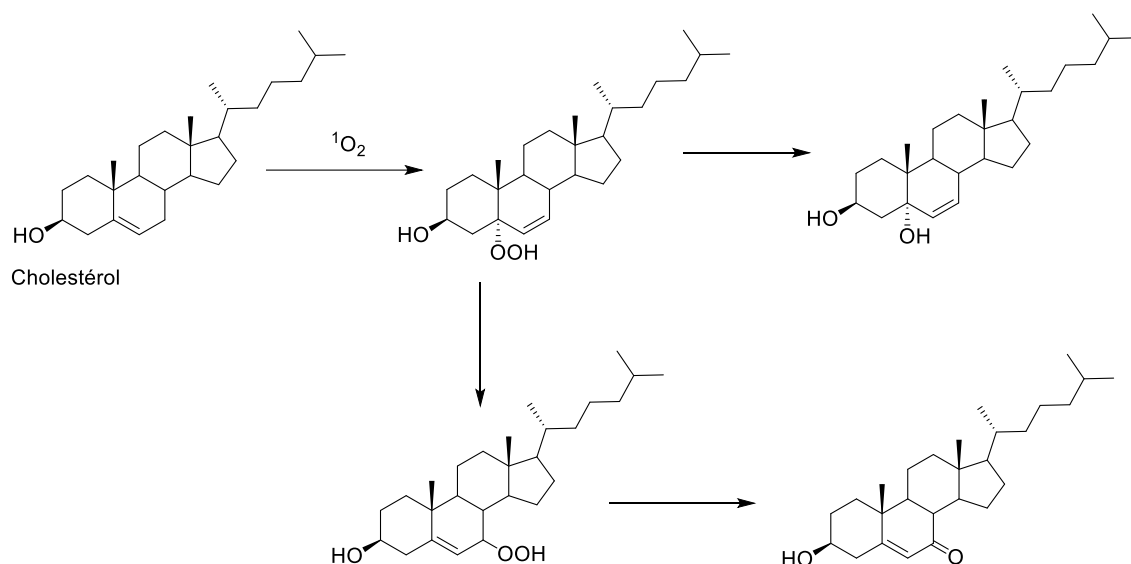


Figure 20 : Principales voies d'oxydation du cholestérol par l'oxygène singulet [102].

- L'oxydation de différents acides aminés modifie la structure des protéines induisant leur perte d'activité. Les principaux acides aminés sont le tryptophane (**Figure 21**), l'histidine mais également la cystéine et la méthionine permettant la formation de ponts disulfures. L'activité oxydante des ERO sur les protéines est considérée comme la cause majeure de la mort cellulaire pour la PDT [103,104].

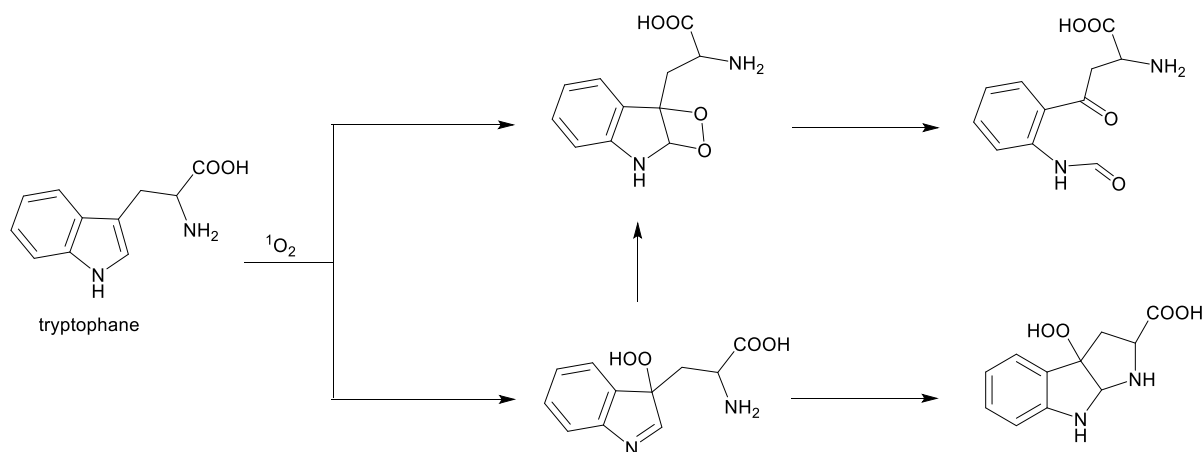


Figure 21 : Oxydation du tryptophane par l'oxygène singulet [104].

- L'oxydation des acides nucléiques conduisant à la modification du matériel génétique est aussi une source importante de la mort cellulaire (**Figure 22**) [104].

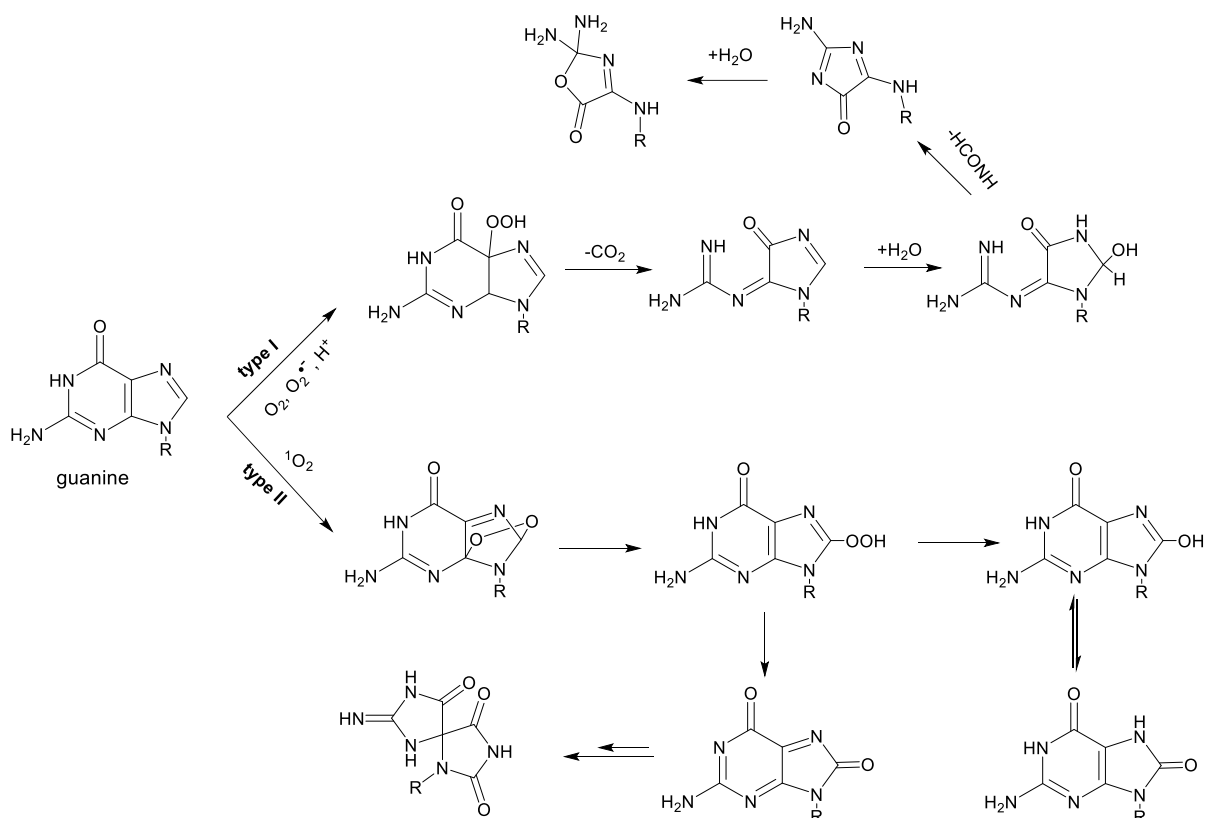


Figure 22 : Exemples d'oxydation de la guanine par les deux catégories d'ERO [105].

IV. Les photosensibilisateurs

Les photosensibilisateurs sont des molécules capables d'être excitées par irradiation lumineuse et de transférer leur énergie à un composé accepteur. Les PS généralement utilisés en PDT peuvent être classés en deux grandes catégories : les PS tétrapyrroliques et les PS non-tétrapyrroliques.

IV.1. Les photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques

Bien qu'ils soient beaucoup moins étudiés que les PS tétrapyrroliques, il existe un nombre important de PS non-tétrapyrroliques d'origine naturelle ou synthétique. Une brève description de certains d'entre eux sera proposée dans le manuscrit.

IV.1.1. Les PS d'origine naturelle

- **La curcumine**

La curcumine (**Figure 23**) est un composé d'origine végétale, extraite à partir du rhizome de la plante *Curcuma longa*, une plante appartenant à la famille des Zingibéracées. Ce pigment naturel est très utilisé comme aliment, conservateur de nourriture, agent colorant, cosmétique et médicinal dans certaines cultures [106]. S'inspirant de son

utilisation dans divers remèdes de médecine traditionnelle, les chercheurs ont démontré un large éventail d'effets pharmacologiques, y compris des activités antitumorales, anti-inflammatoires et anti-infectieuses [107,108]. Comme il s'agit d'un produit alimentaire, il a attiré l'attention en tant que PS antimicrobien naturel et non toxique possible. Paschoal *et coll.* ont démontré que la curcumine pouvait photoinactiver *Streptococcus mutans* après irradiation par une lumière bleue ($\lambda = 420 \pm 20$ nm) [109]. Tovsen *et coll.* ont travaillé sur un dérivé glycosylé de la curcumine qui a permis d'inactiver des souches Gram positif et Gram négatif [110]. Araújo et son équipe ont montré que la curcumine a un effet photobactéricide sur les bactéries cariogènes *in vitro* [111]. Ce groupe a ensuite procédé à un essai clinique chez des volontaires adultes. Malgré les difficultés d'utilisation dues à son caractère hydrophobe, l'utilisation de la curcumine en PDT n'a montré aucun effet secondaire grave dans les études *in vivo*. Elle présente les avantages d'une manipulation facile, d'un coût abordable et d'une bonne efficacité [88]. Les nombreux résultats prometteurs de ce PS ont démontré son potentiel d'utilisation lors d'essais cliniques.

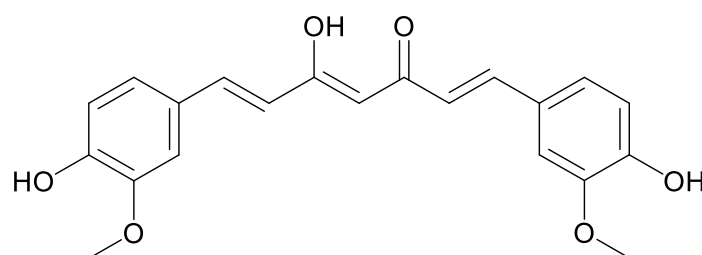


Figure 23 : Structure de la curcumine

- **L'hypéricine**

L'hypéricine (**Figure 24**) est un photosensibilisateur appartenant à la famille des pérylènequinones. Ces quinones sont une famille de chromophores d'origine naturelle présents chez la majorité des *Hypericum*, une famille de plantes herbacées. Sa découverte et caractérisation a été réalisée lors des recherches menées pour comprendre les causes de l'hypéricisme. Il s'agit d'une photosensibilité cutanée des bovins après l'ingestion de grandes quantités de plantes *Hypericum perforatum* [112]. Elle fut extraite pour la première fois en 1942 [113], mais c'est en 1992 que son intérêt pour la PDT a été découvert [114]. Depuis, elle a été largement étudiée en tant que PS à visée anticancéreuse [115]. En 2004, l'activité antimicrobienne d'extraits d'*Hypericum* a été attribuée à la présence de l'hypéricine [116], puis Engelhardt *et coll.* ont montré que ce PS pouvait photoinactiver les bactéries Gram positif. Cependant, son caractère hydrophobe réduit fortement leur activité sur les souches Gram négatif [117].

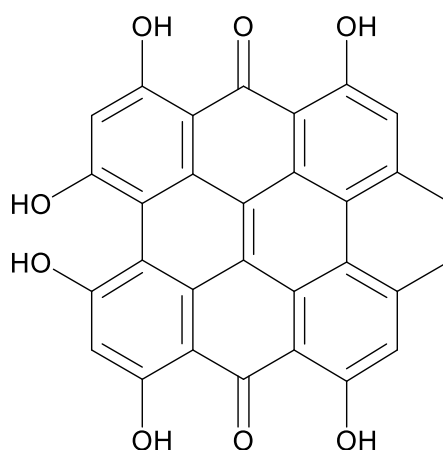


Figure 24 : Structure de l'hypericine

- **La riboflavine**

La riboflavine (**Figure 25**), plus connue sous le nom « vitamine B2 », elle est une vitamine hydrosoluble indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, car elle est nécessaire à la synthèse des flavoprotéines. C'est un PS de couleur jaune vif, ayant deux pics d'absorption en UV (~360 nm) et dans le bleu (~440 nm). Des travaux préliminaires ont montré que l'utilisation de la riboflavine en PACT permet d'inactiver *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *Bacillus subtilis* [118,119].

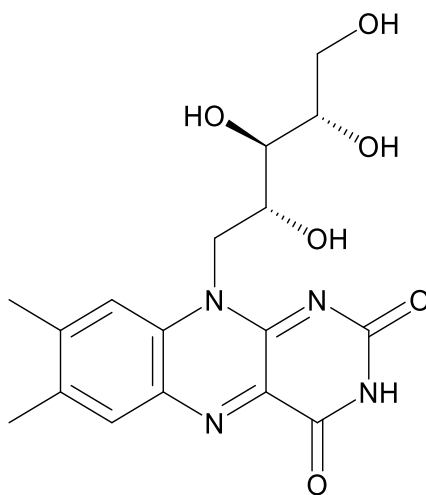


Figure 25 : Structure de la riboflavine

- **Les psoralènes**

Les psoralènes sont des composés chimiques naturels de la famille des furocoumarines. Ces derniers sont présents dans quatre grandes familles taxonomiques : les légumineuses, les moracées, les apiacées et les rutacées [120]. Ce sont des phytoalexines qui vont protéger la plante vis-à-vis des microorganismes phytopathogènes (bactéries, champignons). Ils sont également des molécules allélopathiques qui sont des inhibiteurs de germination et de croissance des plantes concurrentes [121]. Cette capacité de protection est due aux propriétés phototoxiques de ces molécules [122]. La combinaison de 8-méthoxypsoralène (**Figure 26**) et de la lumière ultraviolette (connue sous le nom de PUVA) est utilisée comme un traitement des maladies de la peau tel que le psoriasis [123]. La PUVAthérapie a été utilisée pour l'inactivation des bactéries, virus, protozoaires dans les composants sanguins plaquettaires et plasmatiques. En effet, la molécule de psoralène a la structure et la forme appropriées pour pouvoir intercaler entre les deux brins d'ADN dans la double hélice, et après irradiation, induire la formation de réticulation covalent inter-brins entre acides nucléiques, ce qui provoque la mort des microorganismes [124].

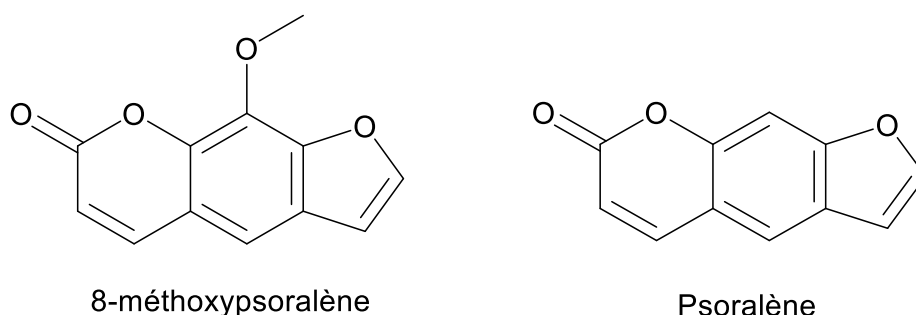


Figure 26 : Structure du psoralène et du 8-méthoxypsoralène

- **La phénalénone**

La 1*H*-phénalén-1-one ou phénalénone (PN) est une molécule aromatique polycyclique possédant un noyau naphthalène à 10 électrons π , un alcène et une cétone, tous conjugués (**Figure 27a**). L'intérêt principal de la phénalénone vient de son rendement en oxygène singulet très élevé, proche de 1 dans la plupart des solvants testés. Les métabolites secondaires contenant le noyau phénalénone, ou ayant des structures dont on peut raisonnablement supposer qu'elles sont dérivées d'une phénalénone, sont rarement trouvés dans la nature. Les premiers composés ont été isolés en 1955 d'une plante du genre *Haemodorum* appartenant à la famille des Hémodoracées [125,126]. Une année après, des phénalénones naturelles ont été découvertes dans des champignons du genre *Penicillium* par Derek H. R. Barton telles que l'atrovénétine (**Figure 27b**) qui a montré une activité antibiotique

[127,128]. Cependant, l'effet photosensibilisateur d'un dérivé de phénalénone a été mis en évidence pour la première fois sur *S. epidermidis* avec une autre phénalénone naturelle appelée lachnanthocarpone (**Figure 27c**) [129]. Récemment, une série de phénalénones portant des groupements cationiques ont été développés, comme le SAPYR (**Figure 27d**), une phénalénone portant un groupement pyridinium qui a donné d'excellents résultats contre de nombreuses souches et biofilms bactériens [130]. Au sein du laboratoire PEIRENE, Godard *et coll.* ont synthétisé 14 nouveaux dérivés de phénalénone portant le groupe triazolium (**Figure 27e**) qui ont montré une solubilité dans l'eau moyenne à bonne. Ces nouveaux sels de triazolium ont été évalués sur six souches bactériennes différentes : trois Gram négatif avec deux souches d'*E. coli* (l'une formant des biofilms, l'autre non) et une souche de *P. aeruginosa*, et trois Gram positif avec deux souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*) et une souche de *Bacillus cereus*. Comparés au SAPYR, les dérivés hydrophobes du sel de triazolium testés semblent présenter une meilleure activité inhibitrice contre toutes les souches bactériennes testées, sauf pour *P. aeruginosa* [131].

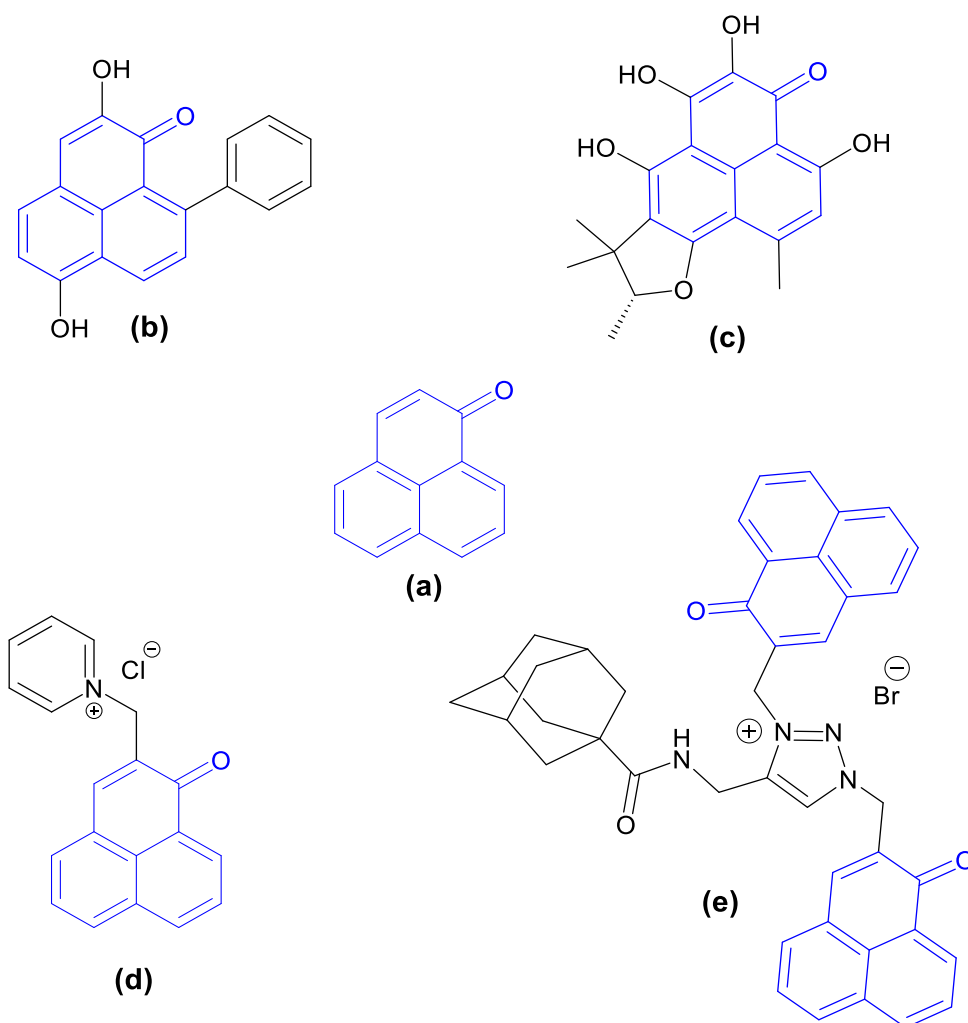


Figure 27 : (a) Phénalénone, (b) Atrovénétine, (c) Lachnanthocarpone, (d) SAPYR, (e) Exemple d'un dérivé de phénalénone portant le groupe triazolium synthétisé par Godard *et coll.*[131].

IV.1.2. Les PS synthétiques

- **Le bleu de méthylène**

Le bleu de méthylène (BM, **Figure 28**) est un colorant dérivé de la phénothiazine découvert à la fin du XIX^{ème} siècle. C'est un PS cationique facile à synthétiser, avec une bonne solubilité en milieu aqueux. Ce PS absorbe dans le rouge (autour de 660 nm) et offre un rendement quantique d'oxygène singulet intéressant, de l'ordre de 0,52 dans l'éthanol [132]. Le BM présente des propriétés intéressantes pour la PDT. De nombreuses études *in vitro*, *in vivo* et même cliniques ont montré l'efficacité du bleu de méthylène en PDT [133]. Cependant, dans l'environnement biologique, le bleu de méthylène est très rapidement converti en bleu de leucométhylène (LMB) en acceptant des électrons du NADH/NADPH. Le LMB ainsi formé est incolore et a une activité photodynamique négligeable, ce qui limite fortement l'utilisation clinique de ce PS [134]. Plusieurs études mettent en avant l'efficacité du bleu de méthylène et

ses dérivés vis-à-vis un grand nombre des souches bactériennes, les biofilms et même les bactéries multi-résistantes. De plus, le bleu de méthylène est actuellement utilisé en Allemagne pour la décontamination de plasma fraîchement congelé [88].

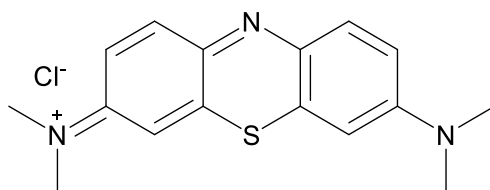


Figure 28 : Structure du bleu de méthylène

- **L'érythrosine**

L'érythrosine (**Figure 29**) est un colorant alimentaire (E127) et appartient à la famille des xanthènes. Il est également largement utilisé comme révélateur de biofilms dentaires grâce à sa capacité à s'accrocher aux biofilms bactériens [135]. Plusieurs études ont montré que l'érythrosine est également un agent antimicrobien relativement efficace, en particulier contre les bactéries dentaires. En 2006, Wood et son équipe ont montré que l'érythrosine permet une meilleure photoinactivation des biofilms de *S. mutans* comparée à l'utilisation à la fois de Photofrin et du bleu de méthylène [136,137].

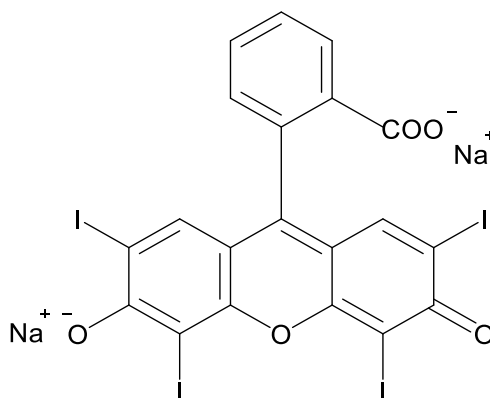


Figure 29 : Structure de l'érythrosine

- **Le Rose de Bengale**

Le Rose du Bengale (**Figure 30**) est un autre colorant de la famille des xanthènes. Utilisé en collyre, il permet de visualiser les lésions éventuelles de la cornée. Il fût l'un des premiers PS utilisé en PACT pour inactiver *E. coli* en 1969 [138]. Des études ont montré l'efficacité du Rose de Bengale en PACT pour inactiver le pathogène parodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* à la fois dans des cultures planctoniques et de biofilm [139]. Il est

également étudié pour l'élaboration de surfaces photobactéricides par fixation sur des polymères naturels et synthétiques [140,141].

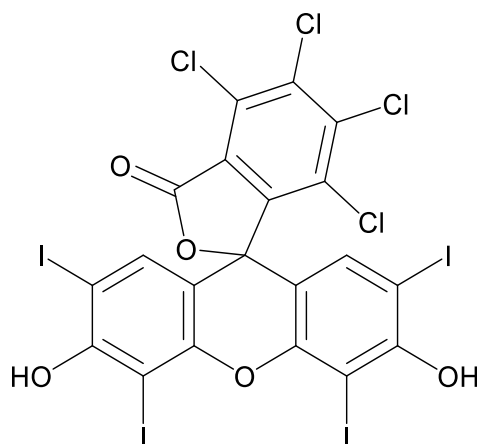


Figure 30 : Structure du Rose de Bengale

- **Les dérivés des bore-dipyrrrométhènes (BODIPY)**

Les bore-dipyrrrométhène sont une nouvelle famille de PS dérivés du BODIPY pour « **BoronDiPyr**romethen » ou encore 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène. Les BODIPY sont des molécules composées de deux unités pyrroliques reliées par un pont méthine et complexées par les atomes d'azote à un groupe difluoroborane (**Figure 31**). Depuis leur apparition en 1968 [142], ces molécules semblaient prometteuses pour l'utilisation en PDT grâce à la possibilité de synthétiser de nombreux analogues ayant différents groupes fonctionnels, des rendements quantiques de production d'oxygène singulet élevés ($\Phi_{\Delta} > 0,9$, méso-alkyl-BODIPY), une bonne stabilité physico-chimique. Cependant, ils ont montré un manque de sélectivité et une toxicité plus élevée à l'obscurité que les autres PS [143]. Cauruso *et coll.* ont publié en 2012, les premiers travaux sur l'effet photobactéricide des BODIPY. Ils ont montré une inactivation de *Staphylococcus xylosus* et *E. coli* par un BODIPY cationique [144].

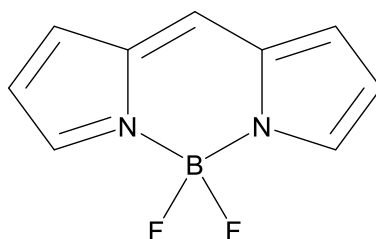


Figure 31 : Structure d'un noyau BODIPY

- **Les fullerènes**

Les fullerènes sont une famille de nanomatériaux constitués exclusivement d'atomes de carbone dont la forme peut être proche d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube (appelé nanotube) ou d'un anneau. Le premier fullerène découvert en 1985 était le C₆₀ (**Figure 32A**), appelé « buckminsterfullerène » [145]. Dès lors, Une grande attention a été portée au développement des utilisations médicales de ces molécules uniques, en particulier lorsqu'elles sont dérivées avec des groupes fonctionnels pour les rendre solubles et donc capables d'interagir avec les systèmes biologiques. Les fullerènes sont relativement photostables, subissent moins de photoblanchiment et effectuent à la fois les réactions photochimiques de type I et de type II, ce qui suggère une utilisation possible des fullerènes dans la PDT [146]. En fonction des groupes fonctionnels introduits dans la molécule, les fullerènes peuvent efficacement photo-activer les cellules microbiennes et les cellules cancéreuses. Cependant, une préoccupation était leur tendance à former des agrégats et leur extrême hydrophobicité, qui les rend moins prometteurs pour une application clinique.

Afin de surmonter ces inconvénients, de nombreuses stratégies ont été appliquées pour rendre ces PS solubles dans les milieux physiologiques, comme l'association à des dendrimères ou des micelles, la PEGylation, ou l'encapsulation dans des cyclodextrines. Toutefois, la fonctionnalisation de fullerènes avec des groupements cationiques reste la stratégie la plus prometteuse en PACT. Plusieurs dérivés cationiques de fullerènes ont été étudiés, nous pouvons citer les travaux de Huang *et coll.* qui ont étudié l'efficacité d'une série de fullerènes cationiques avec un nombre variable de charges. Le composé qui possédait six ammoniums quaternaires (**Figure 32B**) était le photosensibilisateur antimicrobien le plus efficace vis-à-vis de toutes les souches testées (*S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) [147]

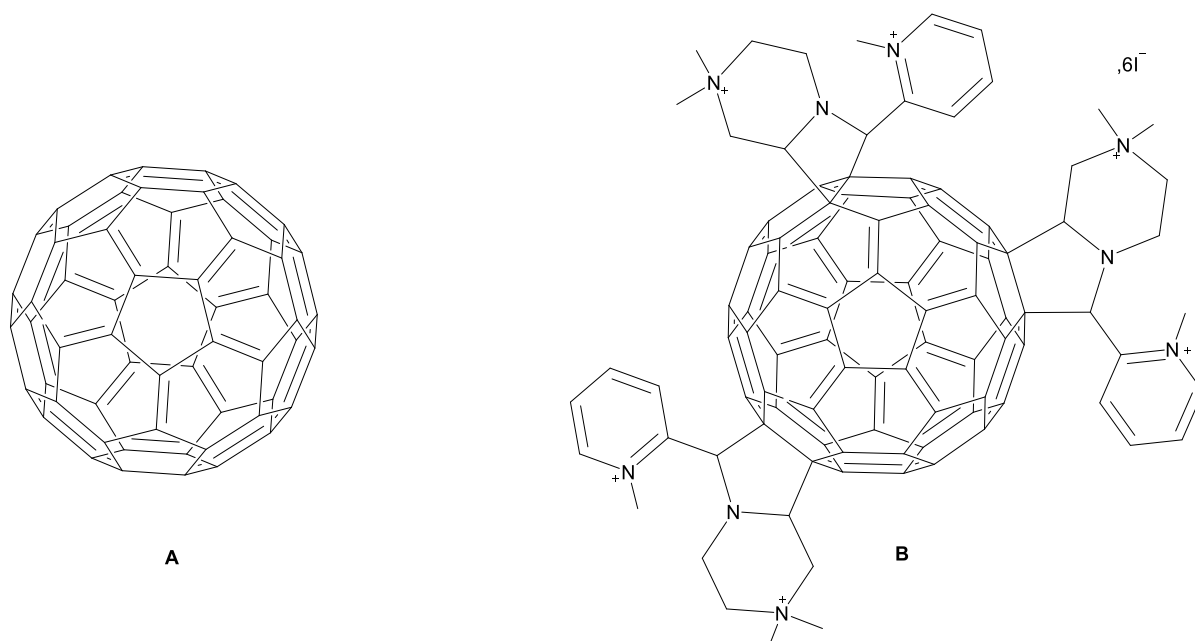


Figure 32 : A : Structure du Buckminsterfullerène (C₆₀), B : Dérivé de fullerène utilisé comme PS antimicrobien.

IV.2. Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques

Les photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques sont nombreux et ont montré un intérêt remarquable en PDT antibactérienne. Cependant, les PS tétrapyrroliques sont les plus étudiés car ils présentent une bonne conversion intersystème et ils offrent beaucoup de possibilités de faire des modifications chimiques, afin d'améliorer leurs propriétés comme leur hydrophilicité et le ciblage cellulaire. Parmi les molécules ayant des cycles pyrroliques les plus utilisés en PDT, on retrouve principalement les porphyrines, les chlorines, les bactérochlorines et les phthalocyanines.

IV.2.1. Structure des porphyrines, chlorines et bactérochlorines

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques composés de quatre unités pyrroles, liées par des ponts méthines (**Figure 33a**). Le squelette de base de ces composés est constitué d'un système conjugué aromatique à 18 électrons π (**Figure 33b**). Cette conjugaison est à l'origine de la stabilité et de la forte coloration de ces molécules. Ces macrocycles se comportent comme des diacides ou des dibases selon le pH du milieu. De plus, leur structure plane, avec quatre atomes d'azotes dirigés vers l'intérieur du macrocycle, leur permet d'être métallées par presque tous les métaux (**Figure 33c**) [148].

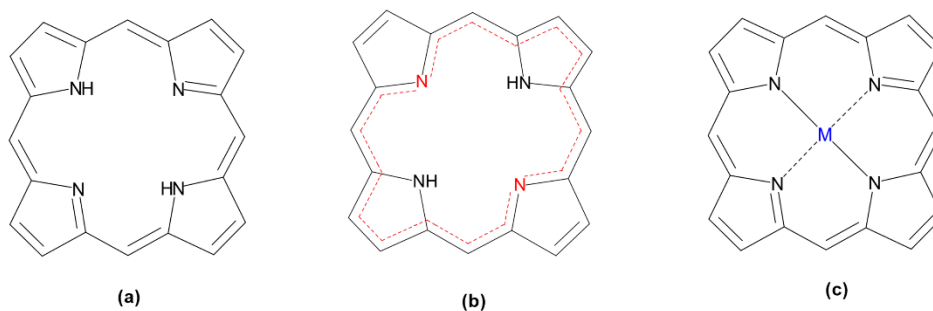


Figure 33 : (a) Porphyrine base libre ; (b) représentation du système de 18 électrons π aromatiques ; (c) Porphyrine métallée.

La structure du noyau porphyrinique contient trois types d'atomes de carbone numérotés de 1 à 20 selon la nomenclature de l'UICPA : les carbones α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 et 19) et β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 et 18) des cycles pyrroliques ainsi que les carbones situés au niveau des ponts méthine nommés méso (5, 10, 15 et 20). Les numéros 21, 22, 23 et 24 sont attribués aux atomes d'azote centraux (**Figure 34**) [149].

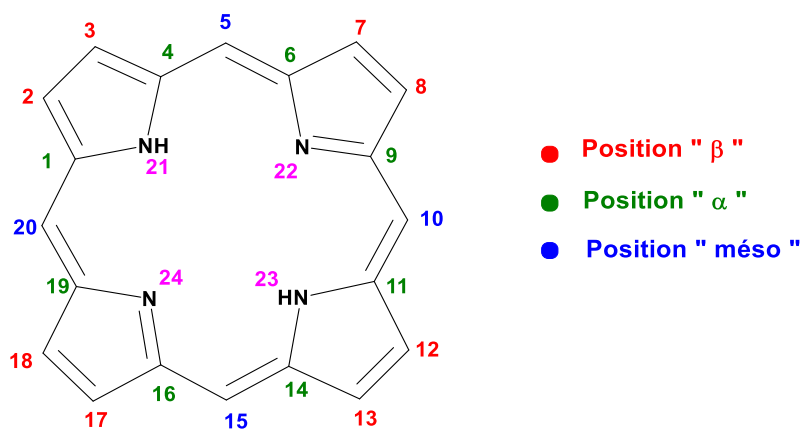


Figure 34 : Numérotation des positions d'une porphyrine.

Les chlorines et les bactériochlorines ont également la même structure de base que les porphyrines. Elles ne diffèrent que par la réduction d'une ou de deux doubles liaisons respectivement. La bactériochlorine peut aussi se trouver sous la forme d'isobactériochlorine selon les positions relatives des pyrroles réduits (**Figure 35**).

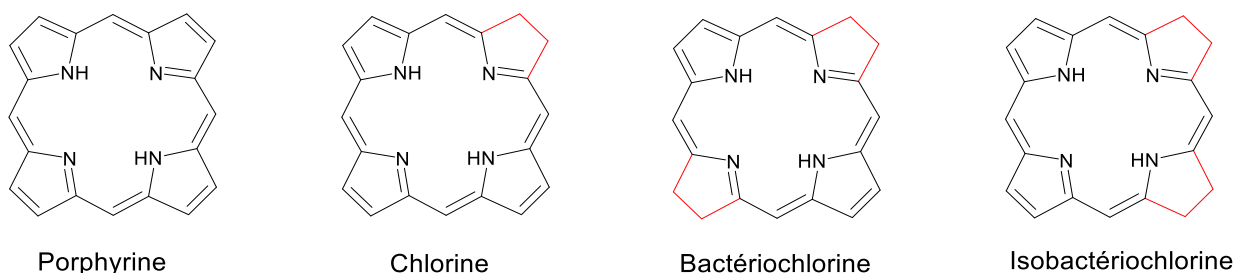


Figure 35 : Différences structurales entre une porphyrine, une chlorine, une bactérochlorine et une isobactérochlorine.

IV.2.2. Les propriétés photophysiques

Le mot porphyrine provient du mot grec « *porphura, πορφύρα* » qui désigne la teinte pourpre, en référence à leur coloration violette intense. Du fait de leur forte conjugaison, les porphyrines absorbent dans le domaine du visible et du proche UV et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Il se compose de deux bandes d'absorption : la bande de Soret (ou bande B) très intense située entre 390 et 430 nm (proche UV) (390-430nm) et les bandes Q (de I à IV) de plus faible intensité située dans le visible entre 480 et 700nm. Ces dernières sont numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses. L'intensité des bandes Q est dix à vingt fois plus faible que celle de la bande de Soret et varie en fonction de la nature et de la position des substituants du macrocycle. On distingue quatre types de spectres qui diffèrent selon les intensités relatives des bandes Q, appelés : étio, rhodo, oxorhodo et phyllo (**Figure 36**) [150].

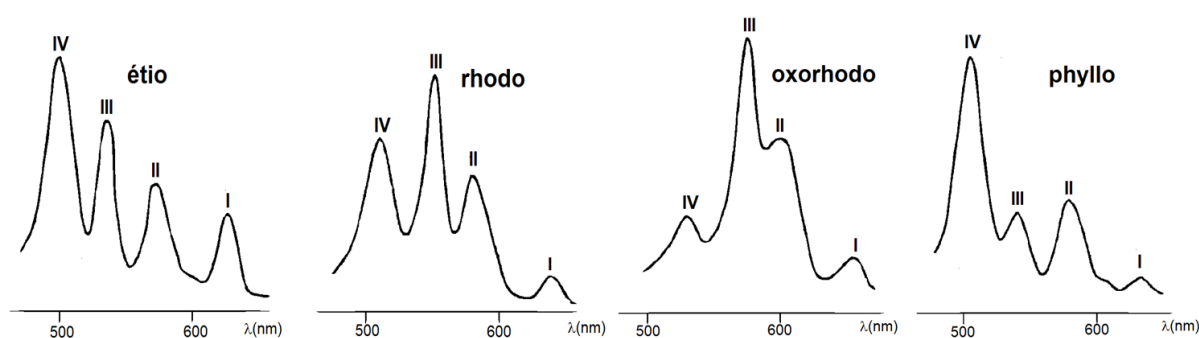


Figure 36 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres [150].

Le nombre de bandes Q est directement lié à la symétrie de la porphyrine. Ainsi, une porphyrine base libre est caractérisée par quatre bandes Q tandis que les porphyrines diprotonées ou métallées n'en présentent que deux (**Figure 37**).

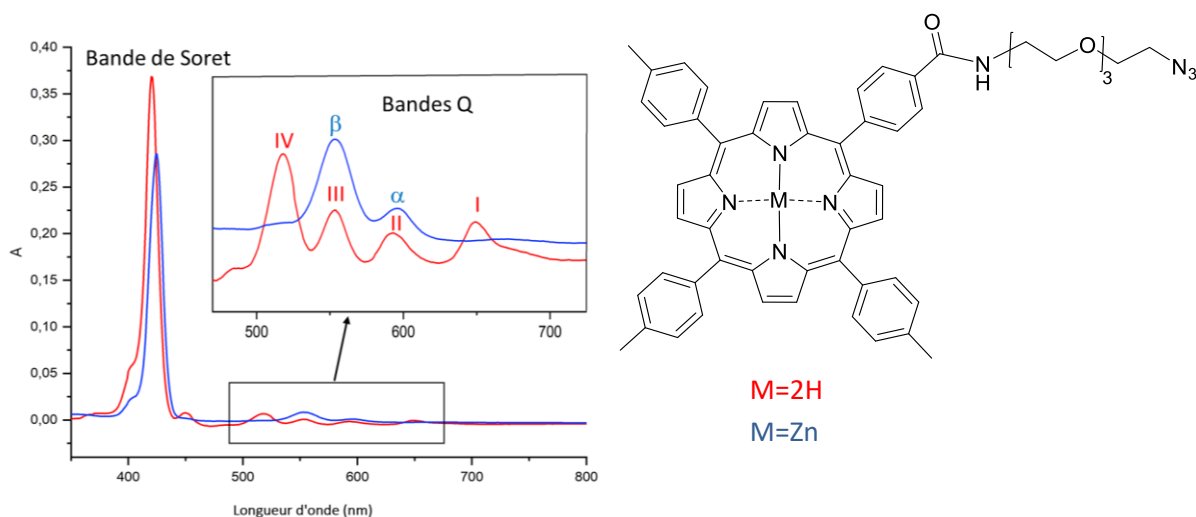


Figure 37 : Spectres d'absorbance d'une porphyrine base libre (rouge) et d'une métalloporphyrine (bleu).

La réduction de la porphyrine entraîne des changements importants des propriétés photophysiques, notamment pour le spectre d'absorbance dans le spectre d'absorption de cette molécule. Ces changements se manifestent au niveau des bandes Q. En effet, pour les chlorines, la bande Q_I est décalée vers le rouge et se situe entre 650 et 700 nm. De plus, elle est 10 fois plus intense que pour les porphyrines. Il en est de même pour les bactériochlorines qui présentent une bande Q_I intense se situant entre 730 et 800 nm. La bande de Soret, quant à elle, varie un peu lors la première réduction de la porphyrine, mais le passage à la bactériochlorine entraîne un déplacement vers les ultra-violets (**Figure 38**).

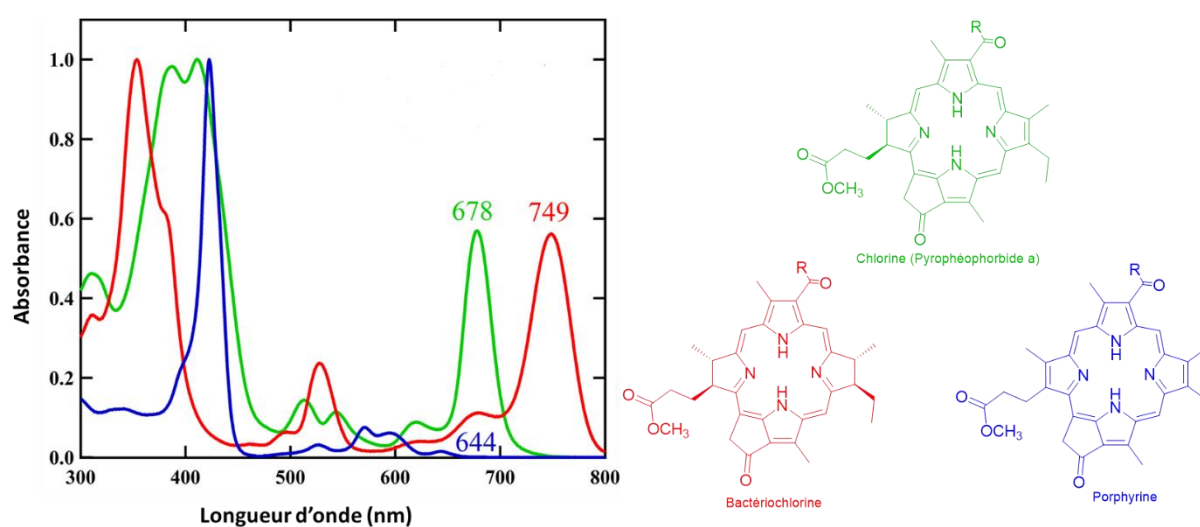


Figure 38 : Spectres d'absorbance de la pyropheophorbide a (vert) ainsi que la porphyrine (bleu) et la bactériochlorine (rouge) correspondantes [151].

IV.2.3. Obtention de PS tétrapyrroliques d'origine naturelle

Les composés tétrapyrroliques, qui sont les pigments les plus abondants trouvés dans la nature, remplissent des fonctions biochimiques très diverses et sont essentiels dans la plupart des organismes vivants connus [152]. Les membres bien connus de ce groupe de molécules sont les hèmes, qui donnent au sang sa couleur rouge, et les chlorophylles, qui sont responsables de la couleur verte des plantes, des algues et de certaines bactéries. Une brève description de quelques méthodes d'extraction et d'hémisynthèse de certains PS à partir de ces pigments est présentée dans la suite du manuscrit.

IV.2.3.1. A partir de pigments d'origine animale

La protohème (ou chloroprotoporphyrine de fer(III)) est le dérivé porphyrinique le plus abondant dans les organismes animaux supérieurs. Elle dérive de nombreuses protéines essentielles pour la vie de ces organismes comme l'hémoglobine, la myoglobine et le cytochrome P-450. L'extraction de cette molécule à partir du sang a été décrite selon deux méthodes :

- **La méthode de Fischer :**

La méthode de Fischer est la méthode classique pour l'obtention de la protohème. Elle consiste à chauffer du sang défibriné (privé de fibrogène) en milieu acide. Après refroidissement, la protohème est récupérée par filtration ou centrifugation. La purification est réalisée par recristallisation, ce qui permet d'obtenir 2,8 à 3,6 g de protohème pure par litre de sang [153].

- **La méthode de Labbe et Nishida :**

Proposée par Labbe et Nishida en 1957 [79], cette méthode est basée sur l'utilisation d'une solution de chlorure de strontium, afin d'éliminer la majorité des protéines par filtration à chaud. La protohème est ensuite récupérée par cristallisation à froid, puis purifiée par recristallisation. Les rendements obtenus par cette méthode sont similaires que ceux obtenus par la méthode de Fischer.

L'extraction de la protohème est importante car cette dernière est un précurseur dans la synthèse d'autres PS très utilisés en PDT. L'hématoporphyrine, la mésoporphyrine IX ou encore la protoporphyrine IX sont quelques exemples de PS préparés par modifications chimiques de la protohème (**Figure 39**).

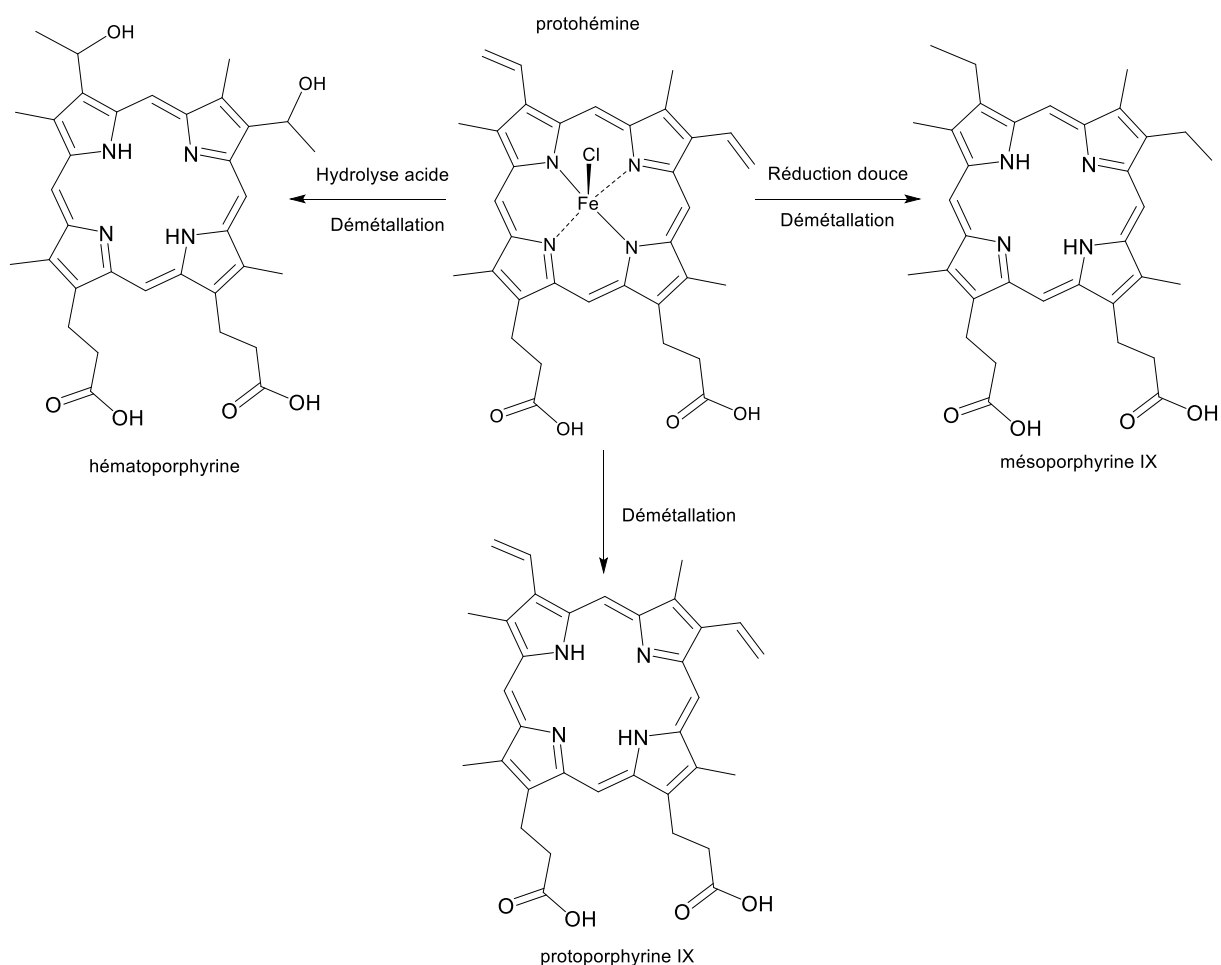
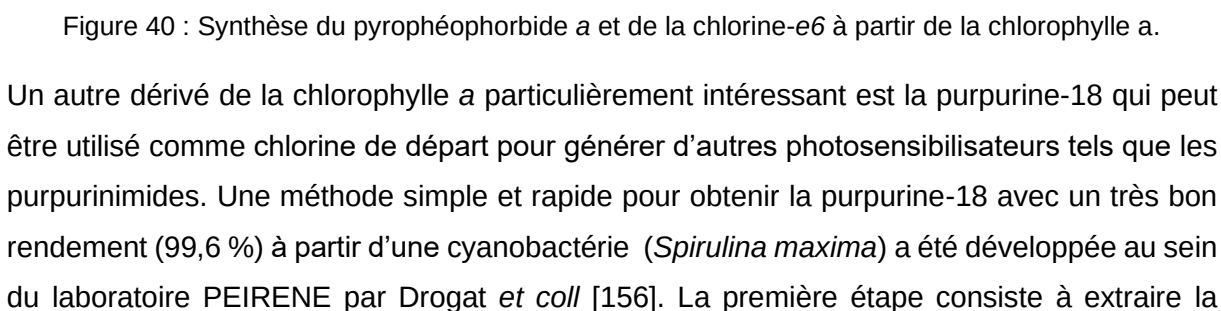


Figure 39 : Structure de la protohème et ces dérivés obtenus après traitement.

IV.2.3.2. A partir de pigments d'origine végétale

D'autres PS tétrapyrroliques naturels sont isolés du règne végétal, comme les chlorines d'origine naturelle obtenues par extraction et modification chimique de différentes chlorophylles. Par exemple, la chlorophylle *a* peut être abondamment extraite des feuilles des végétaux supérieurs. La modification chimique de cette dernière est à la base d'un grand nombre de PS tétrapyrroliques, notamment le pyrophéophorbide *a*, la chlorine-e6 et la purpurine-18.

La démétallation de la chlorophylle *a* permet d'obtenir la phéophytine, qui à son tour peut être hydrolysée pour donner lieu à la phéophorbide *a*. La décarboxylation thermique de cette dernière en présence de collidine à reflux conduit au pyrophéophorbide *a* [154]. La chlorine-e6, quant à elle, peut être obtenue à partir de la chlorophylle *a* en trois étapes : transestérification du groupement ester phytylique de la chlorophylle *a* avec un ester méthylique, puis l'ouverture de l'exocycle à 5 chaînons et enfin la saponification des esters permet d'obtenir la chlorine-e6 (**Figure 40**) [155].



chlorophylle a de la spiruline lors d'un reflux dans un solvant organique. La chlorophylle a extraite est ensuite saponifiée à l'aide d'une solution concentrée de soude, puis oxydée en présence de dioxygène. Enfin un traitement en milieu acide permet la démétallation.

L'intérêt de cette molécule réside dans la très forte réactivité de l'anhydride exocyclique qui peut facilement subir des attaques nucléophiles (**Figure 41**).

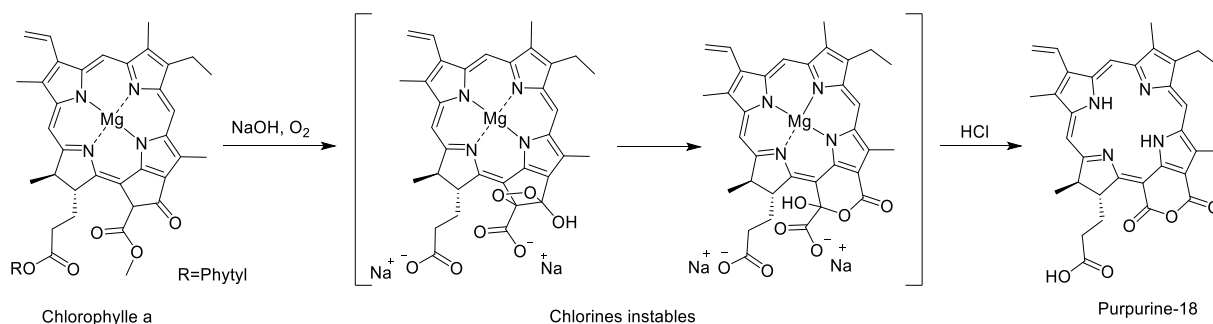


Figure 41 : Synthèse de la purpurine-18 à partir de la chlorophylle a.

D'autres dérivés porphyriniques ont également pu être obtenus à partir de la chlorophylle a, notamment la phylloporphyrine XV diméthylester et la pyrroporphyrine XV diméthylester (**Figure 42**) [157].

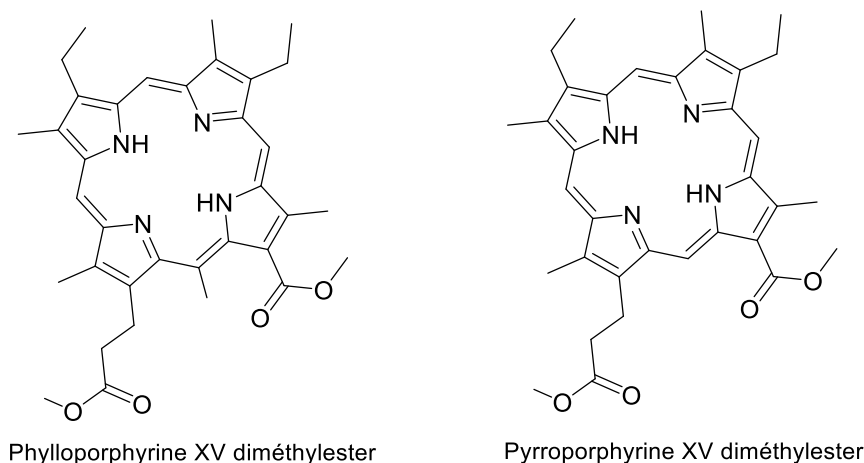


Figure 42 : Porphyrines issus de la chlorophylle a.

IV.2.4. Les méthodes de synthèse des porphyrines

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, l'intérêt pour les porphyrines ne cesse d'augmenter et de nombreuses méthodes de synthèse donnant accès à ces macrocycles ont été développées. Cependant, ces diverses méthodes de synthèse partagent le même mécanisme de formation du noyau porphine : des substitutions électrophiles sur les positions 2 et 5 des pyrroles, formant un macrocycle puis l'oxydation de ce dernier. Différentes stratégies

ont été développées en fonction de la nature, le nombre et la position (*meso* ou/et β) des substituants de la porphyrine visée. Toutes les méthodes peuvent être classées en trois grandes stratégies selon la nature des précurseurs du macrocycle. La première stratégie, la plus courante et la plus ancienne, est basée sur la condensation de quatre unités de pyrrole (voie I). La deuxième stratégie dite "MacDonald" ou stratégie [2+2] (voie II) est une alternative qui consiste à former le macrocycle à partir de deux intermédiaires dipyrrométhanés préalablement synthétisés. La troisième stratégie ou l'approche [3+1] est une variante de la stratégie [2+2] utilisant la condensation d'une unité de pyrrole avec du tripyrrane (voie III). Chacune des trois méthodes ont leurs propres avantages et limites, pour lesquelles les conditions optimales de réaction dépendent de la structure souhaitée. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à ces méthodes de synthèses et tout particulièrement à la condensation des unités pyrroliques, qui sera utilisée lors des travaux réalisés au cours de ce manuscrit.

IV.2.4.1. Synthèse par condensation du pyrrole et d'aldéhyde(s)

- **Synthèse de Rothemund**

La première porphyrine substituée en position *meso* a été obtenue en 1935 par Rothemund [158]. En chauffant à 220 °C un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde dans un système fermé en présence de pyridine (**Figure 43**), Rothemund a obtenu un mélange constitué de la *meso*-tétraphénylporphyrine (TPP) avec un rendement très faible (5 à 10%) [159].

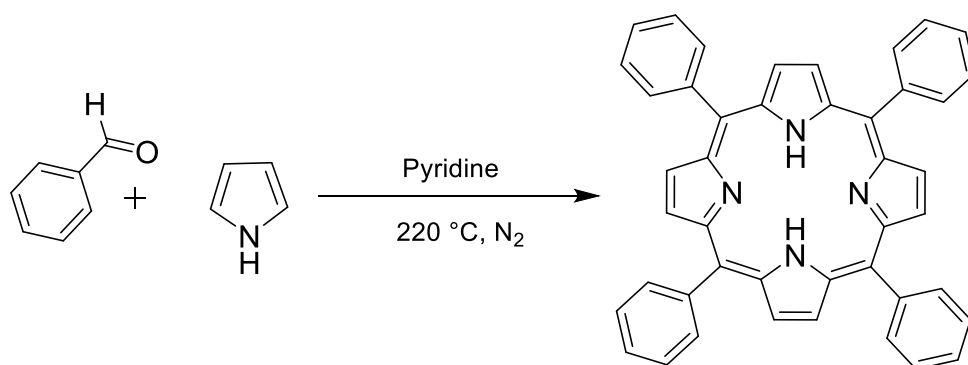


Figure 43 : Synthèse de la TPP selon Rothemund.

- **Synthèse de Adler et Longo**

En 1967, Adler et Longo ont significativement amélioré la méthode précédente par la mise en œuvre de conditions plus douces. En effet, en condensant le benzaldéhyde et le pyrrole dans l'acide propionique à reflux dans un réacteur ouvert à l'air libre pendant au moins trente minutes (**Figure 44**), ils obtiennent la TPP avec un rendement supérieur à 20% [160]. Ces conditions plus douces ont permis d'utiliser un large éventail d'aldéhydes, et par conséquent,

la synthèse d'une grande variété de *meso*-tétraarylporphyrines symétriques. Néanmoins, cette méthode oblige d'utiliser des aldéhydes supportant les hautes températures et une grosse majorité des produits formés sont des impuretés. De plus, la présence d'acide propionique dans le brut réactionnel conduit à la polymérisation concomitante du pyrrole rendant la purification plus compliquée en limitant la cristallisation des porphyrines.

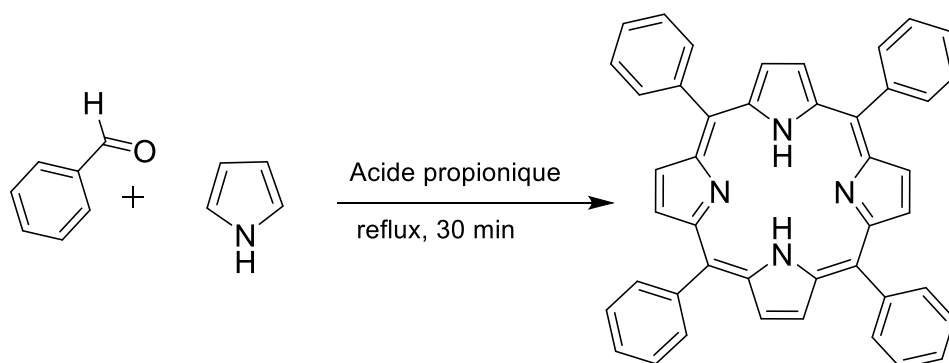


Figure 44 : Synthèse d'une tétraarylporphyrine selon Adler et Longo

- **Synthèse des aldéhydes mixtes « Little »**

En 1975, Little a adapté la méthode d'Adler et Longo à la synthèse des porphyrines asymétriques ayant différents substituants en position *méso*. Cette méthode dite des « aldéhydes mixtes » consiste à condenser dans l'acide propionique à reflux du pyrrole et deux aldéhydes différents en proportions stœchiométriques (**Figure 45**) [161].

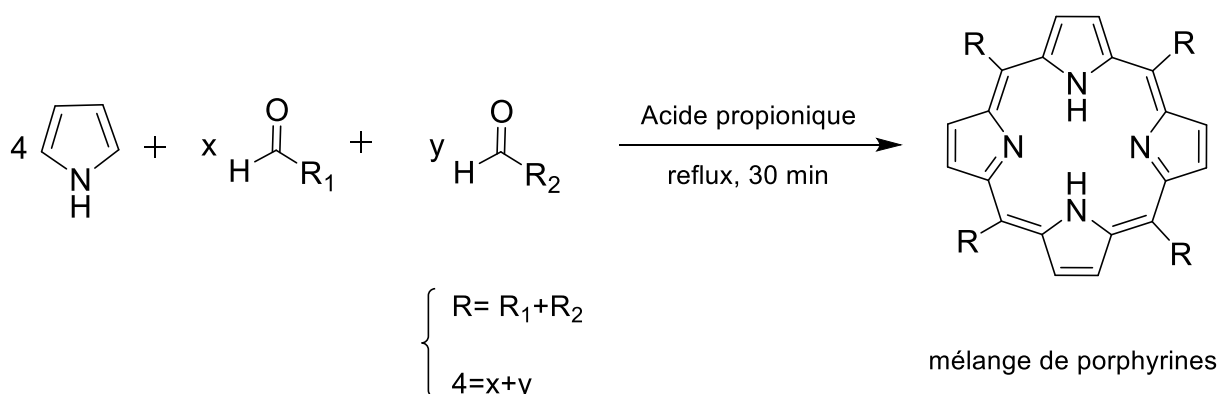


Figure 45 : Méthode des aldéhydes mixtes.

Contrairement à la synthèse d'Adler et Longo, la méthode de Little conduit à la formation de plusieurs porphyrines substituées par un, deux, trois ou quatre groupements identiques. Par exemple, la condensation sur le pyrrole de deux aldéhydes A et B conduit à la formation de 6

différentes porphyrines que nous notons A_4 lorsqu'on effectue la condensation entre un aldéhyde A unique et le pyrrole, A_3B pour celle formée à partir de trois unités de A et une unité de B, cis- A_2B_2 et trans- A_2B_2 pour les isomères cis et trans de la porphyrine formée de deux unités de A et de deux unités de B, AB_3 et B_4 (**Figure 46**).

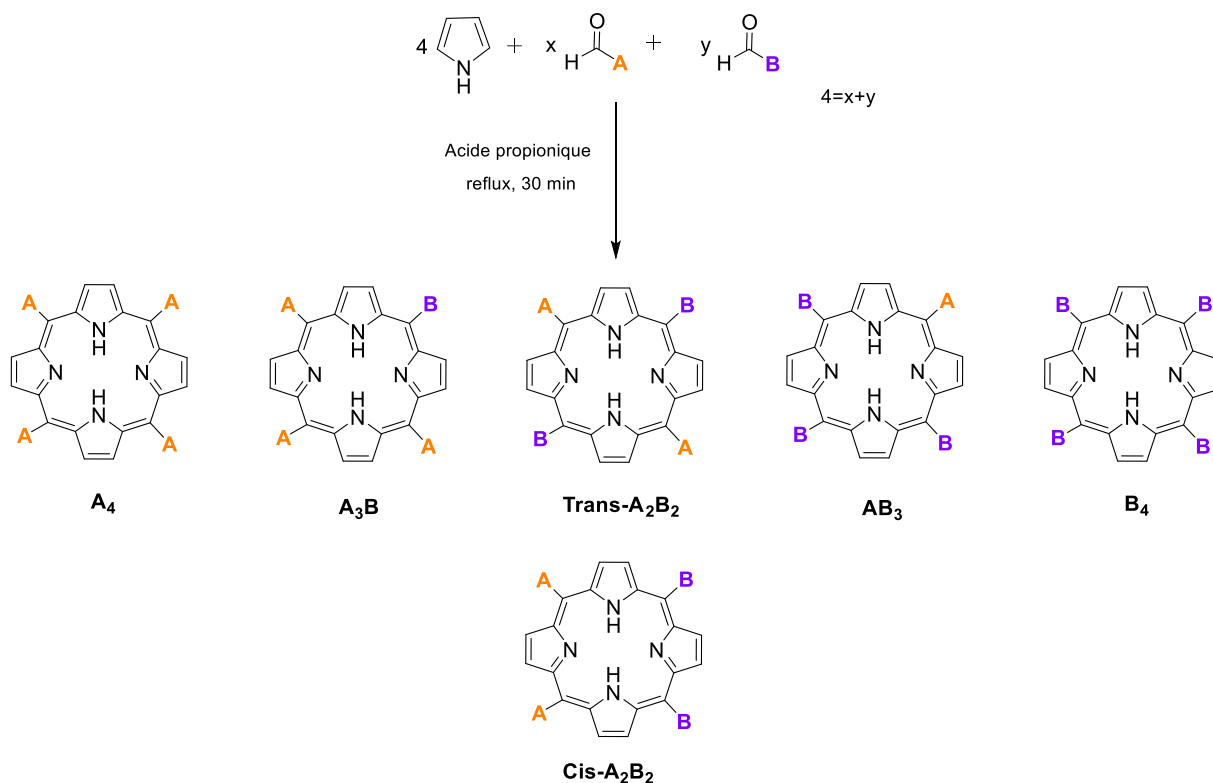


Figure 46 : Les différentes porphyrines produites lors d'utilisation d'un mélange de deux aldéhydes.

La formation préférentielle d'une *meso*-porphyrine asymétrique est orientée, contrôlée statistiquement par le rapport stœchiométrique des réactifs engagés. Par exemple, afin d'obtenir des porphyrines A_3B , il est préférable d'utiliser 3 équivalents de l'aldéhyde A et 1 équivalent pour le B avec 4 équivalents de pyrrole. En plus d'avoir les mêmes limites que la méthode d'Adler et Longo, la purification nécessite l'utilisation de techniques chromatographiques afin de séparer les différentes porphyrines formées. Cependant, il reste le protocole le plus utilisé pour former des porphyrines asymétriques.

• Synthèse de Lindsey

En 1985, Gonsalves *et coll.* [162] ont montré qu'un mélange de pyrrole et d'alkylaldéhyde en présence d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique conduisait à un porphyrinogène (un cycle tétrapyrrolique non conjugué) pouvant être oxydé en *meso*-tétraalkylporphyrine avec un bon rendement. En s'inspirant de cette méthode, Lindsey [163] a proposé une synthèse en deux étapes dans un milieu plus doux et plus dilué. La première consiste à former le

porphyrinogène par condensation, en milieu anhydre, du alkylaldéhyde sur le pyrrole en présence d'une quantité catalytique d'acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ou acide trifluoroacétique). La deuxième étape est l'oxydation du porphyrinogène en porphyrine avec le *para*-chloranil ou le dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ) (**Figure 47**). Initialement ce protocole était utilisé pour obtenir des porphyrines symétriques (les rendements pouvant atteindre 40-50%). Suivant le principe de Little, cette synthèse fut adaptée à l'utilisation de mélange d'aldéhyde pour la formation de porphyrine asymétrique avec de meilleurs rendements.

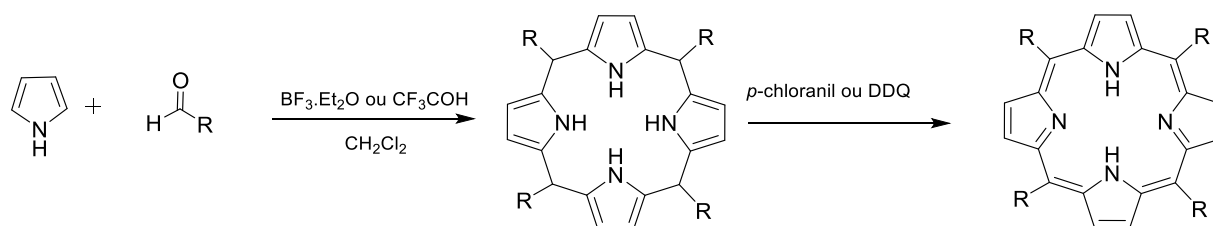


Figure 47: Synthèse de porphyrine selon Lindsey

IV.2.4.2. Synthèses « 2+2 » et « 3+1 »

Cette approche consiste à coupler deux intermédiaires dipyrroliques tels que les dipyrrométhane et les dipyrrométhènes (**Figure 48**) permettant de former une plus grande variété de porphyrines.

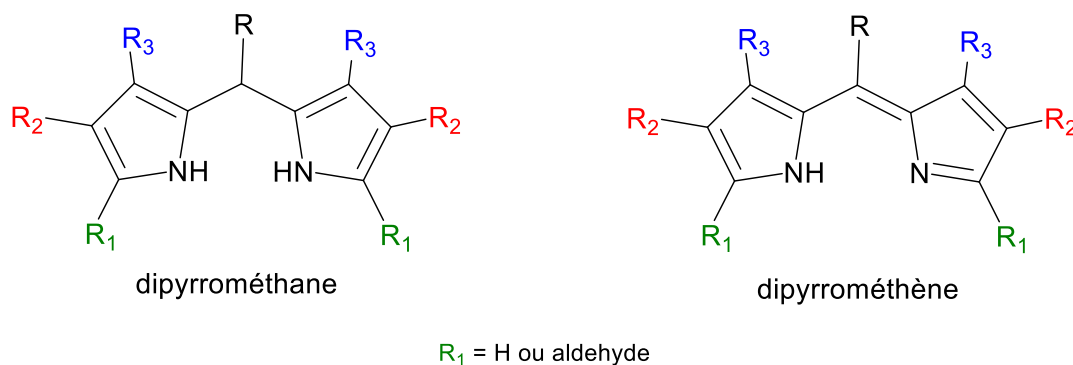


Figure 48 : Structure des dipyrrométhane et des dipyrrométhènes.

• Utilisation des dipyrrométhènes

A la fin des années 1920, l'équipe de Fischer a mis au point une approche originale pour la synthèse totale des porphyrines β -substituées avec des rendements allant de 0,2 à 20% [164]. Leur méthode consiste à provoquer l'autocondensation de 5-bromo-5'-méthylpyrrométhènes en milieu acide à des températures supérieures à 200°C (**Figure 49**). En raison de conditions

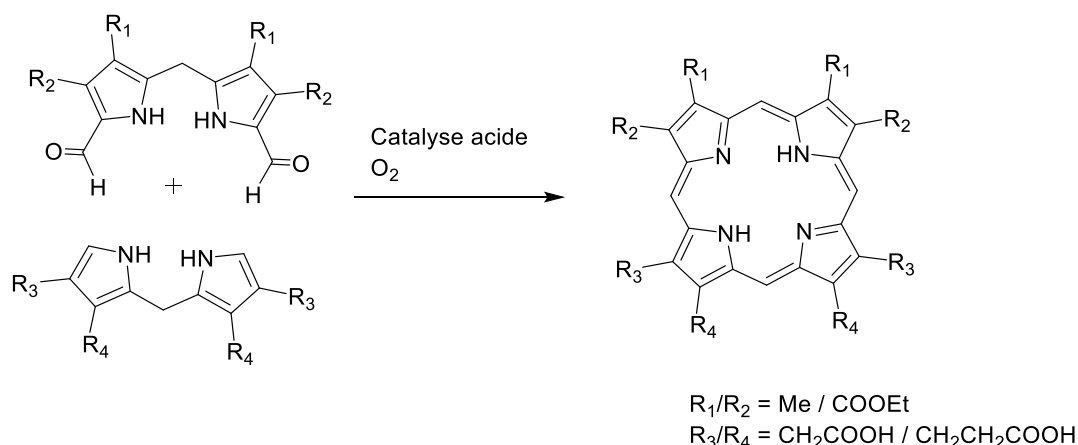


Figure 50 : Synthèse de porphyrines selon Woodward et MacDonald [169,170].

En 1978, Ogoshi *et coll.*, afin d'éviter la préparation de diformyldipyrrométhane, ont développé une variante de la première approche en utilisant des aldéhydes aromatiques en addition aux dipyrrométhanés en présence de TFA comme catalyseur acide. Cette approche a conduit à la synthèse de 5,15-diarylporphyrine avec des rendements allant de 30 à 40% [171]. En 1989, Manka et Lawrence ont obtenu des 5,15-diarylporphyrines avec d'excellents rendements (73-92%) [172]. La seule différence par rapport son prédécesseur est l'utilisation de *p*-chloranil en tant qu'oxydant au lieu de l'air (**Figure 51**).

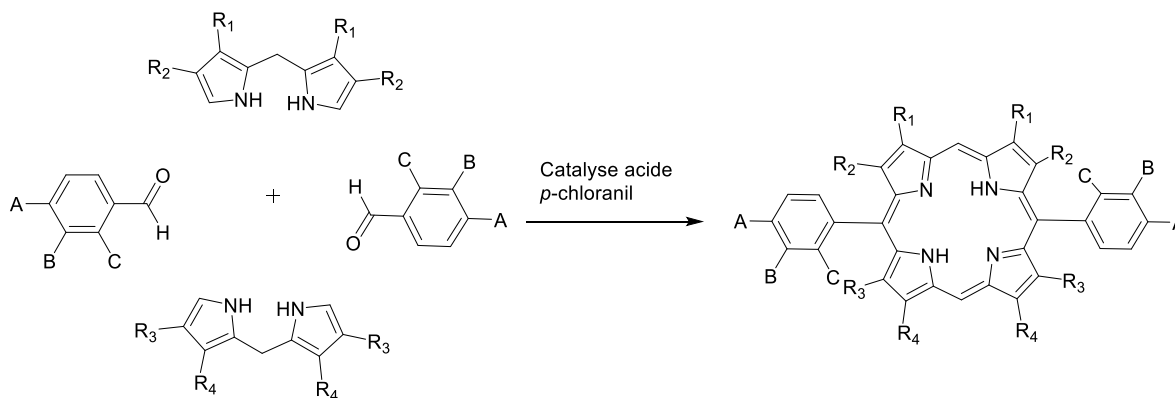


Figure 51 : Synthèse de 5,15-diarylporphyrines à partir de dipyrrométhanés [171,172].

Toutes ces méthodes ont en commun l'exigence de la présence d'une fonction aldéhyde. En 2009, Temelli, toujours en se basant sur la technique de MacDonald, a développé une approche différente combinant les dipyrrométhanés avec des imines [173]. Cette réaction est catalysée par le triflate métallique dans le dichlorométhane, et avec la dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ) comme agent oxydant (**Figure 52**).

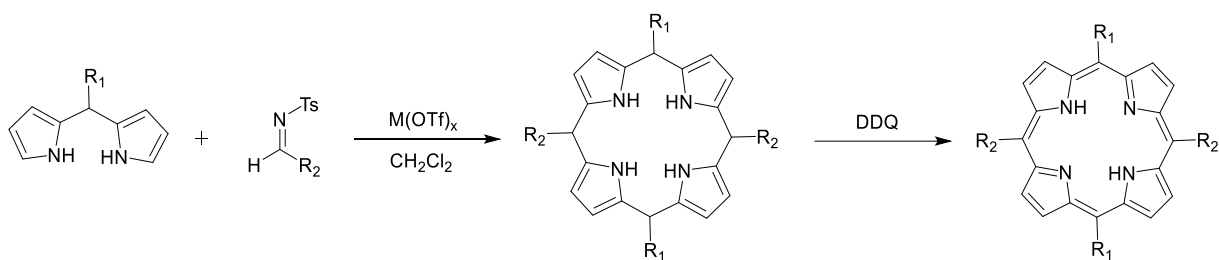


Figure 52 : Synthèse de porphyrine selon Temelli et coll [173].

IV.2.4.3. Synthèse « 3+1 »

La synthèse « 3+1 » consiste à faire réagir un tripyrrane avec un pyrrole afin de former un porphyrinogène, qui est finalement oxydé en porphyrine (**Figure 53**). Le tripyrrane peut être préparé à partir d'un pyrrole ayant deux fonctions alcools. Le tripyrrane peut réagir avec un autre diol pyrrolique pour former une porphyrine (après oxydation) [174].

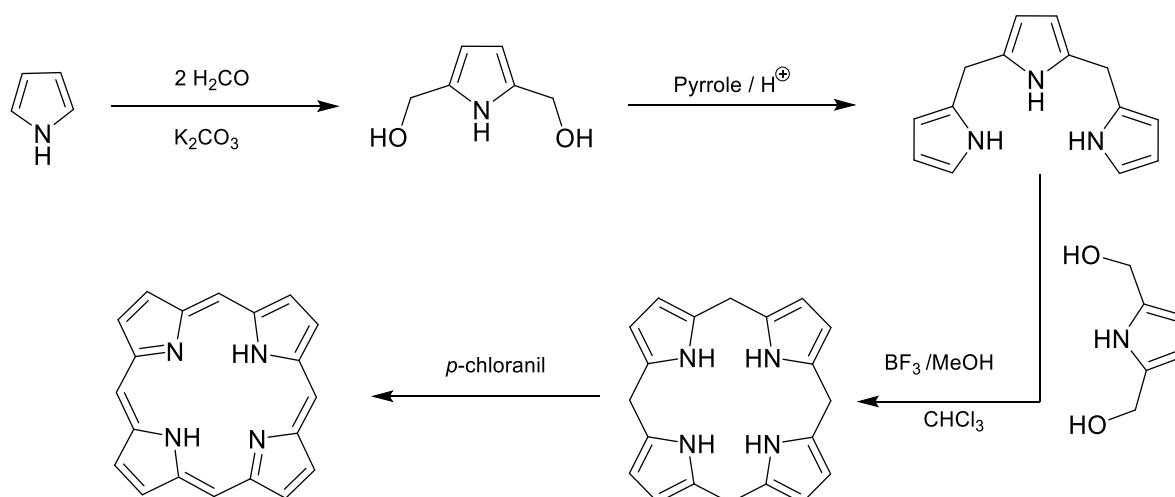


Figure 53 : Synthèse de la porphyrine par la méthode « 3 +1 ».

Hatscher et Senge ont modifié cette méthode en utilisant des aldéhydes à la place du diol, afin d'obtenir des porphyrines mono ou disubstituées en position *méso* avec des rendements dépendants des aldéhydes utilisés (entre 4 et 75%) (**Figure 54**) [175].

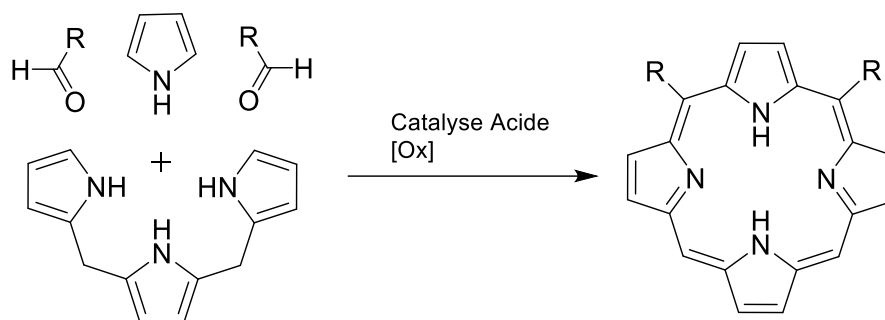


Figure 54 : synthèse "3+1" d'après Hatscher et Senge [175]

IV.2.5. Les phthalocyanines

Les phthalocyanines font elles aussi partie de la classe des photosensibilisateurs tétrapyrroliques. En effet, elles sont constituées de quatre unités isoindoliques reliées par des ponts azotés, assurant une aromaticité comparable à celle des porphyrines. Les phthalocyanines sont très présentes dans la recherche en PDT, car leurs propriétés photophysiques sont particulièrement intéressantes. En effet, les bandes d'absorption les plus fortes de ces PS se situent vers 650-700 nm et donc plus proches de la fenêtre thérapeutique que les porphyrines par exemple, c'est-à-dire situé dans la région rouge/ proche infrarouge (600-850 nm) du spectre de la lumière visible, afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales. En effet, les protéines absorbent dans l'UV et l'hémoglobine oxygénée et la mélanine absorbent jusqu'à 650 nm. Quant à l'eau, elle commence à absorber les rayonnements dès 900 nm. La somme de ces absorptions laisse ainsi une « fenêtre thérapeutique » pour laquelle le rayonnement aura plus de chance d'exciter un photosensibilisateur.

La première découverte des phthalocyanines a été accidentelle. En 1907, Braun et Tcherniac ont observé la formation d'une impureté bleue lors du reflux de l'*o*-cyanobenzamide dans l'éthanol destiné à obtenir des phthalonitriles [176]. Plus tard, en 1927, Diesbach et Von der Weid ont synthétisé de la phthalocyanine de cuivre (rendement de 23 %), de la naphthalocyanine de cuivre et de l'octaméthylphthalocyanine de cuivre lors d'une tentative de conversion de l'*o*-dibromobenzène en phthalonitriles [177]. La découverte de la structure des phthalocyanines n'a été faite que plus tard, dans les années 1930, par Linstead *et coll* [178]. qui ont ensuite développé plusieurs procédés de synthèse de phthalocyanines métallées. Depuis, de nombreuses stratégies ont été développées pour obtenir des phthalocyanines. Une grande partie d'entre elles repose sur la tétramérisation de petites molécules, tel que des benzènes substitués en position *ortho* (par exemple *o*-dibromobenzène, *o*-cyanobenzamide...), des phthalonitriles, des phthalimides, des anhydrides ou acides phthaliques. Ces tétramérisations

nécessitent souvent la présence d'un métal afin d'assurer de meilleurs rendements (**Figure 55**) [179].

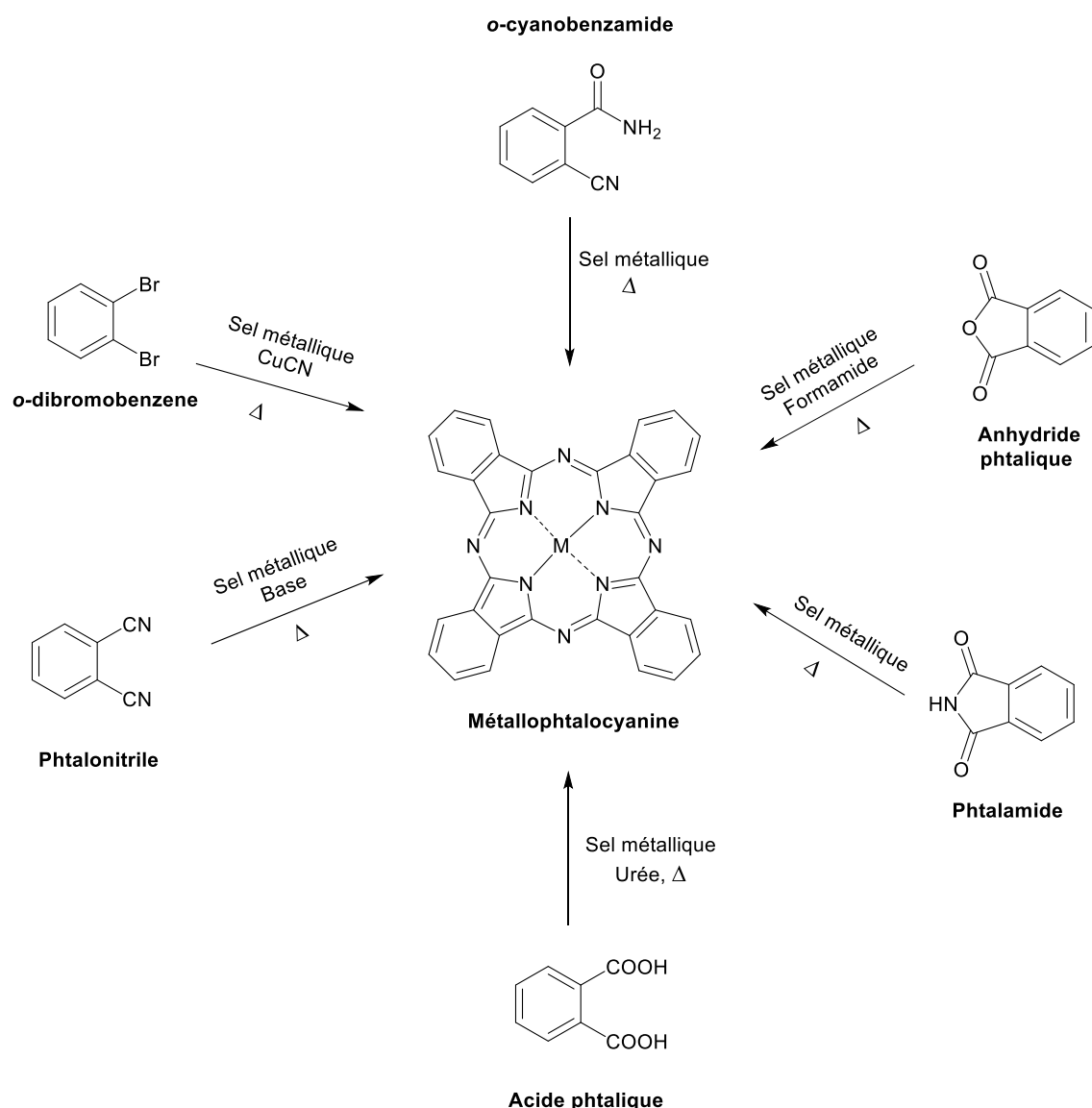


Figure 55 : Voies de synthèse des métallophthalocyanines par tétramérisation de divers précurseurs.

Malgré leurs bons rendements de synthèse et des propriétés photophysiques favorisant théoriquement les applications thérapeutiques, la faible solubilité des phthalocyanines est souvent le facteur limitant pour des applications biologiques, et la fonctionnalisation par des fonctions hydrophiles est la plupart du temps nécessaire [180].

V. Nouvelles stratégies en PACT

Afin d'obtenir une PACT efficace, la sélection du PS est cruciale. Bien que la transposition de la PACT en clinique n'ait pas encore atteint son plein potentiel, des décennies de recherches

ont fourni une série de critères qui doivent être entièrement pris en compte dans la conception d'un PS idéal pour la PACT.

Propriétés optiques adéquates. Le PS doit être capable d'absorber efficacement la lumière à la longueur d'onde utilisée pour l'excitation, c'est-à-dire avoir un coefficient d'extinction élevé. Pour une meilleure pénétration dans les tissus et une plus faible phototoxicité, les longueurs d'onde du proche infrarouge (NIR) de la "fenêtre photothérapeutique" peuvent être préférées. Cependant, ce critère n'est pas toujours nécessaire en PACT.

Propriétés photosensibilisantes appropriées. L'état triplet du PS doit posséder une longue durée de vie avec un CIS efficace, conduisant à un rendement quantique élevé de génération d'oxygène singulet $\Phi\Delta$, et/ou de génération d'ERO.

Solubilité élevée dans l'eau. Ces composés, qui ont tendance à être aromatiques, doivent être suffisamment hydrophiles pour être utilisés dans l'eau ou dans un milieu biologique aqueux pour des applications biologiques.

Faible toxicité à l'obscurité. Le PS doit être non toxique pour les cellules de mammifères avant l'irradiation.

Bonne stabilité. Pour une application en clinique, les PS doivent être chimiquement robustes avant et pendant le processus d'irradiation.

Haute sélectivité de la cible. Les agents pathogènes doivent être ciblés et inactivés de manière sélective sans affecter les cellules hôtes.

Ainsi, comme cité précédemment, les propriétés de nombreux PS ont été utilisées pour éradiquer des espèces bactériennes. Cependant, atteindre une haute spécificité de traitement tout en conservant les autres critères est un défi pour la PACT. Afin de pallier ce problème, plusieurs méthodes d'optimisation ont été mises en place. Nous pouvons les regrouper en trois grandes stratégies (**Figure 56**) :

- L'utilisation de photosensibilisateurs cationiques ou liés à des matériaux polycationiques pour favoriser une interaction électrostatique entre le PS et les différents composants de la paroi cellulaire des bactéries.
- L'affaiblissement de la paroi bactérienne par un agent, ce qui permettra l'intégration du PS dans le cytoplasme.

- La conjugaison d'un PS avec un agent de ciblage ayant une affinité pour des composants bactériens spécifiques, comme les protéines membranaires, permet de guider la molécule active jusqu'à la bactérie. Il s'agit ici du principe de vectorisation.

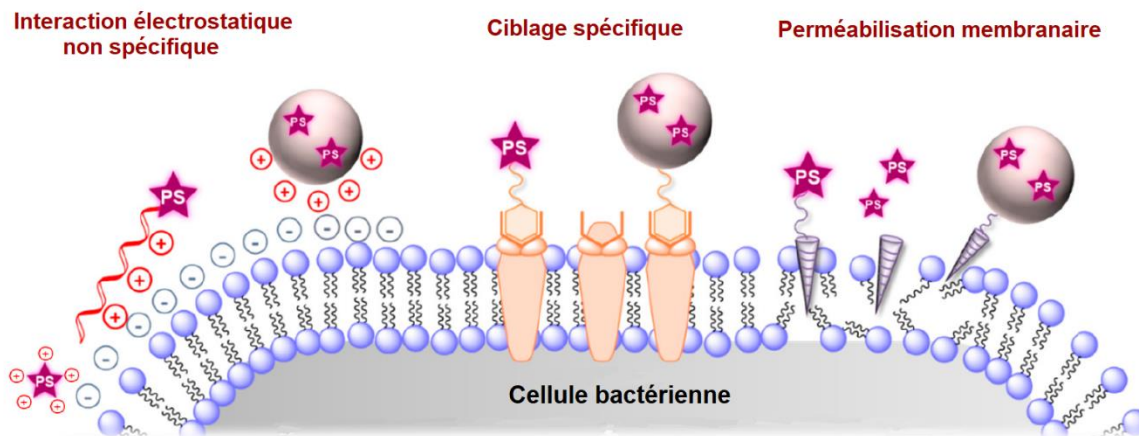


Figure 56 : Les stratégies d'optimisation de la PACT [181].

V.1. L'interaction électrostatique non spécifique

Il est communément admis que les PS cationiques tels que le bleu de méthylène (MB) [182], le bleu de toluidine O (TBO) [183] et d'autres dérivés de phénothiazinium [184], ou les porphyrines cationiques [185–187] et les phtalocyanines [188] sont bien adaptés à la PACT, montrant une bonne affinité pour les bactéries comparée aux PS neutres [189–191] ou chargés négativement [185,192]. En effet, les PS cationiques interagissent par des interactions électrostatiques avec les composants de la paroi cellulaire fortement chargés négativement tels que les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries Gram positif et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif [193–195]. Les PS anioniques et neutres doivent généralement être modifiés chimiquement ou vectorisés afin d'éliminer la répulsion électrostatique avec la membrane bactérienne avant d'être utilisés dans la PACT.

La photoinactivation des bactéries s'est avérée plus efficace contre les bactéries Gram positif à cause de la structure monocouche de leur paroi cellulaire qui permet une pénétration plus profonde des PS. Ainsi, les PS monocationiques permettent d'obtenir un effet photobactéricide sur des bactéries Gram positif. Cependant, la présence d'une membrane externe épaisse et bien organisée chez les bactéries Gram négatif les rend plus résistantes à la PACT [196] et l'épaisseur de la membrane externe limite la pénétration des PS à travers la paroi cellulaire. Pour cela, les dérivés polycationiques sont généralement nécessaires pour l'éradication des bactéries Gram négatif. Cela souligne la nécessité de concevoir des PS spécifiques contre ces agents pathogènes.

Les acides aminés basiques (l'arginine, la lysine et l'histidine) ont aussi le potentiel de cibler la surface chargée négativement des bactéries du fait de la présence de charges positives à pH physiologique. Le conjugué lysine-porphyrine (**Figure 57a**) par exemple a montré une efficacité contre les SARM, *E. coli* et *P. aeruginosa*, à la fois *in vivo* et *in vitro* [197,198]. Pour aller plus loin dans cette approche, des peptides qui contiennent ces acides aminés ont été utilisés. En effet, les stratégies basées sur les peptides offrent des avantages significatifs dans la mesure où la charge cationique peut être facilement ajustée en variant le nombre d'acides aminés, ce qui permet d'améliorer la sélectivité des PS et d'augmenter leur solubilité en milieu aqueux. La conjugaison d'un PS et d'un polymère polycationique a été étudiée pour la première fois par Soukos *et coll.* [199]. Ils ont lié une chlorine-e6 (ce6) à une chaîne polypeptidique composée de 20 résidus de lysine (**Figure 57b**). Ces travaux ont montré que le PS conjugué est capable d'inactiver la souche Gram positif *Actinomyces viscosus* et la souche Gram négatif *Porphyromonas gingivalis* après une minute d'illumination sous une lumière rouge (666 nm, 5-20 J/cm²), tout en épargnant les cellules de l'épithélium buccal. Dans une même approche, Zhou *et coll.* [200] ont synthétisé un peptide hepta-arginine fonctionnalisé à l'extrémité C-terminale avec la purpurine-18 (**Figure 57c**). Ce conjugué s'est lié sélectivement aux bactéries Gram positif et, après une irradiation lumineuse (720 nm, 100 mW/cm², 3 min, 56 J/cm²), entraîne l'éradication complète de ces dernières. Cependant, le taux de survie des bactéries Gram négatif était élevé même à des concentrations élevées, probablement en raison de leur paroi cellulaire plus épaisse empêchant le contact de la membrane cellulaire avec le PS. De la même manière, Zhao *et coll.* [201] ont synthétisé une phtalocyanine de silicium (IV) di-substituée axialement avec des oligopeptides composés de trois arginines (**Figure 57d**). Ce composé a montré une grande affinité pour les bactéries. Cette affinité se traduit par une phototoxicité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que les champignons dans les expériences *in vitro*. En outre, ils ont démontré l'applicabilité thérapeutique *in vivo* de cette approche dans le traitement de l'infection à *S. aureus* chez des modèles murins. Cependant, les PS polycationiques peuvent s'avérer toxiques pour les cellules de mammifères, de sorte que le potentiel translationnel de ces PS peut être limité. C'est pourquoi des PS de ciblage plus spécifiques ont été utilisées pour améliorer la liaison aux bactéries, avec des agents sélectifs.

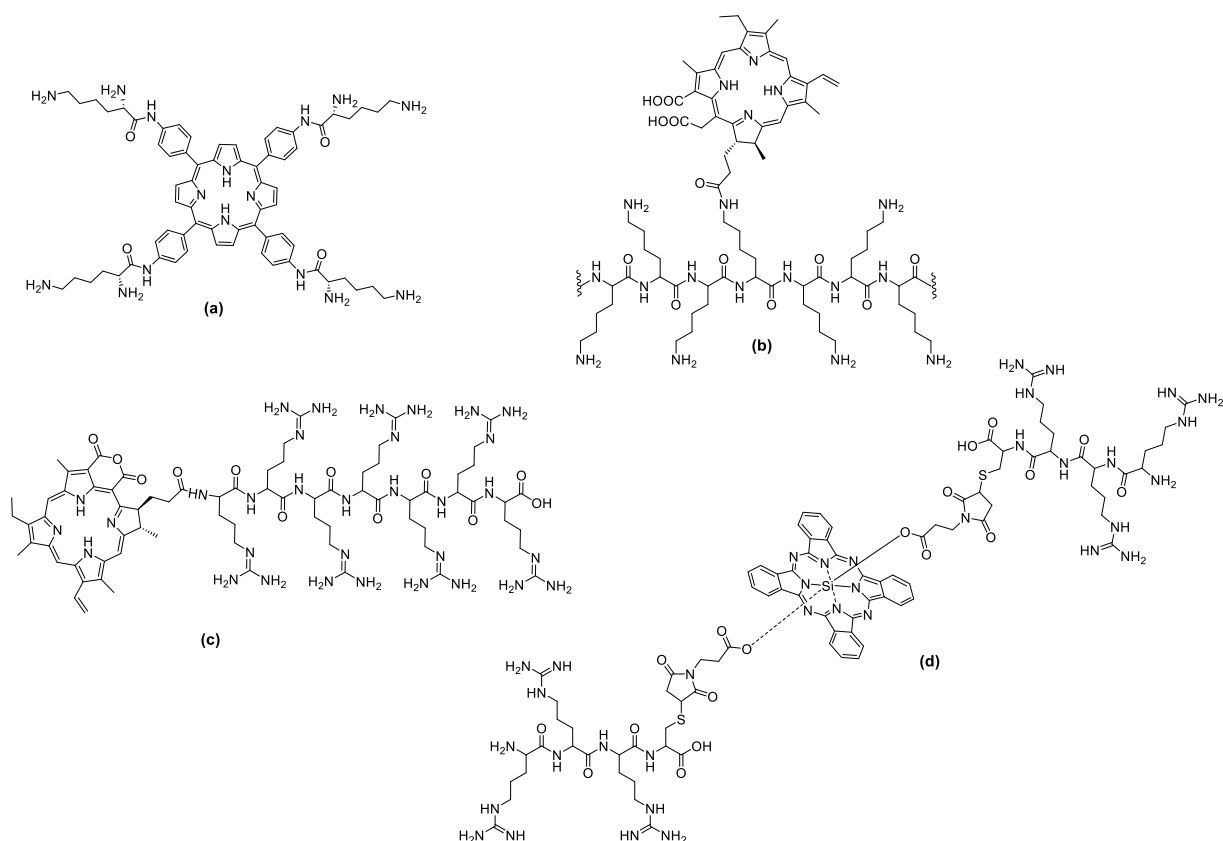


Figure 57 : Exemples de conjugués PS- peptides/ aminoacides polycationiques selon (a) : Meng *et coll.* [197] et Xu *et coll.* [198] (b) : Soukos *et coll.* [199] (c) : Zhou *et coll.* [200] (d) : Zhao *et coll.* [201].

V.2. La perméabilisation membranaire

Un grand nombre de travaux ont été réalisés sur la perméabilité de diverses bactéries à des molécules de structures différentes. L'un des facteurs régissant la sensibilité bactérienne aux antibiotiques est une diminution de la perméabilité à ces molécules. La capacité des chélateurs tels que l'EDTA à déstabiliser le revêtement du LPS en éliminant les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} qui agissent comme des ponts entre les molécules de LPS voisines est maintenant bien acceptée [202]. Un autre groupe de molécules antimicrobiennes a été étudié pour leur capacité à augmenter la perméabilité des bactéries, ce sont des peptides antimicrobiens (PAM). Ce sont des peptides amphipathiques linéaires ou cycliques qui exercent une activité bactériostatique ou bactéricide en ciblant les membranes cellulaires des bactéries par des interactions électrostatiques, et en perturbant l'intégrité de la membrane par insertion, et/ou en perturbant les fonctions intracellulaires [203]. Ainsi, Nitzan *et coll.* ont combiné un PS à un PAM utilisant à la fois les interactions électrostatiques et la capacité de perméabilisation de la membrane, pour augmenter l'efficacité des PS [10]. Dans une stratégie de conjugaison covalente, le couplage des PAM avec des PS a attiré une attention considérable dans le domaine de la PACT.

Récemment, au sein de notre laboratoire, Le Guern *et coll.* ont associé chimiquement différents photosensibilisateurs avec des dérivés de la polymyxine B (PMB) par une liaison covalente [3,204,205]. Une porphyrine cationique a ainsi été attachée à un dérivé PMB (ou le premier acide aminé a été remplacé par une cystéine) en utilisant la chimie thiol-ène click (**Figure 58a**). Le conjugué a montré une meilleure efficacité contre *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* par rapport à la porphyrine seule. Les résultats ont montré aussi que ce produit a une interaction hautement sélective pour les bactéries. Etant donné l'importance de la proximité du PS avec sa cible en PDT, une telle sélectivité et efficacité pourrait indiquer un effet photobactéricide à large spectre, bien avant tout effet secondaire sur les cellules humaines.

Puisque la partie peptidique a subi une faible modification, son activité bactéricide fut majoritairement conservée, ce qui peut entraîner l'émergence de souches résistantes. Afin d'optimiser le composé précédent, les unités d'acide diaminobutyrique (Dab) ont été remplacées par des résidus de lysine (**Figure 58b**). Alors que ces modifications ont entraîné une perte d'activité biologique significative de la partie peptidique, le nouveau composé a, quant à lui, obtenu des résultats prometteurs après irradiation lumineuse. De plus, les analyses en cytométrie en flux et en microscopie confocale ont montré que ce nouveau composé a une interaction stable pour les bactéries, et qu'il dispose aussi de la capacité de perméabiliser la paroi externe [205].

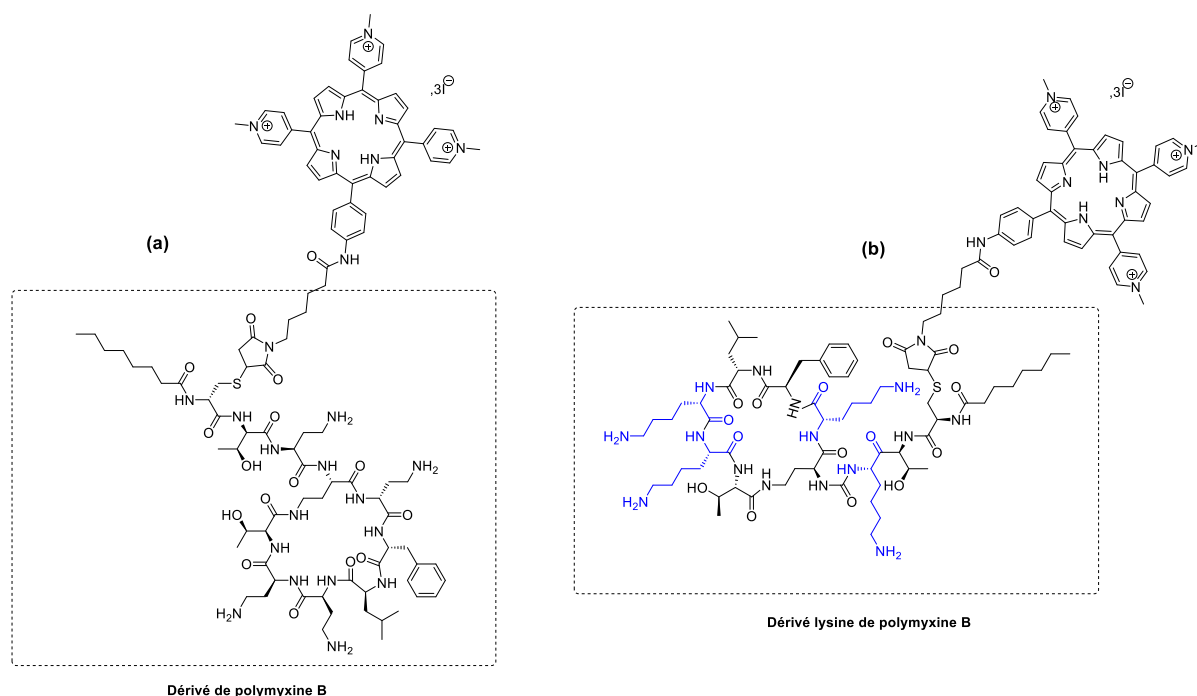


Figure 58 : Les composés photosensibles conjugués à la polymyxine B développés au sein du laboratoire PEIRENE lors des travaux de Le Guern *et coll.* [3,205].

D'autres séquences peptidiques ont été utilisées dans des stratégies covalentes ou non covalentes afin d'optimiser la PACT. Nous pouvons citer les travaux de Johnson *et coll.* [206] qui décrivent l'utilisation de l'éosine Y couplée au peptide (KLAKLAK)₂ (**Figure 59a**) afin d'améliorer la faible affinité membranaire de ce PS anionique, et cibler activement les bactéries Gram positif et Gram négatif tout en conservant une bonne sélectivité envers les cellules de mammifères.

Par ailleurs, Cheng *et coll.* ont également synthétisé un conjugué composé de ce PAM en utilisant la protoporphyrine IX comme PS [207] (**Figure 59b**). Le conjugué a montré une excellente activité photodynamique contre les bactéries Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*E. coli*) *in vitro*. Sa grande efficacité d'inactivation repose à la fois sur la structure hydrophobe/hydrophile du peptide et sur la capacité de génération d'ERO de la PS. L'unité PAM permet la formation d'une structure α -hélicoïdale qui positionne les charges positives d'un côté et conduit à de fortes interactions entre le colorant et les surfaces des bactéries. Après les interactions électrostatiques initiales, les conjugués PAM-PS peuvent pénétrer dans la membrane cellulaire et perturber l'intégrité des cellules, tandis que l'irradiation lumineuse à une longueur d'onde plus importante entraîne l'oxydation des biomolécules (par exemple, les acides nucléiques), ce qui entraîne la mort des bactéries [181].

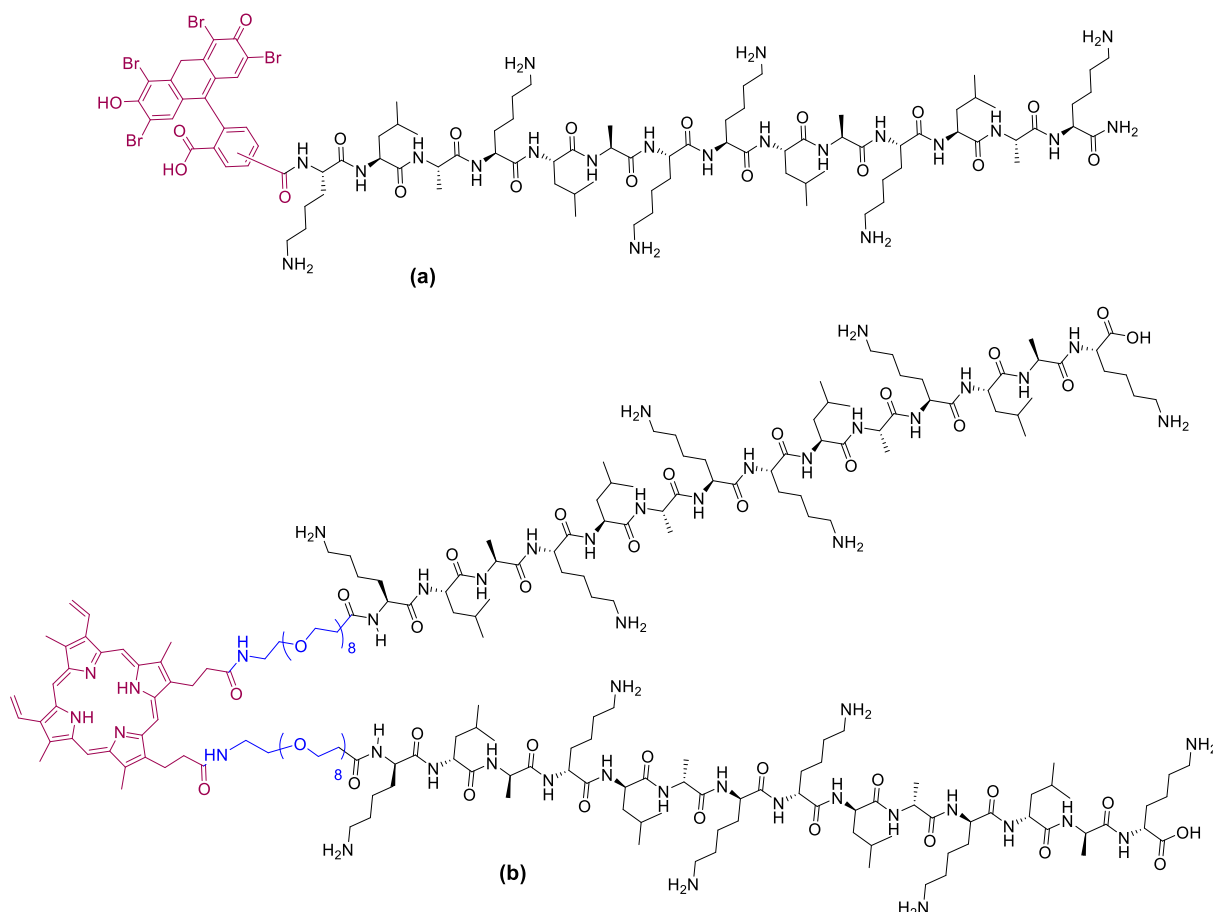


Figure 59 : Exemples de conjugués (KLAKLAK)₂-PS selon (a) : Johnson *et coll.* [206] (b) : Cheng *et coll.* [207].

D'autres séquences peptidiques comme l'Apidécine 1b [208,209] ou l'Aureine 1.2 [210] ont également été utilisées pour optimiser l'effet photobactéricide des PS.

V.3. Le ciblage spécifique

Le problème majeur de la PACT réside dans la sélectivité des cellules : l'effet cytotoxique doit cibler uniquement les bactéries. De ce fait, la stratégie antibactérienne tend à s'orienter vers l'élaboration de molécules « hybrides » composées d'un principe actif photo-activable associé à un module de reconnaissance. La conjugaison d'un photosensibilisateur avec des modules d'adressage (sucres, ligands, peptides) ayant une affinité particulière pour des récepteurs membranaires exprimés à la surface des bactéries induit une augmentation significative et sélective de l'incorporation cellulaire, et donc de l'activité photodynamique. La stratégie de ciblage spécifique est très développée pour la PDT anticancéreuse mais très peu étudiée pour la PACT. Une brève description de quelques conjugués utilisés ou pouvant être utilisés dans la PACT est présentée dans la suite du manuscrit.

V.3.1. La conjugaison d'un PS avec un antibiotique

L'une des stratégies les plus utilisées dans la PACT est la conjugaison d'antibiotiques bien connus avec des molécules photoactives pouvant générer une sélectivité élevée pour les bactéries.

La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides utilisée dans le traitement des infections bactériennes des souches Gram positif. Son mécanisme repose sur l'inhibition de la réticulation de la paroi cellulaire. La vancomycine forme un complexe en se liant par des liaisons hydrogènes avec les terminaisons D-alanyl-D-alanine du peptidoglycane non réticulé (**Figure 60**). Une fois liée, la vancomycine inhibe la formation des liaisons transversales qui stabilisent la paroi cellulaire. Cette paroi cellulaire affaiblie finit par se rompre sous la pression osmotique élevée du cytoplasme bactérien, tuant la bactérie [211].

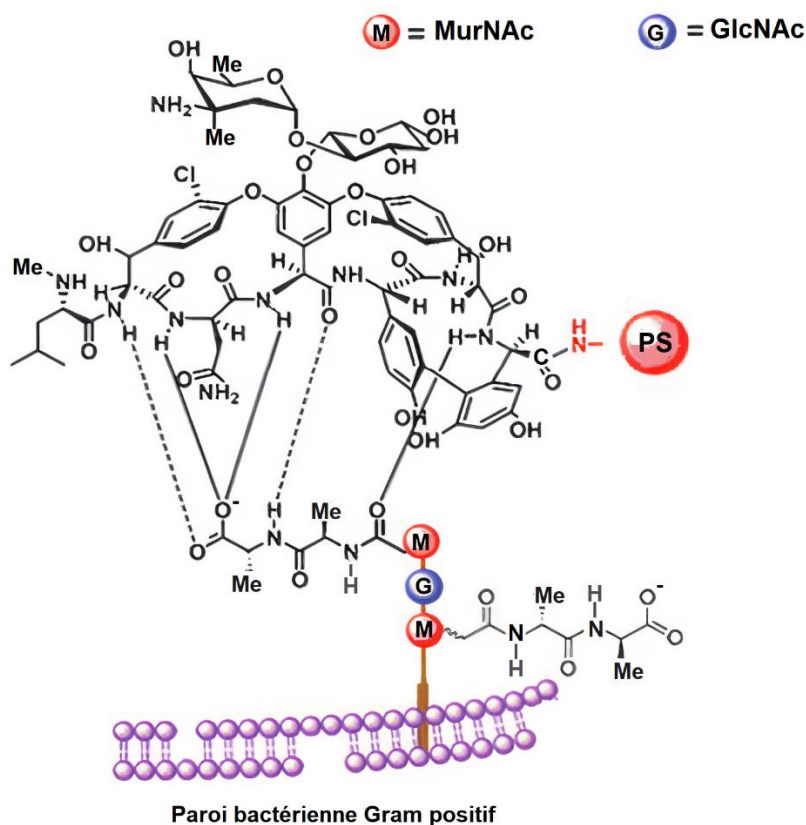


Figure 60 : Liaison de la vancomycine à un peptide D-alanyl-D-alanine [212].

La conjugaison de colorants fluorescents ou de PS à la vancomycine pour localiser et éradiquer les infections bactériennes a été largement étudiée [213–215]. Un exemple significatif de cette approche a été décrite par Xing *et coll.* dans lequel deux molécules de

vancomycine ont été conjuguées à une porphyrine (**Figure 61a**). Ce conjugué a montré des propriétés prometteuses dans l'imagerie fluorescente et la photoinactivation des souches bactériennes d'entérocoques sensibles et résistantes à la vancomycine permettant ainsi un diagnostic et un traitement simultané, une approche appelée théranostique. [212]. Dans une même approche, Feng *et coll.* ont couplé la vancomycine à un dérivé de tétraphényléthène comme PS avec des propriétés d'émission renforcée induite par l'agrégation. Cette sonde théranostique a permis la visualisation sélective et l'éradication des bactéries Gram positif sensibles et résistantes à la vancomycine [89]. Zhai et Wang, quant à eux, ont conjugué une tetrakis(*p*-aminophényl)porphyrine (**Figure 61b**) à la vancomycine et ont étudié son activité photobactéricide contre six souches de bactéries Gram positif, dont *E. faecalis* résistant à la vancomycine [216]. Le conjugué obtenu a montré une grande sélectivité avec des efficacités d'éradication variables envers toutes les souches Gram positif. En revanche, une bibliothèque d'agents PDT photoactifs polycationiques a été synthétisée par Huang *et coll.* [217], et étonnamment, le conjugué de vancomycine (**Figure 61c**) a démontré la plus faible activité photodynamique parmi tous les PS synthétisés. Cette faible efficacité peut être le résultat d'une affinité de liaison réduite de la vancomycine en raison de la conjugaison de ce PS volumineux polycationique. Une autre explication possible réside dans la perte de planéité dans le système π -conjugué de la sous-unité PS résultant de son attachement à un antibiotique aussi volumineux, ce qui diminue le coefficient d'extinction, et donc l'efficacité de génération d'ERO de la sonde. Par conséquent, cette étude révèle l'importance de la conception du conjugué (PS, antibiotique et espaceur), d'un point de vue chimique, biologique et photophysique, pour obtenir des activités PACT hautement efficaces.

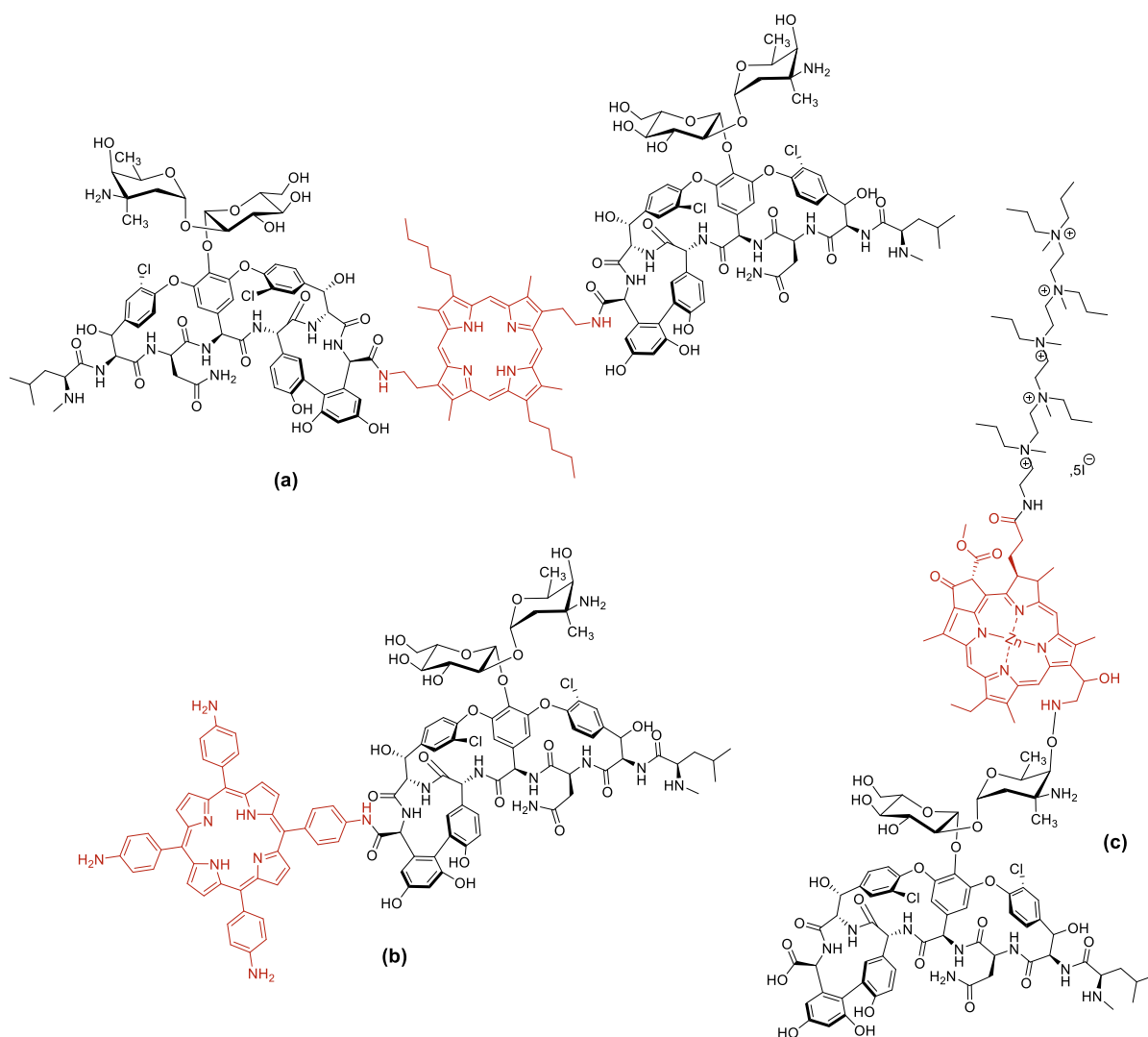


Figure 61 : Exemples de conjugués vancomycine -PS selon (a) : Xing *et coll.* [212] (b) : Zhai et Wang [216] (c) : Huang *et coll.* [217].

La gentamicine est un antibiotique aminoglycoside utilisé pour traiter divers types d'infections bactériennes, en particulier celles provoquées par des bactéries Gram négatif. Au contact de l'agent pathogène, la gentamicine diffuse à travers les porines de la membrane externe et passe dans le cytosol. Son mode d'action est basé sur l'empêchement de l'initiation et de la poursuite de la traduction de la synthèse des protéines en se liant à l'ARN ribosomique 30S et 16S [218]. Nonell *et coll.* ont démontré l'utilisation de la gentamicine comme unité de ciblage dans une stratégie de conjugaison covalente [219] (**Figure 62**). Ils ont couplé la gentamicine au porphycène absorbant la lumière rouge, et le conjugué a montré une éradication significative des souches Gram positif (*S. aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*), même à des concentrations submicromolaires, tandis que les contrôles (PS seul et co-administré avec la gentamicine) n'ont pas eu d'impact significatif sur le taux de survie. Ils ont observé également que la conjugaison de la gentamicine au porphycène hydrophobe augmente sa solubilité dans l'eau, mais elle diminue son activité bactéricide.

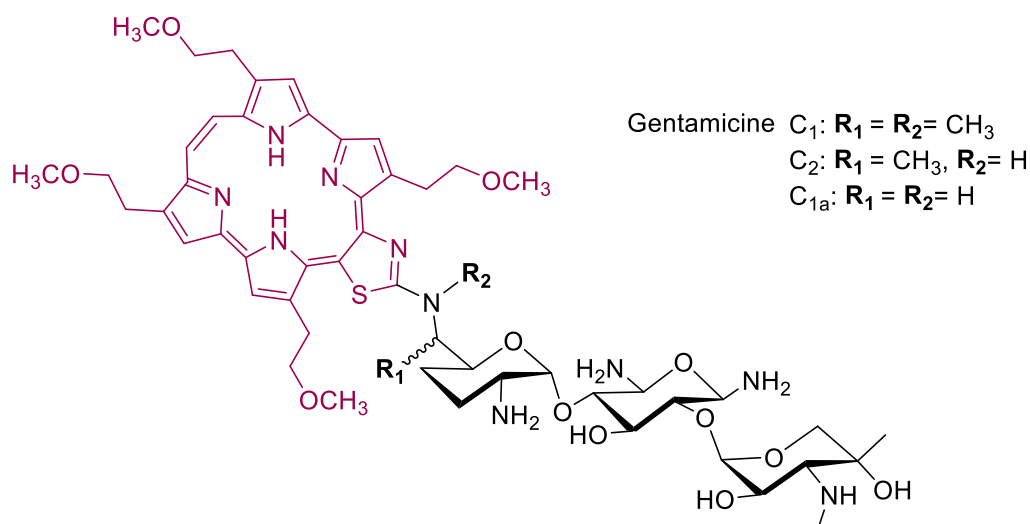


Figure 62 : Structure du conjugué gentamicine - porphycène synthétisé par Nonell *et coll.* [219].

V.3.2. Maltooligosacharides : agents potentiels de ciblage spécifique pour la PACT

Les transporteurs ABC ou transporteurs à cassettes liant l'ATP utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement une grande diversité de molécules à travers les membranes biologiques. Parmi ces transporteurs, on trouve le transporteur de maltose MalFGK2. Ce système MalFGK2 est composé de deux protéines transmembranaires, MalF et MalG, deux copies de la sous-unité ATPase MalK, ainsi qu'une protéine périplasmique de liaison au maltose (MalE) apportant le maltose et d'autres maltodextrines au transporteur, et déclenche son activité ATPase [220]. Chez les bactéries Gram négatif, les MalE sont généralement des protéines solubles situées dans l'espace périplasmique, alors que chez les bactéries Gram positif, ce sont des lipoprotéines attachées à la membrane ou fusionnées aux protéines transmembranaires. Bien que le maltose puisse traverser la membrane externe des bactéries Gram négatif par des porines, les maltodextrines (oligomères de maltose) nécessitent une porine spécifique pour entrer dans le périplasme, appelée maltoporine (LamB). Cette porine forme une structure trimérique qui facilite la diffusion des maltodextrines à travers la membrane [221]. Après avoir pénétré dans le périplasme, le maltose et les maltodextrines sont liés par la MalE périplasmique, qui les amène à la voie d'importation de la membrane interne. La fixation de MalE et du maltose à la surface périplasmique de MalFG entraîne l'hydrolyse de l'ATP par MalK et l'importation du maltose ou de la maltodextrine dans le cytoplasme (**Figure 63**) [222].

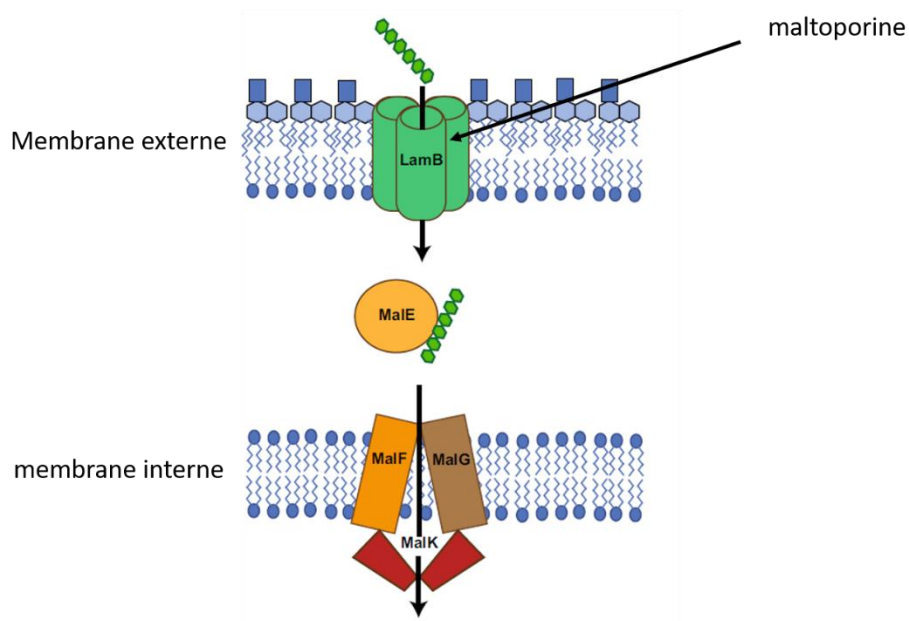


Figure 63 : Modèle de transport de substrat pour MalFGK2 [222]

Les cellules mammaliennes n'expriment pas le transporteur de maltodextrine [223], c'est la raison pour laquelle les dérivés de maltodextrine sont largement utilisés comme agents de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale.

Les sondes d'imagerie à base de maltodextrine (MDS) ont été rapportées pour la première fois en 2011 par Ning *et coll.* [11] pour la détection de bactéries *in vitro* et *in vivo*. Dans ce travail, les colorants fluorescents perylène et IR786 fonctionnalisés par un alcyne ont été couplés à un maltohexaose fonctionnalisé par un azoture à l'extrémité réductrice en utilisant la cycloaddition azoture-alcyne 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I) (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC) (**Figure 64a,b**). Il est avéré que les MDS peuvent s'accumuler spécifiquement et sélectivement dans le site d'infection bactérienne, plutôt que dans les cellules de mammifères ou dans les infections induites par les lipopolysaccharides (LPS). Les résultats de l'expérience ont également confirmé que le mécanisme de ciblage est la voie active du transporteur de maltodextrine-, ce qui est conforme à l'hypothèse précédente. Outre leur capacité à détecter les biofilms bactériens et à distinguer une lésion bactérienne d'une inflammation stérile, les MDS sont également capables de visualiser la microflore d'*E. coli* à partir de 105 unités formant colonies (CFU) *in vivo*, dont la sensibilité est supérieure de deux ordres de grandeur à celle de nombreuses sondes similaires. Ce travail a permis d'éliminer efficacement les interférences et fournit un résultat de diagnostic précis. En 2014, la même équipe de recherche a produit un maltohexaose marqué au ^{18}F (MH ^{18}F) afin de résoudre le problème de la faible pénétration de la lumière dans les tissus (**Figure 64c**). Ce composé est introduit comme traceur de tomographie par émission de positons (TEP) pour le

diagnostic aigu des infections bactériennes [12]. Le MH¹⁸F présente un potentiel prometteur dans l'identification de la résistance bactérienne aux médicaments. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les transporteurs de maltodextrines sont des transporteurs ABC, en d'autres termes, le processus d'internalisation des substrats de maltohexaose, comme le MH¹⁸F, est étroitement lié au métabolisme cellulaire et à la viabilité bactérienne. Les résultats ont montré que le MH¹⁸F pouvait identifier la résistance des bactéries et mesurer l'efficacité de l'antibiothérapie. Ce résultat remarquable indique que MH¹⁸F pourrait être un bon candidat pour guider la sélection des antibiotiques.

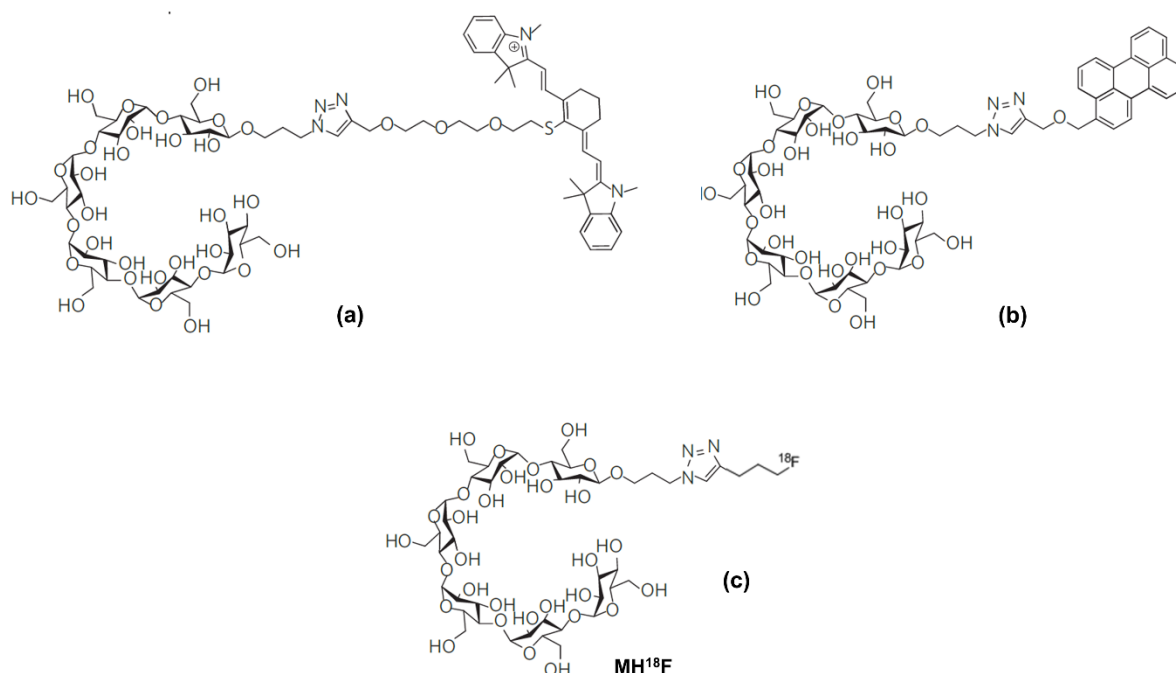


Figure 64 : Les sondes d'imagerie à base de maltodextrine selon Ning *et coll.* [11,12].

En 2019, Pang *et coll.* ont utilisé le maltohexaose dans une stratégie sonothéranostique permettant de marquer spécifiquement les bactéries et de visualiser la thérapie sonodynamique (SDT). En utilisant du cholestérol lié au maltohexaose et des compositions lipidiques sensibles aux bactéries, une plateforme de nanoliposomes intelligents (MLP18) a été développée pour délivrer avec précision la purpurine 18 (un sonosensibilisateur puissant). En exploitant les avantages de la voie de transport de la maltodextrine spécifique aux bactéries, ils ont montré que les MLP18 préparés peuvent cibler spécifiquement le site d'infection bactérienne et distinguer avec précision les foyers d'inflammation stérile ou de cancer grâce à un signal fluorescent/photoacoustique hautement sélectif sur le site infecté par les bactéries chez la souris. De plus, la caractéristique de réponse aux bactéries de MLP18 a activé un relargage et une internalisation efficaces du sonosensibilisateur à haute

concentration dans les cellules bactériennes, ce qui a entraîné une élimination sonodynamique efficace des bactéries MDR [224].

Bien que les maltodextrines se soient révélées efficaces pour cibler spécifiquement les bactéries Gram positif et Gram négatif, leur utilisation en PACT reste très limitée. A notre connaissance il n'existe que deux études qui mettent en évidence l'utilisation des dérivés de maltodextrines en PACT en tant qu'agents de ciblage. L'utilisation d'un conjugué PS-maltohexaose a été publiée pour la première fois en 2016 par Galstyan *et coll.* Les auteurs ont développé une phthalocyanine de silicium (IV) conjuguée à du maltohexaose en tant que sondes ayant à la fois des capacités de marquage fluorescent et de photosensibilisation (**Figure 65**). Le PS conjugué au maltohexaose fournit une double lecture permettant de distinguer les deux groupes d'agents pathogènes, car seule la souche Gram positif a été inactivée, même si les deux ont été marquées par une luminescence dans le proche infrarouge. La résistance aux antibiotiques n'a pas limité l'effet phototoxique, puisque *S. aureus* résistant à la méthicilline a été complètement photo-inactivé [225].

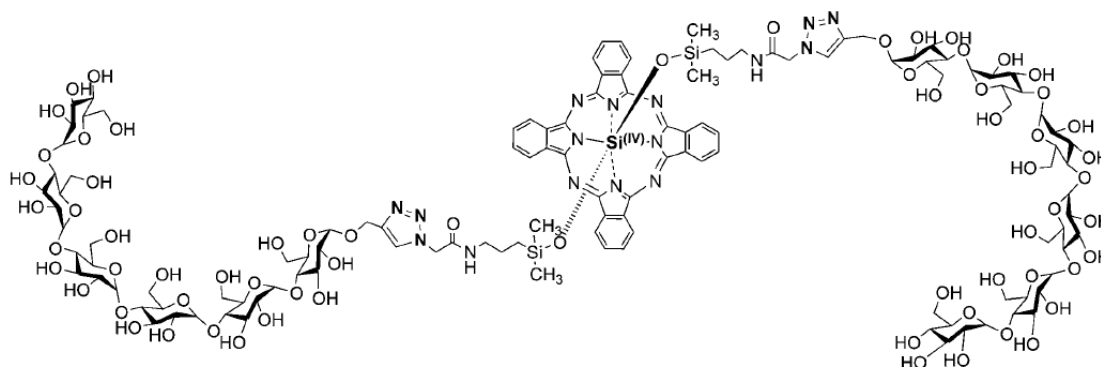


Figure 65 : Structure du conjugué phthalocyanine de silicium (IV) - maltohexaose synthétisé par Galstyan *et coll.* [225].

En 2019, Tang *et coll.* ont développé des nano-agents multifonctionnels qui peuvent potentiellement être utilisés pour l'imagerie et le traitement des infections causées par divers pathogènes bactériens. Les nano-agents sont constitués de nanoparticules de silicium fluorescentes (SiNPs) fonctionnalisées avec un polymère de glucose (mélange d'oligo et polysaccharides comme le poly[4-O-(α -D-glucopyranosyl)-D-glucopyranose]) et chargées de chlorure-e6 (Ce6) (**Figure 66**). Ces nano-agents sont rapidement internalisés dans les bactéries Gram positif et Gram négatif par un mécanisme dépendant des transporteurs de maltodextrine. Les nano-agents peuvent être utilisés pour l'imagerie des bactéries en suivant la fluorescence verte des SiNPs et la fluorescence rouge du Ce6, permettant la détection *in vivo* de seulement 105 unités formant des colonies (UFC). En plus les nano-agents présentent

des efficacités photoantibactériennes *in vivo* de 98 % vis-à-vis de *S. aureus* et de 96 % vis-à-vis de *P. aeruginosa* sous une irradiation lumineuse de 660 nm [226].

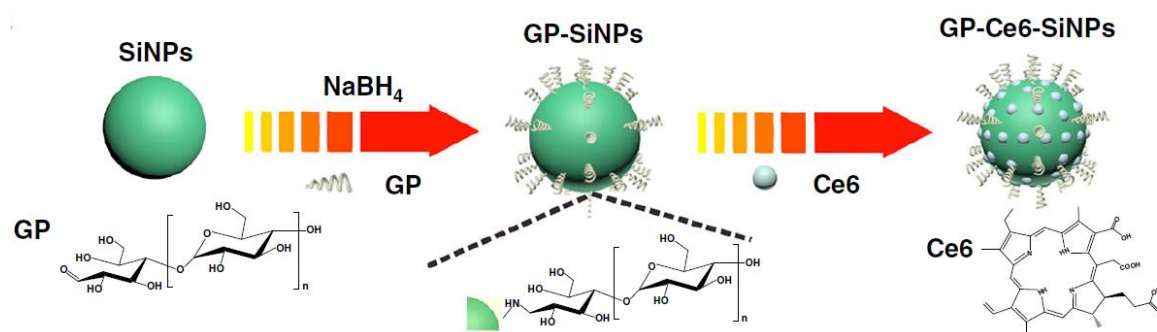


Figure 66 : les nanoagents multifonctionnels pour la détection et le traitement photodynamique des infections bactériennes [226].

Objectif du travail

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour objectif d'optimiser la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne et de surmonter certains problèmes des porphyrines en tant que photosensibilisateurs très étudiés dans la PACT, mais qui souffrent d'une faible solubilité dans l'eau, d'auto-quenching et d'un manque de sélectivité contre les cellules bactériennes.

Dans la continuité des travaux effectués au sein de notre laboratoire, la synthèse et l'évaluation biologique de photosensibilisateurs et de biomatériaux pour des applications en PACT [3,205,227,228], nous nous sommes intéressés à deux stratégies pour l'optimisation de cette thérapie. La première consiste à coupler une porphyrine à des dérivés de maltodextrines utilisés récemment comme agent de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale [11,12,229], afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis des cellules bactériennes. Pour ce faire, nous avons synthétisé deux conjugués, composé d'une *meso*-porphyrine reliée par une chaîne tétraéthylène glycol avec un maltooligosaccharide (maltohexaose ou maltotriose) (**Figure 67**).

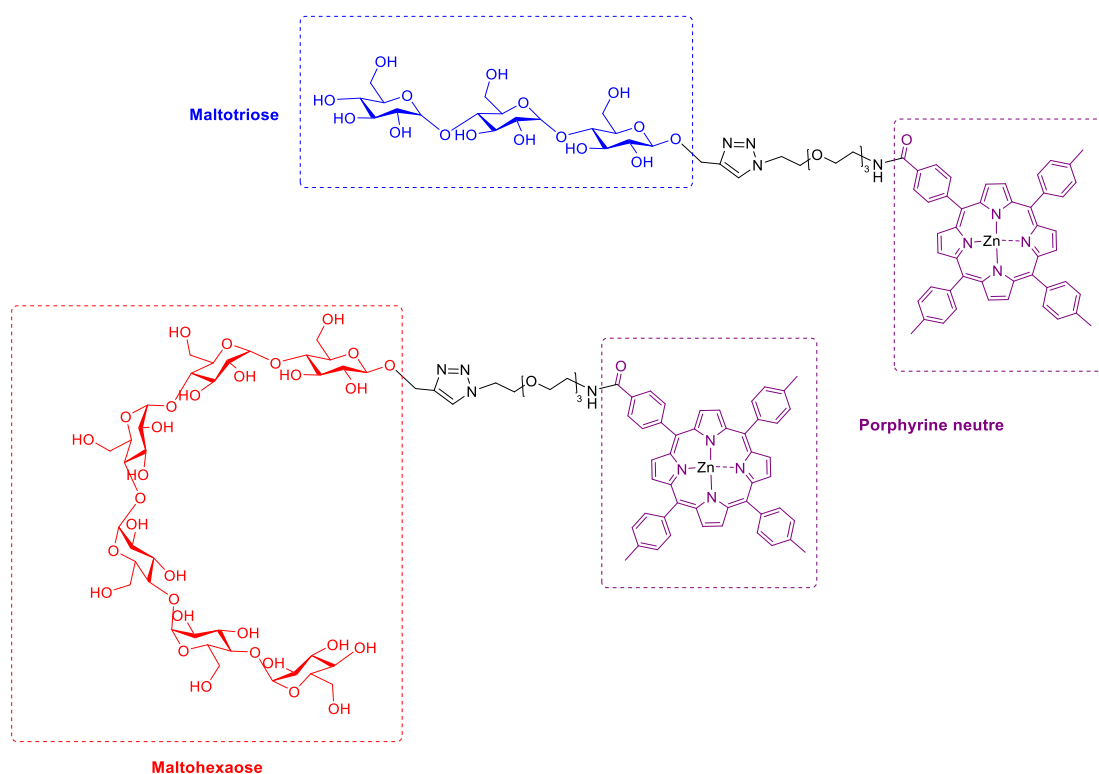


Figure 67 : Structures chimiques des conjugués porphyrine-maltooligosaccharide obtenus au cours de ce travail.

La deuxième stratégie vise à incorporer des porphyrines dans des hydrogels à base de xylane. Pour cela, trois voies sont explorées (**Figure 68**) : dans une première approche, l'hydrogel a été synthétisé d'abord par réticulation de xylane avant de le charger par une porphyrine cationique. Dans la deuxième stratégie, les porphyrines sont fixées d'abord par liaisons

covalentes sur le xylane, puis les hydrogels sont obtenus à partir de ces xylanes fonctionnalisés par un agent de réticulation. Dans la troisième méthode, l'hydrogel est obtenu directement par une réticulation directe du xylane par les porphyrines.

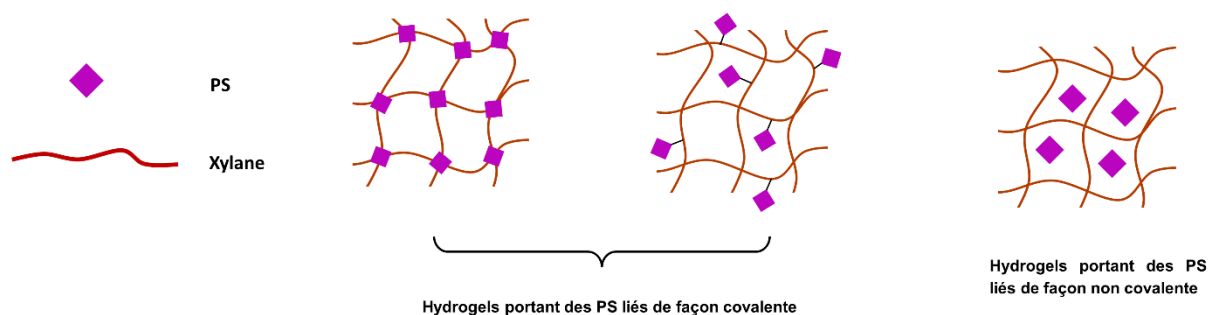


Figure 68 : Les hydrogels à base de xylane portant des PS élaborés au cours de ce travail.

Pour compléter ce travail, ces nouveaux produits sont évalués par des tests biologiques *in vitro* vis-à-vis des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif.

Chapitre II.

Optimisation de la PACT par couplage des PS avec des maltooligosaccharides

Chapitre II. Optimisation de la PACT par couplage des PS avec des maltooligosaccharides

I. Introduction

En s'inspirant des travaux cités précédemment sur l'utilisation des maltooligosaccharides comme agents de ciblage, nous souhaitons greffer chimiquement un dérivé de maltodextrine sur une porphyrine neutre. L'objectif était d'associer l'effet photosensibilisant de la porphyrine et la capacité de ciblage des maltooligosaccharides afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis des cellules bactériennes. Pour ce faire, nous avons choisi la 5-(*p*-carboxyphényl)tritolyldiporphyrine en tant que porphyrine neutre connue pour sa faible efficacité antibactérienne qui va être conjuguée avec les deux maltooligosaccharides les plus utilisés pour le ciblage bactérien (maltohexaose ou maltotriose).

II. Stratégie de synthèse

Nous avons choisi de d'utiliser le concept de "Click-Chemistry" pour la synthèse des conjugués porphyrine-maltooligosaccharide **(12)** et **(13)** qui nécessite la préparation d'un précurseur acétylénique (Maltooligosaccharide) et d'un précurseur azoturé (porphyrine). Ainsi, une méso-tritolyldiporphyrine métallée porteuse d'un bras espaceur azoturé **(6)** est obtenue par métallation au zinc de la porphyrine base libre **(5)** correspondante. Cette dernière est le résultat d'un couplage peptidique de 5-(*p*-carboxyphényl)tritolyldiporphyrine **(1)**, obtenue par condensation du 4-carboxybenzaldéhyde, du *p*-tolualdéhyde et du pyrrole selon la méthode des aldéhydes mixtes et l'espaceur amino-azoturé **(4)** obtenu à partir d'une chaîne tétraéthylène glycol en trois étapes : une méthylation, une azoturation puis une réduction. Les maltooligosaccharides porteurs d'un alcyne terminal **(8)** et **(9)**, quant à eux, sont obtenus par une propargylation directe du maltotriose peracétylé et du maltohexaose peracétylé (**Figure 69**).

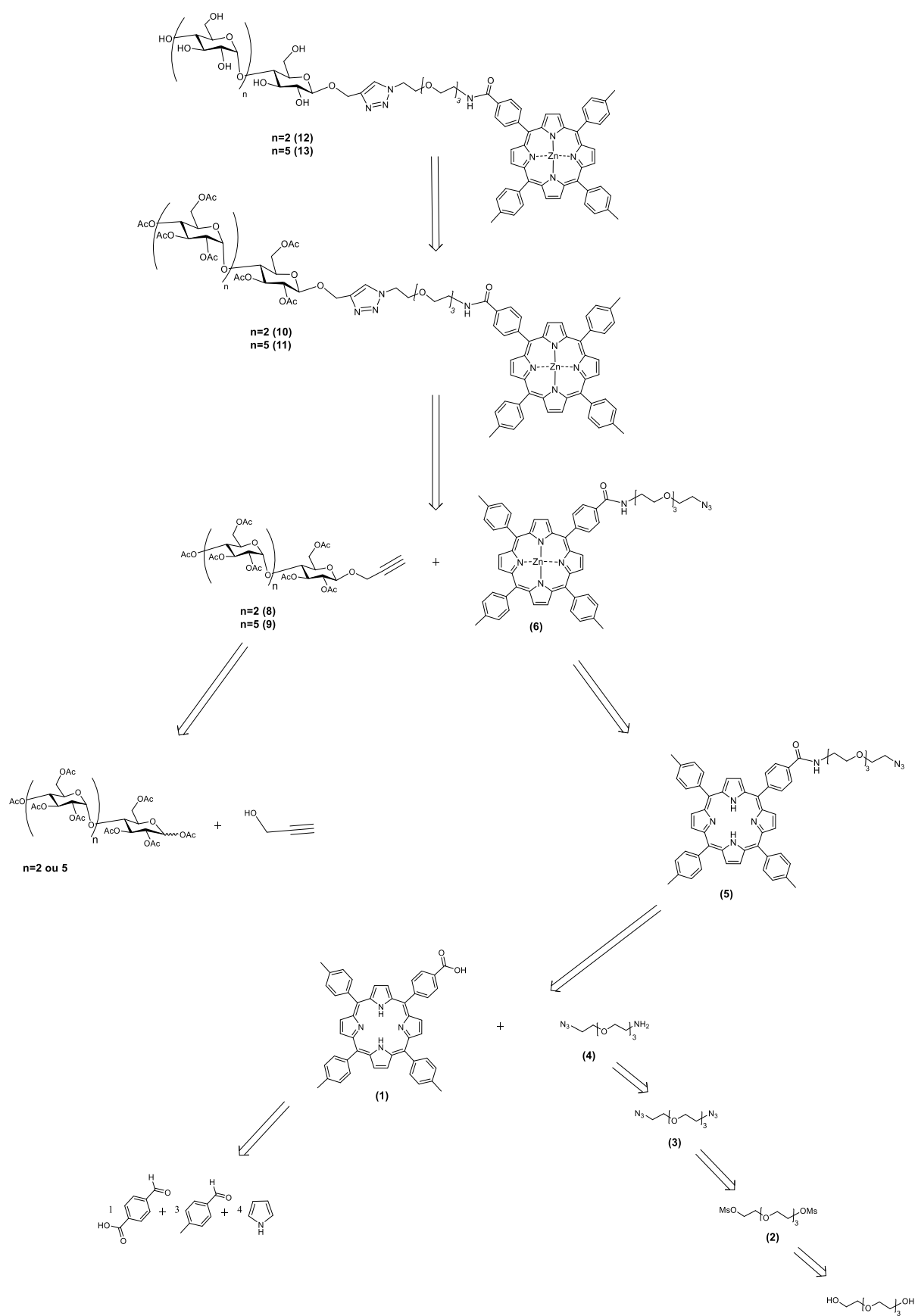


Figure 69 : Schéma rétrosynthétique des conjugués porphyrine-maltooligosaccharide **(12)** et **(13)** obtenus

III. Synthèse des précurseurs

III.1. Synthèse de la 5-(*p*-carboxyphényl)tritolylporphyrine

Nous avons choisi pour cette synthèse la méthode des « aldéhydes mixtes » décrite par Little en 1975 [161] présentée en détail au chapitre II. Elle est bien adaptée à la synthèse des méso-tritolylporphyrines mono-fonctionnalisées qui cristallisent dans le milieu en fin de réaction (**Figure 70**).

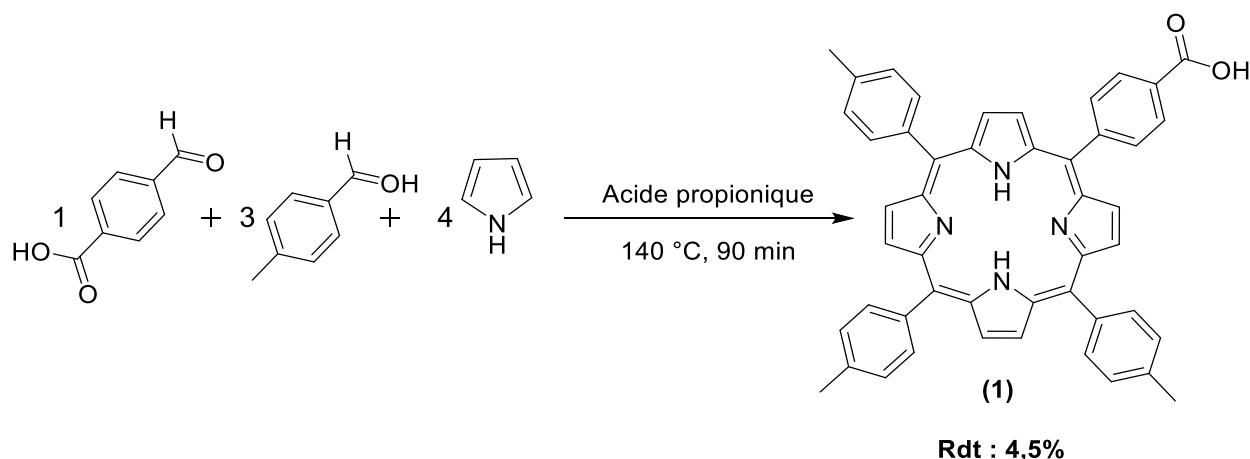


Figure 70 : Synthèse de la 5-(*p*-carboxyphényl)-tritolylporphyrine (**1**) par la méthode des aldéhydes mixtes.

Cette méthode consiste à condenser, au reflux de l'acide propionique qui joue le rôle de solvant et de catalyseur, des quantités stœchiométriques de pyrrole fraîchement distillé, de *p*-tolualdéhyde et de *p*-carboxybenzaldéhyde. La porphyrine monocarboxylée (**1**) cristallise après une nuit à 4 °C, en même temps que d'autres produits qui sont essentiellement la tétratolylporphyrine et des porphyrines di- et tri-carboxylées. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, la porphyrine (**1**) est obtenue avec un rendement de 4,5%. Ce rendement, certes modeste, reste néanmoins conforme à celui attendu pour ce type de réaction et s'explique par la formation des autres *meso*-porphyrines et par la polymérisation concomitante du pyrrole.

La structure de la porphyrine (**1**) est confirmée par spectroscopie RMN ^1H , UV-Visible et spectrométrie de masse. Le spectre RMN ^1H présente deux signaux correspondant aux protons β -pyrroliques résonnant à 8,86 ppm (m, 6H) et à 8,77 ppm (d, 2H) sont caractéristiques d'une porphyrine mono-substituée. Pour les protons aryles, les couples $\text{H}_{2,6}$ résonnent à 8,48 ppm, moins blindés que ceux $\text{H}_{3,5}$ résonnant à 8,33 ppm subissant fortement l'effet attracteur du groupement carboxyle. Les protons des toyles, quant à eux, présentent deux types de signaux avec les couples $\text{H}_{2,6}$ et $\text{H}_{3,5}$ résonnant respectivement à 8,09 ppm et 7,56 ppm. De

plus, la présence d'un signal à -2,76 ppm, fortement blindé confirme que cette porphyrine est bien sous sa forme base libre. Le spectre d'absorption UV-Visible présente le profil attendu pour une porphyrine base libre. Il correspond au type *etio* avec la bande de Soret à 420 nm et les quatre bandes Q situées vers 518, 553, 592 et 649 nm. Ces résultats sont confirmés par spectrométrie de masse ($m/z = 701,2914 [M+H]^+$).

III.2. Synthèse du bras espaceur amino-azoturé (4)

En s'appuyant sur les travaux réalisés dans notre laboratoire [230], nous avons envisagé la synthèse du 1-amino-11-azoturo-trioxaundécane, un bras espaceur linéaire, stable, flexible et hydrophile. Son extrémité aminée permet d'établir une liaison amide avec la fonction acide carboxylique de la porphyrine **(1)**, et l'extrémité azoture permet de former un triazole 1,4-disubstitué par réaction de « click-chemistry ». Ce composé a été synthétisé en trois étapes (**Figure 71**). Dans un premier temps, les alcools aux extrémités de la chaîne tétraéthylène glycol sont converties en groupements azotés, ce qui est l'objet des réactions de mésylation et d'azoturation. C'est au cours de la dernière étape que la molécule est désymétrisée par une réduction partielle de la chaîne diazoturée.

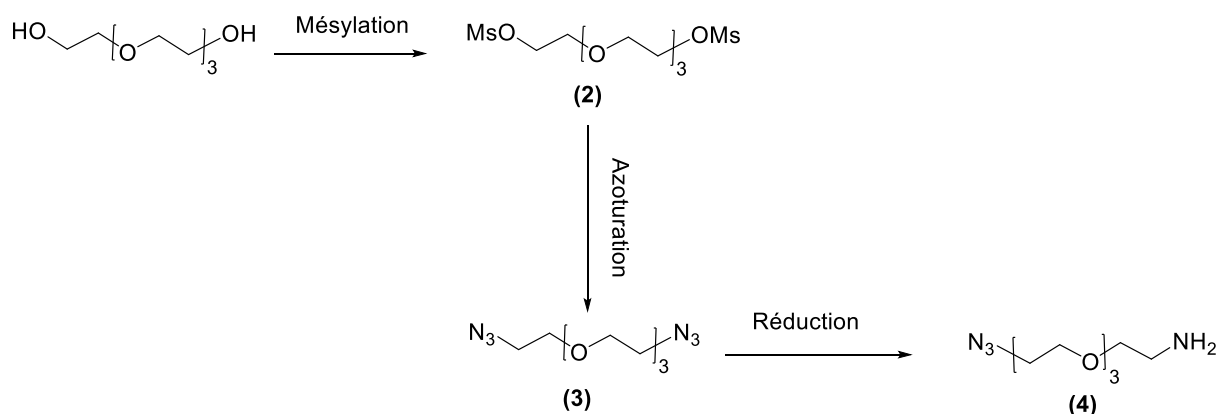


Figure 71 : Schéma général de la synthèse du composé **(4)**

III.2.1. Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane (2)

Les alcools primaires ont été convertis en mésylates par le traitement à froid du tétraéthylène glycol avec du chlorure de méthanesulfonyle en présence de triéthylamine (**Figure 72**).

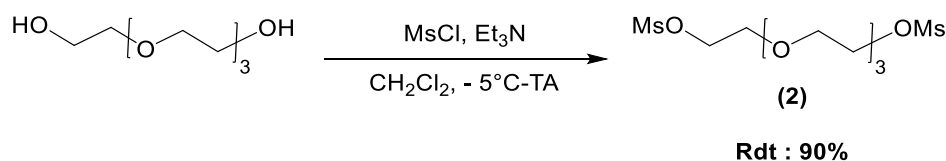


Figure 72 : Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane **(2)**

Le composé **(2)** est alors obtenu avec un rendement de 90%. Les analyses RMN ^1H et ^{13}C ont confirmé sa structure, ainsi que la spectrométrie de masse.

III.2.2. Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundécane **(3)**

La substitution des groupements mésylate par des azotures a été réalisée par chauffage du composé **(2)** dans un mélange éthanol/diméthylacétamide 4 : 1 en présence d'un excès d'azoture de sodium (**Figure 73**).

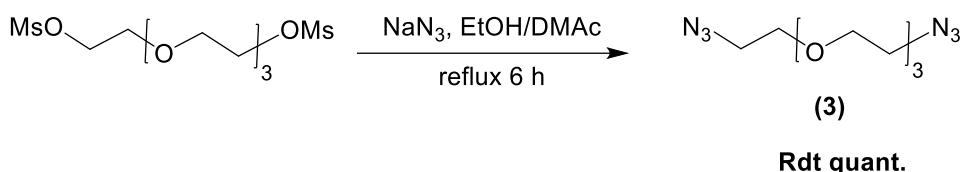


Figure 73 : Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundécane **(3)**

Le diazoture **(3)** est obtenu, après purification sur colonne de silice, avec un rendement quantitatif. La structure du produit attendu est confirmée par RMN (^1H et ^{13}C) et spectrométrie de masse.

III.2.3. Synthèse du 1-amino-11-azoturo- 3,6,9-trioxaundécane **(4)**

La réduction de l'azoture en amine est réalisée en utilisant la réaction de Staudinger [231]. L'obtention du produit monoaminé est contrôlée par l'addition progressive d'une quantité totale de triphénylphosphine (PPh_3) correspondant à 0,5 équivalent de phosphine par azoture. Ce contrôle statistique est renforcé par l'usage d'un mélange biphasique (**Figure 74**). Dès sa formation, l'amine se protone et migre dans la phase aqueuse acide, préservant ainsi le produit attendu de toute nouvelle réduction puisque PPh_3 et OPPh_3 , très hydrophobes, restent dans la phase étherée. En fin de réaction, la phase aqueuse recueillie est basifiée et extraite pour fournir, après purification sur colonne de silice, le composé **(4)** avec un rendement de 65%.

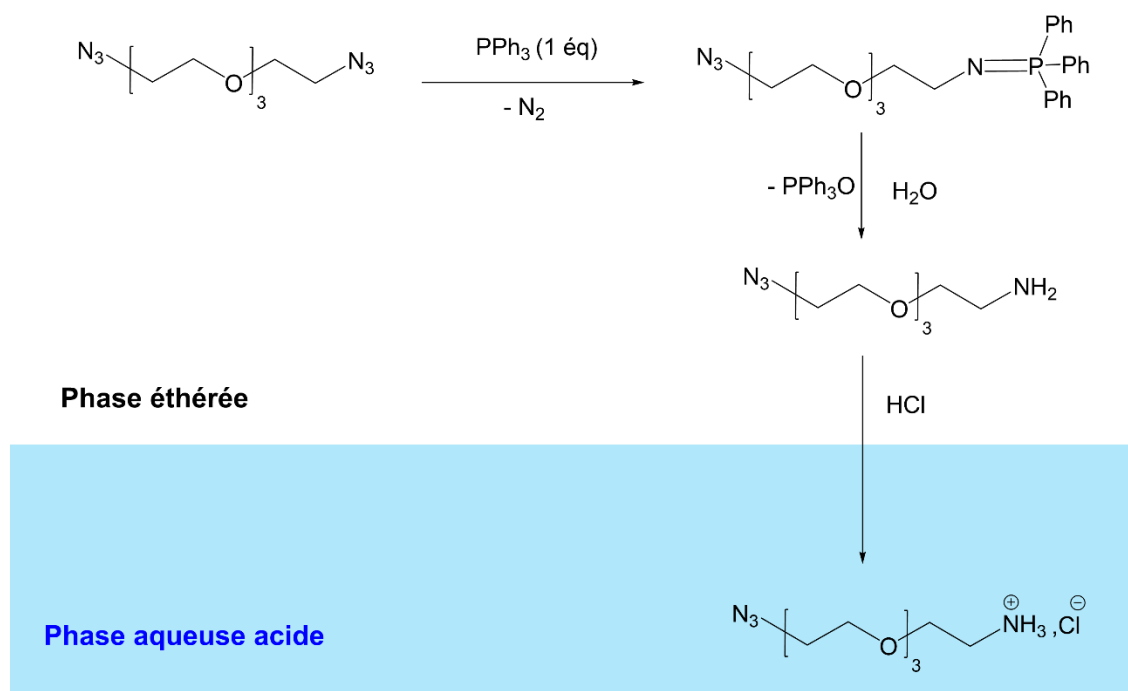


Figure 74 : Réduction de Staudinger réalisée en milieu biphasique.

La structure du composé **(4)** a été caractérisée par spectroscopie de RMN. Le spectre de RMN du proton montre la présence des protons ($\text{CH}_2\text{-N}_3$) et ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$) qui résonnent en deux signaux sous la forme de triplets à 3,40 et 2,89 ppm. Le spectre de RMN du carbone indique la présence de deux signaux à 50,73 et 41,60 ppm correspondant aux deux carbones qui portent ces protons. La spectrométrie de masse confirme la structure ($m/z = 219,1452 [\text{M}+\text{H}]^+$).

III.3. Synthèse de la porphyrine porteuse du bras espaceur (5)

La fixation du bras espaceur **(4)** sur la porphyrine **(1)** a été réalisée en s'appuyant sur des réactifs utilisés en synthèse peptidique. L'activation de la fonction acide carboxylique de la porphyrine est réalisée en présence du N,N-diméthylaminopropyléthylcarbodiimide (EDC) qui est un carbodiimide hydrosoluble, tout comme le dérivé d'urée qui est le sous-produit de la réaction. Nous avons choisi de l'utiliser en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS) qui est un catalyseur hydrosoluble dans le but de former un système couplant efficace et pouvant être éliminé en fin de réaction par de simples lavages à l'eau. Le couplage est réalisé dans le chloroforme anhydre, à température ambiante, avec un rendement de 74% (**Figure 75**).

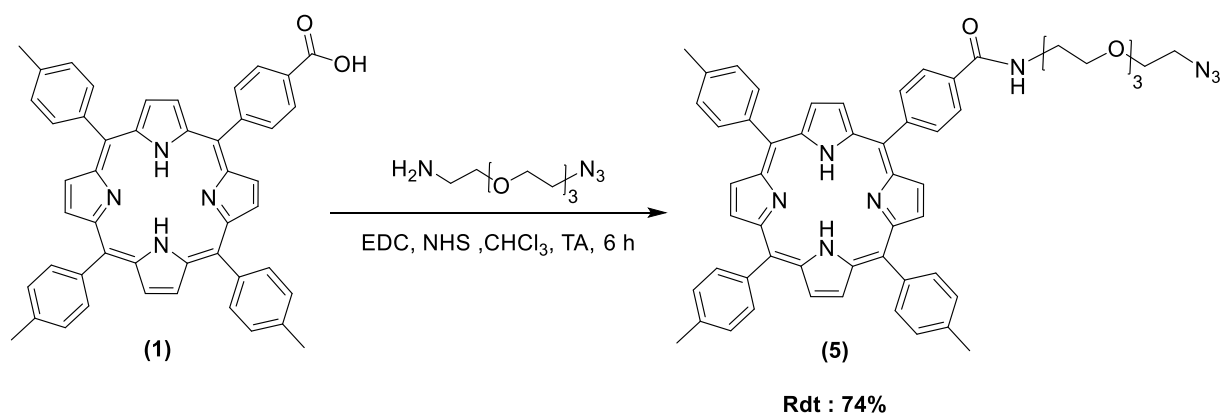


Figure 75 : Synthèse du composé **(5)** par couplage peptidique

La structure de la porphyrine **(5)** est confirmée par spectroscopie RMN, UV-Visible et spectrométrie de masse. L'analyse du spectre de RMN ¹H (**Figure 76**) comme attendu montre la présence des 8 protons β-pyrroliques résonnant sous la forme d'un multiplet à 8,86 ppm pour H_{3,7,8,12,13} et 17 et sous la forme d'un doublet à 8,77 ppm pour H₂ et 18, (*J* = 4,6 Hz). Les doublets observés à 8,28 ppm et 8,18 ppm (*J* = 8 Hz) correspondent respectivement aux protons aryliques H_{2,6} et H_{3,5}. Les protons H_{2,6} et H_{3,5} des tolyles apparaissent respectivement sous forme de doublets à 8,01 ppm et 7,55 ppm (*J* = 7,8 Hz). Les protons portés par l'espaceur résonnent sous la forme de multiplets, entre 3,67 et 3,86 ppm pour les protons H_{a,b,c,d} et e, tandis que les protons H_g et H_h résonnent sous forme de triplets à 3,64 ppm (*J* = 5,1 Hz) et 3,33 ppm (*J* = 5,0 Hz) respectivement. On observe également les protons méthyliques, portés par les tolyles, résonnant sous la forme de singulets, à 2,70 ppm et un singulet à -2,77 ppm et correspondant aux NH pyrroliques.

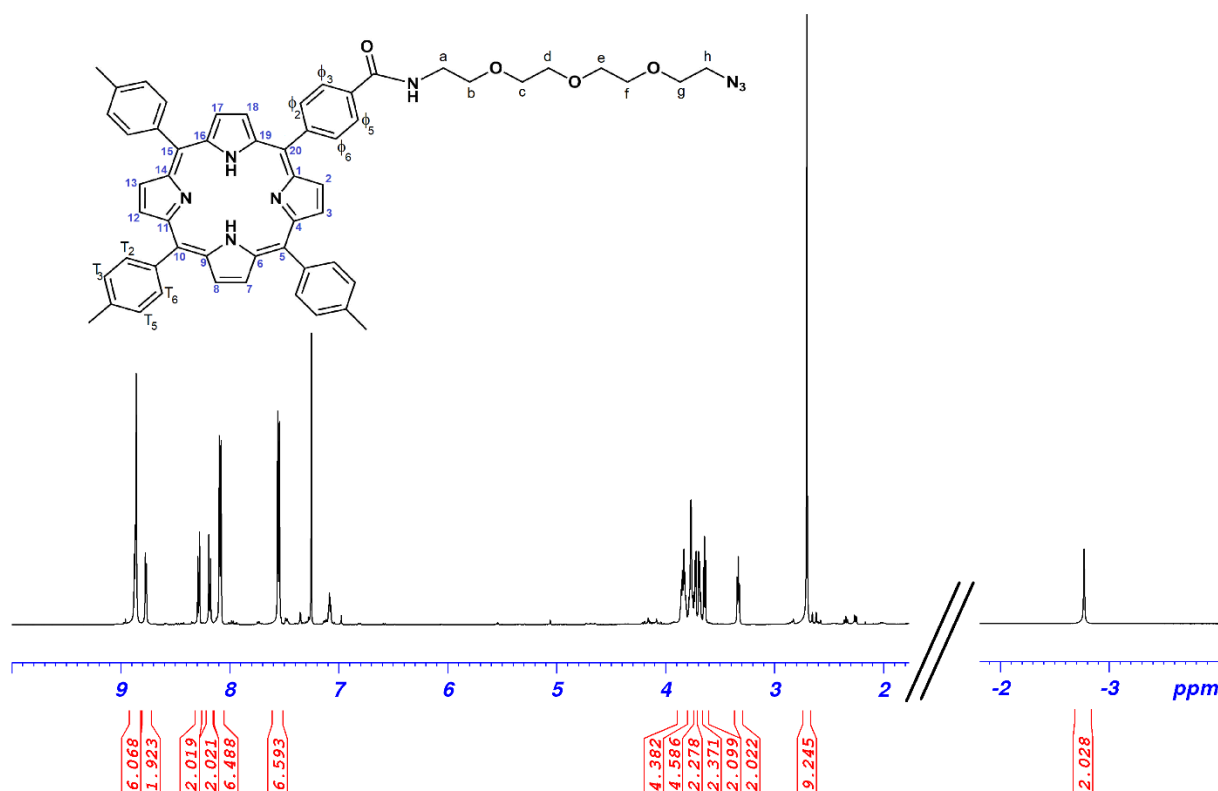


Figure 76 : Spectre RMN ^1H de la porphyrine **(5)** dans CDCl_3 .

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe, en plus des signaux caractéristiques des mésoporphyrines (voir partie expérimentale), un signal fortement déblindé à 167,64 ppm correspondant au carbone de la fonction amide, deux signaux à 60,67 et 40,02 ppm correspondants respectivement aux carbones C_h et C_a et six signaux correspondant aux autres carbones portés par le bras espaceur ($\text{C}_{b,c,d,e}$ et f) qui résonnent à 70,78, 70,66, 70,40, 70,29, 70,09 et 69,97 ppm. Le spectre d'absorption UV-Visible est similaire à celui de la porphyrine **(1)**, avec une bande de Soret à 420 nm et quatre bandes Q I, II, III, et IV respectivement à 648, 592, 552 et 517 nm. La spectrométrie de masse montre la présence du pic quasi-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ attendu ($m/z = 901,4184$).

III.4. Métallation de la porphyrine **(5)**

La métallation de la porphyrine **(5)** par du zinc a pour but de la protéger d'une éventuelle métallation parasite par d'autres métaux employés au cours des réactions suivantes tels que le cuivre. En effet, l'incorporation de tels métaux dans les porphyrines empêche la formation de l'oxygène singulet et limite ainsi l'utilisation des photosensibilisateurs en PACT [232].

La porphyrine **(5)** est mise en présence d'un excès d'acétate de zinc dans le THF à reflux durant 2 heures (**Figure 77**).

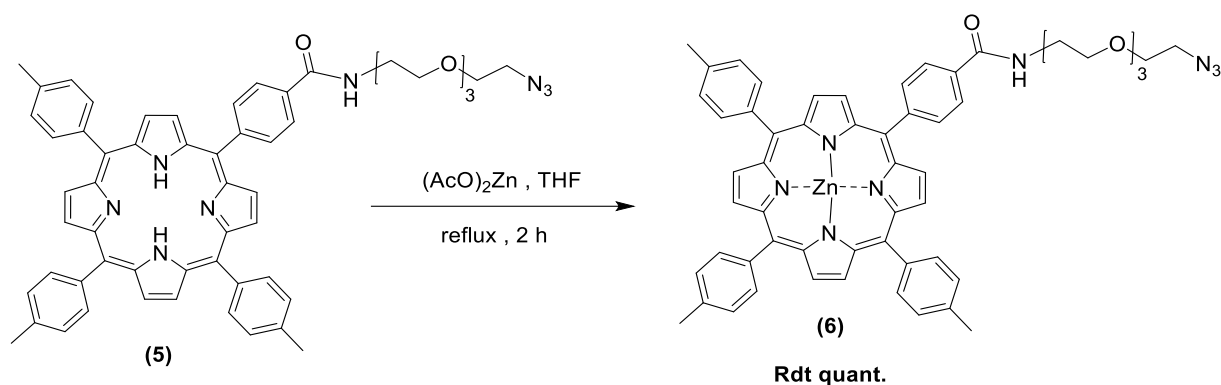


Figure 77 : Métallation de la porphyrine **(5)** avec le diacétate de Zinc

Le produit souhaité **(6)** est obtenu avec un rendement quantitatif. La métallation a été confirmée la disparition des bandes Q_{IV} et Q_I sur le spectre d'absorption UV-Visible (**Figure 78**), et la disparition du signal très blindé de proton NH-interne (-2,77 ppm) sur le spectre RMN ^1H . L'analyse par spectrométrie de masse confirme la masse exacte du produit.

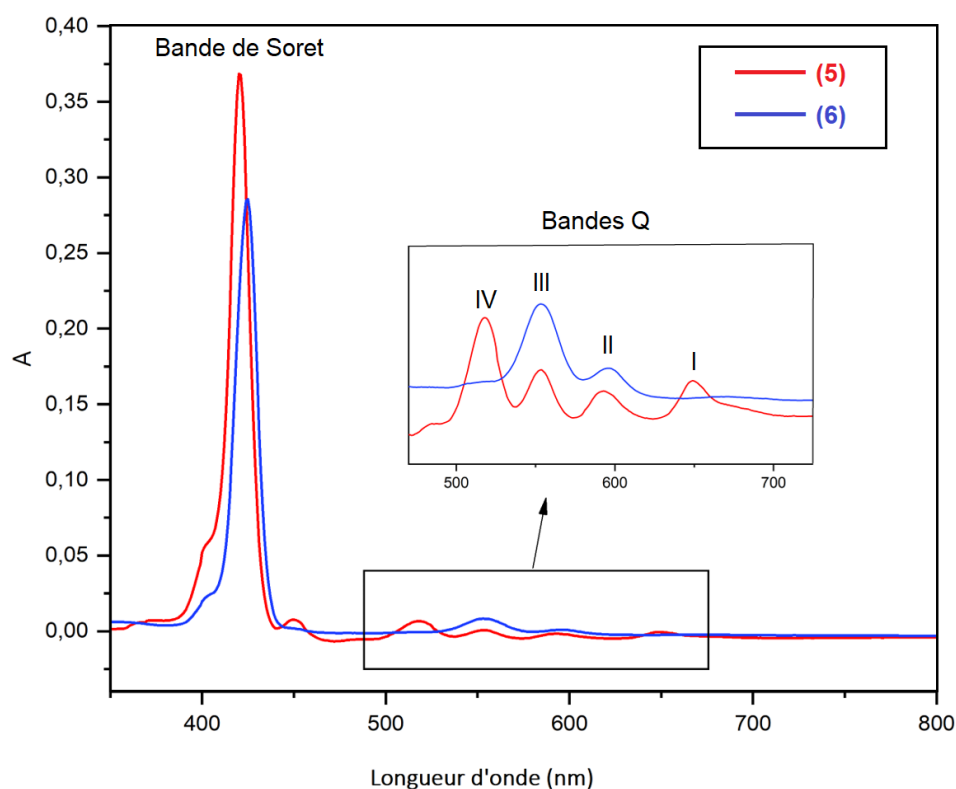


Figure 78 : Spectres UV-Visible de la porphyrine **(5)** (rouge) et de la métalloporphyrine **(6)** (bleu).

III.5. Propargylation du maltooligosaccharide

Parmi les nombreuses méthodes de glycosylation décrites dans la littérature [233], nous avons choisi d'utiliser celle de Magnusson *et coll* [234]. Cette réaction de glycosylation se fait sur des

glucides peracétylés en présence d'alcool est d'un activateur, le diéthérate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$).

Nous avons utilisé pour cette réaction un maltohexaose peracétylé commercial qui est moins cher que le maltohexaose non acétylé, mais ce n'est pas le cas pour le maltotriose, donc il est nécessaire dans une première étape d'acétyler le maltotriose.

III.5.1. Acétylation du maltotriose

La peracétylation du maltotriose est réalisée dans la pyridine anhydre en présence d'anhydride acétique et de 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) à température ambiante pendant 18 h (**Figure 79**).

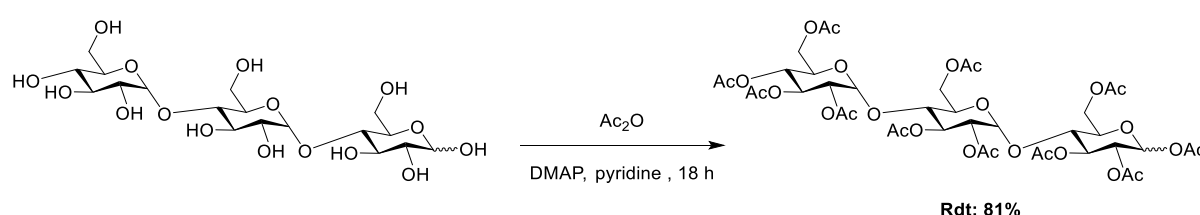


Figure 79 : La peracétylation du maltotriose

La réaction est ensuite traitée et le produit purifié par chromatographie sur colonne de silice. Le maltotriose peracétylé est isolé avec un rendement de 81% sous la forme d'un mélange équimolaire d'anomères ($\alpha/\beta = 1$ estimé par RMN ^1H). Les analyses IR, RMN (^1H et ^{13}C) et la spectrométrie de masse (HRMS) ont confirmé la structure du composé (**7**).

III.5.2. Propargylation des maltooligosaccharides

La substitution de l'acétyle anomérique de deux maltooligosaccharides par l'alcool propargylique est effectuée en une seule étape (**Figure 80**).

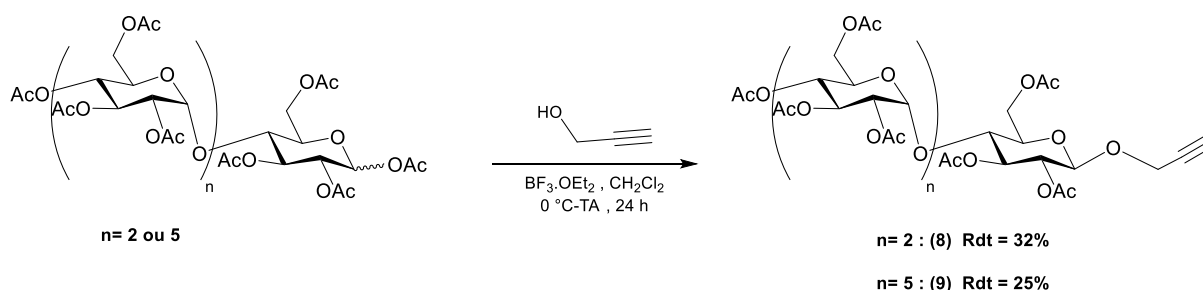


Figure 80 : Propargylation du maltooligosaccharides

L'alcool propargylique est ainsi mis à réagir dans le dichlorométhane anhydre en milieu inerte, avec les maltooligosaccharides peracétylés en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Après 24 h de réaction,

le brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice. Les composés **(8)** et **(9)** sont obtenus avec des rendements respectifs de 32% et 25%. Cette approche est plus simple et rapide que la méthode de préparation généralement décrite dans la littérature. Par exemple Galstyan *et coll.* ont obtenu le maltohexaose propargylé en trois étapes, également à partir du maltohexaose peracétylé, avec un rendement global de 19% [225].

L'analyse par spectrométrie IR du composé **(8)** et **(9)** montre l'apparition d'un pic vers 3280 cm^{-1} correspondant à la vibration de C-H alcyne et un pic vers 2260 cm^{-1} correspondant à la vibration de $\text{C}\equiv\text{C}$. Les spectres RMN ^1H met en évidence la présence du proton propargylique qui apparaît sous la forme d'un triplet à 2,48 ppm ($J = 2,3\text{ Hz}$) et l'analyse par spectrométrie de masse confirme les structures des composés **(8)** et **(9)**. Les spectres RMN ^{13}C , quant à eux, confirment l'obtention de l'anomère β . Sur le spectre RMN ^{13}C , on voit le signal à 97,6 ppm correspondant au carbone β anomérique et les signaux correspondant aux carbones propargyliques, à savoir 78,1 (-CCH), 75,5 (-CCH) et 55,8 ppm (-CH₂-CC).

Cette stéréosélectivité pourrait être expliquée par le type de groupe protecteur utilisé en position 2 du sucre. Un groupe participant, typiquement un groupe carboxyle, entraînera principalement la formation d'un β -glycoside. Tandis qu'un groupe non participant, un groupe habituellement sans groupe carboxyle, aboutira souvent à un α -glycoside.

La présence d'un groupe protecteur acétyle en position 2 permet la formation d'un ion acétoxonium intermédiaire qui bloque l'attaque de la face inférieure du cycle, permettant ainsi la formation d'un β -glycoside de façon prédominante (**Figure 81**).

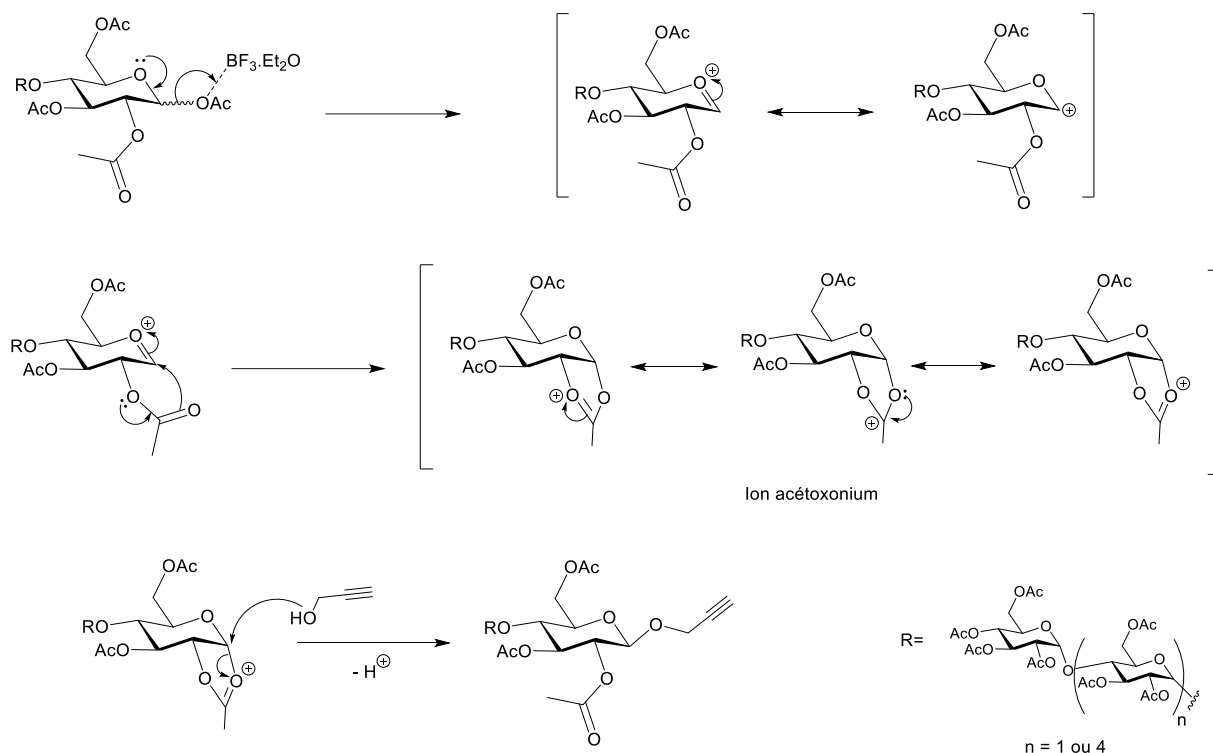


Figure 81 : Mécanisme de propargylation des maltooligosaccharides

IV. Couplages des précurseurs finaux

Après la fixation du bras espaceur sur le photosensibilisateur (synthèses de **6**) l'étape de synthèse consiste à greffer le troisième bloc moléculaire (maltooligosaccharide **7** ou **8**) sur notre porphyrine par la CuAAC.

IV.1. Couplage de la porphyrine (**6**) sur les maltooligosaccharides propargylés (**8**) et (**9**) par réaction de CuAAC

La CuAAC est peut-être l'exemple le plus connu de Click-Chemistry (chimie clic), un concept développé au début des années 2000 pour regrouper un certain nombre de réaction à la cinétique rapide, facile à mettre en œuvre, économe en atome, ne générant que peu de sous-produits, et dont le produit peut être isolé facilement sans méthode de purification lourde.

En utilisant la CuAAC, nous avons établi un lien covalent par engagement de l'azoture du composé (**6**) et l'alcyne terminal des maltooligosaccharides propargylés (**8**) et (**9**) dans une cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par l'ion de cuivre (I). Ainsi, l'hétérocycle 1,2,3-triazole relie le bras tétraéthylène glycol et le sucre, respectivement fixés sur ses positions 1 et 4 (**Figure 82**).

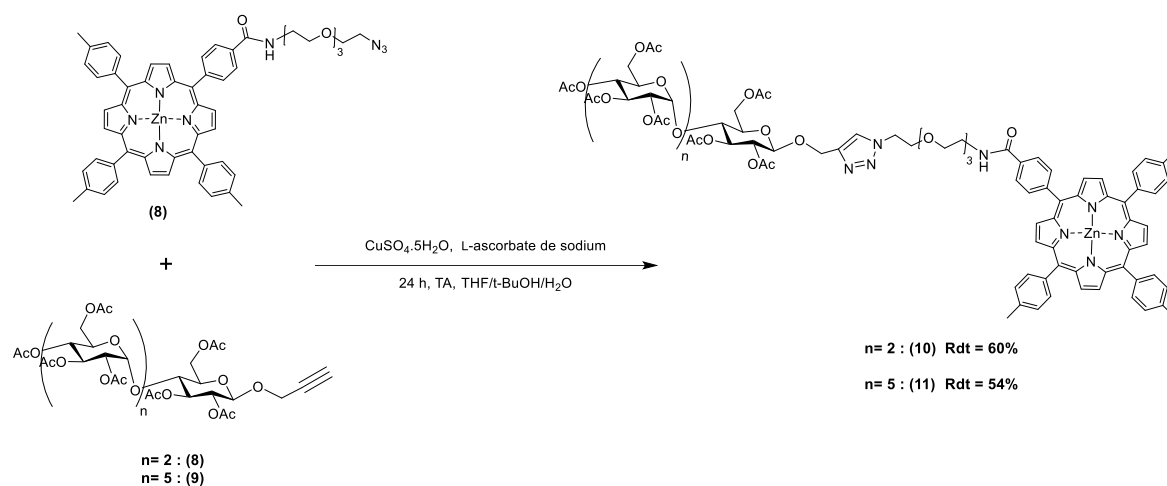


Figure 82 : Synthèse des composés (10) et (11) par CuAAC

La réaction est réalisée dans un mélange aqueux de co-solvants polaires (THF/ tBuOH /eau). Le cation Cu (I) est formé *in situ* par le système CuSO₄ / L-Ascorbate de sodium. Ainsi, après 24 h de réaction à température ambiante puis purification sur plaques préparatives de silice, les produits **(10)** et **(11)** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 60% et 54%.

L'analyse par spectroscopie IR des produits obtenus montre la disparition quasi-totale des bandes caractéristiques des groupements propargyle et azoture. La **Figure 83** montre l'exemple du spectre IR du conjugué porphyrine-maltohexaose **(11)**. En comparaison avec les spectres des composés **(6)** et **(9)**, on observe la disparition des bandes caractéristique du groupement propargyle à 3280 et 2260 cm⁻¹, ainsi que celle du groupement azoture à 2100 cm⁻¹.

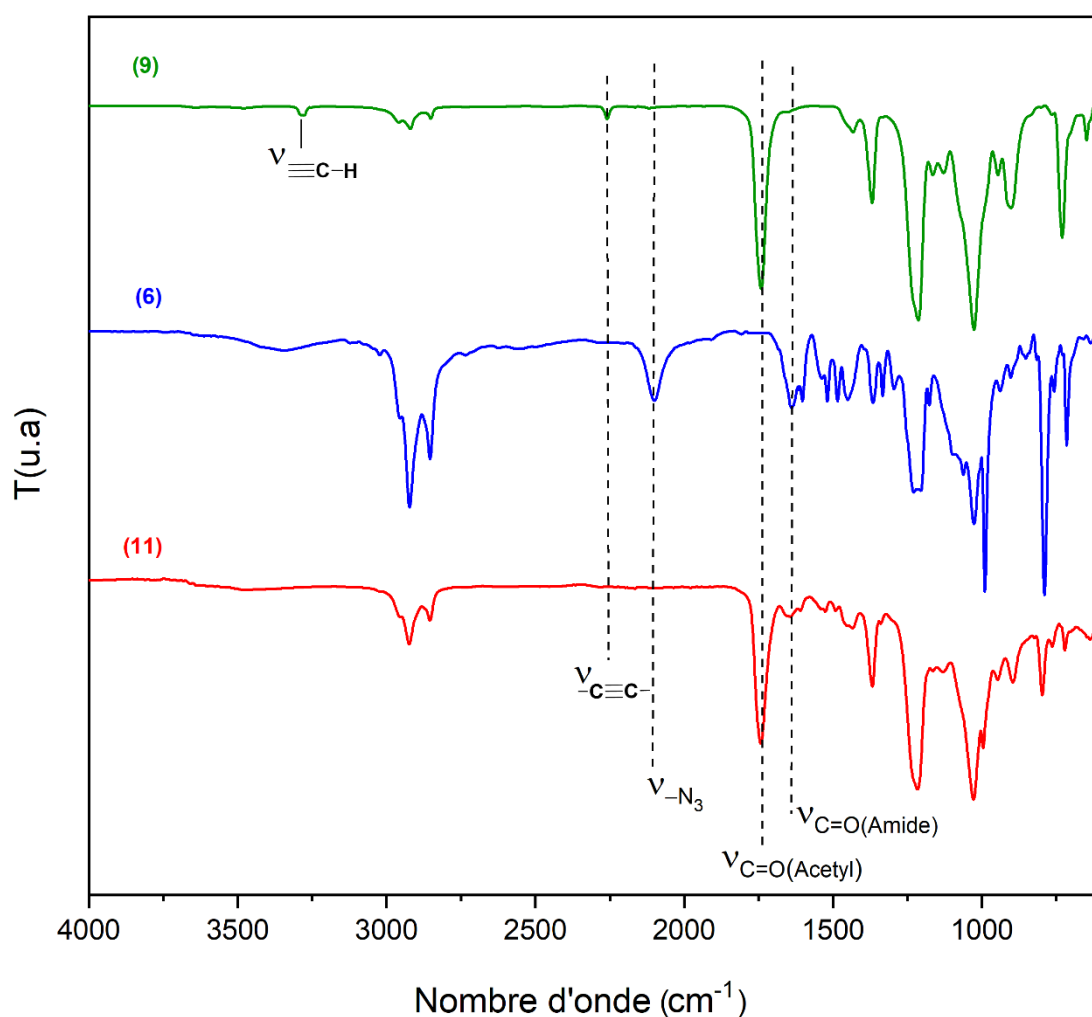


Figure 83 : Les spectres IR des composés **(6)**, **(9)** et **(11)**.

Sur les spectres RMN ^1H de **(10)** et **(11)** (**Figure 84**), on trouve, en plus des signaux caractéristiques aux protons porphyriniques entre 7,5 et 9 ppm, des protons glucidiques entre 3,8 et 5,5 ppm et des protons portés par l'espaceur entre 3,4 et 3,8 ppm, un signal sous forme d'un singulet à 7,04 ppm correspondant au proton du groupe triazole ainsi que les protons méthyliques des groupements acétyles entre 1,9 et 2,2 ppm.

Les spectre UV-Visible dans le chloroforme, quant à eux, sont proches de celui de la porphyrine **(6)**, avec une bande de Soret à 422 nm et deux bandes Q à 551 et 602 nm. La spectrométrie de masse confirme les structures des deux composés.

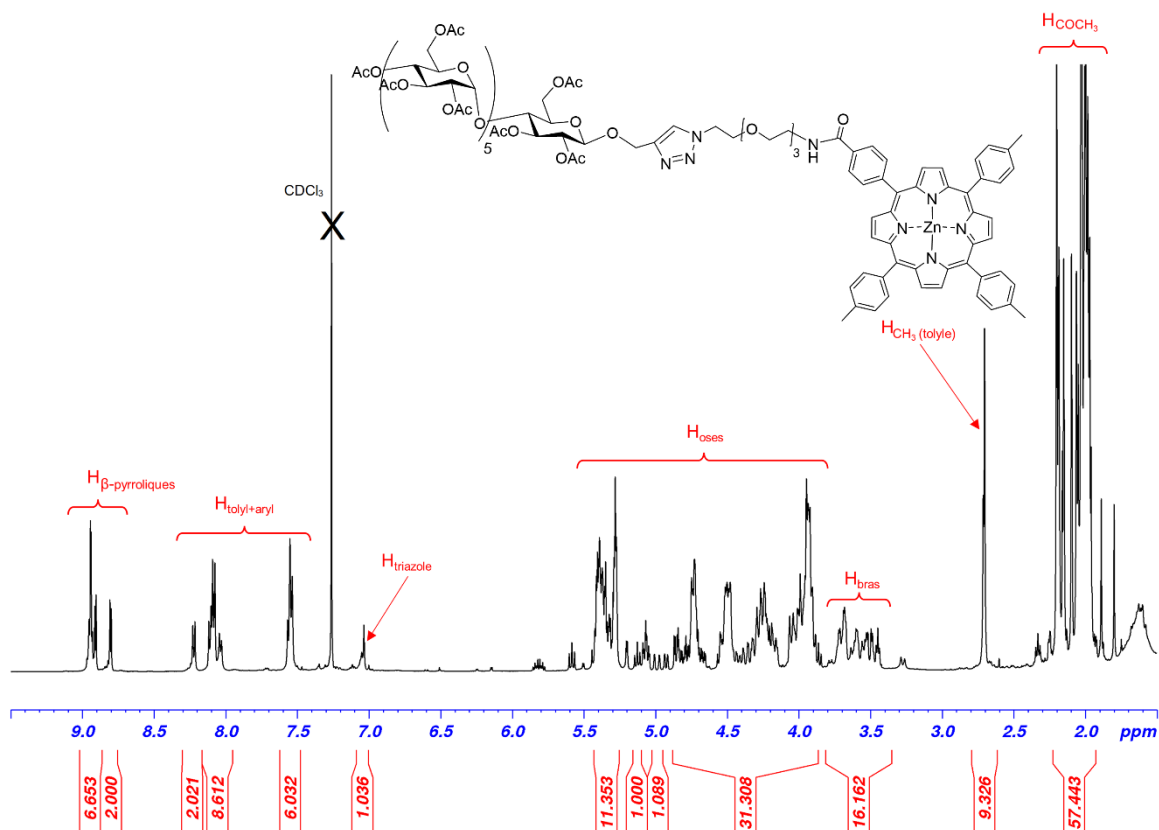


Figure 84 : Spectre RMN ^1H du composé **(11)** dans CDCl_3 .

IV.2. Désacétylation des unités glucidiques

Les réactions de désacétylation sont généralement effectuées en milieu basique en présence de systèmes tels que des solutions méthanoliques de méthanolate de sodium, de méthanolate de baryum, de soude, d'ammoniac, de diéthylamine ou d'autres amines. Dans notre cas, nous avons réalisé la réaction de désacétylation, en tenant compte de la faible solubilité de ces composés dans le méthanol, dans un mélange de dichlorométhane/méthanol (1:1) en présence d'une quantité catalytique de méthanolate de sodium (**Figure 85**). Les produits désirés précipitent dans le milieu, puis sont lavés avec le dichlorométhane puis une petite quantité de méthanol. Les composés déprotégés **(12)** et **(13)** sont obtenus avec des rendements quantitatifs.

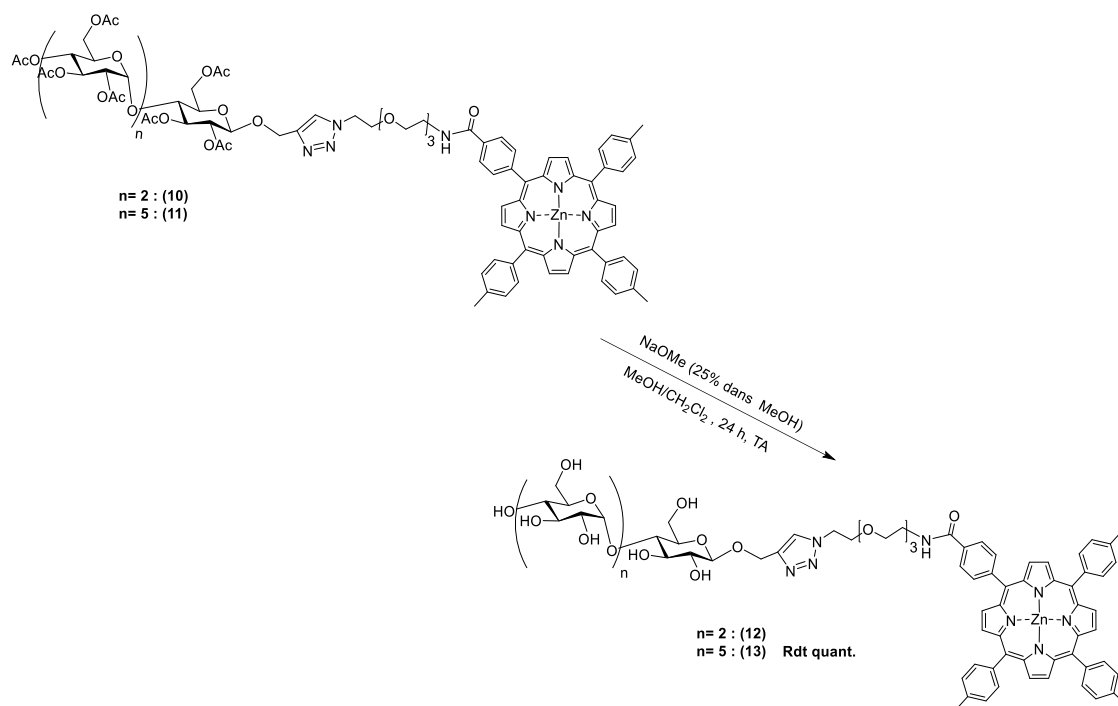


Figure 85 : Désacétylation des composés **(12)** et **(13)**

L'analyse, par spectroscopie de RMN ^1H dans le DMSO- d_6 , met en évidence la disparition des protons méthyliques des groupements acétyles. On observe également le proton anomérique de l'anomère β sous la forme d'un doublet à 4,31 ppm dont la constante de couplage caractéristique est de 7,7 Hz et le proton du triazole apparait sous forme d'un singulet caractéristique à 8,1 ppm. Les RMN du carbone montrent également une disparition des signaux correspondant aux groupements acétyles.

L'analyse infrarouge (**Figure 86**) confirme la désacétylation grâce à la disparition de la bande caractéristique vers 1742 cm^{-1} des groupements acétyles et l'apparition d'une large bande entre $3100 - 3500\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux vibrations de valence des liaisons O-H. Enfin la spectrométrie de masse confirme les structures des **(12)** et **(13)**.

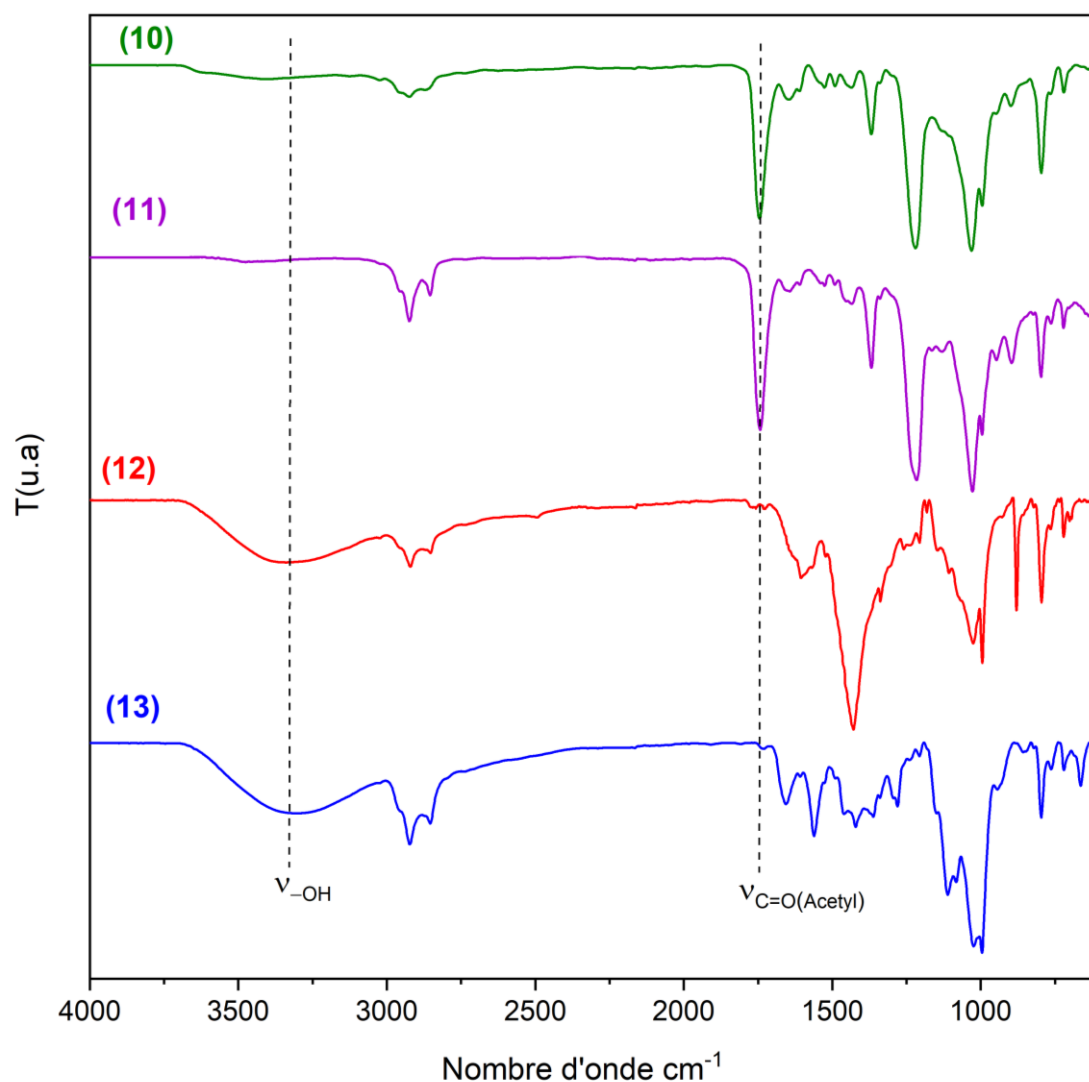


Figure 86 : Les spectres IR des composés **(10)**, **(11)**, **(12)** et **(13)**.

V. Evaluation de l'activité antibactérienne des conjugués porphyrine-maltooligosaccharides.

V.1. Photoinactivation des bactéries

Les tests microbiologiques ont été réalisés sur quatre souches bactériennes connues pour être impliquées dans les infections nosocomiales [235,236] : deux souches d'*E. coli* (une formant des biofilms, l'autre non) qui sont des souches Gram négatif et deux souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*) qui sont des souches Gram positif. La porphyrine neutre **(1)**, le maltotriose (MT) et la maltohexaose (MH) ont été choisis comme témoins.

Des microdilutions ont été réalisées dans des plaques 96 puits par dilutions successives au demi d'une solution mère à 300 μM diluée dans le PBS. Dans chaque puits, contenant 50 μL de solution de concentration variant de 300 à 2,34 μM , sont ajoutés 50 μL de suspension

bactérienne à 4×10^6 UFC/mL pour aboutir à des concentrations allant de 150 à 1,17 μM , et le tout est incubé pendant 1 h à 37 °C. Les plaques sont par la suite irradiées par une lumière de LED blanches pendant 5 h à 37 °C (fluence totale de 25J/cm²) puis 100 μL de milieu Luria-Bertani 2 fois plus concentré (LB2X) ont été ajoutés et les plaques ont été incubées dans l'obscurité pendant la nuit à 37°C. Une autre plaque est préparée de façon identique, et est incubée dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité. La plus basse concentration pour laquelle aucune croissance bactérienne (turbidité) n'est observée correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Concentrations minimales inhibitrices sur *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* dans deux conditions différentes à 37 °C ; 5 heures d'irradiation en lumière blanche (L) (4,83 mW / cm²) et à l'obscurité (O).

Composés	CMI (μM)							
	<i>S. aureus</i> CIP76.25		<i>S. epidermidis</i> CIP109.562		<i>E. coli</i> CIP54.8T		<i>E. coli</i> CIP 53.126	
	L	O	L	O	L	O	L	O
(1)	150	>150	37,50	>150	>150	>150	>150	>150
(12)	18,75	>150	18,75	>150	>150	>150	>150	>150
MT	-	-	-	-	-	-	-	-
(13)	9,37	>150	4,68	>150	>150	>150	>150	>150
MH	-	-	-	-	-	-	-	-

La plus forte concentration testée est de 150 μM . "-" correspondant à une absence d'activité en dessous de cette concentration.

Ensuite, des dilutions en série au 1/10^{ème} sont effectuées à partir de chaque puits, et ces dilutions sontensemencées sur gélose. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, le décompte des colonies peut être effectué à partir de ces boîtes de Petri, ce qui permet d'obtenir la concentration de chaque puit en considérant les dilutions effectuées. La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration en molécule pour laquelle 99,99% des bactéries ont été inhibées (réduction de 4 log par rapport au contrôle non traité).

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Concentrations minimales bactéricides sur *S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. coli* dans deux conditions différentes à 37 °C ; 5 heures d'irradiation en lumière blanche (L) (4,83 mW / cm²) et à l'obscurité (O).

Composés	CMB (μM)							
	<i>S. aureus</i> CIP76.25		<i>S. epidermidis</i> CIP109.562		<i>E. coli</i> CIP54.8T		<i>E. coli</i> CIP 53.126	
	L	O	L	O	L	O	L	O
(1)	150	>150	37,5	>150	>150	>150	>150	>150
(12)	37,5	>150	37,5	>150	>150	>150	>150	>150
MT	-	-	-	-	-	-	-	-
(13)	37,5	>150	9,37	>150	>150	>150	>150	>150
MH	-	-	-	-	-	-	-	-

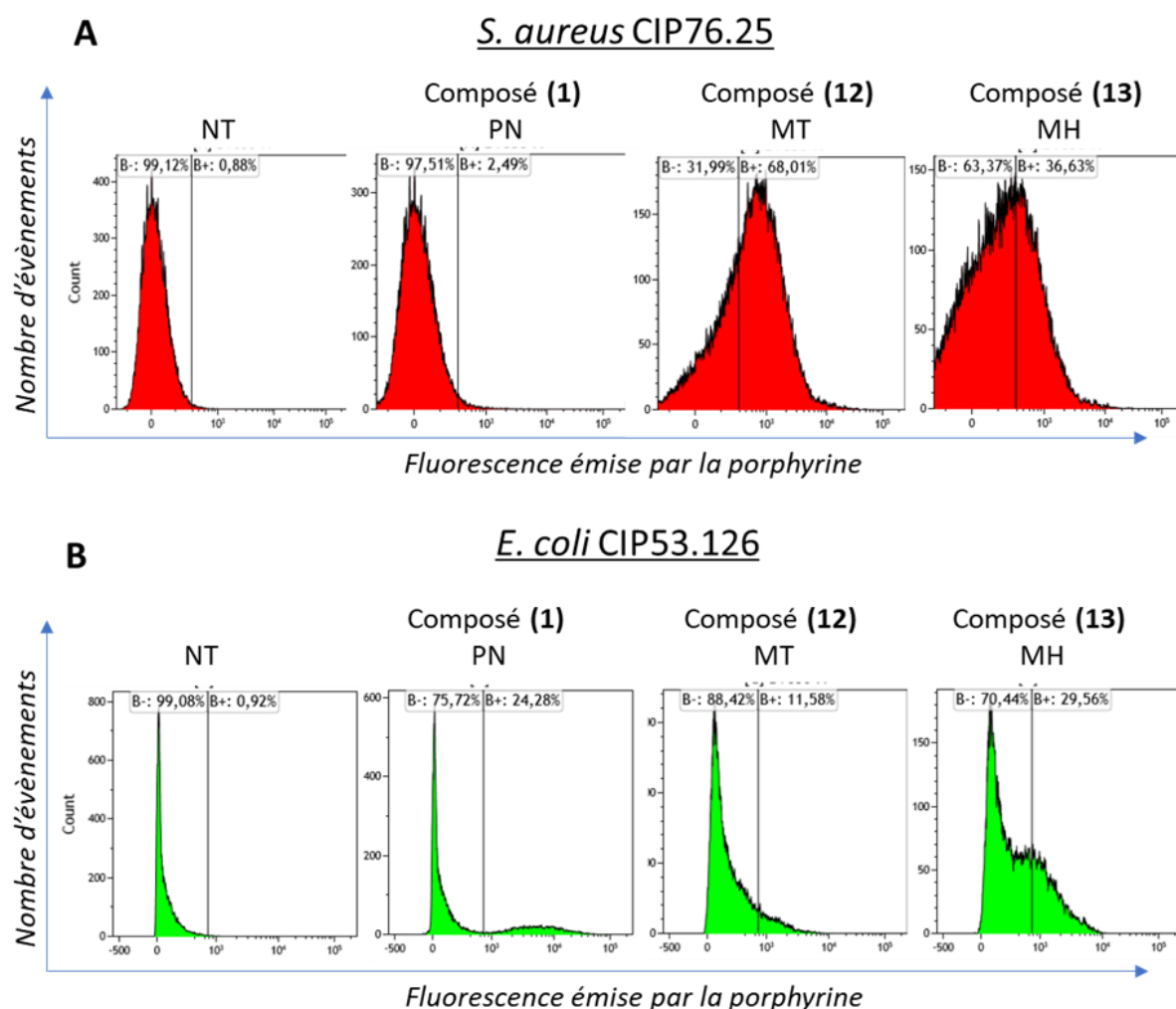
La plus forte concentration testée est de 150 μM. "-" correspondant à une absence d'activité en dessous de cette concentration.

Ces essais ont montré que tous les composés testés ne présentent aucune cytotoxicité dans des conditions d'obscurité aux concentrations testées. Les deux conjugués **(12)** et **(13)** ont montré une meilleure efficacité contre les bactéries Gram positif *S. aureus* et *S. epidermidis*, que la porphyrine seule après irradiation lumineuse. Par ailleurs, la nature du maltooligosaccharide semble influencer sur l'activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches Gram positif. Ainsi, les CMI montrent que les deux souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*) semblent plus sensibles au PS lié au maltohexaose **(13)** que celui lié au maltotriose **(12)**.

Pour les souches Gram négatif, étonnamment, aucun effet significatif n'a pu être observé après irradiation lumineuse. Ce manque d'activité des conjugués de porphyrine-Maltooligosaccharide vis-à-vis des souches Gram négatif testées est très probablement dû à leur maltoporine trimérique (protéine LamB) qui facilite la diffusion des maltodextrines à travers la membrane externe [225]. Ces canaux sont sélectifs pour les glucides et présentent des pores d'un diamètre de 1 nm et une surface à base de glucides [237]. L'affinité de liaison des maltoporines pour les maltodextrines est multipliée par plus de 30 entre le maltose et le maltohexaose et ces glucides ont également un effet bloquant saturable pour les ions et les autres glucides. Les conjugués **(12)** et **(13)** adhèrent peut-être à la membrane externe des bactéries Gram négatif, et les maltoporines ne permettent probablement pas au PS hydrophobe de diffuser vers la membrane interne. Ainsi, la courte plage de diffusion du ¹O₂ ne suffit pas pour provoquer les dommages nécessaires sur la membrane interne.

V.2. Cytométrie en flux

Pour évaluer l'apport du Maltotriose ou du Maltohexaose dans le ciblage des bactéries, des solutions de porphyrine neutre seule ou de porphyrine neutre conjuguée avec le MT ou le MH ont été incubées en présence des bactéries (*S. aureus* CIP76.25 ou *E.coli* CIP53.126) pendant 1 h à 37 °C à l'obscurité. Ensuite, les bactéries ont été lavées 1 fois par du PBS 1X par centrifugation. Les bactéries lavées sont resuspendues dans 500 µL de PBS 1X puis analysées par cytométrie en flux. Les émissions de fluorescence sont enregistrées par un trieur de cellule BD FACSAria™ III (laser d'excitation violet à 407nm, émission de fluorescence détectée par un filtre BV650 (670/30 nm)). Les résultats sont présentés à la **Figure 87**.



	% de bactéries marquées (B+)			
	NT	composé (1) PN	composé (12) MT	composé (13) MH
<i>S. aureus</i> CIP76.25	0,88	2,49	68,01	36,63
<i>E. coli</i> CIP53.126	0,92	24,28	11,58	29,56

Figure 87 : Etude par cytométrie en flux de l'internalisation de la porphyrine neutre seule (1) ou conjuguée avec le MT (12) ou le MH (13) dans : (a) *S. aureus* CIP76.25 ou (b) *E. coli* CIP53.126

Dans le cas de *S. aureus* (Figure 87A), un couplage du photosensibilisateur avec les oligosaccharides semble avoir un impact positif dans l'internalisation de la porphyrine neutre dans la bactérie. En effet, en présence des conjugués (12) et (13), il est observé une fluorescence émise plus importante, ce qui traduit un pourcentage de bactéries marquées (B+) plus important. Cependant, on observe un pourcentage de bactéries marquées plus important après incubation des bactéries avec le conjugué (12), qu'avec le conjugué (13), avec respectivement 68% et 36% des bactéries marquées. Ce résultat indique que le maltotriose semble plus facilement incorporé que la maltohexaose par *S. aureus*. Cette différence d'incorporation pourrait être attribuée à une différence d'hydrophobicité des conjugués. Cette

différence d'incorporation pourrait être également attribuée à une différence de vitesse d'incorporation des maltooligosaccharides par l'intermédiaire des transporteurs des maltodextrines.

Avec *E. coli* (**Figure 87B**), après une incubation des bactéries avec la porphyrine neutre (**1**), on observe une proportion de bactéries marquées (B+) d'environ 24%. Cela implique une interaction du photosensibilisateur avec la bactérie qui n'impliquerait pas le système de transporteurs des maltodextrines. Une fixation des oligosaccharides sur la porphyrine neutre ne semble pas augmenter de manière significative son taux d'incorporation dans les bactéries. Ce résultat pourrait expliquer l'absence de phototoxicité des conjugués (**12**) et (**13**) obtenue précédemment contre les bactéries Gram négatif (**Tableau 2**). Cependant, les résultats obtenus (absence de phototoxicité et absence d'incorporation des conjugués) sont surprenants, compte-tenu que les transporteurs de maltodextrines sont exprimés chez *E. coli*. De plus, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus avec d'autres auteurs [238] qui observent une incorporation de leur fluorophore (Cy7-1) conjugué avec le maltotriose ou le maltohexaose. Néanmoins, cette incorporation semble moins rapide dans les bactéries Gram négatif que dans les bactéries Gram positif. De plus, il apparaît que l'hydrophobicité du conjugué peut aussi avoir un impact sur leur incorporation. Des expériences sont, par contre, nécessaires pour expliquer l'absence d'incorporation des conjugués dans la souche d'*E. coli* utilisée pour nos essais. Une mutation au niveau de certaines sous-unités du complexe du transporteur des maltodextrines (au niveau de la maltoporine LamB). En effet, la présence de mutations dans la séquence de cette maltoporine se traduit par une diminution de l'affinité pour les oligosaccharides.

V.3. Essai d'inhibition de la formation des biofilms chez les bactéries à Gram positif

Dans cette partie, nous avons choisi de tester la capacité du conjugué (**13**) à inhiber la formation de biofilms de deux souches Gram positif (*S. aureus* et *S. epidermidis*). Les bactéries ont été incubées dans des plaques 96 puits avec différentes concentrations de composés (**13**) et (**1**) par rapport à la CMI : $\frac{1}{2}$ CMI, CMI et 2xCMI et ont été soumises ou non à une irradiation lumineuse. Après 24 h d'incubation à 37 °C, le biofilm formé a été coloré par coloration au cristal violet puis quantifiée par UV-Vis. Les résultats sont présentés sur la **Figure 88**.

Pour la porphyrine neutre (**1**), une diminution de la formation du biofilm de *S. epidermidis*, d'environ 55% et 42% a été observée pour les 3 concentrations testées dans des conditions de lumière et d'obscurité respectivement. Pour *S. aureus*, aucune activité d'inhibition de la

formation de biofilm n'a été observée dans des conditions d'obscurité aux concentrations testées et après irradiation, une diminution de 50% de la formation de biofilm a été observée chez *S. aureus* traité avec 2xCMI.

À l'obscurité, le conjugué **(13)** a montré une légère diminution de la formation de biofilm de *S. epidermidis*, d'environ 20 % et 36 % à une concentration égale à 0,5xCMI et CMI respectivement, et à une concentration égale à 2xCMI, il a réduit la formation de biofilm de plus de 90 %. Pour *S. aureus*, le conjugué **(13)** a réduit la formation de biofilm de 56%, 94% et 96% à une concentration égale à 0,5xCMI et CMI et 2xCMI respectivement.

Après irradiation, une meilleure activité d'inhibition de biofilm a été observée pour le conjugué **(13)** par rapport à l'activité de la porphyrine neutre **(1)** avec un taux d'inhibition de 80%, 88% et 90% à une concentration égale à 0,5xCMI et CMI et 2xCMI respectivement pour le biofilm de *S. epidermidis* et un taux d'inhibition de 91%, 94% et 96% pour le biofilm de *S. aureus*. L'inhibition de la formation de biofilms à des concentrations inférieures à la CMI prouve que **(13)** a la capacité d'inhiber la formation de biofilms sans affecter la croissance des cellules planctoniques des bactéries Gram positif.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à coupler une porphyrine neutre à des dérivés de maltodextrines utilisés récemment comme agent de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale [11,12,229], afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis des cellules bactériennes. Pour ce faire, nous avons synthétisé deux conjugués, composé d'une *meso*-porphyrine reliée par une chaîne tétraéthylène glycol à un maltooligosaccharide (maltohexaose ou maltotriose). Après confirmation de la structure par HRMS et RMN, les essais biologiques ont montré que les deux conjugués **(12)** et **(13)** ont une meilleure action photoinhibitrice contre les bactéries Gram positif *S. aureus* et *S. epidermidis*, que la porphyrine neutre après irradiation lumineuse. Par ailleurs, la nature du maltooligosaccharide semble influencer sur l'activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches à Gram positif. Ainsi, les CMI montrent que les deux souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*) semblent plus sensibles au PS lié à un maltohexaose **(13)** que celui lié au maltotriose **(12)**. Ensuite, nous avons choisi de tester la capacité du conjugué **(13)** à inhiber la formation de biofilms de deux souches Gram positif (*S. aureus* et *S. epidermidis*). Ces tests ont montré que le conjugué présente une activité d'inhibition intéressante contre les biofilms des deux souches. En revanche, les deux composés n'ont pas montré d'effet significatif sur les souches à Gram négatifs après irradiation lumineuse. De plus amples études doivent être menées afin de vérifier si les souches étudiées expriment des transporteurs de maltodextrine et ne présentent pas de mutations.

Chapitre III.

Élaboration d'hydrogels à base de xylane pour une application en PACT

Chapitre III. Élaboration d'hydrogels à base de xylane pour une application en PACT

Avant de présenter la conception de ces nouveaux matériaux, une brève présentation est dédiée aux hydrogels et leur utilisation comme supports antibactériens.

I. Les hydrogels

I.1. Définition d'un hydrogel

Les hydrogels sont des réseaux hydrophiles tridimensionnels formés de polymères synthétiques ou naturels, dont les chaînes sont interconnectées entre elles par des nœuds de réticulation de nature chimique ou physique (**Figure 89**). Ils présentent la particularité de gonfler et de pouvoir absorber une grande quantité d'eau et de liquides biologiques. Les hydrogels sont dits "physiques" ou "réversibles" lorsque le réseau est un enchevêtrement de polymère maintenu par des forces secondaires de type liaisons hydrogènes, ioniques ou hydrophobes. Ces liaisons se font et se défont continuellement dépendamment du milieu (pH, température, force ionique). Les hydrogels dits "chimiques" ou "permanents", au contraire, possèdent un réseau qui est maintenu par des réticulations covalentes fournissant un caractère permanent à ces matériaux [239].

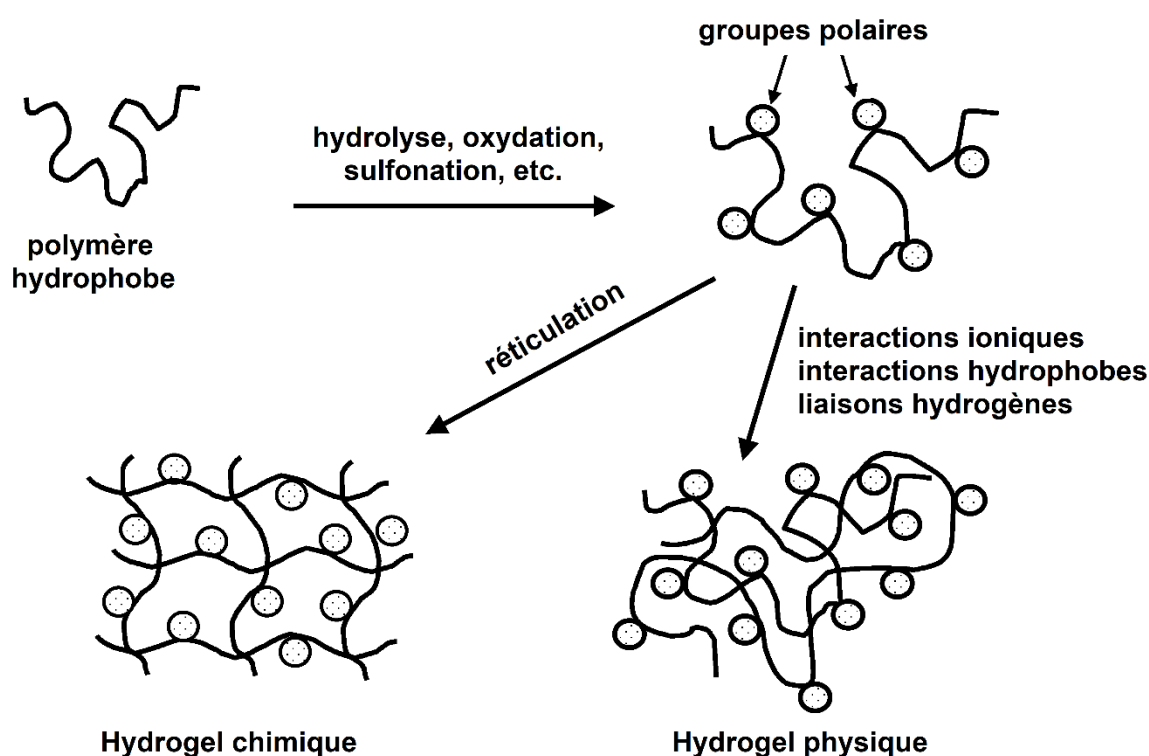


Figure 89 : Schéma de formation d'hydrogels physiques et chimiques.

L'utilisation des hydrogels pour des applications biomédicales remonte aux années 60 lorsque Wichterle et Lim ont mis au point les premières lentilles de contact flexibles à base de poly(hydroxyéthyl méthacrylate) [240]. Depuis lors, la technologie des hydrogels a connu des progrès spectaculaires pour couvrir une large gamme d'applications industrielles, telles que l'industrie agroalimentaire [241], la cosmétique [242] et la pharmacie [243]. Les hydrogels jouent désormais un rôle majeur dans l'ingénierie tissulaire [244], dans les biosenseurs [245], la cicatrisation des plaies [246,247] et la culture cellulaire [248] ou encore comme vecteurs de médicaments [249,250].

I.2. Propriétés notables des hydrogels

Les hydrogels utilisés dans les biotechnologies nécessitent certaines propriétés physico-chimiques que l'on doit pouvoir caractériser et contrôler. Deux caractéristiques importantes sont le gonflement et les propriétés mécaniques. La porosité des hydrogels est également un paramètre nécessaire à étudier aux vues des applications potentielles d'encapsulation. Par ailleurs, ces matériaux ne peuvent être utilisés comme support pour les applications biomédicales que s'ils sont biocompatibles, non toxiques *in situ* et pour certaines applications, biodégradables.

Propriétés de gonflement : Les hydrogels sont généralement caractérisés par leurs propriétés de gonflement dans l'eau ou dans d'autres solvants. En effet, les chaînes polymériques interagissent avec les molécules d'eau et tendent à se dilater. Au contraire, le réseau polymérique, réticulé physiquement ou chimiquement, applique des forces attractives qui retiennent les chaînes. L'équilibre est atteint lorsque les forces de répulsion et d'attraction se compensent [251]. Le taux de gonflement à l'équilibre d'un hydrogel détermine sa capacité à absorber l'eau, et influence notamment ses propriétés mécaniques et sa capacité d'encapsulation des produits actifs. Les propriétés de gonflement sont gouvernées par le type de polymère, la densité de réticulation et les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la force ionique [252].

Propriétés mécaniques : Les propriétés mécaniques d'un hydrogel sont indispensables pour le choix du matériau à utiliser au regard d'une application spécifique : les propriétés attendues ne sont pas les mêmes en ingénierie tissulaire ou pour des lentilles de contact (gel mou), pour un épaississant en agroalimentaire (gel très mou), ou encore dans la fabrication de microbilles absorbant l'humidité (gel dur). Pour mieux comprendre le comportement mécanique des hydrogels, on utilise les théories d'élasticité et de viscoélasticité basées sur la réponse temporelle du gel soumis à une contrainte. On peut distinguer les gels mous, comme les élastomères, qui sont viscoélastiques et possèdent un faible module d'Young. Ils possèdent

une contrainte seuil de plasticité à partir de laquelle la déformation est irréversible : c'est le régime de viscoplasticité. Les gels plus rigides possèdent des modules d'Young supérieurs : ils sont moins déformables et peuvent casser lorsque la contrainte dépasse une contrainte seuil de rupture [253]. La rigidité des hydrogels peut être influencée par de nombreux paramètres tels que la méthode de préparation, le taux de gonflement et le mode et degré de réticulation [251].

Porosité : La porosité est un des paramètres les plus importants pour assurer la migration, l'attachement et la prolifération des cellules ainsi que pour le transport des nutriments et l'incorporation de médicaments. La connaissance de la taille des pores, la distribution des tailles, la forme des pores sont des caractéristiques à prendre en compte car elles influent sur leur utilisation [254]. La dimension des pores peut être affectée par plusieurs facteurs tels que : le degré de réticulation du gel, la structure chimique du polymère et l'environnement extérieur (pH, température et force ionique) [255]. C'est le cas du relargage de molécules actives qui sera différent selon que la molécule active a une dimension inférieure ou supérieure à celle des pores. C'est aussi le cas des structures support « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire où la présence de pores ouverts et interconnectés facilite la croissance cellulaire. Différentes techniques existent pour créer de la porosité (réticulation, lyophilisation, moussage au gaz) et l'analyse de la morphologie des gels peut être évaluée par microscopie électronique à balayage [256]. Cependant, cette technique présente des limites car elle analyse un hydrogel sec dont la structure et la porosité peuvent avoir été modifiée par le procédé de séchage (lyophilisation).

Biocompatibilité : Puisqu'ils vont être en contact avec des tissus humains, il est important que les hydrogels n'engendrent pas de réponses inflammatoires ou immunitaires. Bien que les polymères naturels soient fréquemment considérés comme ayant une biocompatibilité supérieure aux polymères synthétiques, la présence de réticulant et d'amorceurs utilisés dans les polymérisations de monomères et prépolymères naturels est soumise aux mêmes problèmes de toxicité que les hydrogels purement synthétiques. Pour cela des tests de cytotoxicité et de toxicité *in vivo* sont exigés.

II. Hydrogels antimicrobiens

Les hydrogels sont des matériaux extrêmement intéressants à utiliser comme pansements et produits de comblement, comme par exemple, les hydrogels à base d'acide hyaluronique, obtenus par réticulation du ce biopolymère avec de l'éther diglycidyle de 1,4-butanediol (BDDE), qui sont les produits de comblement dermique les plus utilisés dans les procédures de médecine esthétique pour le rajeunissement du visage [257–259]. Ils sont principalement

indiqués pour compenser la perte de volume due à la résorption osseuse et graisseuse liée à l'âge [260].

En raison de leur teneur élevée en eau, les gels fournissent un environnement humide et fortement hydraté à la zone de la plaie, facilitant l'activité immunologique cellulaire essentielle au processus de cicatrisation. Cependant, ce même environnement hydraté peut également faciliter l'infection microbienne. Ainsi, des gels capables de conférer une action antimicrobienne en plus de remplir leur rôle fonctionnel principal (par exemple, cicatrisation, médicament, administration, etc.) sont souhaitables [261].

Afin d'améliorer leur potentiel pour des applications cliniques, plusieurs chercheurs ont synthétisé des hydrogels antimicrobiens avec des stratégies sophistiquées, y compris l'incorporation de polymères avec des propriétés antimicrobiennes intrinsèques ou acquises, des antibiotiques, des peptides antimicrobiens, des biocides chimiques, des nanoparticules antimicrobiennes, et des combinaisons de ceux-ci (**Figure 90**) [262].

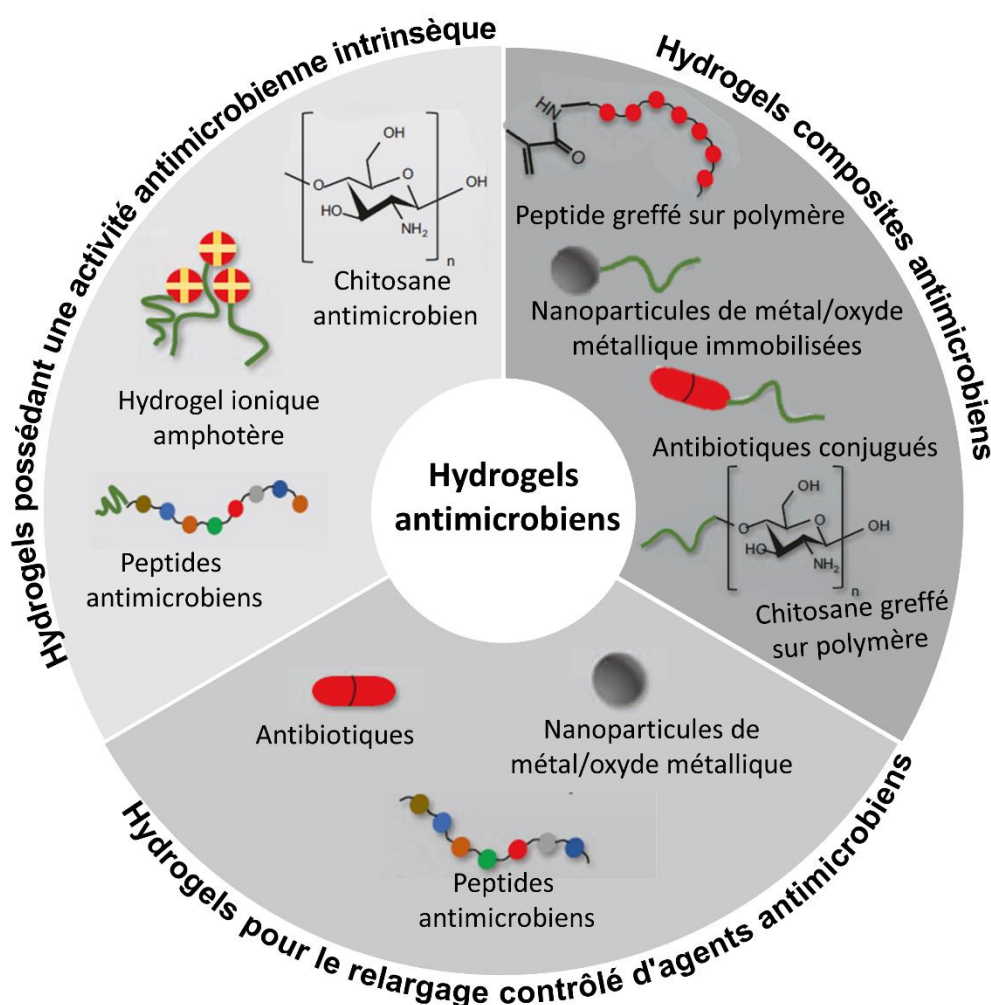


Figure 90 : Les trois principales approches employées pour développer des hydrogels antimicrobiens [262].

II.1. Hydrogels pour le relargage contrôlé d'agents antimicrobiens

Les hydrogels peuvent être utilisés comme systèmes de relargage contrôlé pour délivrer des molécules bioactives telles que des petites molécules, des acides nucléiques, des peptides et des protéines. De plus, les antimicrobiens peuvent être encapsulés de manière non covalente dans le réseau d'hydrogel pour un relargage contrôlé dans les tissus.

La nature hydrophile de nombreux gels fournit un environnement solubilisant pour les antibiotiques. De plus, les systèmes chargés d'antibiotiques peuvent délivrer une dose bactéricide locale adéquate directement sur le site infecté, sans dépasser de manière significative le niveau de toxicité systémique [263]. Les hydrogels, en tant que matrice d'administration locale, offrent un rapport surface/volume élevé et la capacité de concevoir

leurs propriétés physiques, telles que la porosité, pour qu'elles correspondent aux tissus naturels. En outre, il est facile pour les hydrogels de charger sélectivement des médicaments avec un relargage contrôlé et prolongé au site souhaité [264]. Les antibiotiques couramment utilisés pour les hydrogels antimicrobiens sont : la ciprofloxacine [263,265,266], la gentamicine [267–269], la teicoplanine [270], l'amoxicilline [271] et la vancomycine [272–274].

Des études récentes ont montré qu'une combinaison de polymères antimicrobiens synthétiques et d'antibiotiques pourrait potentiellement pallier les problèmes de résistance aux médicaments grâce au mécanisme de lyse membranaire du polymère tout en réduisant la toxicité du polymère puisque la co-utilisation d'antibiotiques permet d'utiliser une plus petite quantité de polymère. Ainsi, Ng *et coll.* ont montré que la combinaison de polycarbonates antimicrobiens cationiques avec des antibiotiques conventionnels telles que la pénicilline G, la doxycycline ou la streptomycine était capable de tuer efficacement une souche de *P. aeruginosa* multirésistante [275]. Ce pathogène opportuniste est associé aux infections nosocomiales et son traitement avec des antibiotiques conventionnels est difficile en raison de la perméabilité limitée de la membrane cellulaire bactérienne. Ils ont montré également que le polymère pouvait non seulement augmenter la perméabilité de la membrane et faciliter la pénétration de petites molécules antibiotiques, mais aussi diminuer la concentration minimale bactéricide du polymère et des antibiotiques pour tuer *P. aeruginosa* sans provoquer d'hémolyse significative. De façon similaire, Sung *et coll.* ont combiné des hydrogels PVA/chitosane avec de la minocycline, un antibiotique à large spectre, et ont démontré des effets améliorés sur la cicatrisation des plaies grâce à la minocycline et à l'effet antifongique du chitosane. Plus précisément, ils ont constaté une amélioration de la cicatrisation des plaies lorsque l'hydrogel était composé de 5 % de PVA, de 0,75 % de chitosane et de 0,25 % de minocycline [276].

II.2. Hydrogels composites antimicrobiens

Les hydrogels composites antimicrobiens sont basés sur l'incorporation de composants antimicrobiens, de manière covalente ou physique, dans des hydrogels standard. Les stratégies comprennent l'incorporation d'antibiotiques, de nanoparticules (NPs) et de PAM.

II.3. Hydrogels élaborés par immobilisation des agents antimicrobiens.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les hydrogels chargés en agents antimicrobiens ont été largement étudiés pour lutter contre les infections bactériennes. Ces hydrogels relarguent des agents antimicrobiens par diffusion passive ou dégradation du gel [264,277]. Cependant, cette approche n'est pas optimale pour les applications à long terme, car la diffusion des médicaments crée des gradients de dose autour de la matrice d'hydrogel,

ce qui entraîne la résistance des bactéries aux médicaments [278]. Pour surmonter ces difficultés, Cleophas *et coll.* ont immobilisé un PAM hautement active (inverso-CysHHC10), sur des hydrogels en utilisant la méthode de « thiol-ène click ». Ces hydrogels ont montré une activité bactéricide prolongée contre *S. aureus* et *S. epidermidis* [279]. Lakes *et coll.* [280]. ont synthétisé un hydrogel contenant de la vancomycine en faisant réagir les amines libres de la vancomycine par une addition de Michael avec les doubles liaisons du polyéthylène glycol. Ce précurseur fonctionnalisé par la vancomycine a formé un hydrogel sous irradiation UV. En raison de la liaison covalente, la vancomycine a une plus faible activité vis-à-vis de *S. aureus* comparée à celle de l'hydrogel physiquement piégé. Cependant, l'efficacité antibactérienne a pu être maintenue plus longtemps grâce à la fixation covalente de la vancomycine. Hu *et coll.* ont utilisé l'amikacine, un antibiotique aminoside, comme agent de réticulation pour former des hydrogels avec des polysaccharides oxydés via une liaison de base de Schiff labile en milieu acide. Les gels ont présenté un relargage contrôlé de l'antibiotique, lorsqu'ils ont été exposés à des bactéries productrices d'acide (comme l'acide carbonique et l'acide lactique), ce qui a entraîné une activité inhibitrice remarquable contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Cette approche a permis d'éviter les effets indésirables et de limiter le risque de résistance bactérienne aux antibiotiques. La même stratégie peut être appliquée pour les autres antibiotiques appartenant à la classe des aminoglycosides (**Figure 91**) [277].

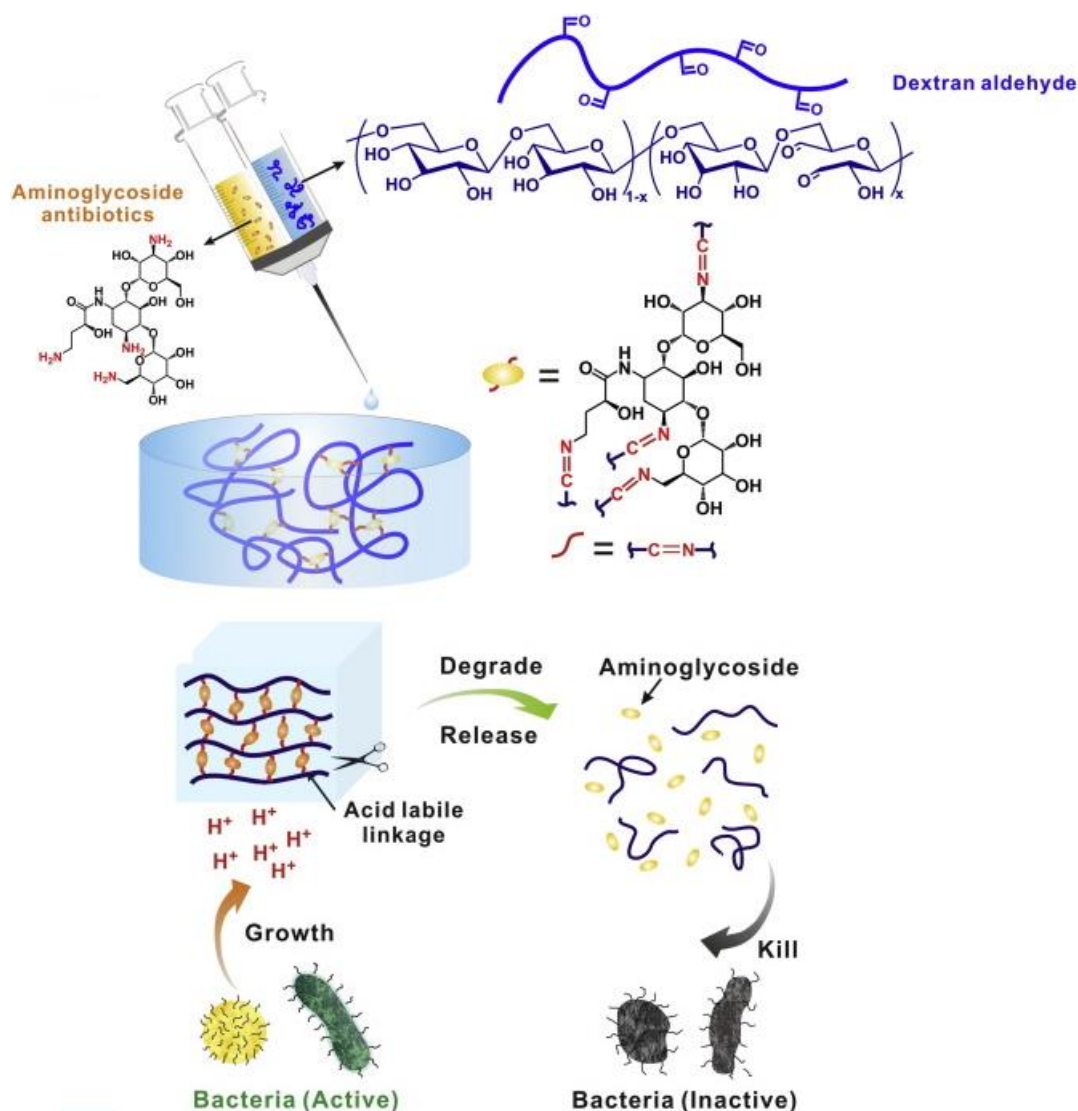


Figure 91 : Concept des hydrogels d'aminoglycosides intelligents selon Hu *et coll.* [277].

L'incorporation de nanoparticules d'argent dans un hydrogel donné permet la formation de matériaux hybrides qui présentent des propriétés antimicrobiennes et sont avantageux pour les applications biomédicales. Des hydrogels de compositions différentes ont été utilisés pour préparer des systèmes antimicrobiens à base d'hydrogel et de nanoparticules d'argent. Il s'agit notamment d'hydrogels dérivés de polymères synthétiques tels que le poly(alcool vinylique) (PVA), la polyvinylpyrrolidone (PVP) et le poly(acrylamide-co-acide acrylique), ainsi que de polymères naturels tels que la gélatine et l'alginate [281–284].

II.4. Incorporation de polysaccharides antimicrobiens dans des hydrogels synthétiques

Le chitosane est le polymère antimicrobien d'origine naturelle le plus étudié. Le chitosane est un polymère cationique naturel produit par désacétylation alcaline ou enzymatique de la chitine

provenant des carapaces de crevettes et autres crustacées. Il est devenu le biopolymère de choix pour le développement d'hydrogels. Pour obtenir des hydrogels à base de chitosane aux propriétés plus souhaitables, le chitosane est généralement combiné à des polymères synthétiques. Par exemple, Noppakundilokrat *et coll.* ont rapporté le développement de chitosane greffé avec du poly(acide acrylique-co-méthacrylate d'hydroxyéthyle) avec une activité antibactérienne accrue contre *S. aureus* [285]. De plus, El Salmawi *et coll.* ont élaboré des hydrogels photopolymérisés à base de PVA et de chitosane. Ils ont étudié les effets de la composition du polymère sur leurs propriétés mécaniques et antimicrobiennes. Leurs résultats suggèrent que l'augmentation de la concentration de PVA améliore les propriétés mécaniques du gel tout en conservant une activité antimicrobienne suffisante [286]. Liu *et al.* ont enduit du chitosane sur des hydrogels de poly(N isopropylacrylamide- co- uréthane) pour fabriquer des tissus antibactériens sensibles à la température. Leur activité antibactérienne a été testée avec succès contre *S. aureus* et *E. coli* [287].

II.5. Hydrogels possédant une activité antimicrobienne intrinsèque

Les hydrogels à activité antimicrobienne intrinsèque font référence aux polymères de ces hydrogels qui présentent une activité antimicrobienne par eux-mêmes ou ceux dont l'activité biocide est conférée par leur modification chimique, à l'exclusion des hydrogels qui incorporent des composés organiques antimicrobiens ou des systèmes inorganiques actifs.

II.5.1. Les polymères naturels

Plusieurs polymères naturels chargés positivement possèdent des propriétés antimicrobiennes, ce qui en font d'excellents candidats comme blocs de construction pour la fabrication d'hydrogels luttant contre les microbes [288]. Par exemple, les propriétés antimicrobiennes inhérentes du chitosane ont été bien documentées [288]. Il est un biopolymère de choix pour le développement d'hydrogels antimicrobiens d'origine naturelle en raison de ses propriétés intéressantes, comme sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa charge positive et sa capacité à se réticuler rapidement [289,290]. Les amines chargées positivement du chitosane interagissent avec les membranes des cellules bactériennes, ce qui entraîne la lyse cellulaire [291,292]. En raison de ses caractéristiques uniques, ce biopolymère a été largement exploré pour son activité antimicrobienne dans la préservation des plantes et des aliments [293].

Szymanska *et coll.* [294]. ont préparé des hydrogels à base de chitosane et ont étudié les effets de la modification structurelle des hydrogels sur leur activité antifongique contre trois souches différentes de la levure du genre *Candida*. La modification du chitosane avec du β -glycérophosphate ou du clotrimazole a entraîné une diminution de l'activité antifongique, ce

qui a été attribué à l'affaiblissement de la nature polycationique du chitosane. Dans une autre étude, Badawy *et coll.* [295] ont fait varier le degré de substitution du N-(6-carboxylcyclohex-3-ènegcarbonyl)chitosane pour modifier la structure du N-(maléoyl)chitosane. L'augmentation du degré de substitution a amélioré les propriétés antibactériennes, les propriétés antifongiques et la solubilité dans l'eau. D'autres polysaccharides, comme le dextran et l'alginate, ont également été étudiés pour le traitement des infections [261].

En général, les hydrogels à base de polysaccharides sont largement utilisés dans la fabrication de biomatériaux pour un certain nombre d'applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité, de leur cytocompatibilité et de leur activité antimicrobienne [296–298]. Dans leurs études, Straccia *et coll.* ont développé un hydrogel antimicrobien hybride en enrobant du chitosane sur des hydrogels d'alginate pour améliorer leurs caractéristiques antimicrobiennes. Cet hydrogel hybride a montré une activité antibactérienne efficace contre *E. coli* [299]. Aziz *et coll.* [300] ont quant à eux utilisé le dextran en conjonction avec le chitosane pour la chirurgie endoscopique des sinus. Ces hydrogels se sont révélés très efficaces contre diverses souches bactériennes. En utilisant la microscopie électronique à balayage, il a été déterminé que les hydrogels chitosane-dextran se lient aux protéines de la paroi cellulaire bactérienne, entraînant la lyse cellulaire et finalement la mort des cellules bactériennes.

II.5.2. Les polymères synthétiques

De nombreux hydrogels antimicrobiens sont constitués de polymères synthétiques associés généralement à des groupes fonctionnels connus pour leur effet antimicrobien tels que les ammoniums quaternaires. Plusieurs polymères synthétiques ont été utilisés pour la préparation d'hydrogels antimicrobiens, notamment le poly(acide acrylique) (PAA), le poly(alcool vinylique) (PVA), le poly(acrylamide) (PAM), le poly(acétate de vinyle) (PVAc) et le poly(éthylèneglycol) (PEG) [264,301]. Les polymères synthétiques présentent l'avantage d'être facilement ajustés pour obtenir des propriétés antimicrobiennes adaptées à une application spécifique [302]. Nous pouvons citer comme exemple les travaux de Yang *et coll.* [303], qui ont mis au point des hydrogels synthétiques antimicrobiens, qui pourraient être utilisés comme revêtement pour les cathéters et les pansements afin de prévenir les infections. Les hydrogels ont été préparés en utilisant l'addition de Michael pour lier chimiquement un copolymère de PEG à blocs cationique et de polycarbonate contenant des groupes d'ammonium quaternaire. Les hydrogels obtenus permettent une inhibition de 99,9 % des isolats cliniques de bactéries Gram positif et négatif multirésistantes (*S. aureus* et *E. coli*) et de levures (*C. albicans*). Les hydrogels n'ont pas montré d'activité hémolytique toxique et ont démontré leur biocompatibilité dans un modèle animal. Par ailleurs, Li *et coll.* [304] ont synthétisé un hydrogel injectable dans lequel un bloc central de poly(iodure de [2-

(méthacryloyloxy)éthyl]triméthylammonium) (PMETA) était pris « en sandwich » entre deux chaînes de PEG (**Figure 92**). L'hydrogel a présenté une action antibactérienne puissante, attribuée aux groupes fonctionnels cationiques.

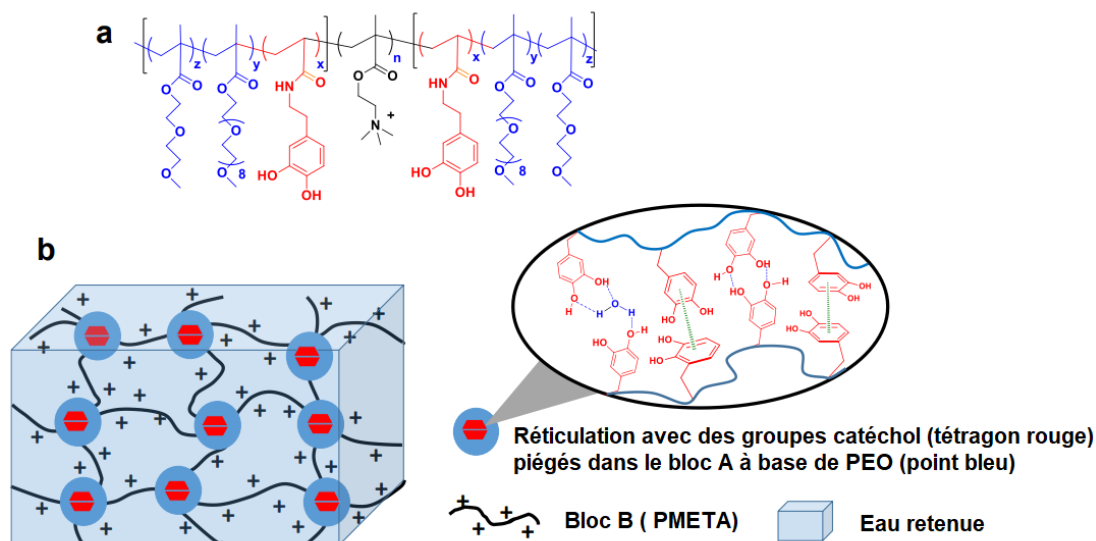


Figure 92: (a) Structure du copolymère triséquencé synthétisé. (b) Schéma d'une structure proposée de l'hydrogel résultant et du mécanisme d'autocicatrisation inspiré des moules. Mécanisme d'auto-guérison inspiré des moules selon Li *et coll.* [304].

II.5.3. Hydrogels à base de peptide

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les PAM ont une forte activité antimicrobienne contre un très large spectre de microorganismes, y compris les bactéries Gram positif et Gram négatif, les champignons et les virus. Cependant, les PAM ont leurs propres inconvénients. Ils ne sont pas stables et faciles à dégrader. De plus, les propriétés antimicrobiennes des PAM naturels ne sont pas aussi bonnes que celles des antibiotiques. Pour surmonter tous ces inconvénients, de nombreuses équipes de chercheurs ont introduit des peptides recombinants actifs plus courts ou qui ont des caractéristiques structurales spécifiques dans la conception des hydrogels afin d'améliorer l'activité antimicrobienne globale [264].

L'utilisation des PAM pour préparer les hydrogels antimicrobiens a commencé par des PAM relativement simples et ont été chargés sur des hydrogels, puis des PAM avec des structures plus complexes ou même des PAM auto-assemblés ont été développés. Mitra *et coll.* [305], par exemple, ont développé un hydrogel amphiphile à base de dipeptides avec de bonnes activités antibactériennes et de plus grandes spécificités cellulaires. Des hydrogels à base de peptides en épingle à cheveux β ont été rapportés, respectivement, par Salick *et coll.* [306].

avec des peptides MAX1 et Veiga *et coll.* [307] avec des peptides riches en arginine. Tous deux sont des peptides auto-assemblés présentant une forte activité antibactérienne.

III. Objectif du chapitre

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la PACT est une stratégie thérapeutique non invasive. Elle a une action rapide et ne semble pas conduire à la mise en place d'une résistance bactérienne, ce qui en fait une alternative intéressante aux traitements conventionnels des infections des plaies par exemple. Cependant, l'utilisation clinique de la plupart des photosensibilisateurs existants a été sévèrement entravée par plusieurs facteurs, notamment leur faible solubilité dans l'eau, leur tendance à l'empilement moléculaire entraînant un auto-quenching et leur manque de sélectivité vis-à-vis des cellules bactériennes. L'utilisation d'une formulation pharmaceutique appropriée de photosensibilisateur peut permettre de surmonter certaines de ces limitations. Les formulations topiques adéquates pour le PACT doivent réunir certaines propriétés favorables, notamment une administration facile et l'absence de douleur, de toxicité ou d'irritation, ces formulations doivent être suffisamment transparentes pour permettre l'excitation du photosensibilisateur par la lumière. Elles doivent également adhérer étroitement au tissu endommagé pour assurer un relargage rapide du photosensibilisateur et sa diffusion à l'intérieur de la plaie.

La majorité de ces caractéristiques se retrouvent dans les hydrogels. C'est pourquoi dans ce chapitre, notre étude s'est focalisée sur l'élaboration des hydrogels à base du xylane portant des photosensibilisateurs pour une application en PACT. Nous avons choisi d'utiliser un 4-O-méthylglucuronoxylane commercial extrait du hêtre, car sa structure est caractéristique des xylanes de bois de feuillus que nous essayons de valoriser au travers de plusieurs études dans notre laboratoire. Pour cela, trois voies ont été explorées (**Figure 93**). Dans une première approche, l'hydrogel a été synthétisé d'abord par réticulation de xylane avant de le charger par une porphyrine cationique. Dans une seconde stratégie, les photosensibilisateurs sont fixés d'abord par liaisons covalentes sur le xylane, puis les hydrogels ont été obtenus à partir de ces xylanes fonctionnalisés par un agent de réticulation. La troisième stratégie est une réticulation directe du xylane par les porphyrines sans utilisation d'autre agent de réticulation.

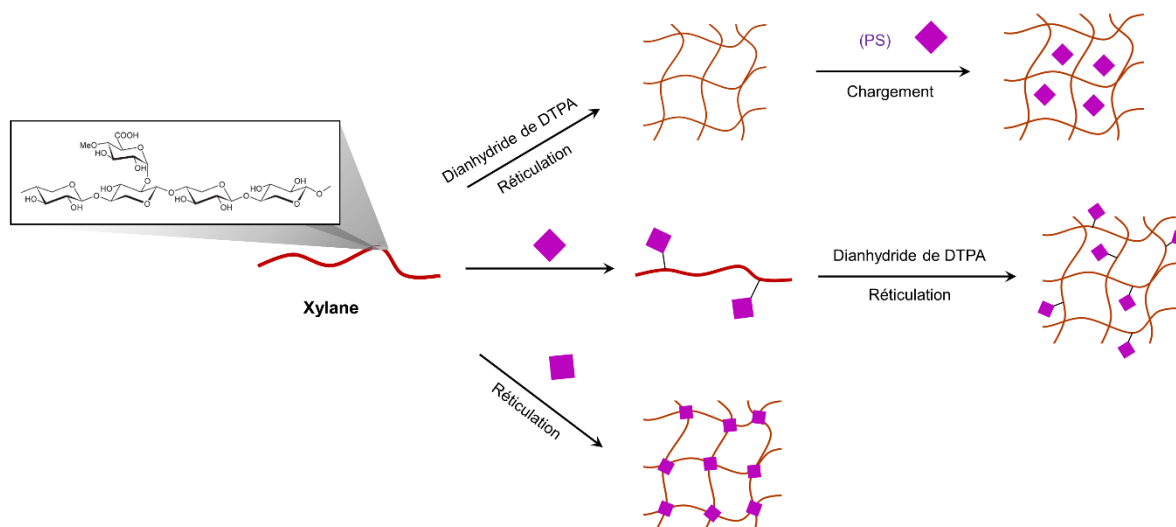


Figure 93 : Schéma général d'élaboration des hydrogels à base du xylane portant des PS.

IV. Élaboration des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon non covalente

Nous nous sommes intéressés dans cette première partie de ce chapitre, à la préparation d'un hydrogel transparent à base de xylane. L'hydrogel a été obtenu par une réaction en une étape par réticulation covalente du xylane. Le tétraiodure de méso-tétrakis(1-méthylpyridinium-4-yl)porphyrine (TMPyP) a été choisi comme modèle de photosensibilisateur hydrosoluble et a été encapsulé dans l'hydrogel. Ce photosensibilisateur combine plusieurs propriétés avantageuses, à savoir une bonne solubilité dans l'eau, une toxicité négligeable à l'obscurité, un rendement quantique élevé en oxygène singulet, une amphiphilie élevée et une élimination rapide de l'organisme [9]. La TMPyP, ainsi que d'autres arylporphyrines portant des dérivés d'ammonium quaternaire sont bien connus dans le PACT car ces photosensibilisateurs ont montré de très bonnes activités contre les bactéries Gram positif et Gram négatif [193]. De plus, ces groupes ammonium chargés positivement permettront à la TMPyP de faire des liaisons ioniques avec les groupements carboxylates de l'hydrogel, ce qui facilite son encapsulation (**Figure 94**).

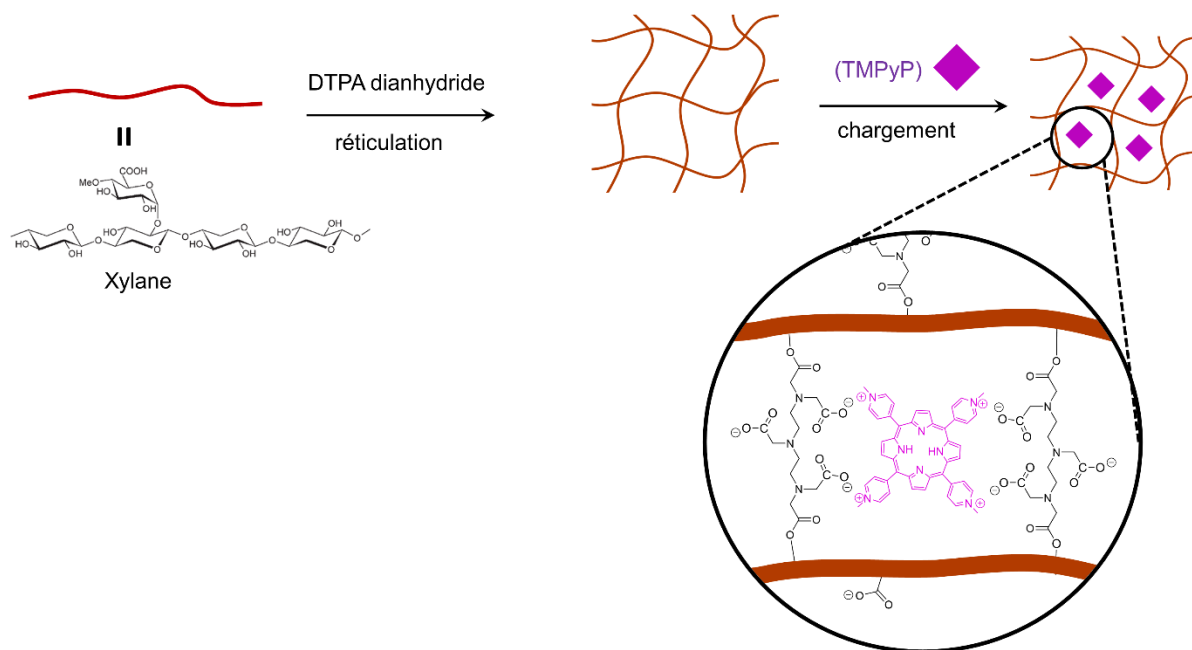


Figure 94 : Procédure générale pour la formation de l'hydrogel à base du xylane portant des PS liés de façon non covalente

IV.1. Structure et caractérisation du xylane étudié

De manière préliminaire, afin de mieux appréhender les éléments de structure ainsi que le potentiel de modification chimique des xylanes, nous nous proposons de présenter brièvement quelques généralités sur cette famille de polysaccharides, ainsi que les caractérisations effectuées sur le xylane natif utilisé dans cette étude.

IV.1.1. Les xylanes

Le xylane est un biomatériau naturel, biodégradable et non toxique. Il est l'un des principaux composants de l'hémicellulose végétale. Après la cellulose, le xylane est le polysaccharide renouvelable le plus abondant dans la nature, que l'on trouve dans les parois cellulaires des plantes terrestres, dans lesquelles elles peuvent constituer plus de 30% en poids sec [308]. La chaîne se compose de 30 à 100 unités de β -D-xylopyranose avec des liaisons 1,4-glycosidiques. Certains xylanes contiennent également de l'arabinose, du glucose, du galactose et du glucuronate dans les branches latérales attachées au C3 du xylose.

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

liaison α -1,2 sur la chaîne de xylose. Le ratio molaire MeGA : Xylose varie entre 1:4 et 1:16, selon l'espèce végétale et les conditions d'extractions [309].

IV.1.2. Caractérisation du 4-O-méthyl-glucuronoxylane du bois de hêtre utilisé

Pour cette étude nous avons utilisé d'un 4-O-méthylglucuronoxylane commercial (Carbosynth) extrait du hêtre. La composition de ce xylane a été caractérisée par dosage colorimétrique, il contient 92,2% d'oses neutres et 7,8% d'acides uroniques. Le dosage des sucres réducteurs a permis de calculer un degré de polymérisation moyen de 101 (rapport entre la quantité de sucres totaux et la quantité de sucres réducteurs). Une analyse RMN ^1H (**Figure 95**) effectuée sur ce xylane confirme la présence d'acide glucuronique et permet de déterminer le DS en acide glucuronique [310].

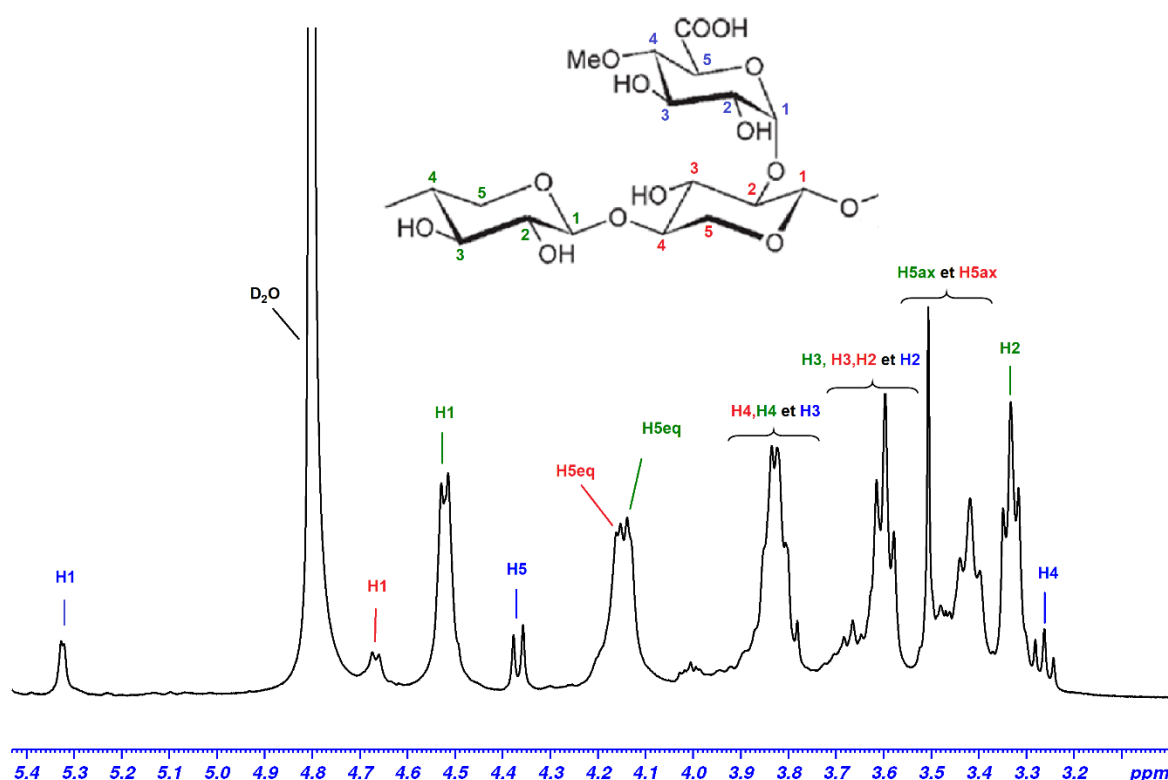


Figure 95 : Spectre RMN ^1H du xylane natif dans le D_2O

Le spectre obtenu montre des signaux intenses correspondant aux protons des unités xylose non substituées, ainsi que des signaux attribués aux unités acides glucuroniques et aux xyloses qui les portent. Les protons anomériques des unités xylose apparaissent sous forme de doublets à 4,5 ppm pour les xyloses substituées et 4,6 ppm pour les non substituées. Ces doublets ont une constante de couplage d'environ 7 Hz caractéristique des liaisons osidiques

de type β . Les protons anomériques des acides glucuroniques présentent un doublet à 5,3 ppm avec une constante de couplage d'environ 2 Hz caractéristique d'une liaison osidique de type α . Ce spectre a permis de calculer le degré de substitution des xylanes en acide glucuronique, en faisant le rapport entre l'intégration du proton anomérique de l'acide 4-O-méthylglucuronique (H1 MeGA) et la somme des intégrations des protons anomériques des unités xyloses substituées et non substituées selon l'équation suivante :

$$DS = \frac{H1 \text{ MeGA}}{H1 \text{ xylose substitué} + H1 \text{ xylose non substitué}} \quad (E1)$$

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

Après avoir présenté la structure des xylanes, nous allons présenter maintenant l'élaboration des hydrogels.

IV.2. Préparation et caractérisation d'hydrogels à base de xylane

Les hydrogels sont préparés par réaction de réticulation en utilisant la dianhydride de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) dans le DMSO pendant 24 h à 80 °C. Cette réaction permet non seulement la formation de ponts entre les chaînes de xylane et donc la formation d'un réseau tridimensionnel, mais génère également trois nouvelles fonctions acide carboxylique, qui vont rendre ce réseau plus hydrophile et qui vont nous permettre de fixer des PS par des interactions ioniques (**Figure 96**).

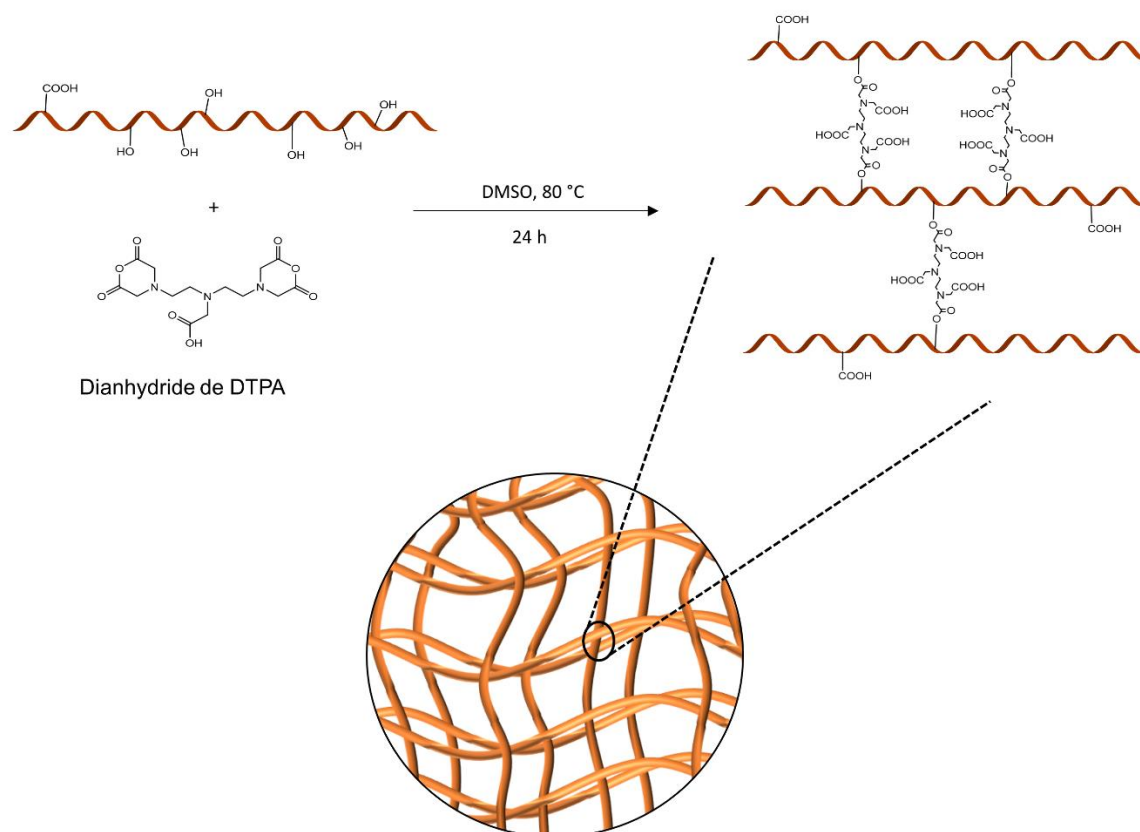


Figure 96 : Réticulation du xylane

0,1, 0,15 et 0,2 équivalent de dianhydride de DTPA par rapport à une d'unité anhydroxylose ont été testés pour obtenir les trois hydrogels **xyl-1**, **xyl-2** et **xyl-3**, respectivement.

La réticulation du xylane a été confirmée par spectroscopie infrarouge (**Figure 97**). Les spectres IR de **xyl-1**, **xyl-2** et **xyl-3**, ont montré l'apparition de la bande caractéristique de l'élongation (-C=O) à 1732 cm^{-1} et la bande caractéristique de l'élongation (-C-O-) à 1204 cm^{-1} . La comparaison entre les spectres du **xyl-1**, **xyl-2** et **xyl-3** montre bien l'augmentation de l'intensités des bandes (-C=O) et (-C-O-), et donc le degré de réticulation, en fonction de la quantité de dianhydride de DTPA utilisées dans la réaction de réticulation.

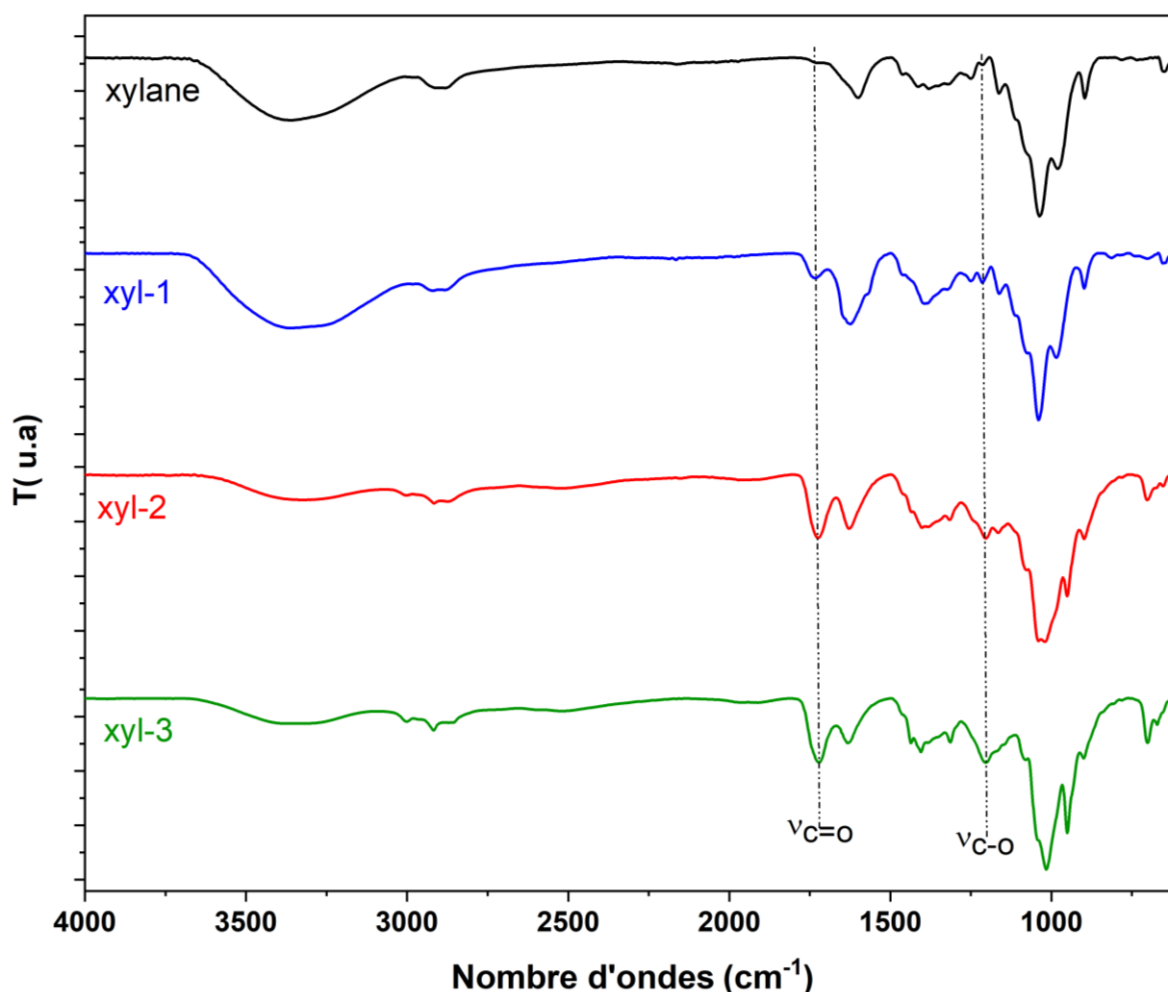


Figure 97 : Spectres IR des xylanes non modifiés, **xyl-1**, **xyl-2** et **xyl-3**

IV.3. Morphologie des hydrogels

Les hydrogels lyophilisés ont été analysés par microscopie électronique à balayage (MEB). La **Figure 98** montre des images MEB de coupes transversales des trois hydrogels synthétisés. Le **xyl-2** et le **xyl-3** présentent des structures macroporeuses avec des pores irréguliers. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces structures macroporeuses sont importantes pour les applications biomédicales puisque ces structures sont connues pour faciliter le chargement et le relargage de médicaments [311]. Nous pouvons également remarquer que la taille moyenne des pores du **xyl-2** est légèrement supérieure à celle du **xyl-3**, ce qui indique que le maille du **xyl-2** est plus large que celui du **xyl-3**. Une structure en forme de fibres peut être trouvée dans le **xyl-1** (**Figure 96a**) en raison de sa faible densité de réticulation observée sur le spectre IR (**Figure 97**).

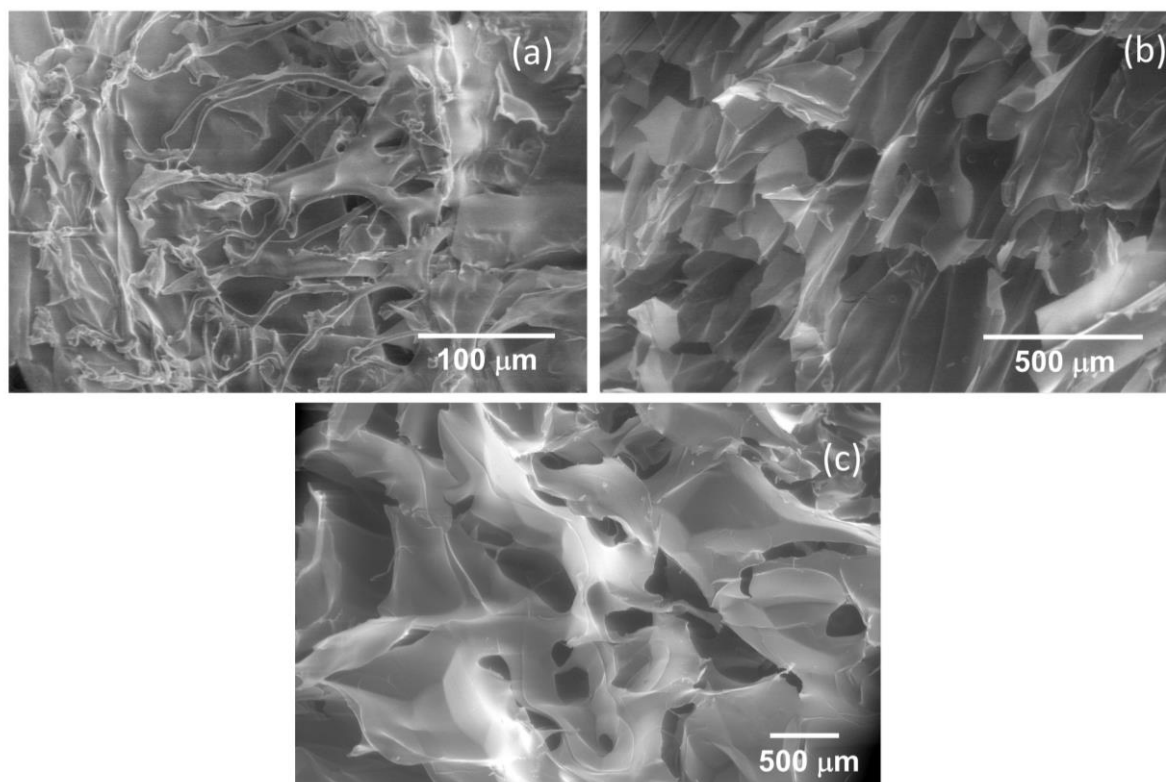


Figure 98 : Images MEB des sections transversales de (a) **xyl-1**, (b) **xyl-2** et (c) **xyl-3** lyophilisés

IV.4. Propriétés de gonflement

Le tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*) a été choisi comme solvant aqueux pour étudier le gonflement des hydrogels car son osmolalité et sa composition ionique sont similaires à celles des fluides du corps humain. Comme le montre la **Figure 99a**, les taux de gonflement des hydrogels préparés augmentent progressivement avec le temps à température ambiante. L'hydrogel **xyl-2** montre une meilleure capacité de gonflement que le **xyl-1** et le **xyl-3**. Cela pourrait être la conséquence de la faible porosité du **xyl-1** (**Figure 98a**), qui est due à la faible réticulation comme indiqué par les spectres IR (**Figure 94**). D'autre part, le taux de réticulation élevé du **xyl-3** conduit à la formation de pores plus petits que ceux du **xyl-2** (**Figure 98c**), ce qui est en accord avec un taux de gonflement plus faible.

Afin de vérifier la sensibilité de l'hydrogel à la température, le comportement de gonflement de l'hydrogel a été testé à différentes températures allant de 4 à 45 °C. Les équilibres de gonflement ont été atteints après 72 h d'immersion dans du PBS. Comme le montre la **Figure 99b**, les **xyl-2** et **xyl-3** peuvent effectivement atteindre leur équilibre de gonflement à 4 °C, qui reste pratiquement inchangé avec l'augmentation de la température. A l'inverse, la capacité de gonflement du **xyl-1** a montré une faible stabilité thermique avec les températures supérieures à 25° C (**Figure 99b**).

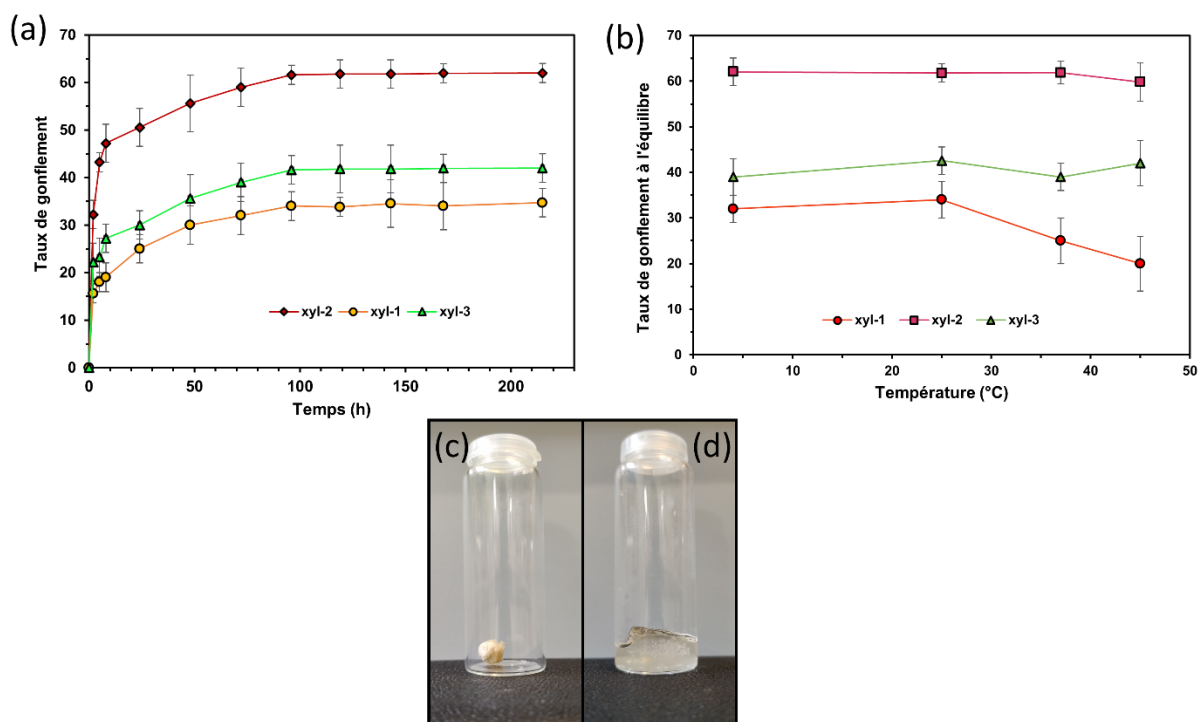


Figure 99 : (a) Taux de gonflement de **xyl-1**, **xyl-2**, et **xyl-3** en fonction de du temps à température ambiante ; (b) Taux de gonflement à l'équilibre de **xyl-1**, **xyl-2**, et **xyl-3** en fonction de la température ; photos de **xyl-2** : (c) avant et (d) après gonflement

Le **xyl-2**, qui présente une meilleure capacité de gonflement et une bonne stabilité thermique, a été choisi pour la suite de cette étude.

IV.5. Gonflement de l'hydrogel **xyl-2** en fonction du pH.

Les hydrogels sensibles au pH jouent un rôle important dans les applications de relargage contrôlé de médicaments et peuvent avoir un impact sur le traitement des plaies [312]. Afin de vérifier sa sensibilité au pH, le taux de gonflement à l'équilibre du **xyl-2** a été déterminé à différentes valeurs de pH. Comme le montre la **Figure 100**, le taux de gonflement à l'équilibre du **xyl-2** augmente progressivement avec le pH de 2 à 9. Nous pouvons supposer que ce comportement est le résultat de la déprotonation progressive des acides carboxyliques de l'hydrogel et de la répulsion électrostatique mutuelle qui en résulte entre les chaînes du réseau et les ponts de réticulation. Par conséquent, le réseau de l'hydrogel s'étend progressivement, ce qui justifie le taux de gonflement plus élevé à un pH élevé [313]. L'augmentation du pH au-dessus de 9,0 entraîne une diminution radicale du taux de gonflement. Cette chute drastique de taux de gonflement pourrait s'expliquer par l'hydrolyse des liaisons ester reliant les chaînes de xylane dans le milieu fortement basique, ce qui conduit à l'effondrement du réseau tridimensionnel.

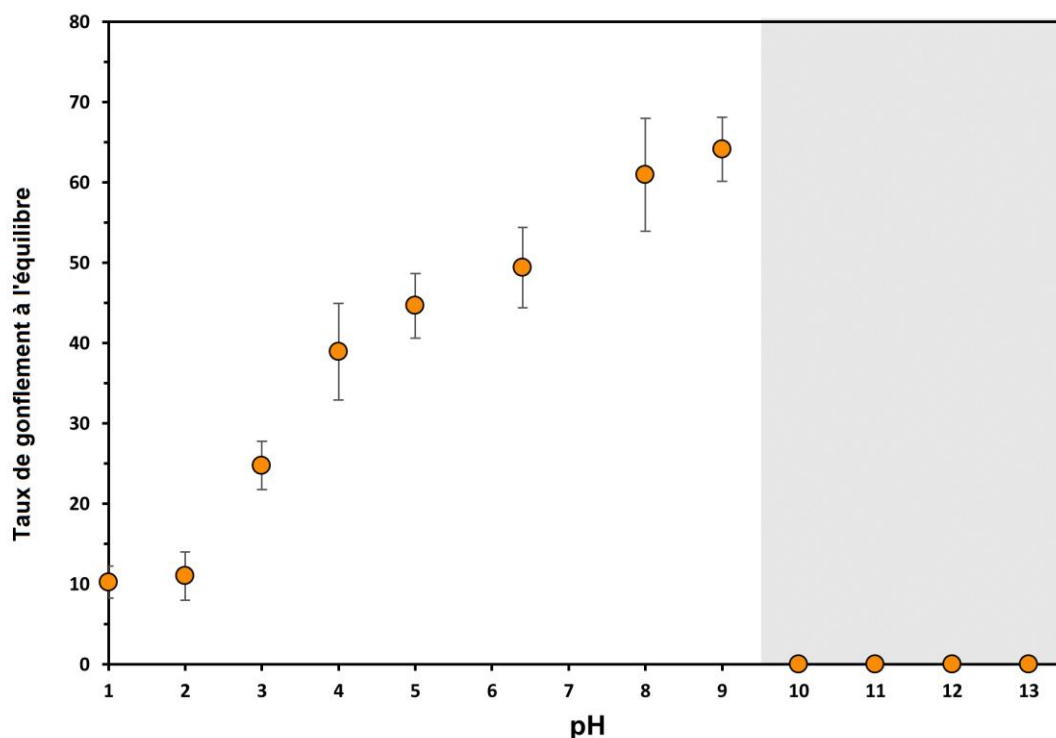


Figure 100 : Effet du pH sur le taux de gonflement à l'équilibre du xyl-2

IV.6. Chargement de l'hydrogel avec TMPyP

La TMPyP a été obtenue par N-méthylation de la tétrakis(4-pyridyl)porphyrine avec un excès d'iodure de méthyle. La structure de la TMPyP a été confirmée par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C et HRMS. L'encapsulation de TMPyP dans l'hydrogel **xyl-2** a été effectuée par immersion de **xyl-2** lyophilisé dans une solution aqueuse de TMPyP (2 mM) pendant 24 h. L'hydrogel chargé de PS résultant a pris une couleur rouge foncé (**Figure 101c**), similaire à la couleur de la solution de TMPyP.

L'hydrogel chargé (**xyl-TMPyP**) a été observé au microscope électronique à balayage (MEB) (**Figure 101a,b**). Les images obtenues montrent que le chargement en TMPyP n'a pas modifié la morphologie poreuse du gel. Cependant, on peut noter une diminution de la taille des pores et une augmentation de l'épaisseur de la paroi qui est probablement due à la formation d'une fine couche de TMPyP sur la paroi de l'hydrogel.

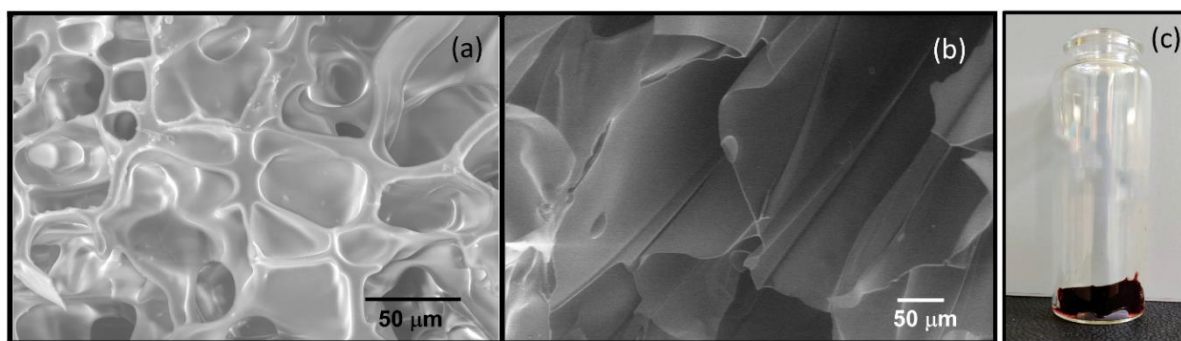


Figure 101 : Images MEB de (a) l'hydrogel chargé de TMPyP (**xyl-TMPyP**) et (b) l'hydrogel non chargé (**xyl-2**) ; (c) : photographie de **xyl-TMPyP**

L'hydrogel chargé en TMPyP a été lyophilisé puis immergé dans une solution d'hydroxyde de sodium (2 M) pour détruire la matrice de l'hydrogel et relarguer tout le TMPyP encapsulé. La quantité de TMPyP encapsulé représentait 10 % de la masse de l'hydrogel chargé de PS déterminé par photométrie (451 nm) en utilisant une courbe d'étalonnage de TMPyP libre dans de l'hydroxyde de sodium 2 M (**Figure 102**).

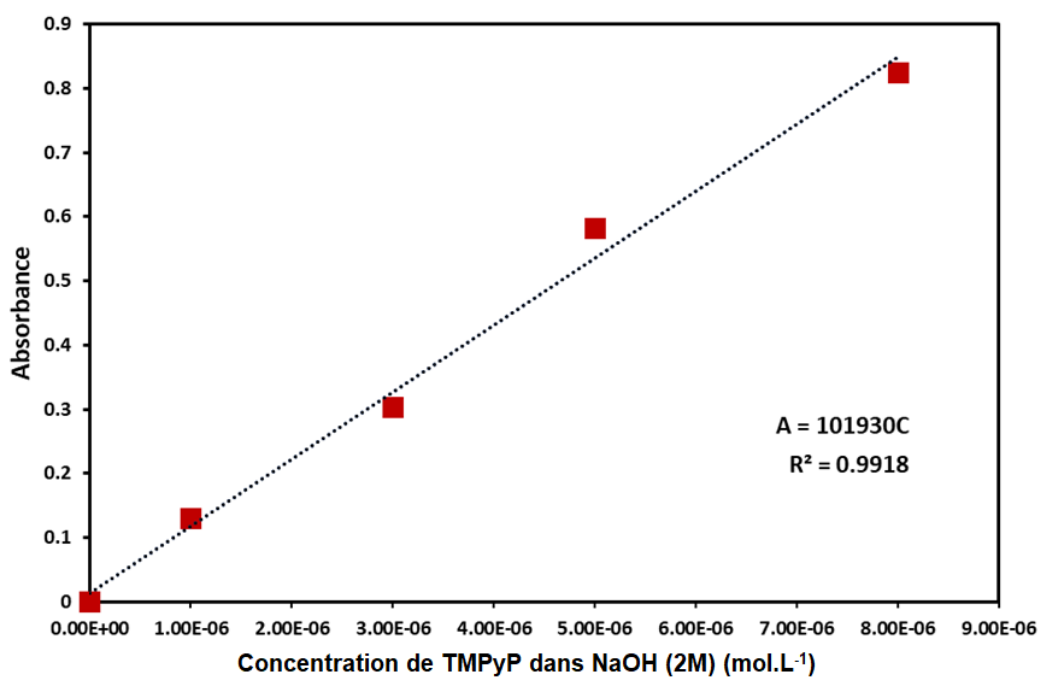


Figure 102 : Courbe d'étalonnage UV-Vis obtenue à partir de différentes concentrations de TMPyP libre dans de l'hydroxyde de sodium concentré (2M) ($\lambda_{\max} = 451 \text{ nm}$).

IV.7. Comportement rhéologique de l'hydrogel.

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée. Dans le cas des polymères, la rhéologie permet d'identifier leur comportement viscoélastique. Cette technique permet également de déterminer les propriétés mécaniques macroscopiques selon le type de structure présent dans le système.

L'analyse rhéologique a montré que les hydrogels chargés et non chargés en PS présentent des propriétés viscoélastiques similaires (**Figure 103a**). Les viscosités des deux hydrogels diminuent de 10^4 - 10^5 Pa.s à 1 Pa.s avec l'augmentation du taux de cisaillement. Ces résultats illustrent le comportement rhéofluidifiant des deux hydrogels, qui est une exigence pour les gels pharmaceutiques conçus pour une application topique [193]. De plus, un point de croisement peut être remarqué à environ 7 s^{-1} . En dessous de ce taux de cisaillement, la présence de TMPyP dans l'hydrogel augmente la viscosité par rapport au **xyl-2**. Ainsi, l'encapsulation de TMPyP dans l'hydrogel pourrait empêcher les mouvements macromoléculaires à faible taux de cisaillement, ce qui entraînerait une viscosité plus forte dans le domaine correspondant. Ensuite, avec un taux de cisaillement suffisamment élevé, la cohésion du réseau tridimensionnel disparaît légèrement, conduisant à une valeur plus faible de la viscosité de l'hydrogel chargé en TMPyP. Pour compléter ces analyses, des expériences de cisaillement oscillatoire ont été réalisées dans le domaine viscoélastique linéaire (**Figure 103b**). La valeur du module de conservation (G') était supérieure à celle du module de perte (G'') sur toute la plage de la fréquence angulaire étudiée. Ainsi, les deux hydrogels possèdent des propriétés dominées par l'élasticité à travers un réseau bien développé, confirmant le comportement de type hydrogel.

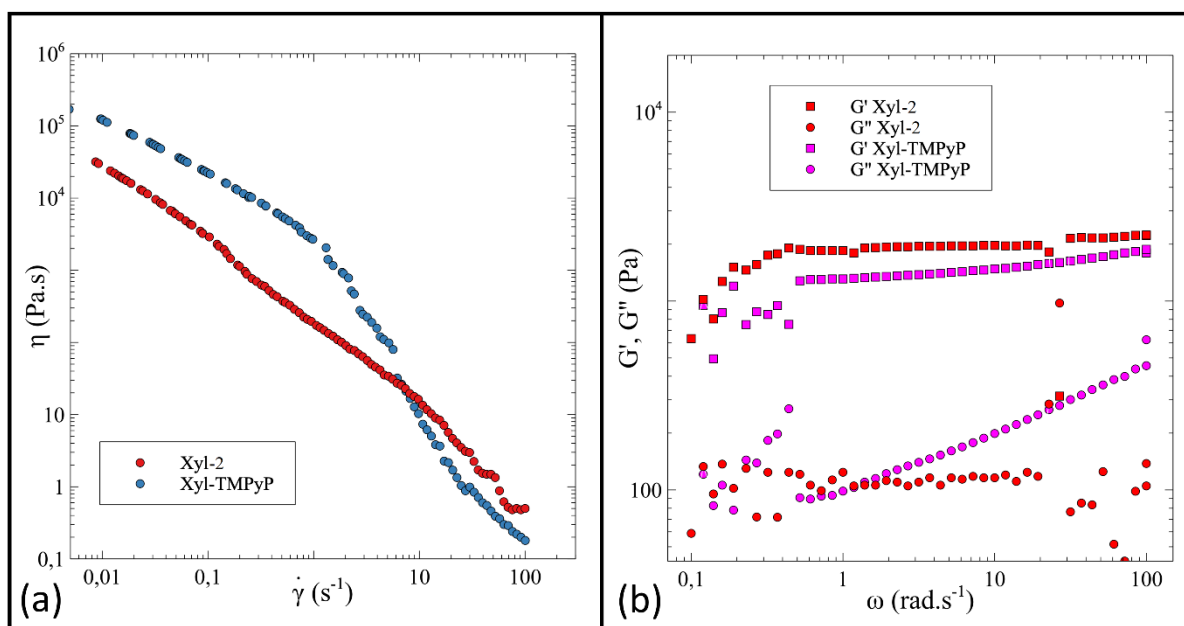


Figure 103 : (a) Propriétés rhéologiques de la viscosité (η) du **xyl-2** et du **xyl-TMPyP** en fonction du taux de cisaillement, et (b) module de conservation (G') et module de perte (G'') du **xyl-2** et du **xyl-TMPyP** en fonction de la fréquence angulaire.

IV.8. Relargage du PS *in vitro* et photoinactivation bactérienne.

Le relargage du TMPyP de l'hydrogel chargé en PS a été étudié dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C. L'hydrogel chargé de TMPyP a été immergé dans du PBS, et la quantité de TMPyP relarguée a été déterminée par spectroscopie UV-Vis en fonction du temps. Comme le montre la **Figure 104**, le relargage initial du PS était très rapide : environ 40 % de la TMPyP a été relarguée au cours des deux premières heures, puis le relargage de la TMPyP a ralenti en se rapprochant de l'équilibre de relargage. Après 10 heures, le relargage du TMPyP a atteint 88% et tout le TMPyP chargé a été relargué des hydrogels dans les 24 heures.

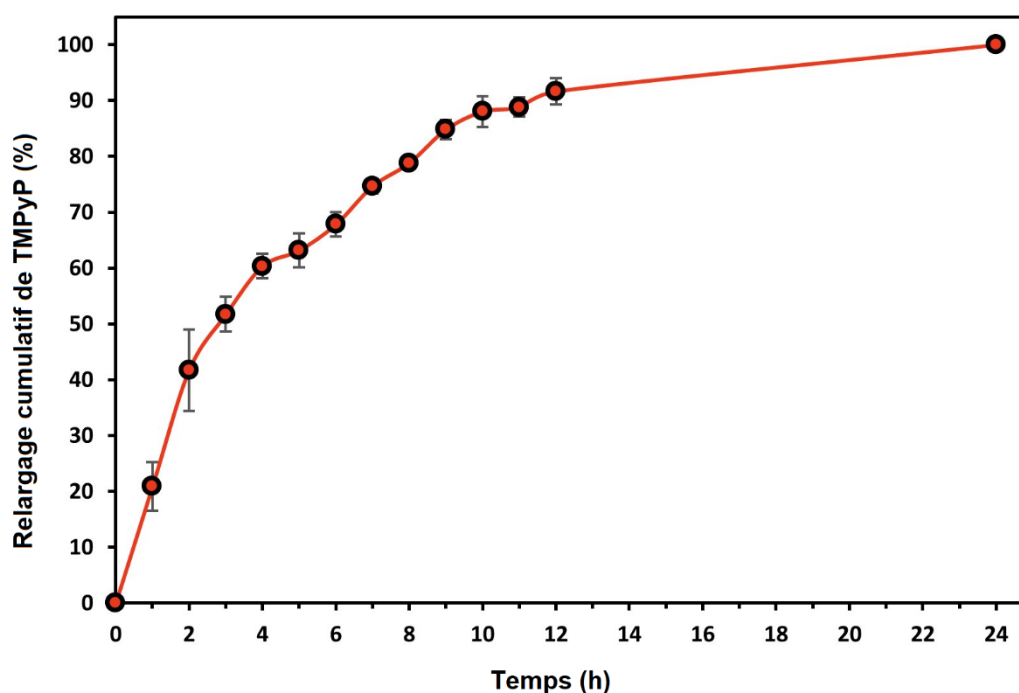


Figure 104 : Relargage *in vitro* de la TMPyP dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C.

Pour évaluer l'activité photobactéricide de l'hydrogel chargé de TMPyP, des tests de diffusion sur disques de gélose ont été réalisés sur quatre souches bactériennes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *S. aureus*) (**Figure 105**). 1 mL d'une suspension bactérienne de chaque souche (préparée à une concentration de 1×10^6 UFC/mL) a été étalée sur une gélose nutritive (milieu TS + 15g/L agar) dans des boîtes de Petri. Un puits de 0,5 cm de diamètre a été creusés dans la gélose. 1 mg d'hydrogel chargé de TMPyP a été déposé dans ce puits puis 50 μ L de PBS ont été ajoutés. Après 2 h d'incubation à l'obscurité à 37 °C, les boîtes de Petri ont été irradiées avec une lumière visible LED blanche à 37 °C (25 J/cm²). Après irradiation, les plaques ont été incubées pendant une nuit à l'obscurité, toujours à 37 °C. Aucune zone d'inhibition de la croissance n'a été observée pour les hydrogels non chargés, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. L'hydrogel chargé de TMPyP également n'a pas montré de cytotoxicité contre les souches bactériennes testées à l'obscurité. Cependant, après une irradiation lumineuse, les boîtes avec l'hydrogel chargé de TMPyP ont montré une zone significative d'inhibition de la croissance, attribuée au relargage et à la diffusion du TMPyP et à la mort subséquente des bactéries. La plus forte activité photobactéricide du TMPyP a été observée contre *S. aureus*, avec la plus grande zone d'inhibition ($20,7 \pm 1,5$ mm) comparée aux autres souches.

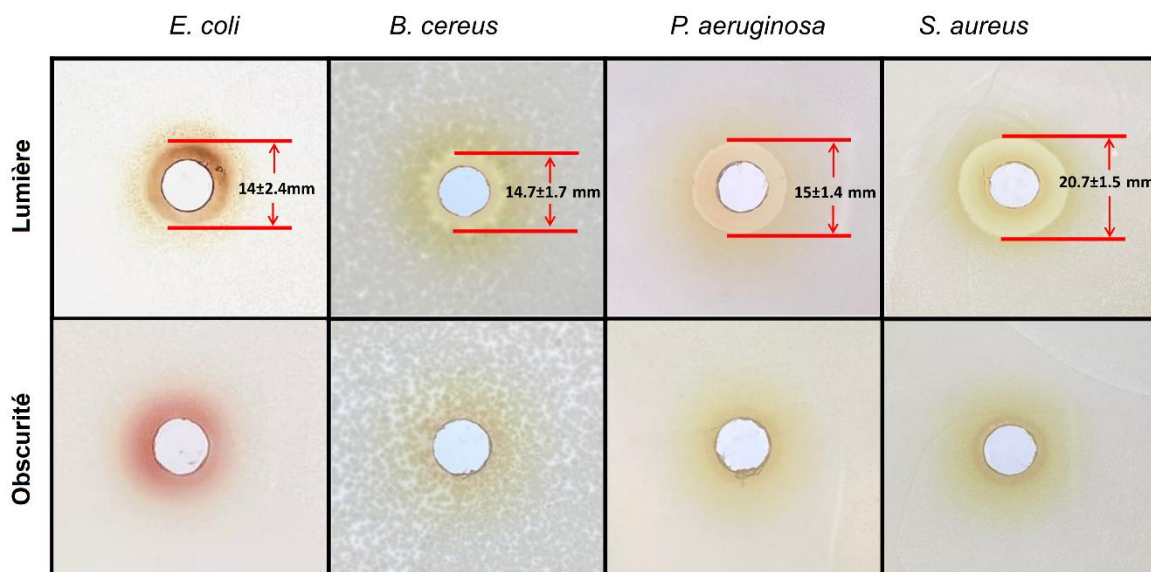


Figure 105 : Inhibition de la croissance bactérienne due au relargage de TMPyP par les hydrogels.

IV.9. Conclusion

Dans cette partie, nous avons mis en évidence une stratégie simple et facile pour synthétiser un hydrogel par réticulation du xylane. Les hydrogels synthétisés présentent une bonne intégrité mécanique et une structure poreuse interconnectée, ainsi qu'un taux de gonflement élevé (environ 62). L'hydrogel **xyl-2** chargé de TMPyP a montré un relargage prolongé de PS jusqu'à 24 heures et une photocytotoxicité contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* et *S. aureus*, alors qu'aucune cytotoxicité n'a été observée à l'obscurité. Dans l'ensemble, l'hydrogel a montré un fort potentiel pour la chimiothérapie antimicrobienne photodynamique.

V. Élaboration des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon covalente

V.1. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse des hydrogels par la deuxième approche comporte trois étapes. Dans un premier temps, une porphyrine cationique porteuse d'un bras espaceur est synthétisée. La deuxième étape consiste à fonctionnaliser le xylane par ces porphyrines selon une réaction d'estérification. Ces derniers permettront, lors d'une troisième étape, de préparer un hydrogel selon une réaction de réticulation en utilisant le dianhydride de DTPA (**Figure 106**).

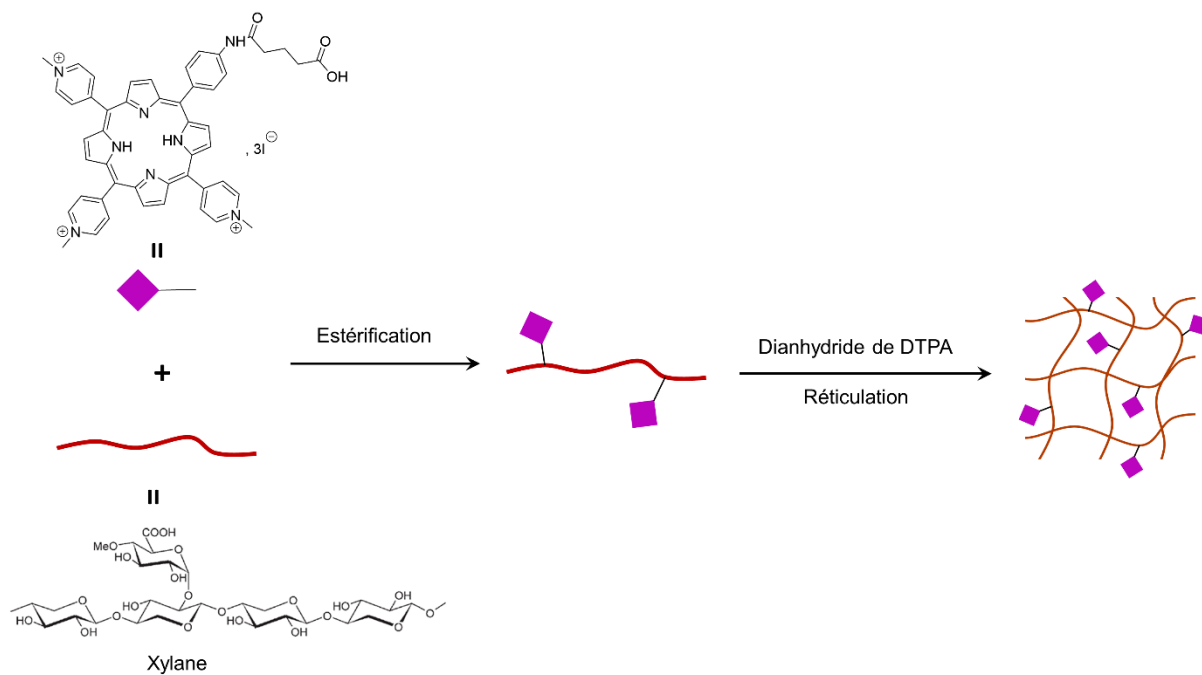


Figure 106 : Stratégie de synthèse des hydrogels à base de xylane portant des PS liés de façon covalente.

V.2. Fonctionnalisation du xylane par la tri(4-pyridyl)porphyrine

V.2.1. Synthèse de la 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (14)

La porphyrine **(14)** a été synthétisée par la méthode des « aldéhydes mixtes » présentée précédemment (Figure 107).

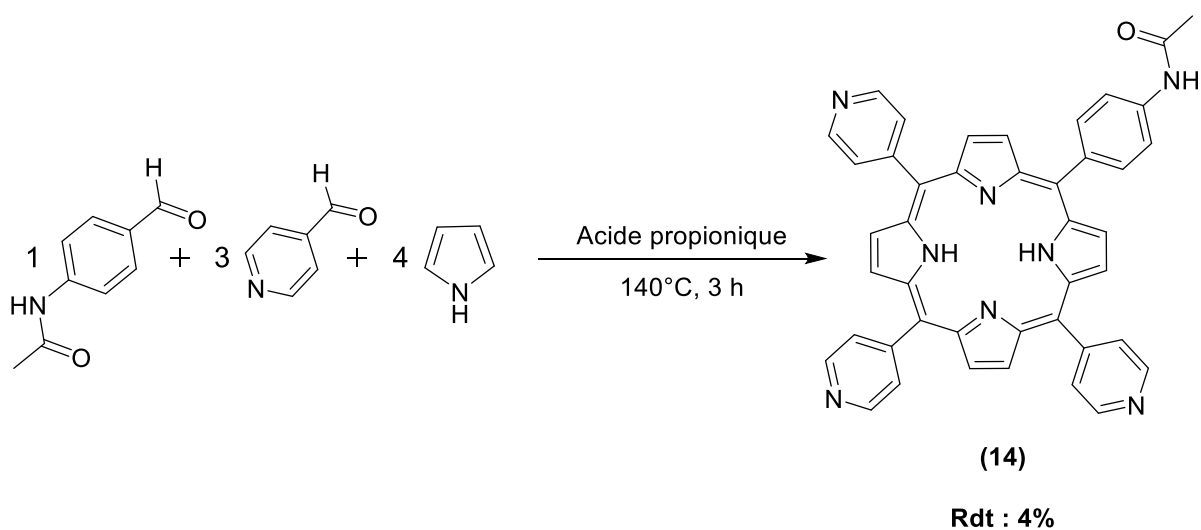


Figure 107 : Synthèse de la 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine **(14)** par la méthode des aldéhydes mixtes.

Le produit attendu est obtenu par condensation du pyrrole et du 4-pyridylcarboxaldéhyde sur le 4-acétamidobenzaldéhyde dans des proportions stoechiométriques. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé **(14)** est isolé avec un rendement de 4%.

La structure de la porphyrine **(14)** a été confirmée par spectroscopie RMN ^1H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H du composé **(14)**, les signaux des groupes de protons β -pyrroliques et *ortho*-pyridyliques entre 8,74 et 9,12 ppm et les protons *mé*ta-pyridyliques à 8,16 ppm (s, 6H), ainsi que les protons aromatiques à 7,98 ppm (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ho-Ar) et à 7,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Hm-Ar) sont en effet caractéristiques d'une *mé*so-tripyritylporphyrine mono-substituée. De plus, la présence d'un signal à -2,84 ppm confirme que cette porphyrine est bien sous sa forme base libre. Enfin, le singulet à 7,79 ppm correspond à l'hydrogène de l'amide, et le singulet à 2,38 ppm correspond au proton de l'acétyle. Le spectre d'absorption UV-Visible présente le profil attendu pour une porphyrine base libre avec une bande de Soret à 420 nm, ainsi que quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 644, 588, 550 et 514 nm.

Ces résultats sont confirmés par spectrométrie de masse ($\text{C}_{43}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 675,2621$ calculée, 675,2615 trouvée.)

V.2.2. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine **(15)**

La déprotection de la fonction amine est réalisée par hydrolyse acide dans une solution d'acide chlorhydrique à 5 M à reflux (**Figure 108**).

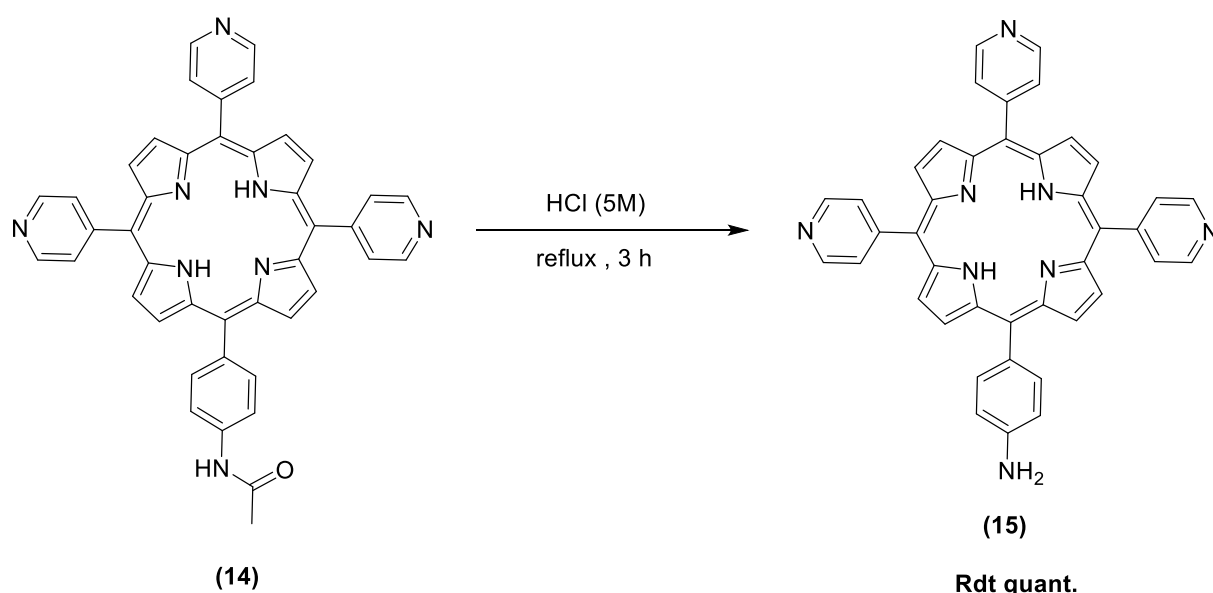


Figure 108 : Synthèse de la porphyrine **(15)**.

Après neutralisation par NaHCO_3 et lavage à l'eau, la porphyrine **(15)** est obtenue avec un rendement quantitatif. La structure de cette dernière a été confirmée par spectroscopies RMN ^1H et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H , la disparition des signaux caractéristiques de l'acétyle atteste du succès de la déprotection. Le spectre UV-Visible reste proche de celui des composés précédents, avec une bande de Soret à 420 nm et quatre bandes Q I, II, III et IV respectivement à 644, 588, 550 et 514 nm. L'analyse par spectrométrie de masse confirme quant à elle la formation du composé déprotégé.

V.2.3. Fixation du bras espaceur sur la porphyrine (14)

La fonctionnalisation de la porphyrine **(14)** avec l'acide glutarique par ouverture de l'anhydride glutarique est réalisée dans du dichlorométhane anhydre et sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 24 h (**Figure 109**).

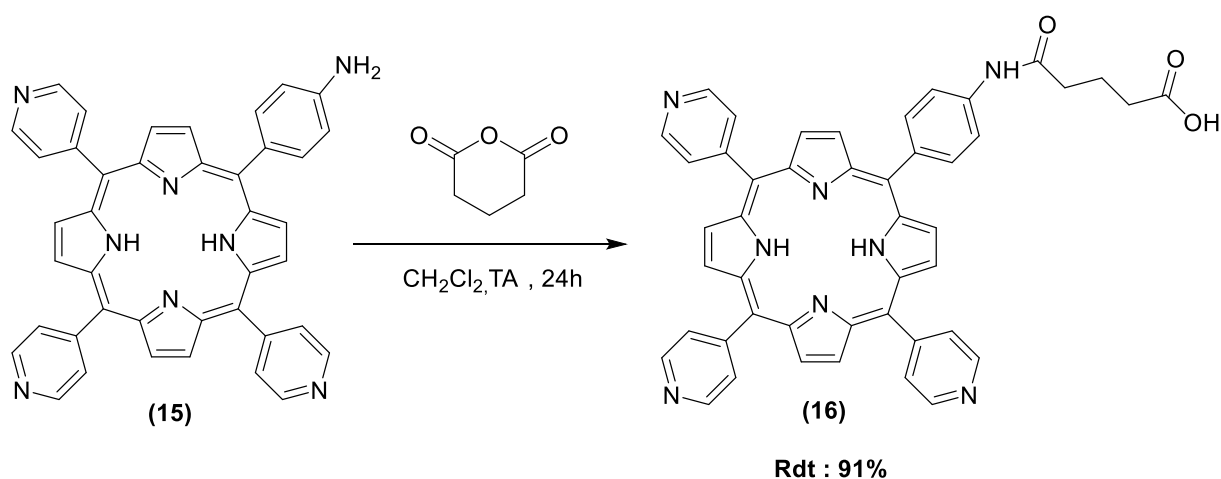


Figure 109 : Synthèse de la porphyrine **(16)**.

Après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice est de l'ordre de 91%. La structure du produit de couplage **(16)** a été confirmée par spectroscopies RMN et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H , les signaux à 2,61 ppm (m, 2H), 2,50 ppm (m, 2H) et 2,16 ppm (m, 2H) sont en effet caractéristiques du bras organique greffé. Le spectre d'absorption UV-Visible, est comme attendu là encore similaire à celui de la porphyrine de départ **(15)**, avec une bande de Soret à 419 nm ainsi que quatre bandes Q I, II, III, et IV respectivement à 645, 590, 550 et 515 nm.

V.2.4. N-méthylation de la porphyrine (16)

La N-méthylation des pyridyles est réalisée avec un excès d'iodure de méthyle dans le DMF anhydre (**Figure 110**). Après 3 h de réaction à reflux, la porphyrine cationique **(17)** est obtenue à l'issue d'une précipitation dans l'éther diéthylique avec un rendement quantitatif.

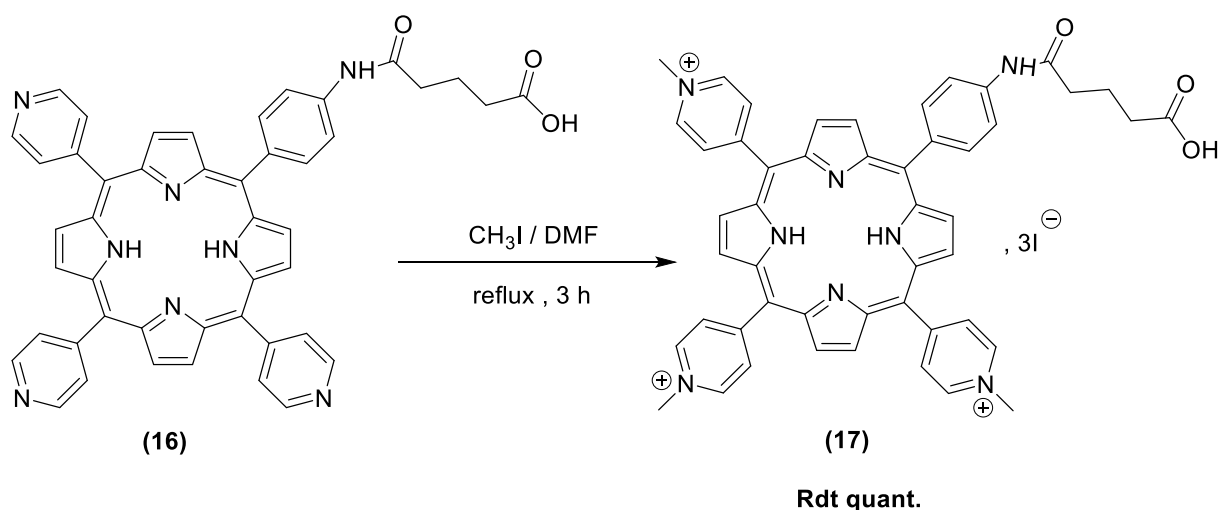


Figure 110 : N-méthylation de la porphyrine **(16)**.

La structure de la porphyrine cationique **(17)** a été confirmée par spectroscopies RMN et d'absorption UV-Visible. Sur le spectre RMN ^1H (**Figure 111**), en plus, des signaux caractéristiques des protons de la *méso*-tripyridylporphyrine mono-substituée à 9,48 ppm (d, $J = 6,1$ Hz, 6H, Ho-py), 9,16 ppm (s, 4H, H_β pyrr), 9,06 ppm (s, 4H, H_β pyrr), 8,02-8,89 ppm (m, 6H, Hm-py), 8,16 ppm (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ho-Ar), 8,12 ppm (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Hm-Ar) et - 2,99 ppm (s, 2H, NH) et les signaux caractéristiques aux protons portés par l'espaceur à 2,56 ppm (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2), 2,41 ppm (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH_2) et 1,96 ppm (quin, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH_2), on trouve un signal supplémentaire qui apparait sous la forme d'un singlet à 4,72 ppm et qui correspond aux 9 protons des méthyles des N-pyridiniums.

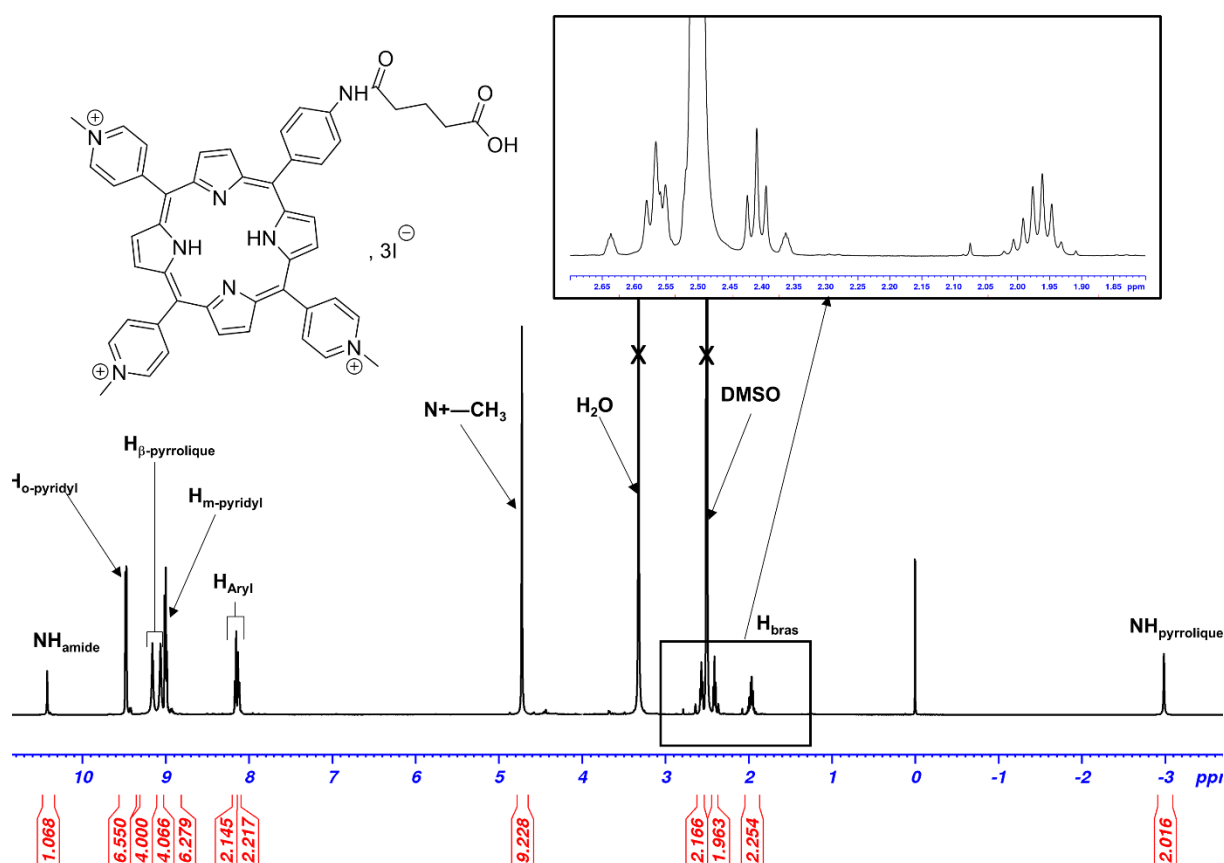


Figure 111 : Spectre RMN ^1H du composé **(17)** dans DMSO-d_6

Le spectre UV-Visible dans le DMSO est proche de celui de la porphyrine **(16)**, avec une bande de Soret à 429 nm ainsi que quatre bandes Q I, II, III, et IV respectivement à 647, 591, 557 et 520 nm. L'analyse par spectrométrie de masse confirme quant à elle la formation du composé méthylé ($\text{C}_{49}\text{H}_{43}\text{N}_8\text{O}_3$ [M] $^{3+}$, $m/z = 263,7814$ calculée, 263,7814 trouvée)

V.2.5. Greffage de la porphyrine **(17)** sur le xylane

L'estérification du xylane a été réalisée en utilisant le N,N'-carbonyldiimidazole (CDI) comme agent de couplage, suivant les travaux réalisés dans notre laboratoire par Bouramtane *et coll.* [314]. Cette réaction commence par une étape d'activation de la fonction acide carboxylique de la porphyrine **(17)** avec 6 équivalents de CDI dans le DMSO, pendant 24 h à 60 °C. Après activation de la porphyrine **(17)**, 500 mg de xylane préalablement solubilisés dans le DMSO sont ajoutés au milieu réactionnel. Cette réaction a été conduite pendant 24 h à 80 °C (**Figure 112**). Sept quantités de la porphyrine **(17)** (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,08 et 0,1 équivalent par rapport à une unité d'anhydroxylose) ont été utilisées pour obtenir les hydrogels **xyl-P1**, **xyl-P2**, **xyl-P3**, **xyl-P4**, **xyl-P5**, **xyl-P6** et **xyl-P7**, respectivement.

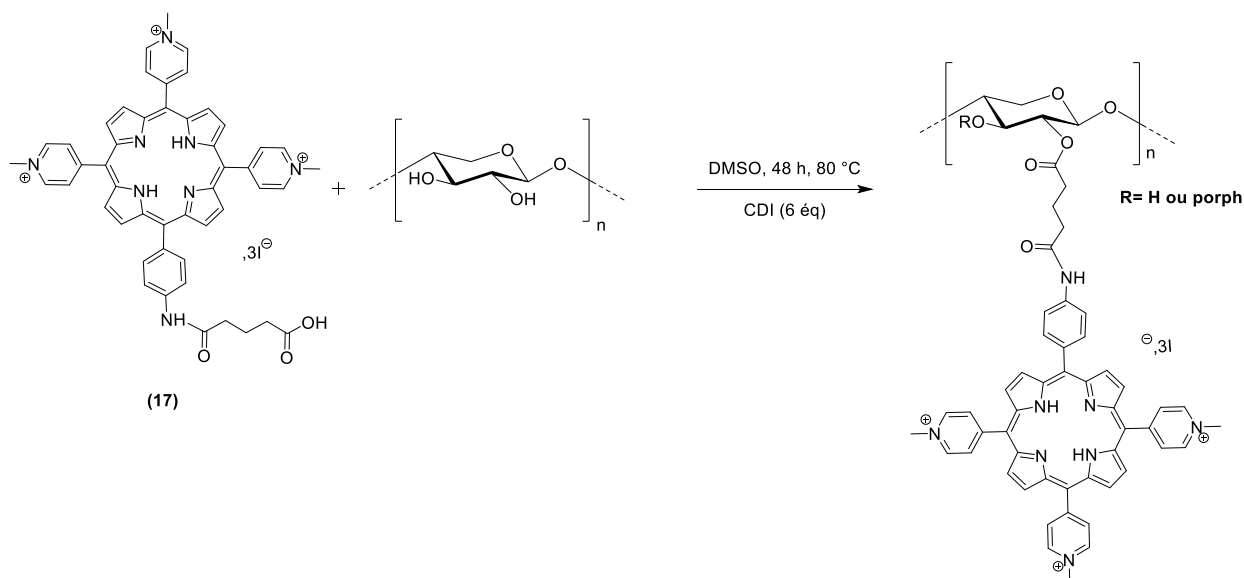


Figure 112 : Greffage de la porphyrine **(17)** sur le xylane.

À la fin de la réaction, le produit obtenu est précipité par l'ajout d'éthanol absolu puis récupéré par filtration et lavé à l'éthanol pour éliminer la porphyrine qui n'a pas réagi, puis séchée à l'étuve à 60 °C.

La comparaison des spectres infrarouge du xylane avant et après fixation de la porphyrine permet de mettre en évidence la présence d'une nouvelle bande intense entre 1680 et 1755 cm^{-1} , correspondant aux superpositions des bandes caractéristiques des carbonyles de l'ester et l'amide (**Figure 113**).

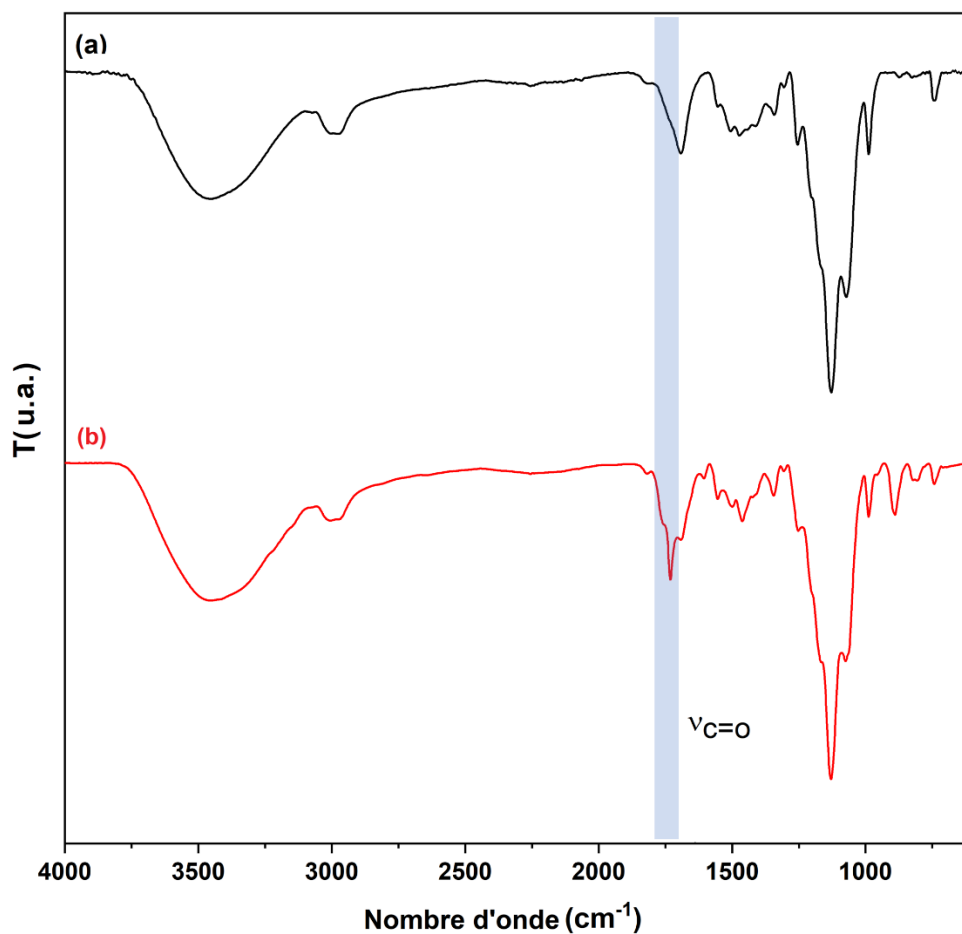


Figure 113 : Spectres IR du xylane (a) avant et (b) après fixation de la porphyrine **(17)**.

La fixation a été confirmée par une analyse RMN ^1H du xylane fonctionnalisé. Le spectre obtenu (**Figure 114**) permet de distinguer deux zones principales. La première correspond aux protons du xylane qui résonnent entre 3,0 et 5,5 ppm, la deuxième est attribuée aux protons de la porphyrine greffée sur le xylane qui résonnent entre 7,5 et 9,6 ppm. Les 9 protons méthyliques des N-pyridiniums résonnent sous la forme d'un singulet à 4,7 ppm. Les deux protons portés par les azotes des pyrroles résonnent à -3,0 ppm.

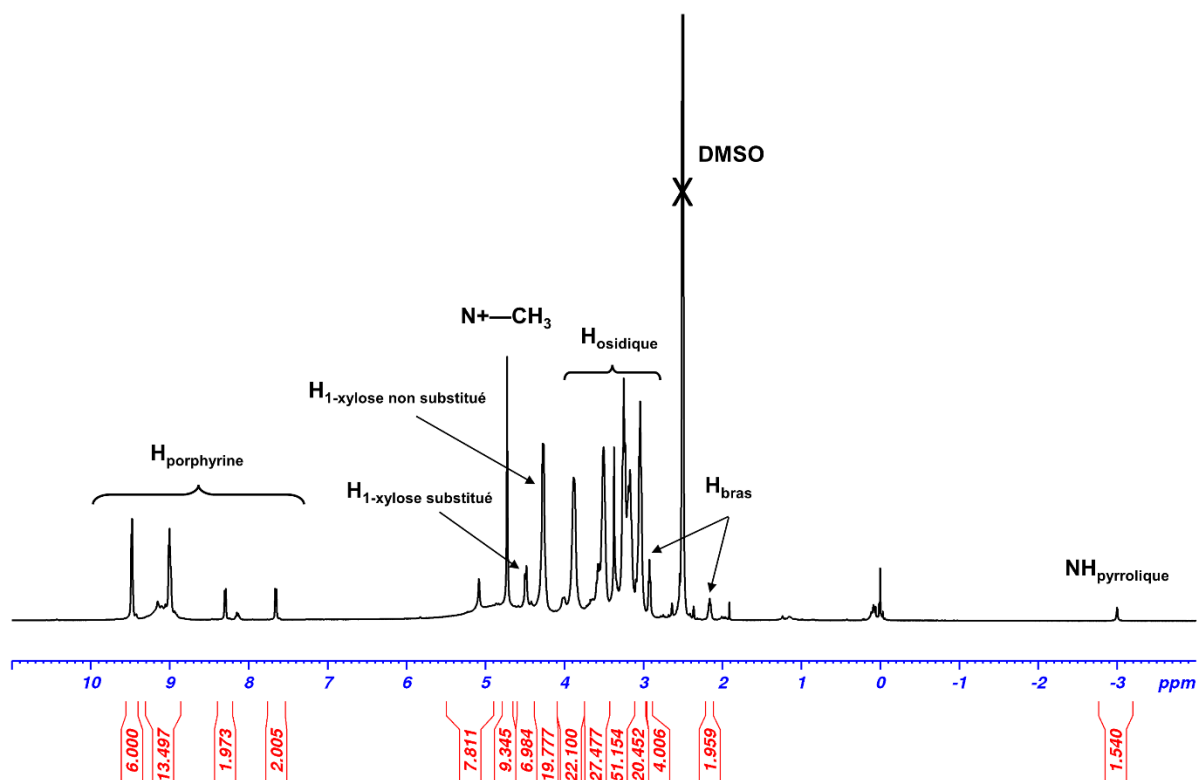


Figure 114 : Spectre RMN ^1H du xylane fonctionnalisé, dans DMSO-d_6 .

Les spectres RMN ^1H des xylanes fonctionnalisés ont permis de calculer le degré de substitution du xylane en porphyrine, en faisant le rapport entre l'intégration d'un proton porphyrinique et l'intégration d'un proton d'une unité xylose. Nous avons choisi d'exprimer le DS en nombre de molécules de porphyrine par unité de répétition de xylane (10 xyloses). Il est calculé à partir de l'équation (E2) :

$$DS = \frac{\Sigma \text{aromatique H}/24}{(\text{H1 xylose substitué} + \text{H1 xylose non substitué})/10} \quad (\text{E2})$$

H (porphyrine) correspond à la somme des intégrations des protons entre 7,5 et 9,6 ppm, et H1 (xylane) est la somme des intégrations des protons anomériques d'unités xylose substituées et non substituées à 4,49 et 4,27 ppm, respectivement. La porphyrine possède 24 protons aromatiques et le motif de répétition du xylane comporte 10 unités xylose. Les DS obtenus sont répertoriés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : DS et nombres d'équivalents de la porphyrine **(17)** utilisés pour obtenir les différents xylanes fonctionnalisés.

Échantillon	Xyl-P1	Xyl-P2	Xyl-P3	Xyl-P4	Xyl-P5	Xyl-P6	Xyl-P7
Nombre d'éq. de (17)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,08	0,10
DS	0,03	0,08	0,11	0,15	0,19	0,37	0,53

V.3. Préparation des hydrogels

Les hydrogels sont préparés en utilisant la même procédure que pour les xylanes non modifiés. Les xylanes fonctionnalisés ont été solubilisés dans du DMSO pendant 24 h à 60 °C. Le dianhydride de DTPA est ensuite ajouté (0,3 éq. par unité anhydroxylose). Après 24 h à 80 °C, les hydrogels résultants ont été immergés dans un excès d'eau distillée et laissé gonfler pendant 7 jours à température ambiante, avec un changement d'eau quotidien, puis lyophilisés (**Figure 115**).

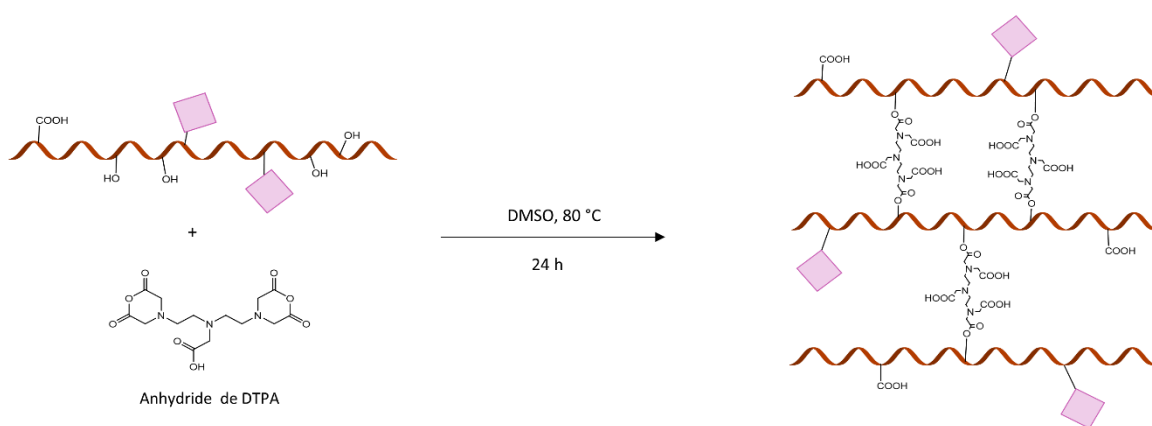


Figure 115 : Réticulation du xylane fonctionnalisé.

La réticulation des xylanes fonctionnalisés a été confirmée par spectroscopie infrarouge. Le spectre IR de **xyl-P5** (**Figure 116**), par exemple, montre l'apparition de la bande à 1745 cm^{-1} caractéristique de l'élongation (-C=O). La présence de cette nouvelle bande confirme l'existence de nouveaux groupes carbonyles due à la fixation du dianhydride de DTPA.

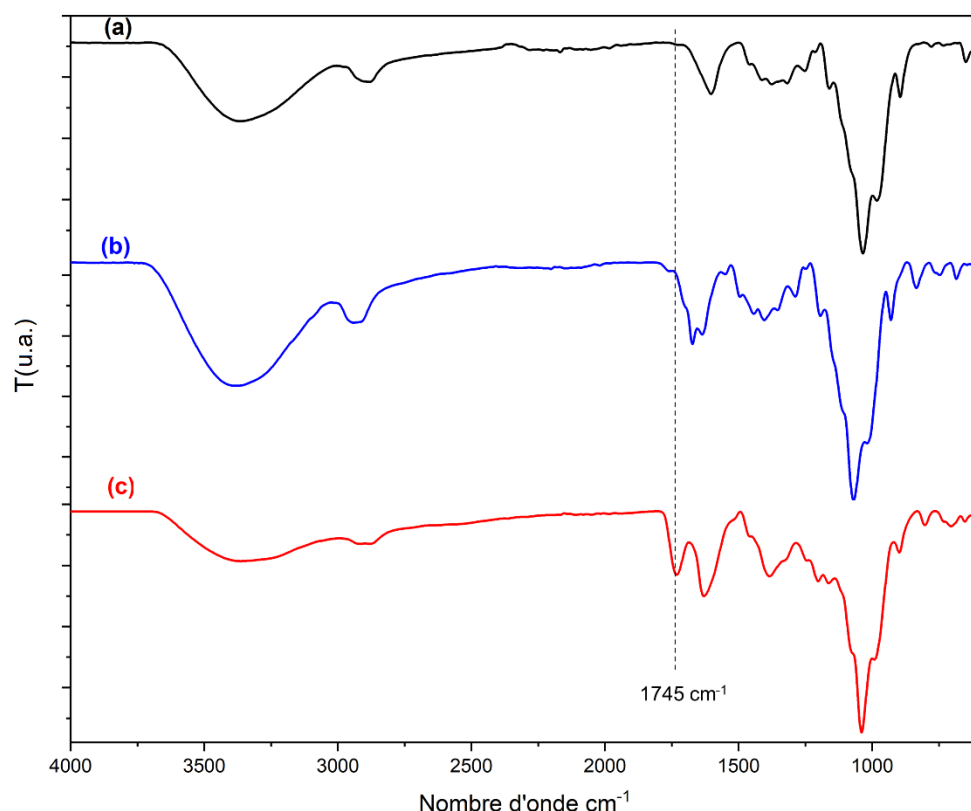


Figure 116 : Spectres IR (a) du xylane natif, (b) du **xyl-P5** et (c) de l'hydrogel formé à partir de **xyl-P5**.

Nous avons appliqué ce protocole expérimental sur tous les xylanes fonctionnalisés. Les échantillons qui ont un DS en porphyrine inférieur ou égale à 0,19 (**xyl-P1**, **xyl-P2**, **xyl-P3**, **xyl-P4** et **xyl-P5**) ont formé respectivement les hydrogels **HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3**, **HG-xyl-P4** et **HG-xyl-P5**. Cependant, Les échantillons **xyl-P6** (DS = 0,37) et **xyl-P7** (DS = 0,53) n'ont pas donné lieu à la formation des hydrogels (pas de gélification à la fin de la réaction et l'absence de bande à 1745 cm^{-1} sur le spectre IR) malgré l'augmentation de la quantité de dianhydride DTPA. Nous supposons que cela vient de la combinaison de la répulsion électrostatique due à la présence de charges positives et de l'encombrement stérique entre chaînes qui ont des degrés des substitutions élevés, ce qui rend la réticulation plus difficile.

V.4. Détermination de la quantité de porphyrine dans les hydrogels

Afin de déterminer la quantité de porphyrine greffés dans les hydrogels. Les hydrogels (**HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3**, **HG-xyl-P4** et **HG-xyl-P5**) lyophilisés obtenus ont été immergés dans une solution de NaOH 2 M pour détruire la matrice de l'hydrogel et rompre les liaisons entre les porphyrines et le xylane. Ainsi, les pourcentages massiques en

porphyrines sont déterminés par spectrophotométrie (448 nm) en utilisant une courbe d'étalonnage de la porphyrine **(17)** libre dans du NaOH 2M (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Pourcentage massique en porphyrine déterminé pour chaque hydrogel.

Hydrogels	HG-XYL-P1	HG-XYL-P2	HG-XYL-P3	HG-XYL-P4	HG-XYL-P5
Pourcentage massique en porphyrines (%)	3,8	6,8	7,7	9,9	13,9

V.5. Morphologie des hydrogels

Les hydrogels lyophilisés ont été analysés par microscopie électronique à balayage. Comme le montre la **Figure 117**, les cinq hydrogels synthétisés présentent des structures poreuses avec des pores irréguliers allant de 50 à 900 μm . Cette similitude de structures des hydrogels est probablement due à l'utilisation de la même quantité de réticulant. On remarque également, que la structure des cinq hydrogels est similaire au réseau tridimensionnel des hydrogels préparés de la même manière mais avec du xylane non modifié (voir IV.3). Cela démontre que la fonctionnalisation du xylane avec des porphyrines cationiques n'affecte pas de manière significative la structure du réseau polymérique de l'hydrogel.

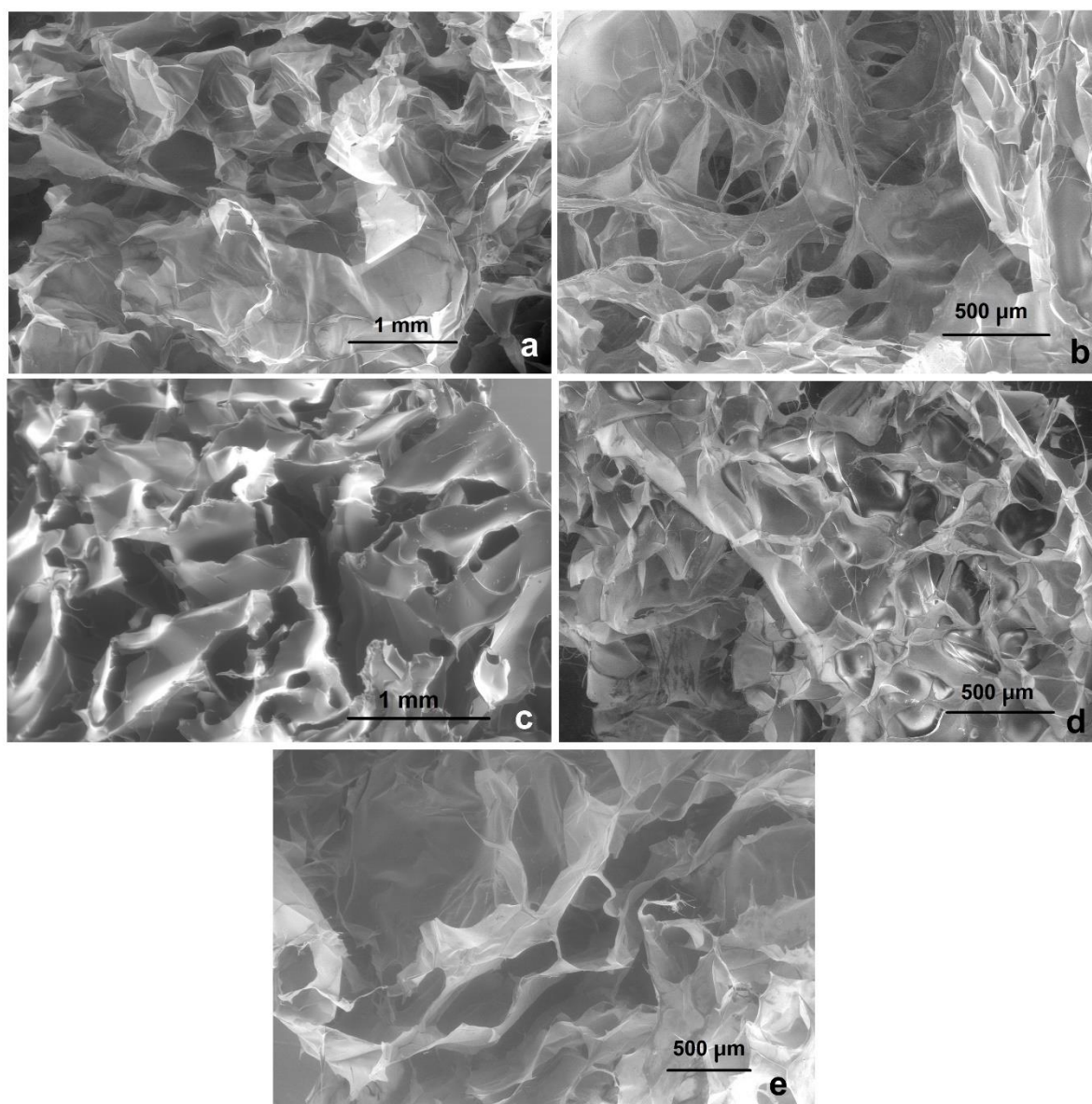


Figure 117 : Images MEB des sections transversales de (a) **HG-xyl-P1**, (b) **HG-xyl-P2**, (c) **HG-xyl-P3**, (d) **HG-xyl-P4** et (e) **HG-xyl-P5** lyophilisés.

V.6. Propriétés de gonflement

Le comportement de gonflement des hydrogels a été étudié dans du PBS (pH 7,4) à 37 °C. Comme le montre la **Figure 118**, tous les hydrogels ont montré une bonne capacité de gonflement. Ces hydrogels ont mis environ 10 heures pour atteindre les équilibres de gonflement. Les comportements de gonflement sont similaires, avec **HG-xyl-P1** et **HG-xyl-P2** qui diffèrent un peu des autres, montrant un taux de gonflement plus élevé sur toute la gamme de temps étudiée et un taux de gonflement à l'équilibre supérieur à 100.

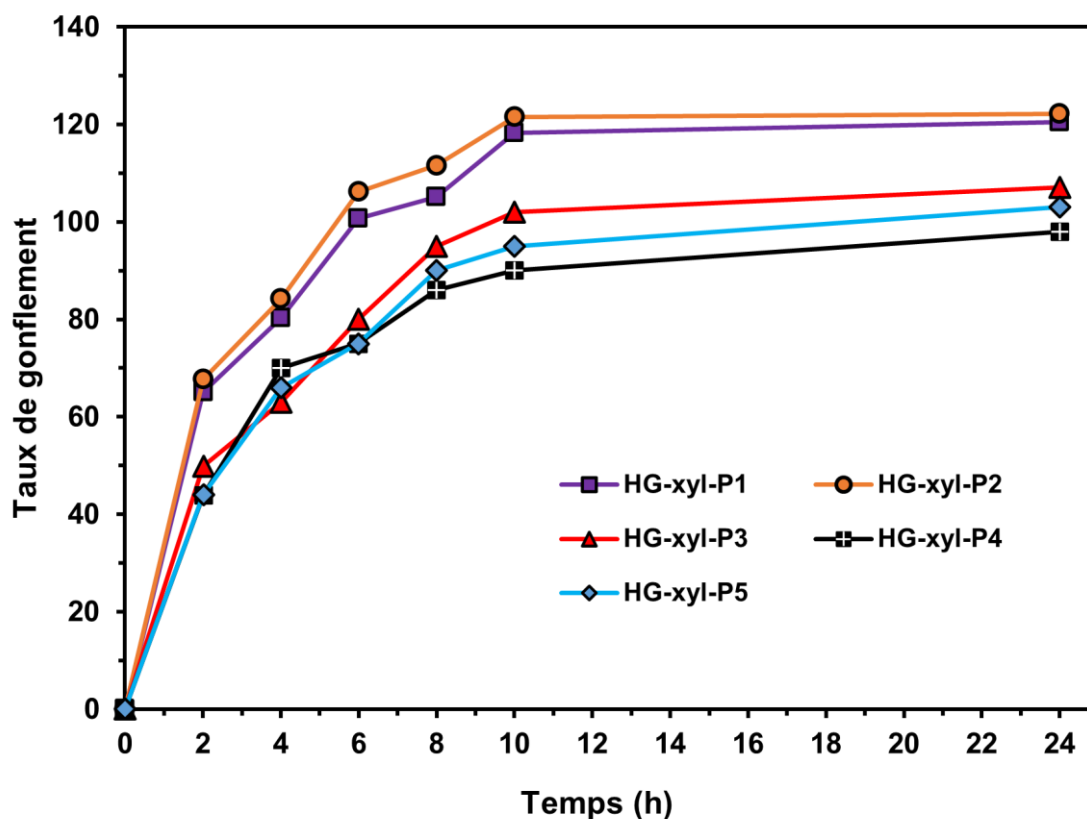


Figure 118: Taux de gonflement de **HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3**, **HG-xyl-P4** et **HG-xyl-P5** en fonction du temps.

V.7. Comportement rhéologique des hydrogels

Le comportement rhéologique des hydrogels est représenté sur la **Figure 119**. La viscosité des hydrogels est mesurée à 25 °C avec un taux de cisaillement de 0,01 à 100 s⁻¹ et les résultats sont représentés dans la **Figure 119a**. Pour tous les hydrogels, avec un taux de cisaillement croissant, la viscosité diminue d'un maximum de 3 Pa.s à un minimum de 10⁻³ Pa.s, se référant au comportement d'amincissement par cisaillement des hydrogels. À un taux de cisaillement élevé (>10 s⁻¹), les viscosités de tous les hydrogels se trouvent dans la même région (entre 10⁻³ et 5.10⁻³ Pa.s), bien que la nature distincte des courbes soit visible à un taux de cisaillement plus faible (c'est-à-dire inférieur à 0,1 Pa.s). Ceci est attribué au relâchement du réseau initial à un taux de cisaillement élevé. Nous remarquons également que **HG-xyl-P5** diffère légèrement des autres, montrant une viscosité plus élevée pour presque toute la gamme de taux de cisaillement étudiée. Cette augmentation de la viscosité observée pour **HG-xyl-P5** peut être due à la grande quantité de porphyrines cationiques que contient cet hydrogel, et qui peuvent interagir ioniquement avec le groupe carboxyle (-COO⁻) du réticulant. Pour compléter ces analyses, des essais de cisaillement oscillatoire ont été réalisés dans le domaine viscoélastique linéaire (**Figure 119b**). La valeur du module de conservation (G') était

supérieure à celle du module de perte (G'') sur toute la plage de la fréquence angulaire étudiée. Ainsi, tous les hydrogels possèdent des propriétés dominées par l'élasticité à travers un réseau bien développé, confirmant le comportement de type hydrogel des échantillons.

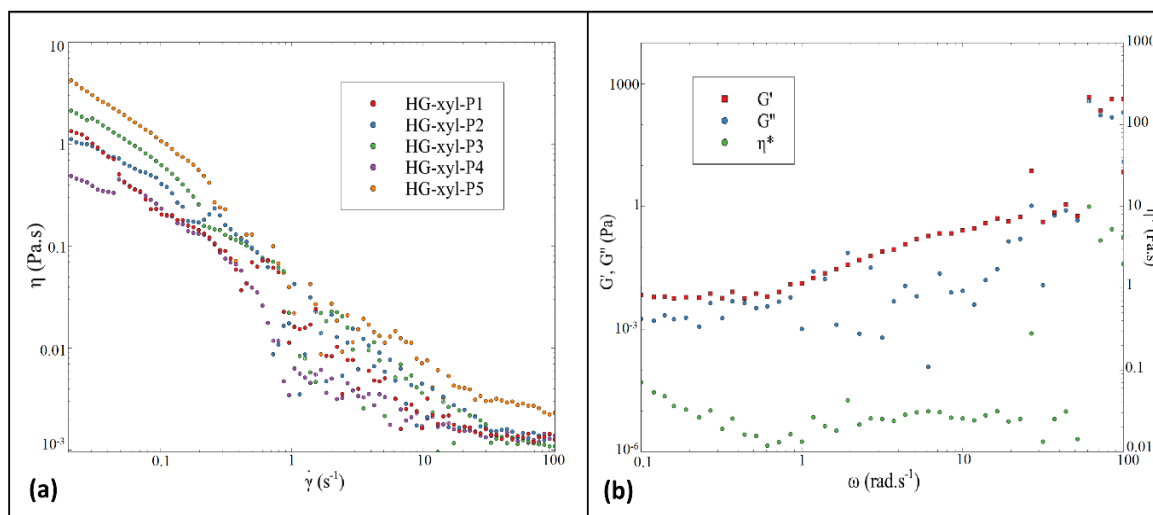


Figure 119 : Propriétés rhéologiques de **HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3**, **HG-xyl-P4** et **HG-xyl-P5** : viscosité (η) en fonction du taux de cisaillement (a), tendance typique des valeurs du module de conservation (G') et du module de perte (G'') en fonction de la fréquence angulaire pendant l'essai de balayage effectué sur le **HG-xyl-P4** (b).

V.8. Evaluation de l'activité antibactérienne des hydrogels

Les tests microbiologiques ont été réalisés sur deux souches bactériennes, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. A partir d'une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle, 100 μL de cette suspension à 10^6 UFC/mL et 1 mg d'hydrogels lyophilisés (**HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3** et **HG-xyl-P4**) ont été déposés dans les puits d'une plaque 96-puits, puis ont été incubés à 37 °C pendant 1 h à l'obscurité. Les plaques ont ensuite été irradiées avec une lumière visible LED blanche à 37 °C (25 J/cm²). Ensuite, le contenu des puits est transféré dans des eppendorfs et placé dans un bain à ultrason afin de décrocher toutes les bactéries des différents hydrogels, puis des dilutions en série au 1/10ème sont effectuées etensemencées sur milieux gélosés (TS+ 17g/L Agar). En parallèle, des solutions de TMPyP à (3,8%, 6,8%, 7,7% et 9,9%) qui correspondent aux quantités de porphyrine cationique greffée sur les différents hydrogels ont été testées. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Valeurs moyennes des log(UFC/mL) dans deux conditions différentes à 37 °C; irradiation en lumière blanche (25 J/cm²) et à l'obscurité

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S.aureus</i>	
	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière
HG-xyl-P1	4,53	-	3,79	-
TMPyP 3,8%	3,08	-	2,34	-
HG-xyl-P2	3,65	-	3,60	-
TMPyP 6,8%	-	-	-	-
HG-xyl-P3	-	-	3,28	-
TMPyP 7,7%	-	-	-	-
HG-xyl-P4	-	-	2,88	-
TMPyP 9,9%	-	-	-	-

"-" Aucune bactérie survivante n'a pu être détectée.

De manière assez marquée, l'ensemble des hydrogels testés exercent une activité photobactéricide sur les deux souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus*, y compris **HG-xyl-P1** qui contient la plus faible quantité de PS. En effet, après irradiation en lumière blanche, aucune bactérie survivante, que ce soit *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, n'a pu être détectée après contact avec les hydrogels. Comme mentionné précédemment, ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les PS cationiques interagissent par des interactions électrostatiques, avec les composants de la paroi cellulaire fortement chargés négativement tels que les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries Gram positif et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif, ce qui rend la génération d'ERO, comme l'oxygène singulet, plus efficace pour éradiquer les bactéries [193–195]. On remarque également pour les 4 hydrogels une diminution de la cytotoxicité à l'obscurité des PS greffés sur les hydrogels par rapport aux PS libres envers *S. aureus*, alors que le même effet n'a été constaté qu'avec **HG-xyl-P1** et **HG-xyl-P2** pour *P. aeruginosa*, mettant en évidence l'effet photodynamique des hydrogels.

A partir de ces résultats préliminaires, nous pouvons conclure que les hydrogels testés ont une excellente photoactivité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif.

V.9. Conclusion

Dans cette partie, Le xylane a été conjugué avec succès avec la porphyrine cationique. Sept échantillons ont été obtenus avec un DS allant de 0,03 à 0,53, puis réticulés par le dianhydride de DTPA. Les échantillons dont le DS de la porphyrine était inférieur ou égal à 0,19 ont formé des hydrogels. Cependant, les échantillons **xyl-P6** (DS = 0,37) et **xyl-P7** (DS = 0,53) n'ont pas

conduit à la formation d'hydrogels. Les hydrogels obtenus ont montré une bonne intégrité mécanique et un taux de gonflement élevé. Ces hydrogels fonctionnalisés à base de xylane ont montré une forte activité photoantibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

VI. Élaboration d'hydrogels par réticulation directe du xylane par les porphyrines

Dans la troisième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la préparation d'un hydrogel à base de xylane portant des PS sans utilisation d'un agent de réticulation. Nous avons choisi d'utiliser la *meso*-tétra(4-carboxyphényl)porphyrine (TCPP) qui va jouer, en plus de son rôle de photosensibilisateur, le rôle de nœud de réticulation entre les chaînes de xylane grâce à ses quatre fonctions acides carboxyliques qui peuvent établir des liaisons esters avec les hydroxyles du xylane, ce qui conduit à la formation d'un réseau tridimensionnel caractéristique des structures de type hydrogel.

VI.1. Préparation et caractérisation de l'hydrogel xyl-TCPP

L'estérification du xylane commence par une étape d'activation de la TCPP avec 8 équivalents de CDI dans le DMSO, pendant 24 h à 60 °C. Après activation de la TCPP, le xylane préalablement dissous dans le DMSO est ajouté au milieu réactionnel. Après 24 h à 80 °C, l'hydrogel résultant a été immergé dans un excès d'eau distillée et laissé gonfler pendant 7 jours à température ambiante, avec un changement d'eau quotidien, puis lyophilisé (**Figure 120**).

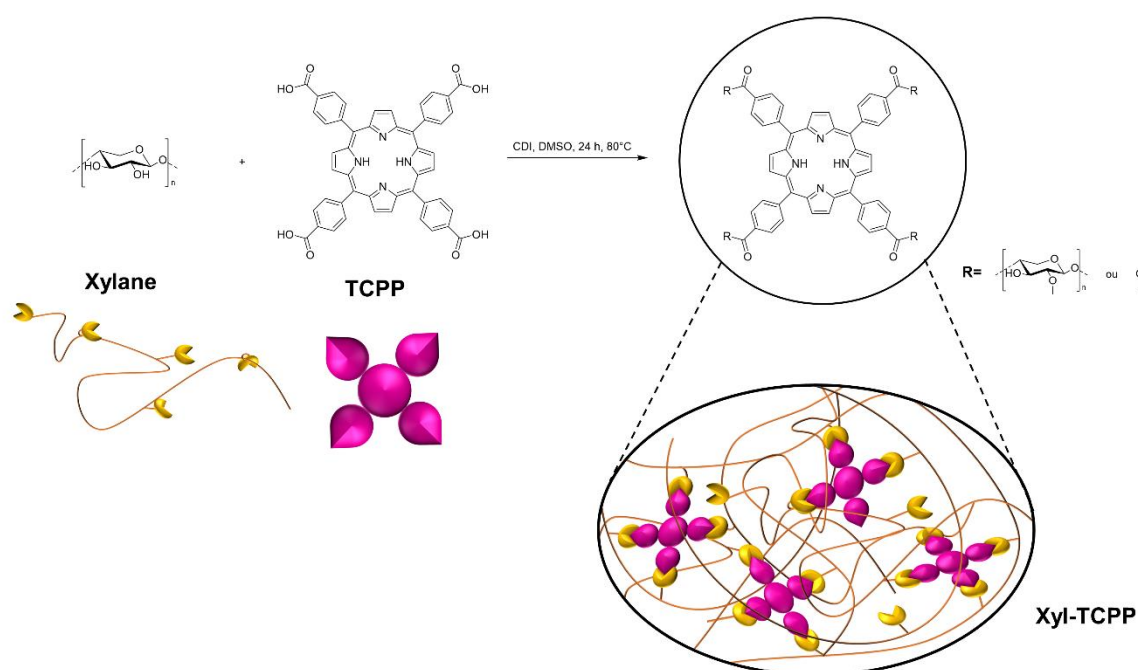


Figure 120 : Synthèse des hydrogels par réticulation directe du xylane par TCPP

Dans un premier temps, nous avons utilisé 200 mg de TCPP par gramme de xylane (soit 0,033 éq. par unité d'anhydroxylose) pour obtenir l'hydrogel **xyl-TCPP-1**. Après lyophilisation, nous avons remarqué que l'hydrogel obtenu ne gonflait pas dans l'eau. Même après 15 jours, l'hydrogel n'a pas été capable d'absorber la même quantité d'eau que celle déjà absorbée avant la lyophilisation (**Figure 121**). Nous supposons que cela est dû au fait que l'hydrogel est trop chargé en porphyrine, ce qui augmente la partie hydrophobe de l'hydrogel. Ainsi, lorsque la lyophilisation élimine l'eau piégée dans l'hydrogel elle favorise les interactions hydrophobes, ce qui rend la repénétration de l'eau dans l'hydrogel très difficile.

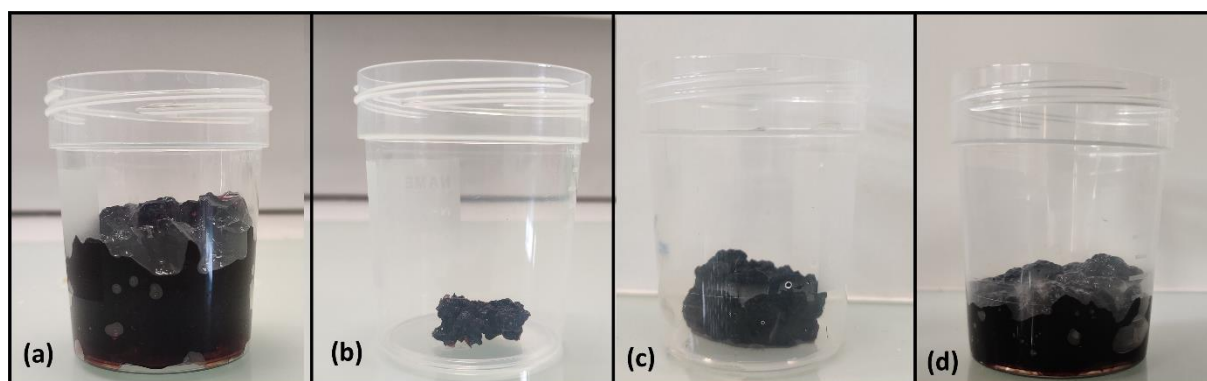


Figure 121 : (a) **xyl-TCPP-1** gonflé dans l'eau directement après la réaction ; (b) **xyl-TCPP-1** après lyophilisation ; (c) **xyl-TCPP-1** après 48 h et (d) après 15 jours de regonflement dans l'eau

Pour résoudre ce problème, nous avons diminué la quantité de TCPP utilisée pour synthétiser l'hydrogel. Ainsi deux autres quantités de TCPP sont testées, 150 et 100 mg (correspondant à 0,025 et 0,017 éq. par rapport à une d'unité anhydroxylose) pour obtenir les hydrogels **xyl-TCPP-2**, et **xyl-TCPP-3**, respectivement.

La fixation de la TCPP sur le xylane a été confirmée par spectroscopie infrarouge (**Figure 122**). Les spectres IR de **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** ont montré l'apparition de la bande caractéristique de l'élongation (-C=O) à 1713 cm^{-1} et la bande caractéristique de l'élongation (-C-O-) à 1267 cm^{-1} . La comparaison entre les spectres du **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** montre bien l'augmentation de l'intensité des bandes (-C=O) et (-C-O-), et donc le degré de réticulation, en fonction de la quantité de TCPP dans la réaction. Cette augmentation est beaucoup plus importante sur le spectre de **xyl-TCPP-1**, ce qui témoigne de l'augmentation du taux du greffage pour ce dernier.

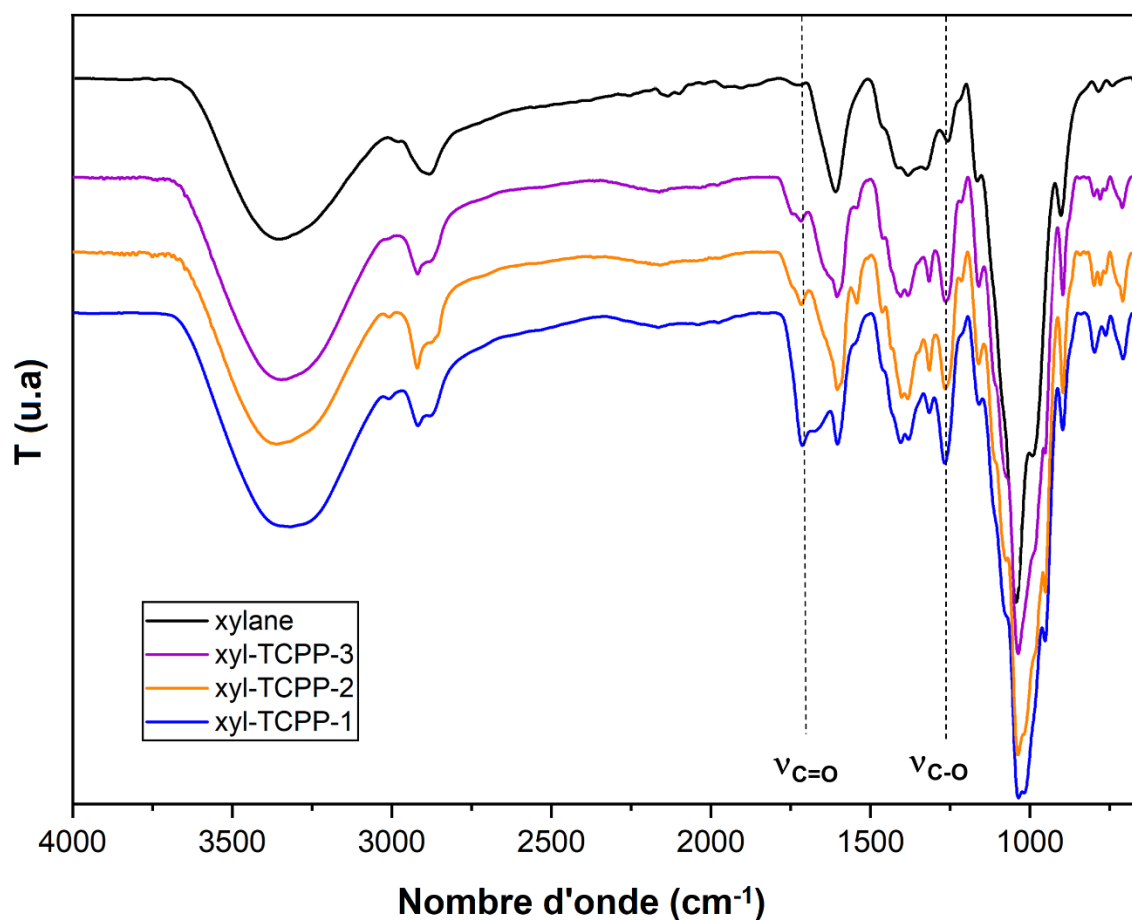


Figure 122 : Spectres IR du xylane natif, **xyl-TCPP1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3**

Afin de déterminer la quantité de TCPP greffée dans chaque formulation, les hydrogels lyophilisés **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** ont été immergés dans une solution de NaOH 2 M pour détruire la matrice de l'hydrogel et rompre les liaisons entre les porphyrines et le xylane. Ainsi, les pourcentages massiques en TCPP sont déterminés par photométrie (410 nm) en utilisant une courbe d'étalonnage de la TCPP libre dans une solution aqueuse de NaOH à 2M (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Pourcentage massique en TCPP déterminé pour les hydrogels **xyl-TCPP1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3**

Hydrogels	xyl-TCPP-1	xyl-TCPP-2	Xyl-TCPP-3
Pourcentage massique en TCPP (%)	14,6	9,5	6,2

VI.2. Propriétés de gonflement des hydrogels xyl-TCPP-1, xyl-TCPP-2 et xyl-TCPP-3

Afin de confirmer notre hypothèse sur l'effet de la quantité de TCPP greffée sur le comportement de gonflement des hydrogels, nous avons suivi dans un premier temps l'évolution du taux de gonflement de trois hydrogels obtenus (**xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3**) dans l'eau distillée en fonction du temps à 37 °C. Comme le montre la **Figure 121a**, les hydrogels **xyl-TCPP-2**, **xyl-TCPP-3** ont montré une bonne capacité de gonflement par rapport **xyl-TCPP-1**. Le gonflement initial du **xyl-TCPP-2** et du **xyl-TCPP-3** est relativement rapide (environ 35,5 et 45,2 respectivement pendant la première heure), puis le taux de gonflement a continué à augmenter en fonction du temps pour atteindre l'équilibre après 24 h pour **xyl-TCPP-2** et après pour 30 h **xyl-TCPP-3**. En revanche, le **xyl-TCPP-1** a montré un gonflement faible et stable (d'environ 14) tout au long de l'expérience (**Figure 123b**).

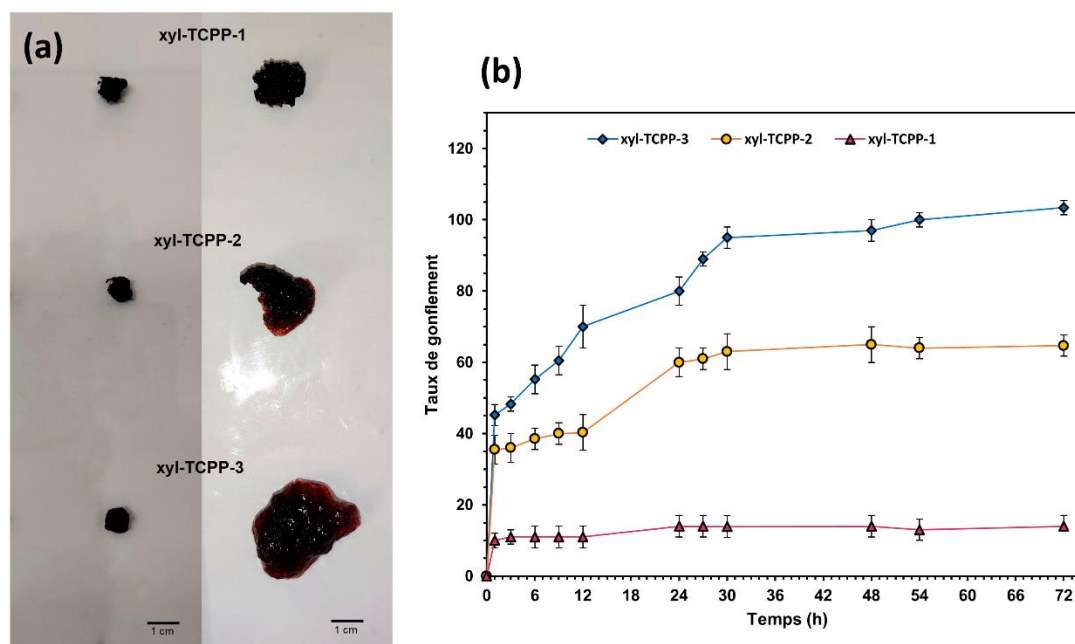


Figure 123 : (a) : Photos de **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** avant gonflement (à gauche) et après 72 h de gonflement (à droite) ; (b) : Taux de gonflement dans l'eau distillée de **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** en fonction du temps

Puisque nous effectuons nos évaluations biologiques dans du PBS (pH 7,4), nous avons refait les tests de taux de gonflement de ces trois hydrogels dans du PBS (**Figure 124**). Ces tests ont montré que moins il y a de TCPP greffée, meilleure est la capacité de gonflement de l'hydrogel. Comme le montre la **Figure 122** le **xyl-TCPP-3** a le plus grand taux de gonflement à l'équilibre dans le PBS suivi du **xyl-TCPP-2** tandis que **xyl-TCPP-1**, comme dans l'eau distillée, a montré un très faible taux de gonflement. En comparant les courbes de **xyl-TCPP-**

2 et **xyl-TCPP-3**, on voit que le gonflement initial du **xyl-TCPP-3** est plus important que celui du **xyl-TCPP-2**. Après une heure d'immersion le taux de gonflement du **xyl-TCPP-2** est de 20,2 alors que celui du **xyl-TCPP-3** est de 35,2. Cependant, le **xyl-TCPP-2** atteint l'équilibre plus rapidement que le **xyl-TCPP-3**. Ces résultats confirment qu'il existe un effet négatif de la quantité de TCPP greffée sur la capacité et le taux de gonflement de l'hydrogel.

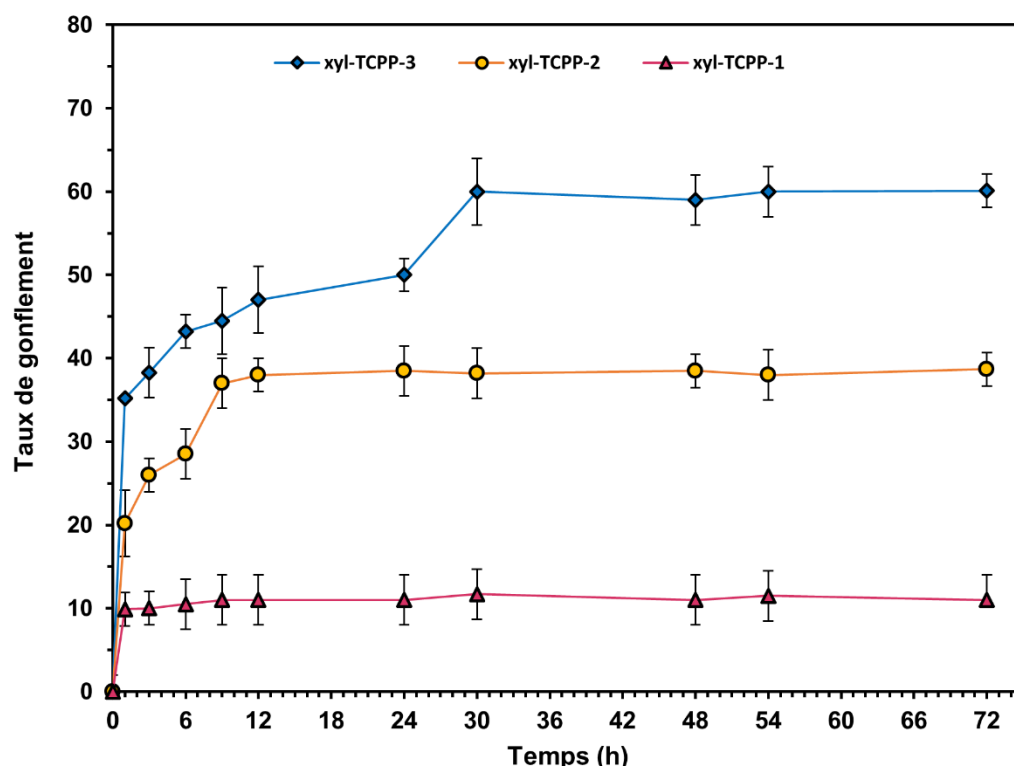


Figure 124 : Taux de gonflement dans le PBS de **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** en fonction du temps

Le **xyl-TCPP-3**, qui présente une meilleure capacité de gonflement dans le PBS, a été choisi pour la suite de cette étude.

VI.3. Morphologie et comportement rhéologique de l'hydrogel xyl-TCPP-3

Les images de MEB de coupes transversales de **xyl-TCPP-3** lyophilisé (**Figure 125**) montrent une structure poreuse interconnectée (en forme de nid d'abeille) avec un diamètre compris entre 200 et 400 μm qui peut favoriser le transport de l' $^1\text{O}_2$ et faciliter également l'entrée des bactéries dans la structure de l'hydrogel.

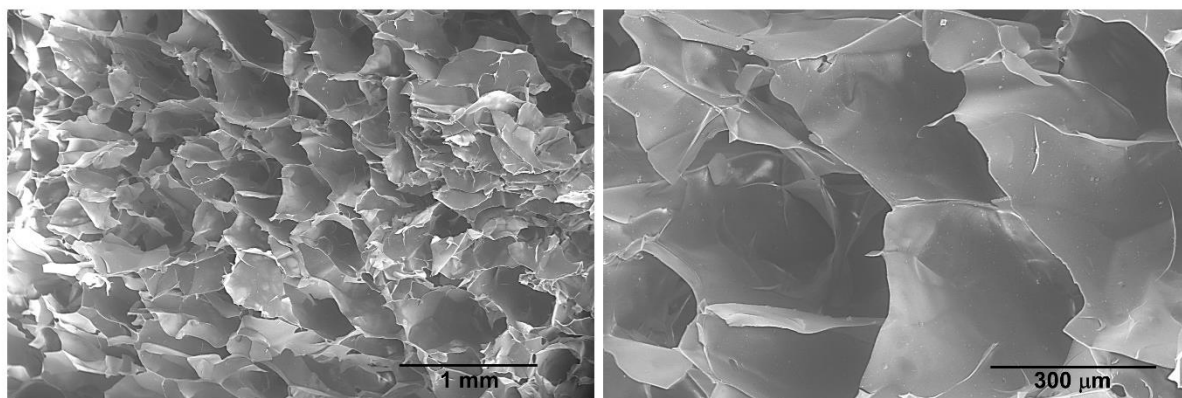


Figure 125 : Images de MEB des sections transversales de **xyl-TCPP-3** lyophilisé

Le comportement rhéologique de **xyl-TCPP-3** est représenté sur la **Figure 126**. La viscosité d'hydrogel est mesurée à 25 °C avec un taux de cisaillement de 10^{-3} à 100 s^{-1} . **Figure 126a** montre que la viscosité de **xyl-TCPP-3** diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement, entre plus de 10^5 Pa.s et 1 Pa.s , montrant que l'hydrogel présente un comportement rhéofluidifiant. En outre, le test de cisaillement oscillatoire est réalisé dans le domaine viscoélastique linéaire. La **Figure 126b** montre que la valeur du module de conservation (G') est stable et supérieure à celle du module de perte (G'') sur toute la plage de la fréquence angulaire étudiée. Ainsi, l'hydrogel possède des propriétés dominées par l'élasticité à travers un réseau bien développé, confirmant le comportement de type hydrogel.

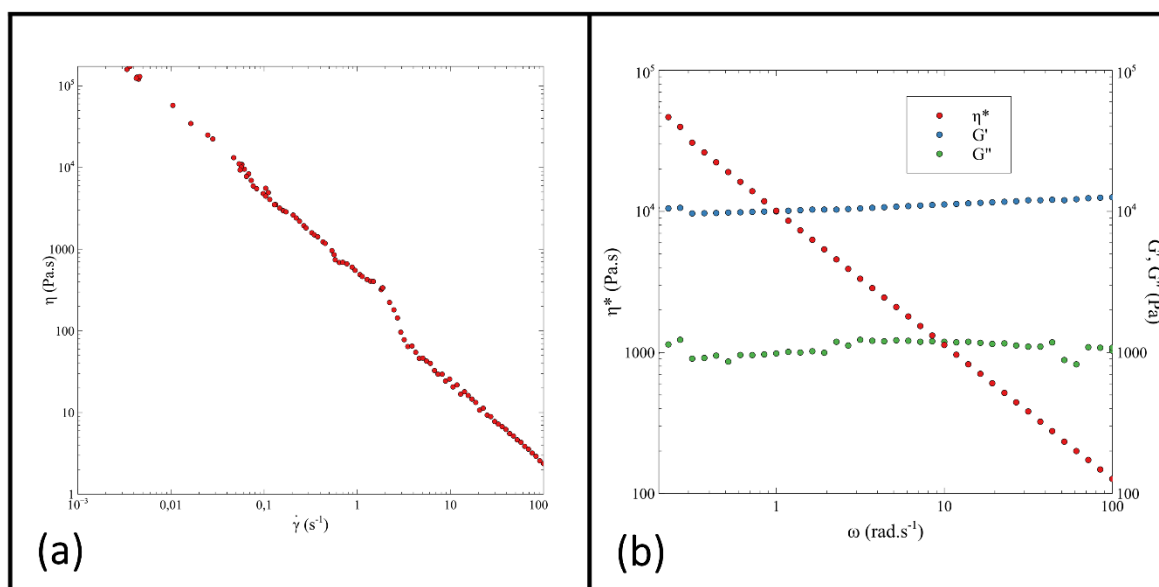


Figure 126 : Propriétés rhéologiques de **xyl-TCPP-3** : la viscosité (η) du **xyl-TCPP-3** en fonction du taux de cisaillement (a), module de conservation (G') et module de perte (G'') du **xyl-TCPP-3** en fonction de la fréquence angulaire (b).

VI.4. Evaluation de l'activité antibactérienne l'hydrogel xyl-TCPP-3

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne de **xyl-TCPP-3**, des tests microbiologiques ont été effectués sur l'hydrogel qui est mis, comme précédemment, en contact avec deux souches bactériennes : *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Valeurs moyennes des log(UFC/mL) dans deux conditions différentes à 37 ° C; irradiation en lumière blanche (25 J/cm²) et à l'obscurité

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S.aureus</i>	
	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière
xyl-TCPP-3	6,39	-	5,85	-
TCPP(6,2%)	4,77	-	4,10	-

"-" Aucune bactérie survivante n'a pu être détectée.

Comme dans le cas des hydrogels fonctionnalisés par des porphyrines cationique, **xyl-TCPP-3** possède un effet photobactéricide vis-à-vis des deux souches *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

VI.5. Conclusion

Dans la troisième partie de ce chapitre, nous avons développé des hydrogels à base de xylane contenant un PS sans utiliser d'autre agent réticulant. Nous avons synthétisé trois hydrogels en utilisant la méso-tétra(4-carboxyphényl)porphyrine comme réticulant. Les tests de gonflement des hydrogels obtenus ont montré que l'hydrogel **xyl-TCPP-3** fonctionnalisé avec la plus petite quantité de TCPP a la bonne propriété de gonflement pour effectuer les tests biologiques, c'est pour cette raison que nous l'avons choisi pour réaliser les tests biologiques vis-à-vis de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les résultats des tests biologiques ont montré que **xyl-TCPP-3** a une forte activité photobactéricide contre les deux souches bactériennes.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour objectif d'optimiser la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne et à surmonter certains problèmes des porphyrines en tant que photosensibilisateurs très étudiés dans la PACT.

Nous nous sommes intéressés, au cours de ce travail, à deux stratégies pour l'optimisation de cette thérapie. La première consiste à coupler une porphyrine à deux dérivés de maltodextrines (maltohexaose ou maltotriose) utilisés récemment comme agent de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale, afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis les cellules bactériennes. Pour ce faire, nous avons synthétisé deux conjugués, composé d'une *meso*-porphyrine reliée par une chaîne tétraéthylène glycol avec un maltooligosaccharide (maltohexaose ou maltotriose). Après confirmation de la structure par HRMS et RMN, les essais biologiques ont montré que les deux conjugués **(12)** et **(13)** ont une meilleure action photoinhibitrice contre les bactéries Gram positif *S. aureus* et *S. epidermidis* que la porphyrine neutre. Par ailleurs, la nature du maltooligosaccharide semble influencer sur l'activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches Gram positif. Ainsi, les CMI montrent que les deux souches de *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S. epidermidis*) semblent plus sensibles au PS lié à un maltohexaose **(13)** qu'à celui lié au maltotriose **(12)**. Ensuite, nous avons choisi de tester la capacité du conjugué **(13)** à inhiber la formation de biofilms de deux souches Gram positif. Ces tests ont montré que le conjugué présente une activité d'inhibition intéressante contre les biofilms des deux souches. En revanche, aucun effet n'a été observé contre les souches Gram négatif dans nos conditions de test.

La deuxième stratégie vise à incorporer des porphyrines dans des hydrogels à base de xylane. Pour cela, trois voies ont été explorées : dans une première approche, l'hydrogel est synthétisé d'abord par réticulation de xylane avant de le charger par une porphyrine cationique. Dans une seconde approche, les porphyrines sont fixées d'abord par liaisons covalentes sur le xylane, puis les hydrogels sont obtenus à partir de ces xylanes fonctionnalisés par un agent de réticulation. Dans la troisième méthode, l'hydrogel est obtenu par une réticulation directe du xylane par les porphyrines. Tous les hydrogels obtenus ont montré une bonne intégrité mécanique et un taux de gonflement élevé ainsi qu'une forte activité photoantibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Pour la première partie, d'autres études sont nécessaires pour vérifier si les souches étudiées expriment des transporteurs de maltodextrine et ne présentent pas de mutations, et si les conjugués porphyrines-maltooligosaccharide sont toxiques ou non pour les cellules humaines. Il est en particulier envisagé d'étudier d'autres types de photosensibilisateurs, notamment des

porphyrines cationiques et des dérivés de la phénalénone, qui possèdent un rendement quantique très élevé de production d'oxygène singulet.

A la suite de ces premiers résultats biologiques satisfaisants obtenus pour les hydrogels de xylane, Il serait également intéressant d'étudier l'activité antibiofilm des hydrogels sur les souches étudiées et tester d'autres souches bactérienne pathogènes et ainsi que des espèces fongiques telles que *Candida albicans*. Ces résultats nous encouragent aussi à augmenter l'éventail des polymères et donc à poursuivre les travaux sur l'élaboration de nouveaux hydrogels photobactéricides. A cet effet, l'utilisation d'autres polymères synthétiques ou naturels est envisageable.

Chapitre IV.

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Réactifs et solvants

Les réactifs, solvants et milieux nutritifs commerciaux ont été obtenus auprès de divers fournisseurs (ACROS Organics, Sigma-Aldrich, Carlo Erba, Alfa Aesar, TCI) et utilisés sans purification préalable. Le xylane de hêtre, l'eicosaacétate de maltohexaose et le maltotriose proviennent de Carbosynth (Compton, Berkshire, UK).

I.2. Chromatographie

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

Les CCM ont été réalisées sur des plaques de silice (Kieselgel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur, Merck). La révélation des plaques est assurée :

- Par observation directe pour les composés colorés,
- Par pulvérisation d'un mélange acide sulfurique/orcinol (0,1 g d'orcinol pour 100 mL d'une solution à 20% d'acide sulfurique) suivie d'un simple chauffage pour les composés glycosylés,
- Par exposition à la lumière UV à l'aide d'une lampe adéquate pour les composés absorbant dans l'UV,
- Par pulvérisation d'une solution de ninhydrine (0,1% dans l'éthanol) suivie d'un simple chauffage pour les produits aminés.

I.2.2. Chromatographie sur couche mince préparative

Les plaques de silice sont préparées par dépôt d'une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (80 g de gel de silice 60 Kieselgel 60 PF₂₅₄, dispersée dans 220 mL d'eau) sur six plaques de verre (20 cm x 20 cm). Les plaques sont séchées à l'air libre pendant une nuit, puis activée à 100 °C pendant minimum 3 h.

I.2.3. Chromatographie sur colonne

Les purifications sont réalisées en phase normale. Les colonnes de gel de silice ont été préparée par suspension de silice 60 (Merck, 0,015–0,040 mm) dans l'éluant adéquat. Le dépôt du produit à purifier a été réalisé par dépôt liquide en solubilisant le produit dans le minimum de ce même éluant, ou par dépôt solide en adsorbant le produit sur du Florisil® (VWR, 60–100 mesh). L'élution est accélérée par une légère surpression d'air comprimé. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur désiré.

Pour les composés aminés, les colonnes sont montées avec une suspension de silice dans un mélange éluant-triéthylamine (90-10). Introduite en excès, la triéthylamine libre est finalement éliminée de la colonne par le passage de l'éluant choisi.

II. Analyses

II.1. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ont été réalisées au sein de la plateforme BISCEM de l'université de Limoges sur un appareil DPX-500 (Bruker) à une fréquence de 500,15 MHz pour les RMN ^1H et de 125 MHz pour les RMN ^{13}C . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont données en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées sont : s (singulet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), t (triplet), dt (double triplet), ddt (double double triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). Les figures élargies comportent un « él » en indice.

II.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

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

II.3. Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les analyses UV-Visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre du type Specord 210 Lambda double faisceau de la marque Analytik Jena. Tous les spectres sont effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. La longueur d'onde correspondant à l'absorption maximale (λ_{max}) est exprimée en nanomètre (nm) et les coefficients d'absorption en $\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$.

II.4. Spectrométrie de Masse

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

II.5. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les observations par microscopie électronique à balayage ont été réalisées au sein de la plateforme SerMiEL de l'Université de Limoges sur ESEM Quanta FEG 450 avec une tension d'accélération de 10-15 kV, et les échantillons sont fixés à l'aide de ruban adhésif carbone sur des supports adaptés au MEB. Les échantillons ont été observés sans traitement préalable.

II.6. Comportement rhéologique

Le comportement rhéologique des hydrogels a été étudié au moyen d'un rhéomètre (Mars III, Thermo Scientific, logiciel Rheowin), avec une configuration géométrique plan-plan de 35 mm et un entrefer de 0,500 mm. Les comportements des gels ont été déterminés par des tests de variation du taux de cisaillement à 25 °C. De plus, les propriétés rhéologiques ont été mesurées lors d'essais oscillatoires avec déformation contrôlée. Une amplitude de déformation de $\gamma_0 = 0,05$ [-] a été choisie pour assurer un régime linéaire de déformation oscillatoire. Le polymère a été placé entre les plaques à 25 °C, et les mesures ont été effectuées dans la plage de fréquences angulaires de 0,1-100 rad/s.

II.7. Test de gonflement

Les expériences de gonflement ont été menées avec une méthode gravimétrique à 37 °C dans de l'eau et dans du PBS (pH = 7,4). Les hydrogels secs préalablement pesés ont été immergés dans un excès d'eau ou de PBS. Les échantillons gonflés ont été retirés de la solution à l'aide d'un filtre en nylon, égouttés et pesés. Le taux de gonflement Q au temps t et le taux de gonflement à l'équilibre Q_{eq} sont déterminés comme suit :

$$Q = \frac{m_t - m_s}{m_s} \quad (1)$$

$$Q_{eq} = \frac{m_{eq} - m_s}{m_s} \quad (2)$$

Où m_s est la masse initiale de l'hydrogel sec, et m_t et m_{eq} sont respectivement la masse au temps t et la masse à l'équilibre de l'hydrogel gonflé.

La même procédure expérimentale a été appliquée pour étudier la sensibilité des hydrogels au pH en utilisant des solutions tampons de phosphate, pH (2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6,8 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 et 13).

III. Essais biologiques

III.1. Cultures bactériennes.

Les souches de bactéries : *S. aureus* CIP76.25, *S. epidermidis* CIP109562, *P. aeruginosa* CIP76.100, *E. coli* CIP54.8T et *E. coli* CIP 53.126 ont été fournis par l'Institut Pasteur (Paris). *B. cereus* CH a été obtenu auprès d'Anyang Yuanshou® (Biodrug Ltd., Chine). Ces bactéries ont été cultivées en milieu liquide Luria-Bertani (LB) (Bacto-tryptone 10 g/L, extrait de levure 5

g/L, NaCl 10 g/L et pH ajusté à 7,5 avec NaOH) ou dans un milieu Trypticase soja (TS) (extraits de caséine pancréatique 17 g/L, farine de soja clivée par papaïne 3 g/L, dextrose 2,5 g/L, chlorure de sodium 5 g/L et hydrogénophosphate de potassium 2,5 g/L) et incubées une nuit à 37 °C dans un incubateur à agitateur rotatif.

III.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

III.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des conjugués porphyrine-maltooligosaccharides.

Des solutions de porphyrines **(1)**, **(12)** et **(13)** et de maltooligosaccharides MT et MH sont préalablement préparées dans du DMSO. Ces dernières sont ensuite diluées dans PBS, de telle sorte que le DMSO ne dépasse pas 1% en concentration. A partir de ces solutions, des dilutions en série (50 µL, de 150 µM à 1,17 µM) sont déposées dans une plaque 96 puits. Ensuite, une suspension bactérienne est déposée dans chaque puit (50 µL, à 4×10^6 UFC/mL) et le tout est incubé pendant 1 h à 37 °C. Les plaques sont ensuite irradiées par une lumière de LED blanches pendant 5 heures à 37 °C. La puissance lumineuse est de 1,39 mW/cm², soit une fluence de 25 J/cm² (Isotech Lightmeter 1335). Une autre plaque est préparée de façon identique, et est incubée dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité. Après irradiation, 100 µL de milieu LB 2X sont ajoutés et les plaques sont incubées dans l'obscurité pendant la nuit à 37 °C. Ensuite, des dilutions en série au 1/10^{ème} sont effectuées à partir de chaque puits, et ces dilutions sontensemencées sur gélose (easySPIRAL®, Interscience). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, le décompte des colonies peut être effectué à partir de ces boîtes de Pétri, ce qui permet d'obtenir la concentration de chaque puits en considérant les dilutions effectuées. La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la concentration en molécule pour laquelle 99,99% des bactéries ont été inhibées (réduction de 4 log par rapport au contrôle non traité).

III.2.2. Cytométrie en flux

10⁸ UFC de chaque souche bactérienne sont incubées en présence de solutions de PS seul ou de PS conjugué avec le MH ou le MT dans un volume final de 1mL à une concentration de 1 µM dans du PBS 1X pendant 1 h à 37 °C à l'obscurité. Ensuite, les bactéries sont centrifugées à 10 000 tr/min pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot de bactéries est lavé à l'aide d'une solution de PBS 1X puis centrifugées à 10 000 tr/min pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot de bactéries lavées est resuspendu dans 500 µL de PBS 1X. Les bactéries sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Les émissions de fluorescence sont enregistrées par un trieur de cellule BD FACS Aria™ III (BD Biosciences, France). Les PS sont excités par un laser violet à 407 nm et leurs émissions de fluorescence

sont détectées par un filtre BV711 (710/50 nm). 10 000 événements ont été enregistrés pour chaque analyse.

III.2.3. Essai d'inhibition de la formation des biofilms

L'étude de l'inhibition de la formation des biofilms a été réalisée à partir de deux souches bactériennes Gram positif, *S. aureus* et *S. epidermidis*. Pour cette étude, ces deux souches bactériennes sont cultivées dans du milieu nutritif supplémenté de glucose à une concentration finale de 25 mM. Le glucose est utilisé afin de favoriser la formation de biofilm. Comme précédemment, des solutions de porphyrines **(1)** et **(13)** et MH sont préalablement préparées dans du DMSO. Les bactéries ont été incubées dans des plaques 96 puits en présence de différentes concentrations de composés **(13)** et **(1)** correspondant à différents multiples de la CMI obtenue après irradiation : 0,5xCMI, 1xCMI et 2xCMI. Après 1 h d'incubation à l'obscurité et à 37 °C, les bactéries sont soumises à l'irradiation lumineuse avec les LED blanches (fluence totale 25 J/cm²). Suite à l'irradiation, 100 µl de milieu nutritif 2X supplémenté en glucose est ajouté dans chaque puits. Après 24 h d'incubation à 37 °C, le milieu de culture est délicatement retiré. Le biofilm formé à la surface des puits est lavé une fois dans un bain d'eau distillée puis séché. Le biofilm est coloré par ajout de 100 µl d'une solution de cristal violet 0,1% (préparé dans l'eau) pendant 15 minutes. Le cristal violet est retiré puis le biofilm coloré est lavé et séché. Le cristal violet est ensuite solubilisé dans de l'acide acétique 33% (vol/vol). La quantité de biofilm formé est évaluée par lecture de DO par spectrophotométrie à 595 nm.

III.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrogel de xylane chargé par TMPyP

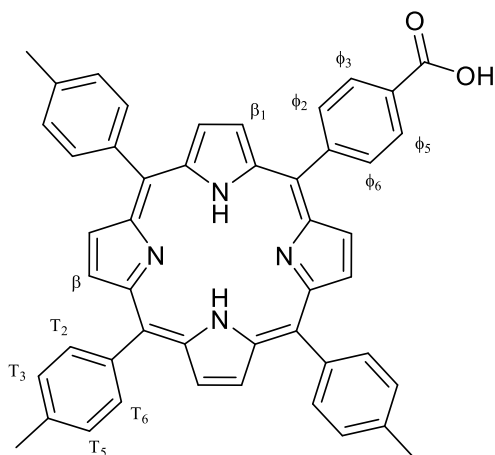
L'activité antibactérienne contre les différentes souches bactériennes a été évaluée par la méthode de diffusion des disques de gélose. 1 mL de suspension bactérienne (1×10^6 CFU/mL) a été étalée uniformément sur des boîtes de Pétri en agar nutritif (LB). Un morceau de gel agar de 10 mm de diamètre a été retiré au centre des boîtes de Pétri et a été remplacé par un morceau d'hydrogel sec. Ensuite, 50 µL de PBS stérile ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 2 h à 37 °C dans l'obscurité. Les plaques ont ensuite été irradiées avec de la lumière blanche pendant 6 h (25 J/cm²) à 37 °C. Après irradiation, les plaques ont été incubées pendant une nuit à l'obscurité à 37 °C.

III.2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des hydrogels de xylane fonctionnalisés par des porphyrines liées de manière covalente

100 μL d'une suspension bactérienne à 10^6 UFC/mL et 1 mg d'hydrogel lyophilisé sont déposés dans les puits d'une plaque 96-puits. 50 μL de solution de porphyrine libre correspondant à la quantité de porphyrine greffée sur les différents hydrogels et 50 μL d'une suspension bactérienne à 2×10^6 UFC/mL sont également déposés dans les puits de la plaque 96 puits, puis le tout est incubé à 37 °C pendant 1 h à l'obscurité. Les plaques sont ensuite irradiées par une lumière de LED blanches pendant 5 heures à 37 °C. La puissance lumineuse est de 1,39 mW/cm², soit un travail de 25 J/cm². Une autre plaque est préparée de façon identique, et est incubée dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité. Après irradiation, les plaques ont été incubées pendant une nuit à l'obscurité à 37 °C. Ensuite, le contenu de chaque puits est transféré dans des tubes Eppendorf et placé dans un bain à ultrason afin de décrocher toutes les bactéries des différents hydrogels, puis des dilutions en série sont préparées à partir de chaque puits de chaque plaque. Ces dilutions sontensemencées sur des géloses à base de bouillon Tryptone Soja et d'Agar. Après une incubation à 37 °C pendant 24 heures, les colonies présentes sur chaque gélose sont dénombrées, afin de calculer la concentration initiale de chaque puits (UFC/mL).

IV. Synthèses

IV.1. Synthèse de la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tri(*p*-tolyl)porphyrine (**1**)



Dans un bicol de 250 mL, 6,4 mL (54 mmol, 3 éq.) de *p*-tolualdéhyde et 2,7 g (18 mmol, 1 éq.) de 4-carboxybenzaldéhyde sont solubilisés dans 200 mL d'acide propanoïque à 140 °C.

Ensuite, 5 mL (72 mmol, 4 éq.) de pyrrole fraîchement distillé sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée, puis le reflux est maintenu à l'abri de la lumière pendant 90 min. Après une nuit à 4 °C, les porphyrines cristallisées sont recueillies par filtration sur filtre Büchner et lavage à l'éthanol absolu (3 x 20 mL). Après purification par chromatographie sur colonne de silice éluée selon un gradient de polarité (mélange chloroforme/éthanol absolu : 100/0 - 90/10), nous avons obtenu 570 mg du produit (**1**) pur sous forme cristaux violets soit un rendement de 4,5%.

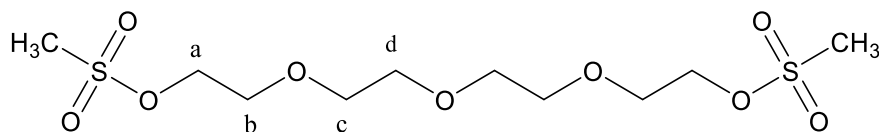
$R_f = 0,53$ ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$: 90/10).

UV-Vis (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$: 420(280,3), 518(15,9), 553(8,5), 592(4,8), 649(4,5).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) : 8,86 (m, 6H, H_β pyrr), 8,77 (d, 2H, $J = 4,5$ Hz, $\text{H}_{\beta 1}$ pyrr), 8,48 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{H}_{\phi 2, \phi 6}$), 8,33 (d, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{H}_{\phi 3, \phi 5}$), 8,09 (d, 6H, $J = 7,3$ Hz, $\text{H}_{\text{T}2, \text{T}6}$), 7,56 (d, 6H, $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_{\text{T}3, \text{T}5}$), 2,71(s, 9H, 3x CH_3), -2,76 (s, 2H, NH).

SM (ESI) : $\text{C}_{48}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 701,2917$ calculée, 701,2914 trouvée.

IV.2. Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane (2)



Dans un bicol de 500 mL, 90 mL (646 mmol, 6,46 éq.) de triéthylamine, 17,41 mL (100 mmol, 1 éq.) de tétraéthylène glycol et 100 mL de dichlorométhane sont refroidis sous agitation magnétique à -5 °C par un mélange glace/sel (3:1). Une solution de 17 mL (220 mmol, 1,1 éq.) de chlorure de mésyle dans 10 mL de dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée surmontée d'une garde de CaCl₂, en maintenant la température au-dessous de 10 °C. Lorsque l'addition est terminée, le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante, et après 90 min le mélange est versé sous agitation dans un erlenmeyer contenant 1 L d'eau distillée. La phase organique est extraite et lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1M, puis avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3 x 400mL). Après séchage sur MgSO₄ et filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. 31,5 g de composé **(2)** sont obtenus sous la forme d'une huile jaune soit un rendement de 90%.

$R_f = 0,62$ (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5).

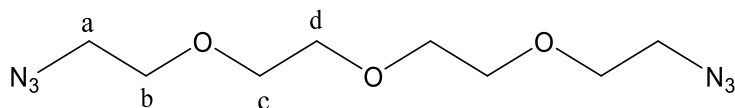
IR : 2935 et 2875 cm⁻¹ ν (CH₂), 1455 cm⁻¹, 1342 et 1169 cm⁻¹ ν (-SO₃-).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 4,37 (t, 4H, $J = 4,5$ Hz, H_a), 3,76 (t, 4H, $J = 4,45$, Hz, H_b), 3,62-3,68 (m, 8H, H_c et H_d), 3,07 (s, 6H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) : 70,54 (C_d) ; 70,43 (C_c) ; 69,45 (C_b) ; 68,91 (C_a), 37,6 (CH₃).

SM (ESI) : C₁₀H₂₃O₉S₂ [M+H]⁺, $m/z = 351,0783$ calculée, 351,0778 trouvée.

IV.3. Synthèse du 1,11-diazoturo-3,6,9-trioxaundecane (3)



Dans un ballon de 250 mL surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, 10 g (28,5 mmol, 1 éq.) de composé (2) sont solubilisés dans 60 mL d'éthanol absolu et 15 mL de diméthylacétamide. 7,58 g (116,6 mmol, 4 éq.) d'azoture de sodium sont alors ajoutés, puis le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 6 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est versé dans un erlenmeyer contenant 120 mL d'un mélange eau distillée et de dichlorométhane (1 :1). Après 15 minutes d'agitation, la phase organique est extraite et lavée à l'eau distillée (3 x 60 mL), puis avec une solution aqueuse saturée de Na₂CO₃ (3 x 200 mL) avant séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation. Après purification par chromatographie sur colonne de silice (éluant DCM/MeOH en 95/5), 7 g du composé (3) sont ainsi obtenus sous la forme d'une huile jaune pâle (rendement quantitatif).

R_f = 0,68 (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5).

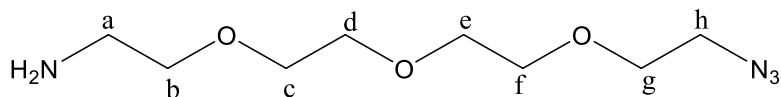
IR : 2935 et 2875 cm⁻¹ ν(CH₂), 2095 cm⁻¹ ν(-N₃), 1455 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 3,70-3,64 (m, 12H, H_b H_c et H_d), 3,39 (t, 4H, J = 5,13 Hz, H_a).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) : δ (ppm) : 70,49 (C_c, d) ; 69,95 (C_b) ; 50,30 (C_a).

SM (ESI) : C₈H₁₇N₆O₃ [M+H]⁺, m/z = 245,1362 calculée, 245,1357 trouvée.

IV.4. Synthèse du 1-amino-11-azoturo-3,6,9-trioxaundecane (4)



Dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 3,82 g (15,6 mmol, 1 éq.) du composé **(3)**, 52 mL d'éther diéthylique et 7 mL de THF, 70 mL d'une solution aqueuse d'HCl 1M sont introduits sous vive agitation magnétique. Par le biais d'une ampoule de coulée, une solution de 4,12 g (15,6 mmol, 1 éq.) de triphénylphosphine dans 35 mL d'éther diéthylique est additionnée. L'agitation est maintenue jusqu'à l'arrêt de formation des bulles gazeuses (dégagement N₂), soit environ 120 min. La solution résultante est laissée décanter puis la phase aqueuse est extraite avec 2x20 mL d'HCl 1M. Les phases aqueuses réunies sont saturées avec du NaCl, puis rendues basiques (pH = 14) par addition de NaOH en pastilles. La phase organique surnageante est récupérée par décantation, puis la phase aqueuse est extraite avec du toluène (3 x 50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2 x 50 mL), Après séchage sur sulfate de magnésium de la phase organique et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur colonne (20 x 4 cm) de silice préalablement neutralisée par migration d'un mélange CH₂Cl₂/Et₃N 90/10. L'élution est réalisée selon un gradient de polarité, en utilisant le mélange CH₂Cl₂/MeOH (100/0-90/10). 2,2 g du composé **(4)** est obtenu sous la forme d'une huile jaune très pâle après purification soit un rendement de 65%.

R_f = 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10 , silice préalablement neutralisée par migration d'un mélange CH₂Cl₂ /Et₃N : 90/10)

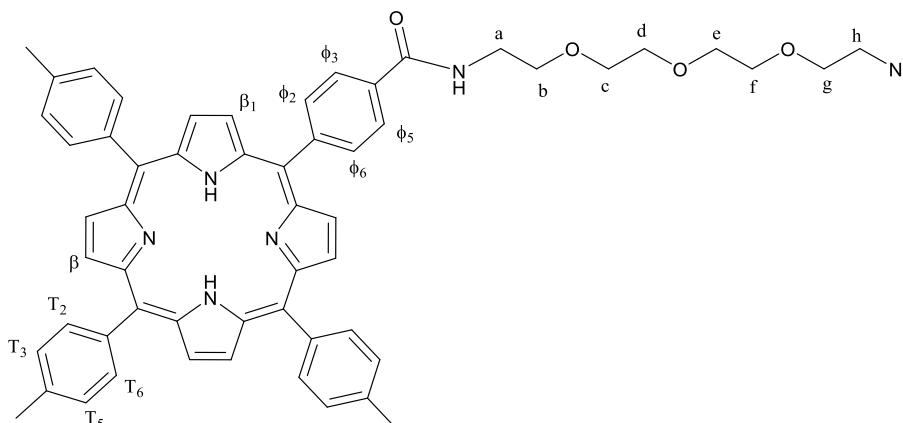
IR : 3355 cm⁻¹ ν(N-H), 2935 et 2875 cm⁻¹ ν(CH₂), 2100 cm⁻¹ ν(-N₃), 1573 δ(N-H), 1455 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 3,70-3,62 (m, 10H, H_c, H_d, H_e, H_f et H_g), 3,53 (t, 2H, J = 5,15 Hz, H_b), 3,40 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H_h), 2,89 (t, 2H, J = 5,2 Hz, H_a).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm): 72,88 (C_b), 70,71 (CH₂) ; 70,67 (CH₂) ; 70,63 (CH₂) ; 70,28 (CH₂) ; 70,04 (CH₂) ; 50,73 (C_h), 41,60 (C_a).

SM (ESI) : C₈H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺, m/z = 219,1458 calculée, 219,1452 trouvée.

IV.5. Synthèse de la 5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-azoturo)phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine (5)



Dans un ballon de 10 mL sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière, 160 mg (0,228 mmol, 1 éq.) de composé **(1)**, 87 mg (0,456 mmol, 2 éq.) d'EDC, 40 mg (0,342 mmol, 1,5 éq.) de NHS et 5 mL de chloroforme anhydres sont agités pendant 60 min, puis 100 mg (0,459 mmol, 2 éq.) de **(4)** sont ajoutés au mélange. Le milieu réactionnel est agité pendant 6 h à température ambiante puis dilué par 15 mL de chloroforme, lavé à l'eau distillée (3 x 20 mL), puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2 x 20 mL). Après séchage sur MgSO₄ et filtration, la phase organique est évaporée sous pression réduite. Après purification sur plaque préparatives de silice avec comme éluant dichlorométhane/méthanol (90/10), la porphyrine **(5)** est obtenue avec une masse de 152 mg soit un rendement de 74 %.

R_f = 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10).

IR : 3360 cm⁻¹ ν(N-H), 2952 cm⁻¹, 2922 cm⁻¹, 2855 cm⁻¹, 2100 cm⁻¹ ν(-N₃), 1640 ν(C=O Amide), 1600 cm⁻¹ δ(N-H).

UV-Vis (CHCl₃), λ_{max}(nm) ε x10⁻³ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 420(189,1), 517(7,8), 552(4,2), 592 (2,3), 648 (2,1).

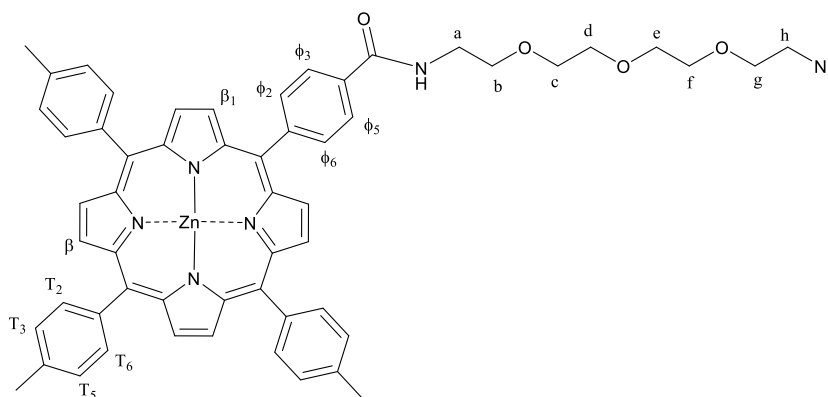
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,86 (m, 6H, H_β pyrr), 8,77 (d, 2H, J = 4,6 Hz, H_{β1} pyrr), 8,28 (d, 2H, J = 8 Hz, H_{φ2, φ6}), 8,18 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H_{φ3, φ5}), 8,01 (d, 6H, J = 7,8 Hz, H_{T2, T6}), 7,55 (d, 6H, J = 7,7 Hz, H_{T3, T5}), 3,81-3,86 (m, 4H, CH₂-O), 3,74-3,78 (m, 4H, CH₂-O), 3,71-3,72 (m, 2H, CH₂-O), 3,67-3,7 (m, 2H, CH₂-O), 3,64 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H_g), 3,33 (t, 2H, J = 5,0 Hz, H_h), 2,70(s, 9H, 3xCH₃), -2,77 (s, 2H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) : δ (ppm) : 167,64 (CONH) ; 145,63 (C_α) ; 145,47 (C_α) ; 139,21 (C_{T1}) ; 139,17 (C_{T1}) ; 137,42 (C_{T4}) ; 137,40 (C_{T4}) ; 134,62 (C_{T2/6}) ; 134,49 (C_{T2/6}) ; 133,95 (C_β) ; 127,45 (C_φ) ; 127,43 (C_φ) ; 125,42 (C_φ) ; 124,71 (C_φ) ; 124,37 (C_φ) ; 123,98 (C_φ) ; 123,48 ; 120,59

(C_{més}) ; 120,36 (C_{més}) ; 118,35 (C_{més}) ; 70,78 (CH₂) ; 70,66 (CH₂) ; 70,40 (CH₂) ; 70,29 (CH₂) ; 70,09 (CH₂) ; 69,97(CH₂) ; 50,67(C_h) ; 40,02(C_a) ; 21,52 (3xCH₃).

SM (ESI) : C₅₆H₅₃N₈O₄ [M+H]⁺, m/z = 901,4190 calculée, 901, 4184 trouvée.

IV.6. Métallation de la 5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-azoturo)phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine (6)



Dans un ballon de 50 mL, 50mg (55 µmol, 1 éq.) du composé **(5)** et 50 mg de diacétate de zinc (0,275 mmol, 5 éq.) sont dissous dans 25 mL de THF. Le mélange est porté au reflux sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière pendant 2 h. Puis le THF est évaporé et le brut est repris dans du chloroforme (20 mL), lavé à l'eau distillée (3 x 30mL), séché sur MgSO₄ puis filtré. Après évaporation, le composé **(6)** est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement quantitatif (54 mg).

R_f = 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10).

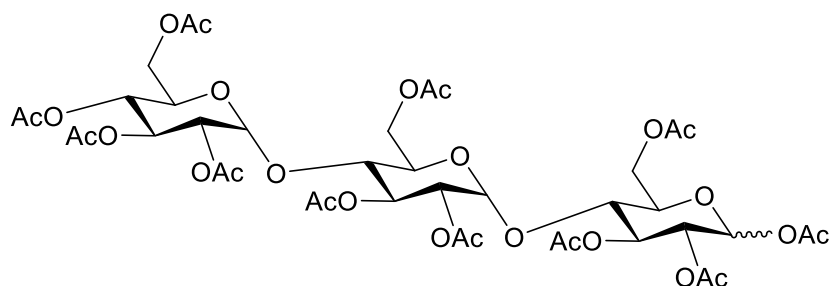
IR : 3360 cm⁻¹ ν(N-H), 2952 cm⁻¹, 2922 cm⁻¹, 2855 cm⁻¹, 2100 cm⁻¹ ν(-N₃), 1640 ν(C=O Amide), 1600 cm⁻¹ δ(N-H).

UV-Vis (CHCl₃), λ_{max}(nm) ε x10⁻³ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 424 (257,6), 553 (6,2), 596 (2,2).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,87 (m, 6H, H_β pyrr), 8,76 (d, 2H, J = 4,65 Hz, H_{β1} pyrr), 8,28 (d, 2H, J = 8 Hz, H_{φ2, φ6}), 8,18 (d, 2H, J = 8,1 Hz, H_{φ3, φ5}), 8,01 (d, 6H, J = 7,8 Hz, H_{T2, T6}), 7,5 (d, 6H, J = 7,7 Hz, H_{T3, T5}), 3,81-3,86 (m, 4H, CH₂-O), 3,74-3,78 (m, 4H, CH₂-O), 3,71-3,72 (m, 2H, CH₂-O), 3,67-3,7 (m, 2H, CH₂-O), 3,64 (t, 2H, J = 5,1 Hz, H_g), 3,33 (t, 2H, J = 4,99 Hz, H_h), 2,7 (s, 9H, 3xCH₃).

SM (ESI) : C₅₆H₅₁N₈O₄Zn [M+H]⁺, m/z = 963,3325 calculée, 963,3319 trouvée.

IV.7. Synthèse du maltotriose peracétylé (7)



Dans un bicol de 100 mL sous atmosphère d'argon, 2,50 g de maltotriose (4,96 mmol, 1 éq.) et 1.21 g de DMAP (9,91 mmol, 2 éq.) sont solubilisés dans 40 mL de pyridine anhydre et la solution résultante est refroidie à 0 °C. Ensuite 14 mL d'anhydride acétique (148,68 mmol, 30 éq.) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée, et le milieu est laissé sous agitation pendant 18 h sous atmosphère d'argon, à température ambiante. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est repris dans 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec 50 mL d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃, puis avec 100 mL de l'eau. La phase aqueuse est réextraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 100 mL). Les phases organiques combinés sont séchés sur Na₂SO₄, puis filtrés et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est alors purifié par chromatographie sur colonne de silice (hexane / EtOAc : 2/3) pour donner **(7)** sous forme de poudre blanche (3,87 g, 81%).

R_f = 0,5 (hexane / EtOAc : 1/2).

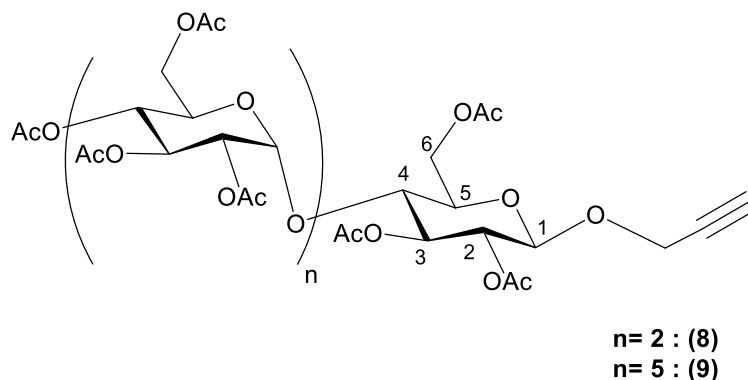
IR : 2963 cm⁻¹, 2918 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 1742 cm⁻¹ ν(C=O Acétyl).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 6,24 (d, 0,5H, J = 3,7 Hz, α-H₁), 5,75 (d, 0,5H, J = 8,1 Hz, β-H₁), 5,51 (t, 1H, J = 9,4 Hz), 5,44-5,32 (m, 2H), 5,32-5,24 (m, 1H), 5,07 (td, 1H, J = 9,8 et 3,2 Hz), 5,00-4,93 (m, 1H), 4,85 (dd, 1H, J = 10,5 et 4,0 Hz), 5,79-4,70 (m, 1H), 4,53-5,41 (m, 2H), 4,36-4,20 (m, 2H), 4,20-4,09 (m, 2H), 4,09-3,82 (m, 5H), 2,26-1,93 (m, 33 H, 11xCOCH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) : δ (ppm) : 170,67; 170,65 ; 170,63 ; 170,62 ; 170,54 ; 170,49 ; 170,48 ; 170,35 ; 170,33 ; 169,98 ; 169,88 ; 169,86 ; 169,85 ; 169,82 ; 169,80 ; 169,65 ; 169,47 ; 169,46 ; 168,96 ; 168,80 ; 95,99 ; 95,95 ; 95,69 ; 95,63 ; 91,28 ; 88,88 ; 75,16 ; 73,51 ; 73,34 ; 72,99 ; 72,54 ; 72,34 ; 72,17 ; 71,80 ; 71,69 ; 70,99 ; 70,52 ; 70,46 ; 70,17 ; 70,12 ; 70,10 ; 69,75 ; 69,39 ; 69,08 ; 68,52 ; 67,93 ; 62,93 ; 62,58 ; 62,29 ; 62,19 ; 61,41 ; 61,37 ; 60,40 ; 21,04 ; 20,94 ; 20,90 ; 20,84 ; 20,81 ; 20,68 ; 20,60 ; 20,58 ; 20,44.

SM (ESI) : C₄₀H₅₄NaO₂₇ [M+Na]⁺, m/z = 989,2750 calculée, 989,2745 trouvée.

IV.8. Synthèse des maltooligosaccharides propargylés (8) et (9)



Dans un ballon de 10 mL sous atmosphère d'argon, 0,55 mmol (1 éq.) de maltooligosaccharide peracétylé est dissous dans 5 mL de dichlorométhane anhydre. Ensuite, 1 mL d'alcool propargylique (16,93 mmol, 30 éq.) et 2 mL du $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (16,20 mmol, 30 éq.) sont ajoutés. Après 24 h d'agitation à 0 °C, 2 g de K_2CO_3 anhydre sont ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant encore 30 min. Le mélange réactionnel est filtré et lavé avec du dichlorométhane, puis le filtrat est lavé avec de l'eau (2 x 30 mL), la phase aqueuse est séparée et extraite avec du dichlorométhane (2 x 50 mL). Après séchage de la phase organique sur Na_2SO_4 , filtration et évaporation du solvant, le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash en utilisant un mélange hexane/acétate d'éthyle (1/2, v/v).

Composé (8)

Rendement = 32%.

R_f = 0,61 (hexane / EtOAc : 1/2).

IR : 3280 cm^{-1} $\nu(\text{CC-H})$, 2963 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 2260 cm^{-1} $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$, 1742 cm^{-1} $\nu(\text{C=O Acétyl})$.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) : 5,46-5,23 (m, 5H), 5,07 (t, 1H, $J = 9,8$ Hz), 4,89-4,78 (m, 3H), 4,74 (dd, 1H, $J = 10,3$ et 4,1 Hz), 4,49 (dd, 1H, $J = 12,2$ et 2,9 Hz), 4,46 (dd, 1H, $J = 12,3$ et 2,1 Hz), 4,35 (d, 2H, $J = 1,6$ Hz), 4,32 (dd, 1H, $J = 12,2$ et 4,1 Hz), 4,25 (dd, 1H, $J = 12,5$ et 3,5 Hz), 4,19 (dd, 1H, $J = 12,3$ et 3,5 Hz), 4,06 (dd, 1H, $J = 12,5$ et 2,1 Hz), 5,07 (dt, 1H, $J = 9,3$ et 3,6 Hz), 2,47 (t, 1H, $J = 2,3$ Hz, -CCH), 2,20-1,95 (m, 30H, 10xCOCH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) : δ (ppm) : 170,63 (COCH₃) ; 170,60 (COCH₃) ; 170,54 (COCH₃) ; 170,48 (COCH₃) ; 170,37 (COCH₃) ; 170,11 (COCH₃) ; 169,85 (COCH₃) ; 169,77 (COCH₃) ; 169,70 (COCH₃) ; 169,45 (COCH₃) ; 97,58 (β C₁) ; 95,77 (α C₁) ; 95,69 (α C₁) ; 78,08 (-CCH) ; 75,51 (-CCH) ; 75,28 ; 73,75 ; 72,54 ; 72,26 ; 71,85 ; 71,76 ; 70,48 ; 70,09 ; 69,40 ; 68,97 ;

68,54 ; 67,94 ; 62,82 ; 62,36 ; 61,41 ; 55,87(-CH₂-CC) ; 20,91(-OCH₃) ; 20,88 (-OCH₃) ; 20,81(-OCH₃) ; 20,68 (-OCH₃) ; 20,60 (-OCH₃) ; 20,57(-OCH₃) .

SM (ESI) : C₄₁H₅₅O₂₇ [M+H]⁺, m/z = 963,2982 calculée, 963,2976 trouvée.

Composé (9)

Rendement = 25%.

R_f = 0,41 (hexane / EtOAc : 1/2).

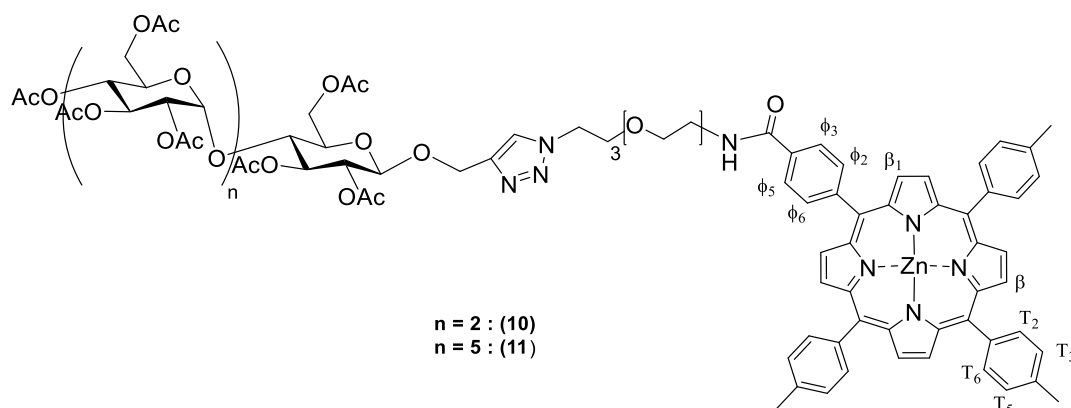
IR : 3280 cm⁻¹ ν(CC-H), 2963 cm⁻¹, 2918 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 2260 cm⁻¹ ν(C≡C), 1742 cm⁻¹ ν(C=O Acétyl).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 5,42-5,26 (m, 11H), 5,07 (t, 1H, J = 9,9 Hz, H₄), 4,85 (dd, 1H, J = 4,2 Hz et 10 Hz, H₂), 4,81 (t, 1H, J = 7 Hz), 4,54-4,45 (m, 4H), 4,40-3,87 (m, 20H), 3,8 (ddd, 1H, J = 9,6 ; 6 et 3, H₅), 2,48 (t, 1H, J = 2,25 Hz, -CCH), 2,24-1,96 (m, 57H, 19xCOCH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) : 170,72 (COCH₃) ; 170,68 (COCH₃) ; 170,66 (COCH₃) ; 170,64 (COCH₃) ; 170,55 (COCH₃) ; 170,47 (COCH₃) ; 170,44 (COCH₃) ; 170,40 (COCH₃) ; 170,38 (COCH₃) ; 170,12 (COCH₃) ; 169,77 (COCH₃) ; 169,62 (COCH₃) ; 169,56 (COCH₃) ; 169,50 (COCH₃) ; 169,48 (COCH₃) ; 97,61(β C₁) ; 95,76 (α C₁) ; 95,66 (α C₁) ; 78,13 (-CCH), 75,51 (-CCH) ; 75,33 ; 73,70 ; 73,56 ; 73,39 ; 73,31 ; 72,41 ; 72,31 ; 71,89 ; 71,75 ; 71,71 ; 71,64 ; 40,52 ; 70,46 ; 70,08 ; 69,39 ; 69 ; 68,48 ; 67,99 ; 62,79 ; 62,56 ; 62,52 ; 62,40 ; 62,22 ; 61,41 ; 55,85 (-CH₂-CC) ; 22,67 (-OCH₃) ; 21,30 (-OCH₃) ; 20,88 (-OCH₃) ; 20,86 (-OCH₃) ; 20,80 (-OCH₃) ; 20,67 (-OCH₃) ; 20,60 (-OCH₃) ; 20,59 (-OCH₃) ; 20,58 (-OCH₃) ; 20,55 (-OCH₃)

SM (ESI) : C₇₇H₁₀₃O₅₀ [M+H]⁺, m/z = 1827,5517 calculée, 1827,5512 trouvée.

IV.9. Synthèse des composés (10) et (11)



Dans un ballon de 25 mL, 1 équivalent de **(8)** ou **(9)** (0,076 mmol), 88 mg de **(6)** (0,091 mmol, 1,2 éq), 40 mg de sulfate de cuivre pentahydraté (0,16 mmol, 2 éq), 63 mg de L-ascorbate de sodium (0,32 mmol, 4 éq), 0,8 mL d'eau distillée, 4 mL de *tert*-butanol et 8 mL de THF sont successivement introduits. Après 24 h de réaction à température ambiante et sous agitation, le solvant est évaporé et le brut réactionnel repris dans 20 mL de dichlorométhane. Ensuite, la phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 10 mL) puis la phase aqueuse est séparée et extraite avec du dichlorométhane (2 x 10 mL). Après séchage sur Na₂SO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est alors purifié sur plaque préparatives de silice (éluant dichlorométhane /méthanol 95/5).

Composé (10)

Rendement = 60%

R_f = 0,32 (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5).

IR : 2963 cm⁻¹, 2918 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 1742 cm⁻¹ v(C=O Acétyl), 1640 v(C=O Amide), 1600 cm⁻¹ δ(N-H).

UV-Vis (CHCl₃), λ_{max}(nm) ε x10⁻³ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 422 (368,8), 551 (14,8), 602 (4,3).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,97-8,92 (m, 4H, H_β pyrr), 8,91 (d, 2 H, J = 4,6 Hz, H_β pyrr), 8,80 (d, 2 H, J = 4,6 Hz, H_{β1} pyrr), 8,23 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H_{φ2, φ6}), 8,14-8,04 (m, 8H, H_{φ3, φ5} et H_{T2, T6}), 7,59-7,50 (m, 6H, H_{T3, T5}), 7,00 (s, 1H, H_{triazole}), 5,48-3,78 (m, 23 H), 3,78-3,40 (m, 16H, H_{tétraéthylène glycol}), 2,70 (s, 9H, 3xCH₃), 2,20-1,91 (m, 30 H, 10xCOCH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) : 170,60 (COCH₃) ; 170,55 (COCH₃) ; 170,53 (COCH₃) ; 170,35 (COCH₃) ; 170,32 (COCH₃) ; 169,96 (COCH₃) ; 169,83 (COCH₃) ; 169,66 (COCH₃) ; 169,56 (COCH₃) ; 169,44 (COCH₃) ; 167,67 (CONH) ; 150,38 (C_α pyr) ; 150,26 (C_α pyr) ; 149,60 (C_α pyr) ; 146,69 ; 144,33 ; 142,66 ; 140,14 ; 140,11 ; 137,02 ; 137,00 ; 134,51 ; 134,43 ; 133,43 ; 132,09 ; 131,91 ; 131,86 ; 131,27 ; 130,18 ; 129,20 ; 127,47 ; 127,28 ; 127,25 ; 125,15 ;

122,93 ; 121,18 ; 121,10 ; 119,23 ; 99,56 (β C₁) ; 95,66 (α C₁) ; 75,07; 73,45; 72,41; 72,23; 72,07; 71,89; 71,71; 70,52; 70,45; 70,41; 70,39; 70,23; 70,14; 70,07; 69,60; 69,37; 68,94; 68,91; 68,49; 67,93; 62,58; 62,23; 62,02; 61,36; 53,42; 49,54 (CH₂-triazole) ; 39,71 (CH₂-NHCO) ; 22,70 (CH₃) ; 22,66 (CH₃) ; 21,72 (CH₃) ; 21,53 (CH₃) ; 20,92 (CH₃) ; 20,89 (CH₃) ; 20,83 (CH₃); 20,78 (CH₃); 20,74 (CH₃); 20,69 (CH₃); 20,65 (CH₃); 20,58 (CH₃); 20,51(CH₃).

SM (ESI) : C₉₇H₁₀₅N₈O₃₀Zn [M+H]⁺, m/z = 1925,6228 calculée, 1925,6223 trouvée.

Composé (11)

Rendement = 54%

R_f = 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5).

IR : 2963 cm⁻¹, 2918 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 1742 cm⁻¹ v(C=O Acétyl), 1640 v(C=O Amide), 1600 cm⁻¹ δ (N-H).

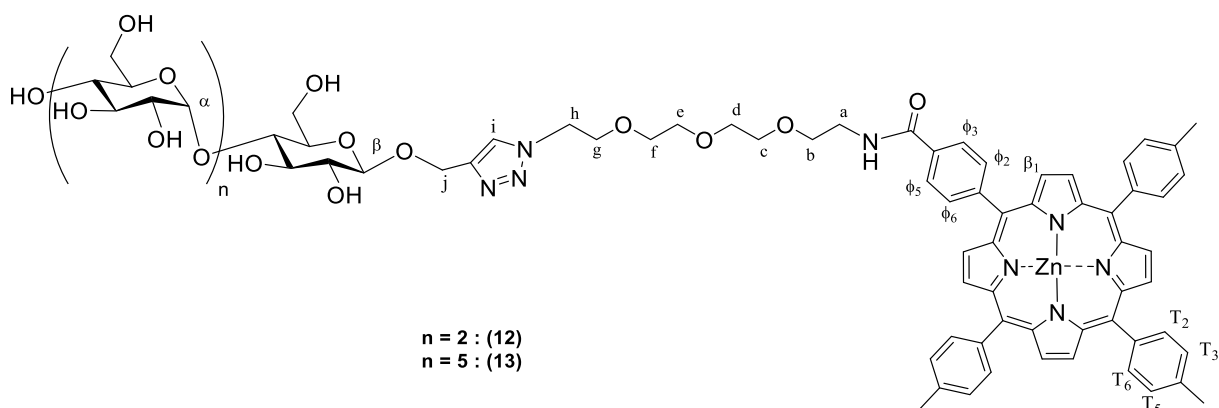
UV-Vis (CHCl₃), $\lambda_{\max}$ (nm) $\epsilon \times 10^{-3}$ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) : 422 (85,6), 551 (4,3), 602 (1,3).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 8,98-8,89 (m, 6H, H _{β} pyrr), 8,80 (d, 2 H, J = 4,6 Hz, H _{β 1} pyrr), 8,22 (d, 2H, J = 7,95 Hz, H _{ϕ 2, ϕ 6}), 8,13-8,01 (m, 8H, H _{ϕ 3, ϕ 5} et H_{T2, T6}), 7,55 (m, 6H, H_{T3, T5}), 7,04 (s, 1H, H_{triazole}), 5,44-5,24 (m, 11 H), 5,12 (t, 1H, J = 9,1 Hz), 5,02-4,96 (m, 1H), 4,88-3,83 (m, 31 H), 3,80-3,40 (m, 16H, H_{tétraéthylène glycol}), 2,7(s, 9H, 3xCH₃), 2,22-1,93 (m, 57 H, 19xCOCH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) : 170,79 (COCH₃) ; 170,72 (COCH₃) ; 170,69 (COCH₃) ; 170,66 (COCH₃) ; 170,57 (COCH₃) ; 170,47 (COCH₃) ; 170,43 (COCH₃) ; 170,39 (COCH₃) ; 170,31 (COCH₃) ; 170,22 (COCH₃) ; 169,88 (COCH₃) ; 169,82 (COCH₃) ; 169,76 (COCH₃) ; 169,61 (COCH₃) ; 169,56 (COCH₃) ; 169,53 (COCH₃) ; 169,49 (COCH₃) ; 167,63 (CONH) ; 150,37 (C _{α} pyr) ; 150,25 (C _{α} pyr) ; 150,24 (C _{α} pyr) ; 149,87 (C _{α} pyr) ; 146,68 ; 142,77 ; 140,15 ; 140,12 ; 139,29 ; 137,01 ; 136,97 ; 134,51 ; 133,31 ; 132,07 ; 131,98 ; 131,91 ; 131,85 ; 131,26 ; 127,72 ; 127,24 ; 125,11 ; 121,18 ; 121,08 ; 119,20 ; 99,58 (β C₁) ; 95,77 (α C₁) ; 95,74 (α C₁) ; 95,69 (α C₁) ; 95,64 (α C₁) ; 94,99 (α C₁) ; 75,13 ; 74,71 ; 73,95 ; 73,74 ; 73,62 ; 73,39 ; 73,34 ; 73,22 ; 72,43 ; 72,38 ; 72,38 ; 72,35 ; 72,13 ; 71,94 ; 71,77 ; 71,77 ; 71,73 ; 71,72 ; 71,66 ; 71,64 ; 71,56 ; 70,58 ; 70,53 ; 70,46 ; 70,37 ; 70,19 ; 70,11 ; 70,07 ; 69,63 ; 69,46 ; 69,39 ; 69,37 ; 69,11 ; 69,04 ; 68,96 ; 68,47 ; 67,98 ; 67,85 ; 63,00 ; 62,94 ; 62,56 ; 62,51 ; 62,45 ; 62,37 ; 62,23 ; 62,21 ; 62,09 ; 62,40 ; 49,54 (CH₂-triazole) ; 39,67(CH₂-NHCO) ; 22,69 (CH₃) ; 21,51 (CH₃) ; 20,92 (CH₃) ; 20,92 (CH₃) ; 20,85 (CH₃) ; 20,80 (CH₃) ; 20,69 (CH₃) ; 20,67 (CH₃) ; 20,59 (CH₃) ; 20,57 ; 20,53 (CH₃) ; 20,49 (CH₃).

SM (ESI) : C₁₃₃H₁₅₄O₅₄N₈Zn [M+2H]²⁺, m/z = 1395,4421 calculée, 1395,4415 trouvée.

IV.10. Synthèse des composés (12) et (13)



Dans un ballon de 25 mL, 100 mg de **(11)** ou **(12)** sont dissous dans un mélange (1:1) de dichlorométhane/méthanol, puis une quantité catalytique (4-5 gouttes) d'une solution de méthanolate de sodium à 25% dans le méthanol est ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 h. Le précipité formé est centrifugé et lavé avec du dichlorométhane puis une petite quantité de méthanol. Après séchage, les produits **(12)** et **(13)** sont récupérés avec un rendement quantitatif.

Composé (12)

IR : 3320 cm^{-1} $\nu(\text{O-H})$, 2963 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} $\nu(\text{C=O Amide})$, 1600 cm^{-1} $\delta(\text{N-H})$.

UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$: 430 (146,8), 562 (4,9), 602 (2,8).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ (ppm) : 8,77 (s, 6H, H_β pyr), 8,74 (d, 2H, $J = 4,5\text{ Hz}$, $\text{H}_{\beta 1}$ pyr), 8,25 (s, 4H, $\text{H}_{\phi 2,3,5,6}$), 8,1 (s, 1H, H_i), 8,05 (d, 6H, $J = 7,5\text{ Hz}$, $\text{H}_{T2,T6}$), 7,59 (d, 6H, $J = 7,5\text{ Hz}$, $\text{H}_{T3,T5}$), 5,02 (d, 1H, $J = 2,1\text{ Hz}$, H_α), 4,99 (d, 1H, $J = 2,7\text{ Hz}$, H_α), 4,85 (d, 1H, $J = 12\text{ Hz}$, H_i), 4,62 (d, 1H, $J = 12\text{ Hz}$, H'_i), 4,53 (t, 2H, $J = 4,8\text{ Hz}$, H_h), 4,30 (d, 1H, $J = 7,5\text{ Hz}$, H_β), 3,58 (t, 2H, $J = 4,9\text{ Hz}$, H_g), 3,77-3,43 (m, 21H), 3,18-2,99 (m, 8H, $\text{H}_{c,d,e,f}$), 2,63 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 2,63 (m, 2H, H_b), 2,36 (m, 2H, H_a).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) : δ (ppm) : 165,52 (CONH) ; 149,37 (C_α pyr) ; 149,27 (C_α pyr) ; 148,77 (C_α pyr) ; 145,61 ; 143,39 ; 139,74 ; 136,74 ; 133,96 ; 133,24 ; 131,62 ; 131,47 ; 131,42 ; 131,10 ; 127,11 ; 125,33 ; 124,49 ; 120,39 ; 120,23 ; 118,90 ; 101,86 ($\beta \text{ C}_1$) ; 100,81 (C_1) ; 100,55 (C_1) ; 79,83 ; 79,47 ; 76,23 ; 75,14 ; 73,40 ; 73,20 ; 73,03 ; 72,80 ; 72, 51 ; 71,89 ; 71,66 ; 69,82 ; 69,69 ; 69,58 ; 69,49 ; 68,92 ; 68,89 ; 68,64 ; 61,47 ; 60,71 ; 60,58 ; 60,17 ; 49,24 (C_h) ; 41,03 ; 20,96 (CH_3).

SM (ESI) : $\text{C}_{77}\text{H}_{85}\text{N}_8\text{O}_{20}\text{Zn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 1505,5172$ calculée, 1505,5166 trouvée.

Composé (13)

IR : 3320 cm^{-1} ($\nu(\text{O-H})$), 2963 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1640 $\nu(\text{C=O Amide})$, 1600 cm^{-1} $\delta(\text{N-H})$.

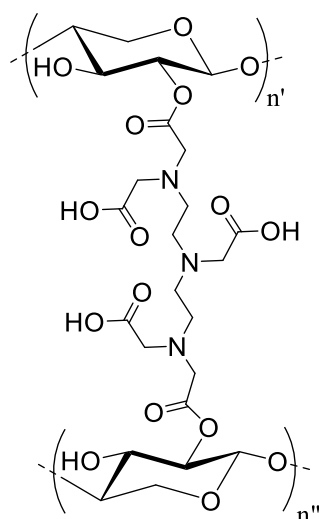
UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$: 430 (243,2), 562 (7,7), 602 (4,4).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) : δ (ppm) : 8,79-8,76 (m, 6H, H_β pyr), 8,74 (d, 2H, $J = 4,5$ Hz, $\text{H}_{\beta 1}$ pyr), 8,25 (s, 4H, $\text{H}_{\phi 2,3,5,6}$), 8,10 (s, 1H, H_i), 8,05 (d, 6 H, $J = 7,5$ Hz, $\text{H}_{T2,T6}$), 7,60 (d, 6H, $J = 7,7$ Hz, $\text{H}_{T3,T5}$), 5,05-4,97 (m, 5H, H_α), 4,85 (d, 1H, $J = 12$ Hz, H_j), 4,62 (d, 1H, $J = 12$ Hz, H'_j), 4,52 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, H_h), 4,31 (d, 1 H, $J = 7,7$ Hz, H_β), 3,85 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, H_g), 3,76-3,4 (m, 36 H), 3,08-2,93 (m, 8 H, $\text{H}_{c,d,e,f}$), 2,66 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 2,64-2,62 (m, 2H, H_b), 2,37-2,34 (m, 2H, H_a).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) : δ (ppm) : 166,29 (CONH) ; 149,38 (C_α pyr) ; 149,28 (C_α pyr) ; 148,78 (C_α pyr) ; 145,61 ; 143,46 ; 143,34 ; 139,73 ; 136,96 ; 133,96 ; 133,93 ; 131,64 ; 131,48 ; 131,42 ; 131,24 ; 131,12 ; 127,12 ; 125,34 ; 124,46 ; 120,40 ; 120,25 ; 118,92 ; 101,92 ($\beta \text{ C}_1$) ; 100,75 (C_1) ; 100,45 (C_1) ; 100,42 (C_1) ; 79,72 ; 79,51 ; 79,38 ; 75,10 ; 73,34 ; 72,98 ; 72, 93 ; 71,93 ; 71,91 ; 71,90 ; 71,61 ; 71,59 ; 71,58 ; 69,70 ; 69,58 ; 69,49 ; 68,93 ; 68,92 ; 68,64 ; 61,53 ; 61,52 ; 60,17 ; 60,13 ; 60,10 ; 49,23 (C_h) ; 41,82 ; 41,74 ; 41,65 ; 41,58 ; 41,49 ; 41,42 ; 41,32 ; 41,25 ; 41,08 ; 40,91 ; 20,96 (CH_3).

SM (ESI) : $\text{C}_{95}\text{H}_{116}\text{N}_8\text{O}_{35}\text{Zn}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $m/z = 996,3417$ calculée, 996,3412 trouvée.

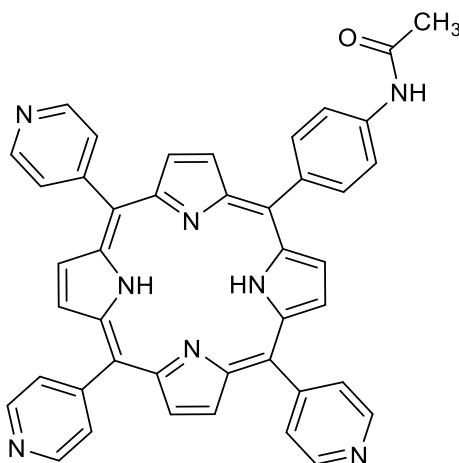
IV.11. Réticulation du xylane



Dans un ballon de 50 mL, 1 g de xylane (7,57 mmol d'unité d'anhydroxylose, 1 éq.) est solubilisé dans 20 mL de DMSO pendant 24 h à 60 °C. Ensuite, 0,270 g (0,757 mmol, 0,1 éq.), 0,540 g (1,514 mmol, 0,2 éq.) ou 0,811 g (2,27 mmol, 0,3 éq.) de dianhydride diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) sont ajoutés pour obtenir respectivement **xyl-1**, **xyl-2** et **xyl-3**. Le mélange est agité à 80 °C jusqu'à la formation d'un gel, puis l'agitation est arrêtée et la réaction est maintenue pendant 24 h à 80 °C. L'hydrogel résultant a été immergé dans un excès d'eau distillée et laissé gonfler pendant 7 jours à température ambiante, avec un changement d'eau quotidien, puis lyophilisé.

IR : 3344 cm^{-1} $\nu(\text{OH})$, 3000 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} , 1732 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1627 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1204 cm^{-1} $\nu(\text{C-O})$.

IV.12. Synthèse de 5-(4-acétamidophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (**14**)



Dans un bicol de 250 mL, 6,79 mL (72 mmol, 3 éq.) de 4-pyridylcarboxaldéhyde, 3,92 g (24 mmol, 1 éq.) de 4-acétamidobenzaldéhyde et 150 mL d'acide propionique sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 140 °C (reflux) puis 6,66 mL (96 mmol, 4 éq.) de pyrrole fraîchement distillé sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée, puis le reflux est maintenu à l'abri de la lumière pendant 3 h. A la fin de réaction, l'acide propionique est évaporé à la pompe à palettes et le brut est purifié une première fois sur un Plug pour éliminer les goudrons, puis par chromatographie sur colonne de silice éluée selon un gradient de polarité (mélange chloroforme/éthanol absolu : 100/0 - 90/10). La porphyrine (**14**) est obtenue sous forme de poudre violette avec un rendement de 4% (650 mg).

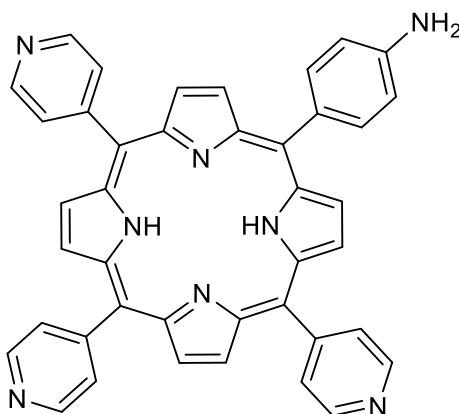
$R_f = 0,52$ ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$: 90/10).

UV-Vis (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$: 420 (175,4), 516 (8,7), 550 (3,5), 589 (2,9), 646 (1,6).

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) : δ (ppm) : 9,08-9,00 (m, 6H, Ho-py), 8,94 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H, H_β pyrr), 8,94 (s, 4H, H_β pyrr), 8,80 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H, H_β pyrr), 8,20 – 8,10 (m, 8H, Hm-py/ Ho-Ar), 7,94 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Hm-Ar), 7,79 (s, 1H, NH_{amide}), 2,38 (s, 3H, CH_3), -2,84 (s, 2H, NH).

SM (ESI) : $\text{C}_{43}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 675,2621$ calculée, 675,2615 trouvée.

IV.13. Synthèse de la 5-(4-aminophényl)-10,15,20-tri(4-pyridyl)porphyrine (**15**)



250 mg (0,37 mmol) de (**14**) et 250 mL d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée (5M, 250 mL) dans un ballon de 500 ml. Le tout est chauffé à reflux pendant 3 h. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel repris dans 60 mL d'un mélange de chloroforme et d'une solution saturée de NaHCO₃ (1:1). Ensuite, la phase organique est lavée avec de l'eau (2 x 20 mL) puis la phase aqueuse est séparée et extraite avec du dichlorométhane (2 x 20 ml). Après séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé afin de récupérer la porphyrine (**15**) sous la forme d'une poudre violette avec un rendement quantitatif.

$R_f = 0,61$ (CHCl₃/EtOH : 90/10).

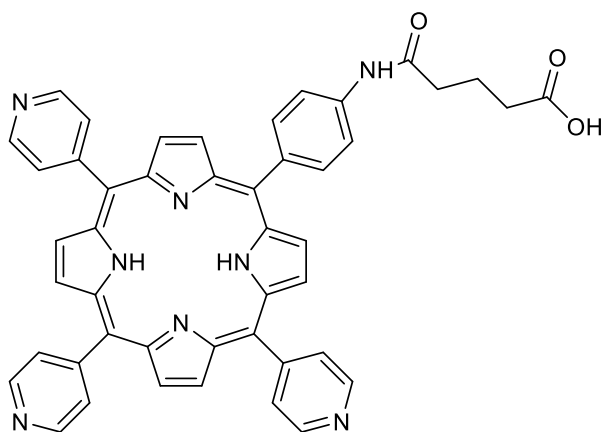
UV-Vis (CHCl₃), $\lambda_{max}(nm)$ $\epsilon \times 10^{-3} (L.mol^{-1}.cm^{-1})$: 420 (255), 514 (15), 550 (7,7), 588 (5), 644 (4,6).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) : 9,12-8,97 (m, 8H, Ho-py/ H _{β pyrr), 8,89 – 8,74 (m, 6H, H _{β pyrr), 8,16 (s, 6H, Hm-py), 7,98 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ho-Ar), 7,09 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, Hm-Ar), -2,84 (s, 2H, NH).}}

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm): 161,75 ; 150,69 ; 150,52 ; 150,31 ; 150,14 ; 150,11 ; 150,05 ; 149,69 ; 148,39 ; 148,34 ; 146,47 ; 135,82 ; 131,58 ; 129,38 ; 124,77 ; 124,16 ; 123,96 ; 123,86 ; 122,59 ; 122,28 ; 122,13 ; 122,04 ; 121,35 ; 121,14 ; 120,62 ; 118,93 ; 117,29 ; 116,65 ; 113,56.

SM (ESI) : C₄₁H₂₉N₈O [M+H]⁺, m/z = 633,2515 calculée, 633,2510 trouvée.

IV.14. Synthèse du composé (16)



Dans un ballon de 50 mL sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière, 200 mg (0,32 mmol, 1 éq.) de **(15)** et 377 mg (6,31 mmol, 20 éq.) d'anhydride glutarique sont dissous dans 15 mL de dichlorométhane. La réaction est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 24 h. Après évaporation du solvant, le produit est purifié sur plaque préparatives de silice avec comme éluant dichlorométhane/méthanol (90/10), la porphyrine **(16)** est obtenue avec une masse de 220 mg soit un rendement de 91%.

$R_f = 0,58$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10).

UV-Vis (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$: 419 (217,6), 515 (11,1), 550 (4,6), 590 (4), 645 (2,5).

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 9:1, 500 MHz) : δ (ppm) : 9,13-8,90 (m, 8H, Ho-py/ H_β pyrr), 8,89 – 8,67 (m, 6H, H_β pyrr), 8,24-8,17 (m, 6H, Hm-py), 8,15 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Ho-Ar), 8,02 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Hm-Ar), 2,61 (m, 2H, CH_2), 2,50 (m, 2H, CH_2), 2,16 (m, 2H, CH_2), -2,90 (s, 2H, NH).

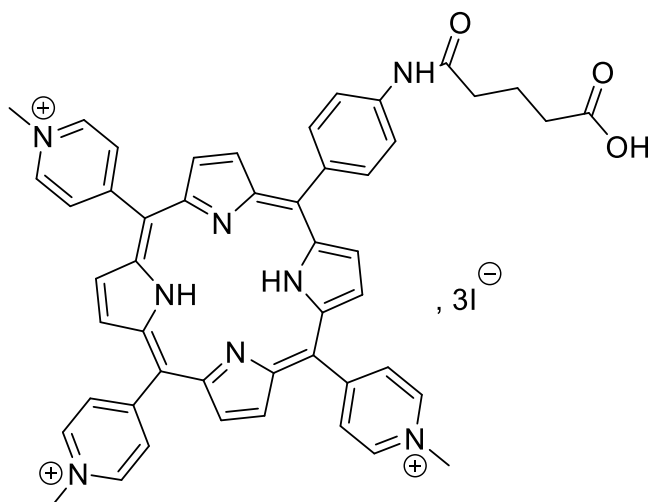
RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 9:1, 125 MHz): δ (ppm): 175,74 (C=O) ; 172,33 (C=O) ; 150,89 ; 150,83 ; 147,89 ; 147,85 ; 138,75 ; 136,95 ; 135,19 ; 129,78 ; 121,79 ; 118,29 ; 117,27 ; 116,79 ; 36,52 (CH_2) ; 33,17 (CH_2) ; 20,17 (CH_2).

SM (ESI) : $\text{C}_{46}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 747,2832$ calculée, 747,2827 trouvée.

IV.15. N-méthylation des porphyrines

Dans un ballon de 50 mL, un excès d'iodométhane (60 éq.) est introduit dans une solution de DMF anhydre (25 mL) contenant la porphyrine (1 éq.). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à reflux (140 °C). Après évaporation du solvant et de l'excès d'iodométhane, précipitation dans l'éther diéthylique puis filtration, la porphyrine N-méthylée est récupérée sous la forme d'une poudre violette avec un rendement quantitatif.

IV.15.1. Synthèse du composé (17)



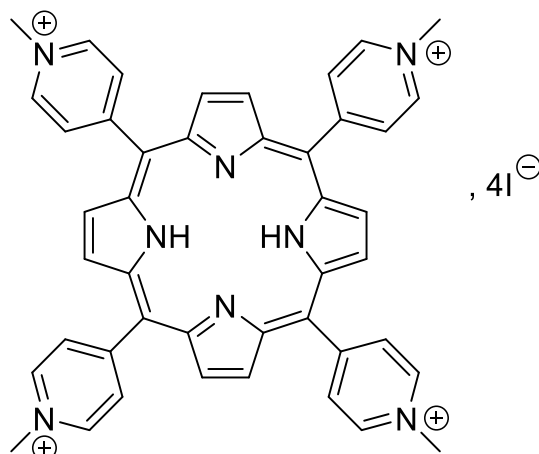
UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\max}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$: 429 (144,6), 520 (9,8), 557 (4,9), 591 (4), 647 (1,8).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) : 10,42 (s, 1H, NH_{amide}), 9,48 (d, $J = 6,1$ Hz, 6H, Ho-py), 9,16 (s, 4H, H_β pyrr), 9,06 (s, 4H, H_β pyrr), 8,02-8,89 (m, 6H, Hm-py), 8,16 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ho-Ar), 8,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Hm-Ar), 4,72 (s, 9H, 3xN $^+$ -CH $_3$), 2,56 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH $_2$), 2,41 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH $_2$), 1,96 (quin, $J = 7,4$ Hz, 2H, CH $_2$), -2,99 (s, 2H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ (ppm): 174,12 (C=O); 171,25 (C=O); 156,50 ; 156,46 ; 144,08 ; 144,05 ; 139,61 ; 134,72 ; 134,63 ; 131,99 ; 122,86 ; 117,48 ; 115,16 ; 114,28 ; 47,79 (CH $_3$) ; 35,56 (CH $_2$) ; 32,95 (CH $_2$) ; 20,47 (CH $_2$).

SM (ESI) : C $_{49}$ H $_{43}$ N $_8$ O $_3$ [M] $^{3+}$, $m/z = 263,7814$ calculée, 263,7814 trouvée

IV.15.2. Tétraiodure de 5,10,15,20-tétrakis(1-méthylpyridinium-4-yl)porphyrine (TMPyP)

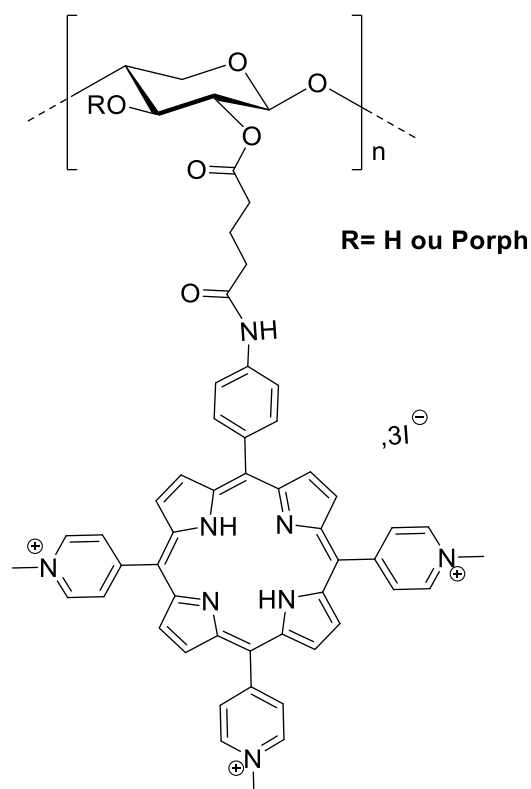


UV-Vis (DMSO), $\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$ $\epsilon \times 10^{-3} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$: 423 (5,2), 520 (5), 557 (3,6), 585(3,6), 642 (2,9).

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ (ppm) : 9,49 (d, $J = 6,4$ Hz, 8 Ho-py), 9,21(s, 8H, H_β pyrr), 9,0 (d, $J = 6,5$ Hz, 8H, Hm-py), 4,73 (s, 12H, N^+-CH_3), -3,09 (s, 2H, NH)

SM (ESI) : $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{N}_8 [\text{M}]^{4+}$, $m/z = 169,5799$ calculée, 169.5811 trouvée.

IV.16. Greffage de la porphyrine (17) sur le xylane



Toutes les synthèses ont été réalisées suivant le même protocole expérimental. Dans un ballon de 25 mL, la porphyrine **(17)** est solubilisée dans 10 mL de DMSO, puis 6 équivalents de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, le xylane préalablement solubilisé dans le DMSO est ajouté (**Tableau 8**). La réaction est maintenue 24 h à 80 °C. À la fin de la réaction, le xylane est précipité avec l'éthanol absolu, puis filtré et séché à l'étuve à 60 °C.

IR : 3359 cm⁻¹ ν(OH), 2895 cm⁻¹, 2917 cm⁻¹, 1700 cm⁻¹ ν(C=O), 1627 cm⁻¹ ν(C=O).

Tableau 8 : Les quantités des réactifs utilisées pour fonctionnaliser le xylane.

Échantillon	xyl-P1	xyl-P2	xyl-P3	xyl-P4	xyl-P5	xyl-P6	xyl-P7
Nombre d'éq. (porphyrine (17))	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,08	0,01
m(porphyrine (17)) (mg)	44	89	134	177	222	177	221
m(xylane) (mg)	500	500	500	500	500	250	250
DS	0,03	0,08	0,11	0,15	0,19	0,37	0,53

IV.17. Élaboration d'hydrogels à base de xylane portant des PS liés de manière covalente

200 mg de xylane fonctionnalisé sont solubilisés dans 5 mL de DMSO pendant 24 h à 60 °C. Ensuite, 150 mg (0,42 mmol) de dianhydride de DTPA sont ajoutés. Le mélange est chauffé à 80 °C et agité en continu jusqu'à la formation du gel (environ 24 h), puis l'agitation est arrêtée et la réaction est maintenue pendant 24 h à 80 °C. Les hydrogels résultants **HG-xyl-P1**, **HG-xyl-P2**, **HG-xyl-P3**, **HG-xyl-P4** et **HG-xyl-P5** sont immergés dans un excès d'eau distillée et laissés à gonfler pendant 7 jours à température ambiante, avec un changement d'eau quotidien, puis lyophilisés.

IR : 3400 cm^{-1} $\nu(\text{OH})$, 2895 cm^{-1} , 2917 cm^{-1} , 1745 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1700 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$, 1627 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$.

IV.18. Réticulation directe du xylane par les porphyrines

Dans un ballon de 25 mL, 100, 150 ou 200 mg de *meso*-tétra(4-carboxyphényl)porphyrine sont solubilisés dans du DMSO (13 g/L), puis 8 équivalents de CDI sont ajoutés. Après 24 h de réaction à 60 °C, 1 g de xylane (7,57 mmol d'unités d'anhydroxyloses) préalablement solubilisé dans du DMSO est ajouté. Le mélange est agité à 80 °C jusqu'à la formation d'un gel, puis l'agitation est arrêtée et la réaction est maintenue pendant 24 h à 80 °C. Les hydrogels résultants **xyl-TCPP-1**, **xyl-TCPP-2** et **xyl-TCPP-3** sont immergés dans un excès d'eau distillée et laissés à gonfler pendant 7 jours à température ambiante, avec un changement d'eau quotidien, puis lyophilisés.

IR : 3328 cm⁻¹ ν (OH), 2918 cm⁻¹, 2873 cm⁻¹, 1713cm⁻¹ ν (C=O), 1603 cm⁻¹ ν (C=O), 1267 cm⁻¹, 800 cm⁻¹, 708 cm⁻¹.

Références bibliographiques

- [1] O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom; 2016.
- [2] Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019;51:72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- [3] Le Guern F, Sol V, Ouk C, Arnoux P, Frochot C, Ouk T-S. Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin following the Attachment of Polymyxin B. *Bioconjug Chem* 2017;28:2493–506. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00516>.
- [4] Ambrosini V, Issawi M, Sol V, Riou C. Photodynamic inactivation of *Botrytis cinerea* by an anionic porphyrin: an alternative pest management of grapevine. *Sci Rep* 2020;10:17438. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74427-9>.
- [5] E. Akilov O, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci* 2007;6:1067–75. <https://doi.org/10.1039/B703521G>.
- [6] Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:406–11. <https://doi.org/10.1039/B311903N>.
- [7] Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species – bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:955–89. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026>.
- [8] Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009;6:170–88. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.10.008>.
- [9] Xia L-Y, Zhang X, Cao M, Chen Z, Wu F-G. Enhanced Fluorescence Emission and Singlet Oxygen Generation of Photosensitizers Embedded in Injectable Hydrogels for Imaging-Guided Photodynamic Cancer Therapy. *Biomacromolecules* 2017;18:3073–81. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00725>.
- [10] Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Photosensitized Porphyrins. *Photochem Photobiol* 1992;55:89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x>.
- [11] Ning X, Lee S, Wang Z, Kim D, Stubblefield B, Gilbert E, et al. Maltodextrin-based imaging probes detect bacteria in vivo with high sensitivity and specificity. *Nat Mater* 2011;10:602–7. <https://doi.org/10.1038/nmat3074>.
- [12] Ning X, Seo W, Lee S, Takemiya K, Rafi M, Feng X, et al. PET Imaging of Bacterial Infections with Fluorine-18-Labeled Maltotetraose. *Angew Chem Int Ed* 2014;53:14096–101. <https://doi.org/10.1002/anie.201408533>.
- [13] Cheng Y, Li D, Pang X, Liu G. Maltotetraose-based probes for bacteria-specific imaging: Great sensitivity, specificity and translational potential. *Chin Chem Lett* 2020;31:1049–50. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2019.09.032>.
- [14] Cartaxo da Costa Urtiga S, Rodrigues Marcelino H, Sócrates Tabosa do Egito E, Eleamen Oliveira E. Xylan in drug delivery: A review of its engineered structures and biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2020;151:199–208. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.04.016>.
- [15] Xing R, Liu Y, Zou Q, Yan X. Self-assembled injectable biomolecular hydrogels towards phototherapy. *Nanoscale* 2019;11:22182–95. <https://doi.org/10.1039/c9nr06266a>.

- [16] Peng P-C, Hsieh C-M, Chen C-P, Tsai T, Chen C-T. Assessment of Photodynamic Inactivation against Periodontal Bacteria Mediated by a Chitosan Hydrogel in a 3D Gingival Model. *Int J Mol Sci* 2016;17:1821. <https://doi.org/10.3390/ijms17111821>.
- [17] Strokov K, Galstyan A. Chitosan-Silicon Phthalocyanine Conjugate as Effective Photo-Functional Hydrogel for Tracking and Killing of Bacteria. *Eur J Org Chem* 2020;2020:7327–32. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202001363>.
- [18] Khurana B, Gierlich P, Meindl A, Gomes-da-Silva LC, Senge MO. Hydrogels: soft matters in photomedicine. *Photochem Photobiol Sci* 2019;18:2613–56. <https://doi.org/10.1039/C9PP00221A>.
- [19] Madigan MT, Brock TD, Martinko JM, Madigan MT, Martinko JM. Brock biology of microorganisms. Boston: Pearson; 2015.
- [20] Schulz HN, Jørgensen BB. Big Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:105–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.105>.
- [21] Duda VI, Suzina NE, Polivtseva VN, Boronin AM. Ultramicrobacteria: Formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. *Microbiology* 2012;81:379–90. <https://doi.org/10.1134/S0026261712040054>.
- [22] Reece JB, Campbell NA. Campbell biologie. Paris: Pearson; 2012.
- [23] Bactérie. Wikipédia 2021.
- [24] Becker R, Hirsh S, Hu E, Jamil A, Mathew S, Newcomb K, et al. INHIBITORY EFFECTS OF *Camellia sinensis* (GREEN TEA) ON *Streptococcus mutans* 2009. [https://www.semanticscholar.org/paper/INHIBITORY-EFFECTS-OF-Camellia-sinensis-\(-GREEN-TEA-Becker-Hirsh/ae0b534799604c46703708fc6db39d74440a2d89](https://www.semanticscholar.org/paper/INHIBITORY-EFFECTS-OF-Camellia-sinensis-(-GREEN-TEA-Becker-Hirsh/ae0b534799604c46703708fc6db39d74440a2d89) (accessed August 27, 2021).
- [25] Epand RM, Walker C, Epand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 2016;1858:980–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>.
- [26] Aaron TG, Robert WHI. Eradicating Bacterial Biofilms with Natural Products and their Inspired Analogues that Operate Through Unique Mechanisms. *Curr Top Med Chem* 2017;17:1954–64.
- [27] Berlanga M, Guerrero R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Factories* 2016;15. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5>.
- [28] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>.
- [29] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>.
- [30] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond Engl* 2001;358:135–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1).
- [31] Myszka K, Czaczyk K. Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors. *IntechOpen*; 2012. <https://doi.org/10.5772/33048>.
- [32] Keyes K, Lee MD, Maurer JJ. Antibiotics: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Transfer. *Microb. Food Saf. Anim. Agric.*, John Wiley & Sons, Ltd; 2003, p. 45–56. <https://doi.org/10.1002/9780470752616.ch6>.
- [33] Van Leeuwenhoek A. More microscopical observations made by the same M. Leewenhoeck, and promised in numb. 97. Of these tracts; communicated in his letters

- of August 15. 1673 and of April 7. 1674. *Philos Trans R Soc Lond* 1674;9:23–5. <https://doi.org/10.1098/rstl.1674.0010>.
- [34] Playfair J. *Living with Germs: In health and disease*. OUP Oxford; 2007.
 - [35] Schwartz RS. Paul Ehrlich's Magic Bullets. *N Engl J Med* 2004;350:1079–80. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048021>.
 - [36] Wainwright M, Kristiansen JE. On the 75th anniversary of Prontosil. *Dyes Pigments* 2011;88:231–4. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.08.012>.
 - [37] Davies J. Where have All the Antibiotics Gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2006;17:287–90.
 - [38] Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives*. *Clin Infect Dis* 2011;52:S397–428. <https://doi.org/10.1093/cid/cir153>.
 - [39] Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2012;18:268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
 - [40] Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:7687–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>.
 - [41] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin--Japan, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:624–6.
 - [42] O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015;8:217–30. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>.
 - [43] Sydnor ERM, Perl TM. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:141–73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-10>.
 - [44] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study 2010;10:6.
 - [45] Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb Drug Resist Larchmt N* 2019;25:890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>.
 - [46] Dublanchet A, Fruciano E. [A short history of phage therapy]. *Med Mal Infect* 2008;38:415–20. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.016>.
 - [47] Parfitt T. Georgia: an unlikely stronghold for bacteriophage therapy. *The Lancet* 2005;365:2166–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66759-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66759-1).
 - [48] Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, et al. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Curr Pharm Biotechnol* 2010;11:69–86. <https://doi.org/10.2174/138920110790725401>.
 - [49] Wright A, Hawkins CH, Änggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 2009;34:349–57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>.

- [50] Sang Y, Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev* 2008;9:227–35. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001497>.
- [51] Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:246–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.073>.
- [52] Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2011;11:114. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-114>.
- [53] Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs ECW, Rehm BHA, Hancock REW. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. *Infect Immun* 2008;76:4176–82. <https://doi.org/10.1128/IAI.00318-08>.
- [54] de la Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EBM, Horsman S, et al. Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2696–704. <https://doi.org/10.1128/AAC.00064-12>.
- [55] Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4673–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4673-4679.2004>.
- [56] Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992;258:1004–7. <https://doi.org/10.1126/science.1439793>.
- [57] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 2003;55:27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- [58] Yount NY, Yeaman MR. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:337–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134535>.
- [59] Panacek A, Kvítek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006;110:16248–53. <https://doi.org/10.1021/jp063826h>.
- [60] Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333–40. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065>.
- [61] Singh P, Garg A, Pandit S, Mokkapati VRSS, Mijakovic I. Antimicrobial Effects of Biogenic Nanoparticles. *Nanomater Basel Switz* 2018;8:E1009. <https://doi.org/10.3390/nano8121009>.
- [62] Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine* 2017;12:3941–65. <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>.
- [63] Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, Ou-Yang Y-S, Chen Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:1115–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>.
- [64] Abo-Zeid Y, Williams GR. The potential anti-infective applications of metal oxide nanoparticles: A systematic review. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2020;12:e1592. <https://doi.org/10.1002/wnan.1592>.
- [65] Guerrero Correa M, Martínez FB, Vidal CP, Streitt C, Escrig J, de Dicastillo CL. Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and

- antimicrobial action. Beilstein J Nanotechnol 2020;11:1450–69. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.129>.
- [66] Molina-Reyes J, Romero-Moran A, Uribe-Vargas H, Lopez-Ruiz B, Sanchez-Salas JL, Ortega E, et al. Study on the photocatalytic activity of titanium dioxide nanostructures: Nanoparticles, nanotubes and ultra-thin films. Catal Today 2020;341:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.05.033>.
- [67] Seabra AB, Pelegrino MT, Haddad PS. Chapter 24 - Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and Challenges. In: Ficaí A, Grumezescu AM, editors. Nanostructures Antimicrob. Ther., Elsevier; 2017, p. 531–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00024-X>.
- [68] Edris H, Pouran M, Parisa T, Hooshyar H, John S, Mohammad AK, et al. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. Curr Drug Metab 2017;18:120–8.
- [69] Barberi-Heyob M, Frochot C, Bezdetnaya-Bolotina L, Brault D, Dumas D, Guillemin F, et al. The photodynamic therapy. Actual Chim 2007;308–309:26–34.
- [70] Frochot C, Barberi-Heyob M, Blanchard-Desce M, Bolotina L, Bonneau S, Chiara M, et al. La thérapie photodynamique : état de l'art et perspectives. Actual Chim 2015:46–50.
- [71] Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:380–7. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [72] Daniell MD, Hill JS. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. ANZ J Surg 1991;61:340–8. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x>.
- [73] Prime J. Les accidents toxiques par l'eosinate de sodium. Jouve Boyer 1900.
- [74] Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Zeitung Biol 1900;39:524–6.
- [75] Tappeiner H von, Joldlbauer A. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes. , Arch Klin Med 1904;80:427–87.
- [76] Haussmann W. Die sensibilisierende Wirkung tierscher Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. Wien Klin Wochenschr 1908;21:1527–9.
- [77] Meyer-Betz F. Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of blood and bile pigments. , Dtsch Arch Klin Med 1913;112:476-503.
- [78] Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood. Biol Comptes Rendus 1924;91:1423–4.
- [79] Auler H, Banzer G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. Z Für Krebsforsch 1942;53:65–8.
- [80] Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ. Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic, Embryonic, and Traumatized Tissues for Porphyrins and Metalloporphyrins. Exp Biol Med 1948;68:640–1. <https://doi.org/10.3181/00379727-68-16580>.
- [81] Schwartz S, Absolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, Xrays and tumors. Univ Minn Med Bull 1955;27:7–8.
- [82] Lipson RL, Blades EJ, Olsen AM. The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. J Natl Cancer Inst 1961;26:1–11. <https://doi.org/10.1093/jnci/26.1.1>.
- [83] Dougherty TJ. Activated Dyes as Antitumor Agents. JNCI J Natl Cancer Inst 1974;52:1333–6. <https://doi.org/10.1093/jnci/52.4.1333>.
- [84] Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors 1978;38:9.

- [85] Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor 1976;36:5.
- [86] Dougherty TJ, Potter WR, Weishaupt KR. The Structure of the Active Component of Hematoporphyrin Derivative. In: Andreoni A, Cubeddu R, editors. *Porphyr. Tumor Phototherapy*, Boston, MA: Springer US; 1984, p. 23–35. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4721-7_3.
- [87] DeRosa M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 2002;233–234:351–71. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- [88] Yin R, Hamblin M. Antimicrobial Photosensitizers: Drug Discovery Under the Spotlight. *Curr Med Chem* 2015;22:2159–85. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150319120134>.
- [89] Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Contag CH, Hasan T. Rapid Control of Wound Infections by Targeted Photodynamic Therapy Monitored by In Vivo Bioluminescence Imaging. *Photochem Photobiol* 2007;75:51–7. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750051RCOWIB2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750051RCOWIB2.0.CO2).
- [90] Morley S, Griffiths J, Philips G, Moseley H, O'Grady C, Mellish K, et al. Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy. *Br J Dermatol* 2013;168:617–24. <https://doi.org/10.1111/bjd.12098>.
- [91] Kjeldstad B, Johnsson A. AN ACTION SPECTRUM FOR BLUE AND NEAR ULTRAVIOLET IN ACTIVATION OF *Propionibacterium acnes*; WITH EMPHASIS ON A POSSIBLE PORPHYRIN PHOTSENSITIZATION. *Photochem Photobiol* 1986;43:67–70. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb05592.x>.
- [92] Wiegell SR, Wulf HC. Photodynamic therapy of acne vulgaris using methyl aminolaevulinate: a blinded, randomized, controlled trial. *Br J Dermatol* 2006;154:969–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.07107.x>.
- [93] Neugebauer J, Jozsa M, Kübler A. Die antimikrobielle photodynamische Therapie zur Prävention der alveolären Otitis und des Dolor post extractionem. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2004;8:350–5. <https://doi.org/10.1007/s10006-004-0572-6>.
- [94] Foote CS. DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION. *Photochem Photobiol* 1991;54:659–659. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x>.
- [95] Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009;24:259–68. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- [96] Foote CS, Shook FC, Abakerli RB. [3] Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol.*, vol. 105, Elsevier; 1984, p. 36–47. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05006-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05006-0).
- [97] Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J Photochem Photobiol B* 1990;6:343–4. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(90\)85104-5](https://doi.org/10.1016/1011-1344(90)85104-5).
- [98] Moan JE, Boye E. Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin. *Photobiochem Photobiophys* 1981;2:301–7.
- [99] Schafer FQ, Buettner GR. Singlet Oxygen Toxicity Is Cell Line-dependent: A Study of Lipid Peroxidation in Nine Leukemia Cell Lines. *Photochem Photobiol* 1999;70:858–67. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08294.x>.

- [100] Terao J, Matsushita S. Reactivities and Products in Photosensitized Oxidation of Unsaturated Triglycerides. *Agric Biol Chem* 1978;42:667–8. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.42.667>.
- [101] Kulig MJ, Smith LL. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *J Org Chem* 1973;38:3639–42. <https://doi.org/10.1021/jo00960a050>.
- [102] El-Beltagi HS, Mohamed HI. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* 2013;41:44–57. <https://doi.org/10.15835/nbha4118929>.
- [103] Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:761–70. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00817-9).
- [104] Baptista MS, Cadet J, Mascio PD, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol* 2017;93:912–9. <https://doi.org/10.1111/php.12716>.
- [105] Cadet J, Courdavault S, Ravanat J-L, Douki T. UVB and UVA radiation-mediated damage to isolated and cellular DNA. *Pure Appl Chem* 2005;77:947–61. <https://doi.org/10.1351/pac200577060947>.
- [106] Ravindran PN, Babu KN, Sivaraman K. *Turmeric: The genus Curcuma*. CRC Press; 2007.
- [107] Gupta KK, Bharne SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J* 2006;273:5320–32. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05525.x>.
- [108] Ruby AJ, Kuttan G, Dinesh Babu K, Rajasekharan KN, Kuttan R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett* 1995;94:79–83. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03827-J](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03827-J).
- [109] Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci* 2015;30:885–90. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1492-1>.
- [110] Tovsen ML, Bruzell E, Ferrari E, Saladini M, Gaware VS, Másson M, et al. Antibacterial phototoxic effects of synthetic asymmetric and glycosylated curcuminoids in aqueous formulations: Studies on curcumin and curcuminoids. LIV. *J Photochem Photobiol B* 2014;140:150–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.013>.
- [111] Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg* 2012;30:393–9. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3195>.
- [112] Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PAM. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:221–41. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00126-1).
- [113] Brockmann H, Pohl F, Maier K, Haschad MN. Über das Hypericin, den photodynamischen Farbstoff des Johanniskrautes (*Hypericum perforatum*). *Justus Liebigs Ann Chem* 1942;553:1–52. <https://doi.org/10.1002/jlac.19425530102>.
- [114] Thomas C, MacGill RS, Miller GC, Pardini RS. Photoactivation of Hypericin Generates Singlet Oxygen in Mitochondria and Inhibits Succinoxidase. *Photochem Photobiol* 1992;55:47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04208.x>.
- [115] Miskovsky P. Hypericin - A New Antiviral and Antitumor Photosensitizer: Mechanism of Action and Interaction with Biological Macromolecules. *Curr Drug Targets* 2002;3. <https://doi.org/10.2174/1389450023348091>.

- [116] Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res* 2004;18:230–2. <https://doi.org/10.1002/ptr.1430>.
- [117] Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 2010;9:365–9. <https://doi.org/10.1039/B9PP00144A>.
- [118] O'rourke JF, Dowds BC. Dye-mediated photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Biochem Soc Trans* 1992;20:76S-76S. <https://doi.org/10.1042/bst020076s>.
- [119] Thakuri P, Joshi R, Basnet S, Pandey S, Taujale S, Mishra N. Antibacterial photodynamic therapy on *staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa* in-vitro n.d.:4.
- [120] Pathak MA, Daniels F, Fitzpatrick TB. The Presently Known Distribution of Furocoumarins (Psoralens) in Plants. *J Invest Dermatol* 1962;39:225–39. <https://doi.org/10.1038/jid.1962.106>.
- [121] Hale AL, Meepagala KM, Oliva A, Aliotta G, Duke SO. Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*. *J Agric Food Chem* 2004;52:3345–9. <https://doi.org/10.1021/jf0497298>.
- [122] Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol* 2000;73:299–305. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00279-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00279-8).
- [123] Melski JW, Tanenbaum L, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Bleich HL. Oral methoxsalen photochemotherapy for the treatment of psoriasis: a cooperative clinical trial. *J Invest Dermatol* 1977;68:328–35. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12496022>.
- [124] Vatansever F, Ferraresi C, Sousa MVP de, Yin R, Rineh A, Sharma SK, et al. Can biowarfare agents be defeated with light? *Virulence* 2013;4:796–825. <https://doi.org/10.4161/viru.26475>.
- [125] Cooke RG, Segal W. Colouring matters of Australian plants. IV. Haemocorin: A unique glycoside from *Haemodorum corymbosum* Vahl. *Aust J Chem* 1955;8:107–13. <https://doi.org/10.1071/ch9550107>.
- [126] Cooke RG, Segal W. Colouring matters of Australian Plants. V. Haemocorin: The chemistry of the Aglycone. *Aust J Chem* 1955;8:413–21. <https://doi.org/10.1071/ch9550413>.
- [127] Barton DHR, de Mayo P, Morrison GA, Schaeppi WH, Raistrick H. Some Observations on the Constitutions of Herqueinone and Related Compounds. *Chem Ind* 1956:552–3.
- [128] Narasimhachari N, Vasavada BN, Viswanathan S. Antibiotic activity of deoxy-herqueinone (atrovenetin monomethyl ether). *Experientia* 1965;21:376–376. <https://doi.org/10.1007/BF02139744>.
- [129] Kornfeld JM, Edwards JM. An investigation of the photodynamic pigments in extracts of *Lachnanthes tinctoria*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1972;286:88–90. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(72\)90092-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(72)90092-X).
- [130] Späth A, Leibl C, Cieplik F, Lehner K, Regensburger J, Hiller K-A, et al. Improving Photodynamic Inactivation of Bacteria in Dentistry: Highly Effective and Fast Killing of Oral Key Pathogens with Novel Tooth-Colored Type-II Photosensitizers. *J Med Chem* 2014;57:5157–68. <https://doi.org/10.1021/jm4019492>.
- [131] Godard J, Gibbons D, Leroy-Lhez S, Williams RM, Villandier N, Ouk T-S, et al. Development of Phenalenone-Triazolium Salt Derivatives for aPDT: Synthesis and Antibacterial Screening. *Antibiotics* 2021;10:626. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060626>.

- [132] Redmond RW, Gamlin JN. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem Photobiol* 1999;70:391–475. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x>.
- [133] Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2005;2:175–91. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9).
- [134] Tang W, Xu H, Park EJ, Philbert MA, Kopelman R. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:579–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.066>.
- [135] Schäfer F, Nicholson JA, Gerritsen N, Wright RL, Gillam DG, Hall C. The effect of oral care feed-back devices on plaque removal and attitudes towards oral care. *Int Dent J* 2003;53:404–8. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2003.tb00917.x>.
- [136] Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:680–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl021>.
- [137] Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:190–2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl205>.
- [138] Bellin JS, Lutwick L, Jonas B. Effects of photodynamic action on *E. coli*. *Arch Biochem Biophys* 1969;132:157–64. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90348-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90348-8).
- [139] Goulart R de C, Bolean M, Paulino T de P, Thedei G, Souza SLS, Tedesco AC, et al. Photodynamic Therapy in Planktonic and Biofilm Cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg* 2009;28:S-53. <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2591>.
- [140] Pessoni L, Lacombe S, Billon L, Brown R, Save M. Photoactive, Porous Honeycomb Films Prepared from Rose Bengal-Grafted Polystyrene. *Langmuir* 2013;29:10264–71. <https://doi.org/10.1021/la402079z>.
- [141] Shrestha A, Hamblin MR, Kishen A. Characterization of a Conjugate between Rose Bengal and Chitosan for Targeted Antibiofilm and Tissue Stabilization Effects as a Potential Treatment of Infected Dentin. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4876–84. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-12>.
- [142] Treibs A, Kreuzer F-H. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebig's Ann Chem* 1968;718:208–23. <https://doi.org/10.1002/jlac.19687180119>.
- [143] Kamkaew A, Hui Lim S, Boon Lee H, Voon Kiew L, Yong Chung L, Burgess K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2013;42:77–88. <https://doi.org/10.1039/C2CS35216H>.
- [144] Caruso E, Banfi S, Barbieri P, Leva B, Orlandi VT. Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 2012;114:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.05.007>.
- [145] Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* 1985;318:162–3. <https://doi.org/10.1038/318162a0>.
- [146] Sharma SK, Chiang LY, Hamblin MR. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream? *Nanomed* 2011;6:1813–25. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.144>.
- [147] Huang L, Terakawa M, Zhiyentayev T, Huang Y-Y, Sawayama Y, Jahnke A, et al. Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials.

- Nanomedicine Nanotechnol Biol Med 2010;6:442–52.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.10.005>.
- [148] Kadish KM, Smith KM, Guillard R. The porphyrin handbook. Vol. 3, Vol. 3,. San Diego, Calif.; London: Academic; 2000.
- [149] Moss GP. Nomenclature of tetrapyrroles. Eur J Biochem 1988;178:277–328.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14453.x>.
- [150] Falk JE, Smith KM, editors. Porphyrins and metalloporphyrins: a new edition based on the original volume by J. E. Falk. Amsterdam ; New York: Elsevier Scientific Pub. Co; 1975.
- [151] Ohashi K, Kinoshita Y, Tamiaki H. Syntheses of Chalcone-Type Chlorophyll Derivatives Possessing a Bacteriochlorin, Chlorin or Porphyrin π -System and Their Optical Properties. Photochem Photobiol 2019;95:755–61. <https://doi.org/10.1111/php.13044>.
- [152] Layer G, Jahn D, Deery E, Lawrence AD, Warren MJ. 7.13 - Biosynthesis of Heme and Vitamin B12. In: Liu H-W (Ben), Mander L, editors. Compr. Nat. Prod. II, Oxford: Elsevier; 2010, p. 445–99. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00144-1>.
- [153] Fischer H. Preparation of hemin. Org Synth 1955;3:442–3.
- [154] Gossauer A, Engel N. Chlorophyll catabolism — structures, mechanisms, conversions. J Photochem Photobiol B 1996;32:141–51. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(95\)07257-8](https://doi.org/10.1016/1011-1344(95)07257-8).
- [155] Pallenberg AJ, Dobhal MP, Pandey RK. Efficient Synthesis of Pyropheophorbide-a and Its Derivatives. Org Process Res Dev 2004;8:287–90.
<https://doi.org/10.1021/op034160h>.
- [156] Drogat N, Barrière M, Granet R, Sol V, Krausz P. High yield preparation of purpurin-18 from Spirulina maxima. Dyes Pigments 2011;88:125–7.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2010.05.006>.
- [157] Kadish K, Smith KM, Guillard R. The Porphyrin Handbook, Volume 1. Elsevier; 2000.
- [158] Rothmund P. FORMATION OF PORPHYRINS FROM PYRROLE AND ALDEHYDES. J Am Chem Soc 1935;57:2010–1. <https://doi.org/10.1021/ja01313a510>.
- [159] Rothmund P, Menotti AR. Porphyrin Studies. IV.1 The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. J Am Chem Soc 1941;63:267–70.
<https://doi.org/10.1021/ja01846a065>.
- [160] Adler AD, Longo FR, Finarelli JD, Goldmacher J, Assour J, Korsakoff L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. J Org Chem 1967;32:476–476.
<https://doi.org/10.1021/jo01288a053>.
- [161] Little RG, Anton JA, Loach PA, Ibers JA. The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. J Heterocycl Chem 1975;12:343–9.
<https://doi.org/10.1002/jhet.5570120226>.
- [162] Gonsalves AMDR, Pereira MM. A new look into the rothemund meso-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis. J Heterocycl Chem 1985;22:931–3.
<https://doi.org/10.1002/jhet.5570220363>.
- [163] Lindsey JS, Hsu HC, Schreiman IC. Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. Tetrahedron Lett 1986;27:4969–70. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85109-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85109-6).
- [164] Fischer H, Friedrich H, Lamatsch W, Morgenroth K. Porphyrin syntheses XVIII (XIX). Syntheses of coproporphyrin I and II and also mesoporphyrin II, V and XII. Techn Hochsch Munchen Ann 1928;466:147–78.

- [165] Paine J, Chang C, Dolphin D. SYNTHESIS OF PORPHYRINS VIA DIPYRRROMETHENES. *Heterocycles* 1977;7:831–8.
- [166] Paine JB, Hiom J, Dolphin D. Bromination of dipyrromethenes for porphyrin synthesis. *J Org Chem* 1988;53:2796–802. <https://doi.org/10.1021/jo00247a025>.
- [167] Rao PD, Dhanalekshmi S, Littler BJ, Lindsey JS. Rational Syntheses of Porphyrins Bearing up to Four Different Meso Substituents. *J Org Chem* 2000;65:7323–44. <https://doi.org/10.1021/jo000882k>.
- [168] Laha JK, Dhanalekshmi S, Taniguchi M, Ambroise A, Lindsey JS. A Scalable Synthesis of Meso-Substituted Dipyrromethanes. *Org Process Res Dev* 2003;7:799–812. <https://doi.org/10.1021/op034083q>.
- [169] Arsenault GP, Bullock E, MacDonald SF. Pyrromethanes and Porphyrins Therefrom1. *J Am Chem Soc* 1960;82:4384–9. <https://doi.org/10.1021/ja01501a066>.
- [170] Woodward RB. The total synthesis of chlorophyll. *Pure Appl Chem* 1961;2:383–404. <https://doi.org/10.1351/pac196102030383>.
- [171] Ogoshi H, Sugimoto H, Nishiguchi T, Watanabe T, Matsuda Y, Yoshida Z. Syntheses of 5-aryl- and 5,15-diaryl-2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylporphines. *Chem Lett* 1978;7:29–32. <https://doi.org/10.1246/cl.1978.29>.
- [172] Manka JS, Lawrence DS. High yield synthesis of 5,15-diarylporphyrins. *Tetrahedron Lett* 1989;30:6989–92. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)93405-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)93405-7).
- [173] Temelli B, Unaleroglu C. Synthesis of meso-tetraphenyl porphyrins via condensation of dipyrromethanes with N-tosyl imines. *Tetrahedron* 2009;65:2043–50. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.01.009>.
- [174] A Facile Route to Tripyrrane from 2,5-Bis(hydroxymethyl)pyrrole and the Improved Synthesis of Porphine by the. *Synlett* 1999;1999:73–4. <https://doi.org/10.1055/s-1999-2565>.
- [175] Hatscher S, Senge MO. Synthetic access to 5,10-disubstituted porphyrins. *Tetrahedron Lett* 2003;44:157–60. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02475-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02475-9).
- [176] Braun A, Tcherniac J. Über die Produkte der Einwirkung von Acetanhydrid auf Phthalamid. *Berichte Dtsch Chem Ges* 1907;40:2709–14. <https://doi.org/10.1002/cber.190704002202>.
- [177] Diesbach H de, Weid E von der. Quelques sels complexes des o-dinitriles avec le cuivre et la pyridine. *Helv Chim Acta* 1927;10:886–8. <https://doi.org/10.1002/hlca.192701001110>.
- [178] Linstead RP. 212. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters. *J Chem Soc Resumed* 1934:1016–7. <https://doi.org/10.1039/JR9340001016>.
- [179] Rezazgui O. Towards a bio-inspired photoherbicide: Synthesis and studies of fluorescent tagged or water-soluble. These de doctorat. Limoges, 2015.
- [180] Dumoulin F, Durmuş M, Ahsen V, Nyokong T. Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs. *Coord Chem Rev* 2010;254:2792–847. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.002>.
- [181] Klausen M, Ucuncu M, Bradley M. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules* 2020;25:5239. <https://doi.org/10.3390/molecules25225239>.
- [182] Felgenträger A, Maisch T, Dobler D, Späth A. Hydrogen Bond Acceptors and Additional Cationic Charges in Methylene Blue Derivatives: Photophysics and Antimicrobial Efficiency. *BioMed Res Int* 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/482167>.

- [183] Fekrazad R, Zare H, Vand SMS. Photodynamic therapy effect on cell growth inhibition induced by Radachlorin and toluidine blue O on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;15:213–7. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.001>.
- [184] Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01074.x>.
- [185] Nitzan Y, Dror R, Ladan H, Malik Z, Kimel S, Gottfried V. Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem Photobiol* 1995;62:342–7. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05279.x>.
- [186] Merchat M, Spikes JD, Bertoloni G, Jori G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B* 1996;35:149–57. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)07321-6](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07321-6).
- [187] Le Guern F, Ouk T-S, Yerzhan I, Nurlykyz Y, Arnoux P, Frochot C, et al. Photophysical and Bactericidal Properties of Pyridinium and Imidazolium Porphyrins for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *Molecules* 2021;26:1122. <https://doi.org/10.3390/molecules26041122>.
- [188] Vecchio D, Dai T, Huang L, Fantetti L, Roncucci G, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/CI in infected mouse skin abrasion. *J Biophotonics* 2013;6:733–42. <https://doi.org/10.1002/jbio.201200121>.
- [189] Yow CMN, Tang HM, Chu ESM, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol* 2012;88:626–32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01085.x>.
- [190] Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci* 2014;29:629–35. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1369-3>.
- [191] Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Improved antibacterial phototoxicity of a neutral porphyrin in natural deep eutectic solvents. *J Photochem Photobiol B* 2015;148:188–96. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.022>.
- [192] Cho K, Lee SY, Chang B-S, Um H-S, Lee J-K. The effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* attached to surface-modified titanium. *J Periodontal Implant Sci* 2015;45:38–45. <https://doi.org/10.5051/jpis.2015.45.2.38>.
- [193] Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol* 2009;9:70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-70>.
- [194] Reddi E, Ceccon M, Valduga G, Jori G, Bommer JC, Elisei F, et al. Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins. *J Photochem Photobiol* 2002;75:462–70. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750462PPAAAO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750462PPAAAO2.0.CO2).
- [195] Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of Uptake of a Cationic Water-Soluble Pyridinium Zinc Phthalocyanine across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:522–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.522-527.2000>.
- [196] Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc* 2013;8:108–20.

- [197] Meng S, Xu Z, Hong G, Zhao L, Zhao Z, Guo J, et al. Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates. *Eur J Med Chem* 2015;92:35–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.029>.
- [198] Xu Z, Gao Y, Meng S, Yang B, Pang L, Wang C, et al. Mechanism and In Vivo Evaluation: Photodynamic Antibacterial Chemotherapy of Lysine-Porphyrin Conjugate. *Front Microbiol* 2016;7:242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00242>.
- [199] Soukos NS, Hamblin MR, Hasan T. The Effect of Charge on Cellular Uptake and Phototoxicity of Polylysine Chlorine6Conjugates. *Photochem Photobiol* 1997;65:723–9. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb01916.x>.
- [200] Zhou J, Qi G-B, Wang H. A purpurin-peptide derivative for selective killing of Gram-positive bacteria via insertion into cell membrane. *J Mater Chem B* 2016;4:4855–61. <https://doi.org/10.1039/c6tb00406g>.
- [201] Zhao Y, Ying J-W, Sun Q, Ke M-R, Zheng B-Y, Huang J-D. A novel silicon(IV) phthalocyanine-oligopeptide conjugate as a highly efficient photosensitizer for photodynamic antimicrobial therapy. *Dyes Pigments* 2020;172:107834. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107834>.
- [202] R. Hamblin M, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436–50. <https://doi.org/10.1039/B311900A>.
- [203] Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;20:228–35. <https://doi.org/10.1159/000331009>.
- [204] Le Guern F. Inhibition de souches bactériennes par de nouveaux composés photosensibles conjugués à la Polymyxine B. Thèse de doctorat. Université de Limoges, 2017.
- [205] Le Guern F, Ouk T-S, Ouk C, Vanderesse R, Champavier Y, Pinault E, et al. Lysine Analogue of Polymyxin B as a Significant Opportunity for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *ACS Med Chem Lett* 2018;9:11–6. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00360>.
- [206] Johnson GA, Muthukrishnan N, Pellois J-P. Photoinactivation of Gram positive and Gram negative bacteria with the antimicrobial peptide (KLAKLAK)(2) conjugated to the hydrophilic photosensitizer eosin Y. *Bioconjug Chem* 2013;24:114–23. <https://doi.org/10.1021/bc3005254>.
- [207] Zhang A-N, Wu W, Zhang C, Wang Q-Y, Zhuang Z-N, Cheng H, et al. A versatile bacterial membrane-binding chimeric peptide with enhanced photodynamic antimicrobial activity. *J Mater Chem B* 2019;7:1087–95. <https://doi.org/10.1039/c8tb03094d>.
- [208] Dosselli R, Gobbo M, Bolognini E, Campestrini S, Reddi E. Porphyrin-apidaecin conjugate as a new broad spectrum antibacterial agent. *ACS Med Chem Lett* 2010;1:35–8. <https://doi.org/10.1021/ml900021y>.
- [209] Dosselli R, Tampieri C, Ruiz-González R, De Munari S, Ragàs X, Sánchez-García D, et al. Synthesis, characterization, and photoinduced antibacterial activity of porphyrin-type photosensitizers conjugated to the antimicrobial peptide apidaecin 1b. *J Med Chem* 2013;56:1052–63. <https://doi.org/10.1021/jm301509n>.
- [210] de Freitas LM, Lorenzón EN, Santos-Filho NA, Zago LH de P, Uliana MP, de Oliveira KT, et al. Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. *Sci Rep* 2018;8:4212. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22687-x>.

- [211] Mitchell M. Antibacterial Agents Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Anti-Infect Agents Med Chem Former Curr Med Chem - Anti-Infect Agents* 2007;6:243–7. <https://doi.org/10.2174/187152107782023114>.
- [212] Xing B, Jiang T, Bi W, Yang Y, Li L, Ma M, et al. Multifunctional divalent vancomycin: the fluorescent imaging and photodynamic antimicrobial properties for drug resistant bacteria. *Chem Commun Camb Engl* 2011;47:1601–3. <https://doi.org/10.1039/c0cc04434b>.
- [213] van Oosten M, Schäfer T, Gazendam JAC, Ohlsen K, Tsompanidou E, de Goffau MC, et al. Real-time in vivo imaging of invasive- and biomaterial-associated bacterial infections using fluorescently labelled vancomycin. *Nat Commun* 2013;4:2584. <https://doi.org/10.1038/ncomms3584>.
- [214] Gao H-Z, Yang K-W, Wu X-L, Liu J-Y, Feng L, Xiao J-M, et al. Novel conjugation of norvancomycin-fluorescein for photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Bioconjug Chem* 2011;22:2217–21. <https://doi.org/10.1021/bc200382d>.
- [215] Choi K-H, Lee H-J, Park BJ, Wang K-K, Shin EP, Park J-C, et al. Photosensitizer and vancomycin-conjugated novel multifunctional magnetic particles as photoinactivation agents for selective killing of pathogenic bacteria. *Chem Commun Camb Engl* 2012;48:4591–3. <https://doi.org/10.1039/c2cc17766h>.
- [216] Zhai L, Yang K-W. Porphyrin-vancomycin: A highly promising conjugate for the identification and photodynamic inactivation of antibiotic resistant Gram-positive pathogens. *Dyes Pigments* 2015;120:228–38. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.04.017>.
- [217] Huang L, Wang M, Huang Y-Y, El-Hussein A, Wolf LM, Chiang LY, et al. Progressive cationic functionalization of chlorin derivatives for antimicrobial photodynamic inactivation and related vancomycin conjugates. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 2018;17:638–51. <https://doi.org/10.1039/c7pp00389g>.
- [218] DANIELS PJL, RANE DF, McCOMBIE SW, TESTA RT, WRIGHT JJ, NAGABHUSHAN TL. Chemical and Biological Modification of Antibiotics of the Gentamicin Group. *Aminocyclitol Antibiot.*, vol. 125, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1980, p. 371–92. <https://doi.org/10.1021/bk-1980-0125.ch020>.
- [219] Nieves I, Hally C, Viappiani C, Agut M, Nonell S. A porphycene-gentamicin conjugate for enhanced photodynamic inactivation of bacteria. *Bioorganic Chem* 2020;97:103661. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103661>.
- [220] Mächtel R, Narducci A, Griffith DA, Cordes T, Orelle C. An integrated transport mechanism of the maltose ABC importer. *Res Microbiol* 2019;170:321–37. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.09.004>.
- [221] Scheepers GH, Nijeholt JAL a, Poolman B. An updated structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* 2016;590:4393–401. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12445>.
- [222] Silhavy TJ, Mitchell AM. Genetic Analysis of Protein Translocation. *Protein J* 2019;38:217–28. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09813-y>.
- [223] Gopal S, Berg D, Hagen N, Schriefer E-M, Stoll R, Goebel W, et al. Maltose and Maltodextrin Utilization by *Listeria monocytogenes* Depend on an Inducible ABC Transporter which Is Repressed by Glucose. *PLOS ONE* 2010;5:e10349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010349>.

- [224] Pang X, Xiao Q, Cheng Y, Ren E, Lian L, Zhang Y, et al. Bacteria-Responsive Nanoliposomes as Smart Sonotheranostics for Multidrug Resistant Bacterial Infections. *ACS Nano* 2019;acs.nano.8b09336. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09336>.
- [225] Galstyan A, Block D, Niemann S, Grüner MC, Abbruzzetti S, Oneto M, et al. Labeling and Selective Inactivation of Gram-Positive Bacteria Employing Bimodal Photoprobes with Dual Readouts. *Chem - Eur J* 2016;22:5243–52. <https://doi.org/10.1002/chem.201504935>.
- [226] Tang J, Chu B, Wang J, Song B, Su Y, Wang H, et al. Multifunctional nanoagents for ultrasensitive imaging and photoactive killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nat Commun* 2019;10:4057. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12088-7>.
- [227] Ringot C, Sol V, Barrière M, Saad N, Bressollier P, Granet R, et al. Triazinyl Porphyrin-Based Photoactive Cotton Fabrics: Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity. *Biomacromolecules* 2011;12:1716–23. <https://doi.org/10.1021/bm200082d>.
- [228] Ringot C, Saad N, Brégier F, Bressollier P, Poli E, Chaleix V, et al. Antibacterial activity of a photosensitive hybrid cellulose fabric. *Photochem Photobiol Sci* 2018;17:1780–6. <https://doi.org/10.1039/C8PP00212F>.
- [229] Cheng Y, Li D, Pang X, Liu G. Maltohexaose-based probes for bacteria-specific imaging: Great sensitivity, specificity and translational potential. *Chin Chem Lett* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.09.032>.
- [230] Bakleh ME, Sol V, Estieu-Gionnet K, Granet R, Déléris G, Krausz P. An efficient route to VEGF-like peptide porphyrin conjugates via microwave-assisted ‘click-chemistry.’ *Tetrahedron* 2009;65:7385–92. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.028>.
- [231] Staudinger H, Meyer J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv Chim Acta* 1919;2:635–46. <https://doi.org/10.1002/hlca.19190020164>.
- [232] Cavaleiro JAS, Görner H, Lacerda PSS, MacDonald JG, Mark G, Neves MGPMS, et al. Singlet oxygen formation and photostability of meso-tetraarylporphyrin derivatives and their copper complexes. *J Photochem Photobiol Chem* 2001;144:131–40. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00540-8).
- [233] Das R, Mukhopadhyay B. Chemical O-Glycosylations: An Overview. *ChemistryOpen* 2016;5:401–33. <https://doi.org/10.1002/open.201600043>.
- [234] Magnusson G, Noori G, Dahmén J, Frejd T, Lave T. BF₃--Etherate Induced Formation of 2,2,2-Trichloroethyl Glycopyranosides. Selective Visualization of Carbohydrate Derivatives on TLC Plates. *Acta Chem Scand* 1981;35b:213–6. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.35b-0213>.
- [235] Agaba P, Tumukunde J, Tindimwebwa JVB, Kwizera A. Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. *BMC Res Notes* 2017;10:349. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2695-5>.
- [236] Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens in Intensive Care Units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) Study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1430–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.01538-07>.
- [237] Axer A, Hermann S, Kehr G, Clases D, Karst U, Fischer-Riepe L, et al. Harnessing the Maltodextrin Transport Mechanism for Targeted Bacterial Imaging: Structural Requirements for Improved in vivo Stability in Tracer Design. *ChemMedChem* 2018;13:241–50. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700543>.

- [238] Zlitni A, Gowrishankar G, Steinberg I, Haywood T, Sam Gambhir S. Maltotriose-based probes for fluorescence and photoacoustic imaging of bacterial infections. *Nat Commun* 2020;11:1250. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14985-8>.
- [239] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:3–12. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00239-3).
- [240] Wichterle O, Lím D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 1960;185:117–8. <https://doi.org/10.1038/185117a0>.
- [241] Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 2015;6:105–21. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [242] Parente ME, Andrade AO, Ares G, Russo F, Jiménez-Kairuz Á. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *Int J Cosmet Sci* 2015;37:511–8. <https://doi.org/10.1111/ics.12227>.
- [243] Zhao F, Yao D, Guo R, Deng L, Dong A, Zhang J. Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Nanomaterials* 2015;5:2054–130. <https://doi.org/10.3390/nano5042054>.
- [244] Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 2017;35:530–44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>.
- [245] S. King PJ, Saiani A, V. Bichenkova E, F. Miller A. A de novo self-assembling peptide hydrogel biosensor with covalently immobilised DNA-recognising motifs. *Chem Commun* 2016;52:6697–700. <https://doi.org/10.1039/C6CC01433J>.
- [246] Annabi N, Rana D, Shirzaei Sani E, Portillo-Lara R, Gifford JL, Fares MM, et al. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. *Biomaterials* 2017;139:229–43. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.011>.
- [247] Yang DH, Seo DI, Lee D-W, Bhang SH, Park K, Jang G, et al. Preparation and evaluation of visible-light cured glycol chitosan hydrogel dressing containing dual growth factors for accelerated wound healing. *J Ind Eng Chem* 2017;53:360–70. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.05.007>.
- [248] Luo Y, Lou C, Zhang S, Zhu Z, Xing Q, Wang P, et al. Three-dimensional hydrogel culture conditions promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocytes. *Cytotherapy* 2018;20:95–107. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.08.008>.
- [249] Xie Z, Shen J, Sun H, Li J, Wang X. Polymer-based hydrogels with local drug release for cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother* 2021;137. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111333>.
- [250] Wei W, Li J, Qi X, Zhong Y, Zuo G, Pan X, et al. Synthesis and characterization of a multi-sensitive polysaccharide hydrogel for drug delivery. *Carbohydr Polym* 2017;177:275–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.133>.
- [251] Ebara M, Kotsuchibashi Y, Uto K, Aoyagi T, Kim Y-J, Narain R, et al. Smart Hydrogels. In: Ebara M, Kotsuchibashi Y, Narain R, Idota N, Kim Y-J, Hoffman JM, et al., editors. *Smart Biomater.*, Tokyo: Springer Japan; 2014, p. 9–65. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54400-5_2.
- [252] Shetye SP, Godbole DA, Shilpa D, Gajare P. Hydrogels: Introduction, Preparation, Characterization and Applications 2015;1:25.
- [253] Rolland L. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide. These de doctorat. Université Pierre et Marie Curie, 2013.

- [254] Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:371–83. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0639>.
- [255] Lowman AM, Peppas NA. Solute transport analysis in pH-responsive, complexing hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol). *J Biomater Sci Polym Ed* 1999;10:999–1009. <https://doi.org/10.1163/156856299X00586>.
- [256] Sivashanmugam A, Arun Kumar R, Vishnu Priya M, Nair SV, Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur Polym J* 2015;72:543–65. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014>.
- [257] Ave MN, Issa MCA. Hyaluronic Acid Dermal Filler: Physical Properties and Its Indications. In: Issa MCA, Tamura B, editors. *Botulinum Toxins Fill. Relat. Subst.*, Cham: Springer International Publishing; 2019, p. 187–97. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16802-9_39.
- [258] Fallacara A, Manfredini S, Durini E, Vertuani S. Hyaluronic Acid Fillers in Soft Tissue Regeneration. *Facial Plast Surg FPS* 2017;33:87–96. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597685>.
- [259] Basta SL. Cosmetic Fillers: Perspectives on the Industry. *Facial Plast Surg Clin N Am* 2015;23:417–21. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2015.07.001>.
- [260] La Gatta A, Salzillo R, Catalano C, D'Agostino A, Pirozzi AVA, De Rosa M, et al. Hyaluronan-based hydrogels as dermal fillers: The biophysical properties that translate into a “volumetric” effect. *PLoS ONE* 2019;14:e0218287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218287>.
- [261] Veiga AS, Schneider JP. Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. *Biopolymers* 2013;100:637–44. <https://doi.org/10.1002/bip.22412>.
- [262] Joshi Navare K, Eggermont LJ, Rogers ZJ, Mohammed HS, Colombani T, Bencherif SA. Antimicrobial Hydrogels: Key Considerations and Engineering Strategies for Biomedical Applications. In: Li B, Moriarty TF, Webster T, Xing M, editors. *Racing Surf. Pathog. Implant Infect. Adv. Antimicrob. Strateg.*, Cham: Springer International Publishing; 2020, p. 511–42. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34475-7_22.
- [263] De Giglio E, Cometa S, Ricci MA, Cafagna D, Savino AM, Sabbatini L, et al. Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections. *Acta Biomater* 2011;7:882–91. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.030>.
- [264] Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, et al. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine* 2018;13:2217–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154748>.
- [265] Tsou T-L, Tang S-T, Huang Y-C, Wu J-R, Young J-J, Wang H-J. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) wound dressing containing ciprofloxacin and its drug release studies. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:95–100. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-5954-2>.
- [266] Marchesan S, Qu Y, Waddington LJ, Easton CD, Glattauer V, Lithgow TJ, et al. Self-assembly of ciprofloxacin and a tripeptide into an antimicrobial nanostructured hydrogel. *Biomaterials* 2013;34:3678–87. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.096>.
- [267] Li H, Yang J, Hu X, Liang J, Fan Y, Zhang X. Superabsorbent polysaccharide hydrogels based on pullulan derivate as antibacterial release wound dressing. *J Biomed Mater Res A* 2011;98A:31–9. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33045>.
- [268] Overstreet D, McLaren A, Calara F, Vernon B, McLemore R. Local Gentamicin Delivery From Resorbable Viscous Hydrogels Is Therapeutically Effective. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:337–47. <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3935-9>.

- [269] Singh B, Sharma S, Dhiman A. Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: Biomedical properties and histological study of wound healing. *Int J Pharm* 2013;457:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.028>.
- [270] Peng K-T, Chen C-F, Chu I-M, Li Y-M, Hsu W-H, Hsu RW-W, et al. Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles. *Biomaterials* 2010;31:5227–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.027>.
- [271] Chang C-H, Lin Y-H, Yeh C-L, Chen Y-C, Chiou S-F, Hsu Y-M, et al. Nanoparticles Incorporated in pH-Sensitive Hydrogels as Amoxicillin Delivery for Eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomacromolecules* 2010;11:133–42. <https://doi.org/10.1021/bm900985h>.
- [272] Simões SMN, Veiga F, Torres-Labandeira JJ, Ribeiro ACF, Sandez-Macho MI, Concheiro A, et al. Syringeable Pluronic- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm* 2012;80:103–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.09.017>.
- [273] Gustafson CT, Boakye-Agyeman F, Brinkman CL, Reid JM, Patel R, Bajzer Z, et al. Controlled Delivery of Vancomycin via Charged Hydrogels. *PLOS ONE* 2016;11:e0146401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146401>.
- [274] Zhang J, Xiao C, Wang J, Zhuang X, Chen X. Photo cross-linked biodegradable hydrogels for enhanced vancomycin loading and sustained release. *Chin J Polym Sci* 2013;31:1697–705. <https://doi.org/10.1007/s10118-013-1358-9>.
- [275] Ng VWL, Ke X, Lee ALZ, Hedrick JL, Yang YY. Synergistic Co-Delivery of Membrane-Disrupting Polymers with Commercial Antibiotics against Highly Opportunistic Bacteria. *Adv Mater* 2013;25:6730–6. <https://doi.org/10.1002/adma.201302952>.
- [276] Engler AC, Tan JPK, Ong ZY, Coady DJ, Ng VWL, Yang YY, et al. Antimicrobial Polycarbonates: Investigating the Impact of Balancing Charge and Hydrophobicity Using a Same-Centered Polymer Approach. *Biomacromolecules* 2013;14:4331–9. <https://doi.org/10.1021/bm401248t>.
- [277] Hu J, Quan Y, Lai Y, Zheng Z, Hu Z, Wang X, et al. A smart aminoglycoside hydrogel with tunable gel degradation, on-demand drug release, and high antibacterial activity. *J Controlled Release* 2017;247:145–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.003>.
- [278] Neut D, van de Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:885–91. <https://doi.org/10.1093/jac/47.6.885>.
- [279] Cleophas RTC, Sjollem J, Busscher HJ, Kruijtz JAW, Liskamp RMJ. Characterization and Activity of an Immobilized Antimicrobial Peptide Containing Bactericidal PEG-Hydrogel. *Biomacromolecules* 2014;15:3390–5. <https://doi.org/10.1021/bm500899r>.
- [280] Lakes AL, Peyyala R, Ebersole JL, Puleo David A, Hilt JZ, Dziubla TD. Synthesis and Characterization of an Antibacterial Hydrogel Containing Covalently Bound Vancomycin. *Biomacromolecules* 2014;15:3009–18. <https://doi.org/10.1021/bm5006323>.
- [281] Yu H, Xu X, Chen X, Lu T, Zhang P, Jing X. Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 2007;103:125–33. <https://doi.org/10.1002/app.24835>.
- [282] Thomas V, Yallapu MM, Sreedhar B, Bajpai SK. A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *J Colloid Interface Sci* 2007;315:389–95. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.068>.

- [283] Rattanuengsrikul V, Pimpha N, Supaphol P. Development of gelatin hydrogel pads as antibacterial wound dressings. *Macromol Biosci* 2009;9:1004–15. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900131>.
- [284] Singh R, Singh D. Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23:2649–58. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4730-3>.
- [285] Noppakundilokrat S, Sonjaipanich K, Thongchul N, Kiatkamjornwong S. Syntheses, characterization, and antibacterial activity of chitosan grafted hydrogels and associated mica-containing nanocomposite hydrogels. *J Appl Polym Sci* 2013;127:4927–38. <https://doi.org/10.1002/app.37612>.
- [286] El Salmawi KM. Gamma Radiation-Induced Crosslinked PVA/Chitosan Blends for Wound Dressing. *J Macromol Sci Part A* 2007;44:541–5. <https://doi.org/10.1080/10601320701235891>.
- [287] Liu B, Hu J, Meng Q. Nonwoven supported temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/polyurethane copolymer hydrogel with antibacterial activity. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89:1–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31180>.
- [288] Ferreira MOG, Leite LLR, de Lima IS, Barreto HM, Nunes LCC, Ribeiro AB, et al. Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. *Carbohydr Polym* 2016;152:409–18. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.037>.
- [289] Wahid F, Zhong C, Wang H-S, Hu X-H, Chu L-Q. Recent Advances in Antimicrobial Hydrogels Containing Metal Ions and Metals/Metal Oxide Nanoparticles. *Polymers* 2017;9:636. <https://doi.org/10.3390/polym9120636>.
- [290] Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011;36:981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.
- [291] El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. Chitosan in plant protection. *Mar Drugs* 2010;8:968–87. <https://doi.org/10.3390/md8040968>.
- [292] Goy RC, Britto D de, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 2009;19:241–7. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.
- [293] Badawy MEI, Rabea EI. A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *Int J Carbohydr Chem* 2011;2011:e460381. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>.
- [294] Szymańska E, Winnicka K, Wieczorek P, Sacha PT, Tryniszewska EA. Influence of Unmodified and β -Glycerophosphate Cross-Linked Chitosan on Anti-Candida Activity of Clotrimazole in Semi-Solid Delivery Systems. *Int J Mol Sci* 2014;15:17765–77. <https://doi.org/10.3390/ijms151017765>.
- [295] Badawy MEI, Rabea EI. Synthesis and Antimicrobial Activity of N-(6-Carboxyl Cyclohex-3-ene Carbonyl) Chitosan with Different Degrees of Substitution. *Int J Carbohydr Chem* 2016;2016:e6046232. <https://doi.org/10.1155/2016/6046232>.
- [296] Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesàro A. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Mar Drugs* 2016;14:99. <https://doi.org/10.3390/md14050099>.
- [297] Cascone MG, Maltinti S. Hydrogels based on chitosan and dextran as potential drug delivery systems. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:301–7. <https://doi.org/10.1023/A:1008961614439>.
- [298] Janciauskaite U, Rakutyte V, Miskinis J, Makuska R. Synthesis and properties of chitosan-N-dextran graft copolymers. *React Funct Polym* 2008;68:787–96. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.12.001>.

- [299] Straccia MC, D'Ayala GG, Romano I, Oliva A, Laurienzo P. Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing. *Mar Drugs* 2015;13:2890–908. <https://doi.org/10.3390/md13052890>.
- [300] Aziz MA, Cabral JD, Brooks HJL, Moratti SC, Hanton LR. Antimicrobial Properties of a Chitosan Dextran-Based Hydrogel for Surgical Use. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:280–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.05463-11>.
- [301] Li S, Dong S, Xu W, Tu S, Yan L, Zhao C, et al. Antibacterial Hydrogels. *Adv Sci* 2018;5:1700527. <https://doi.org/10.1002/advs.201700527>.
- [302] Smithers GW. Whey and whey proteins—From 'gutter-to-gold.' *Int Dairy J* 2008;18:695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>.
- [303] Liu SQ, Yang C, Huang Y, Ding X, Li Y, Fan WM, et al. Antimicrobial and Antifouling Hydrogels Formed In Situ from Polycarbonate and Poly(ethylene glycol) via Michael Addition. *Adv Mater* 2012;24:6484–9. <https://doi.org/10.1002/adma.201202225>.
- [304] Li L, Yan B, Yang J, Huang W, Chen L, Zeng H. Injectable Self-Healing Hydrogel with Antimicrobial and Antifouling Properties. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9:9221–5. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16192>.
- [305] Narayan Mitra R, Shome A, Paul P, Kumar Das P. Antimicrobial activity, biocompatibility and hydrogelation ability of dipeptide -based amphiphiles. *Org Biomol Chem* 2009;7:94–102. <https://doi.org/10.1039/B815368J>.
- [306] Salick DA, Kretsinger JK, Pochan DJ, Schneider JP. Inherent antibacterial activity of a peptide-based beta-hairpin hydrogel. *J Am Chem Soc* 2007;129:14793–9. <https://doi.org/10.1021/ja076300z>.
- [307] Veiga AS, Sinthuvanich C, Gaspar D, Franquelim HG, Castanho MARB, Schneider JP. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels. *Biomaterials* 2012;33:8907–16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.046>.
- [308] Bajpai P. Chapter 2 - Xylan: Occurrence and Structure. In: Bajpai P, editor. *Xylanolytic Enzym.*, Amsterdam: Academic Press; 2014, p. 9–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801020-4.00002-0>.
- [309] Ebringerová A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromol Symp* 2005;232:1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>.
- [310] Elkihel A, Christie C, Vernisse C, Ouk T-S, Lucas R, Chaleix V, et al. Xylan-Based Cross-Linked Hydrogel for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *ACS Appl Bio Mater* 2021;4:7204–12. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00760>.
- [311] Gafițanu CA, Filip D, Cernătescu C, Ibănescu C, Danu M, Pâslaru E, et al. Formulation and evaluation of anise-based bioadhesive vaginal gels. *Biomed Pharmacother* 2016;83:485–95. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.053>.
- [312] Ninan N, Forget A, Shastri VP, Voelcker NH, Blencowe A. Antibacterial and Anti-Inflammatory pH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:28511–21. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10491>.
- [313] Cao X, Peng X, Zhong L, Sun R. Multiresponsive Hydrogels Based on Xylan-Type Hemicelluloses and Photoisomerized Azobenzene Copolymer as Drug Delivery Carrier. *J Agric Food Chem* 2014;62:10000–7. <https://doi.org/10.1021/jf504040s>.
- [314] Bouramtane S, Bretin L, Pinon A, Leger D, Liagre B, Richard L, et al. Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. *Carbohydr Polym* 2019;213:168–75. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.070>.

Publications et communications

Publications

Elkihel, A.; Christie, C.; Vernisse, C.; Ouk, T.-S.; Lucas, R.; Chaleix, V.; Sol, V. Xylan-Based Cross-Linked Hydrogel for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, 4 (9), 7204–7212. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00760>.

Elkihel, A.; Vernisse, C.; Ouk, T.-S.; Lucas, R.; Chaleix, V.; Sol, V. New Cationic Porphyrin–Xylan Conjugate Hydrogel for aPDT applications. *J. Appl. Polym. Sci.* (Soumise).

Elkihel, A.; Vernisse, C.; Ouk, T.-S.; Sol, V. Maltooligosaccharide -porphyrin conjugate for bacteria-targeted Photodynamic Therapy (en cours de rédaction).

Communications

Orales

Photosensitizers coupled with poly or oligosaccharides for antimicrobial photodynamic therapy applications. *4^{ème} journées du GDR HappyBio et 3^{ème} journée de la Photothérapie dynamique en France*, 24-26 novembre **2021**, Toulouse

Maltohexaose-porphyrin conjugate for bacteria-targeted Photodynamic Therapy. *19th Congress of the European Society for Photobiology*, 30 août – 3 septembre **2021**, Salzbourg, (Autriche).

Photosensitizers-peptide complexes and photosensitizers coupled with poly or oligosaccharides for antimicrobial photodynamic therapy applications. *11th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-11)*, 28 juin - 3 juillet **2021**, Buffalo, New York (USA).

Posters

Neutral porphyrin coupled with oligosaccharides for antimicrobial photodynamic therapy. *4^{ème} journées du GDR HappyBio et 3^{ème} journée de la Photothérapie dynamique en France*, 24-26 novembre **2021**, Toulouse.

Maltohexaose-porphyrin conjugate for bacteria-targeted Photodynamic Therapy. *19th Congress of the European Society for Photobiology*, 30 août – 3 septembre **2021**, Salzbourg, (Autriche).

Synthesis of maltohexaose-photosensitizer conjugate for bacteria Targeted Photodynamic Therapy. *Photodynamic Therapy and Photodiagnosis update*, 5 et 6 novembre **2020**, Nancy.



Nouveaux biomatériaux photosensibles pour des applications antimicrobiennes

Bien que la thérapie photodynamique a été découverte il y a plus d'un siècle par sa capacité à inactiver les microorganismes, elle a été développée principalement comme traitement thérapeutique anticancéreux. Récemment, avec le nombre croissant d'infections causées par des bactéries multirésistantes, la chimiothérapie photodynamique antimicrobienne (PACT) est considérée comme une approche antimicrobienne alternative prometteuse. La PACT est une stratégie thérapeutique non invasive, et a une action rapide. De plus, la PACT ne semble pas induire la mise en place de mécanismes de résistance par les bactéries, ce qui en fait une alternative attrayante, par exemple, aux traitements conventionnels des infections des plaies. Les photosensibilisateurs les plus utilisés dans le PACT sont les porphyrines et leurs dérivés. Cependant, ces composés souffrent d'une faible solubilité dans l'eau, d'auto-quenching et d'un manque de sélectivité contre les cellules bactériennes. Afin de pallier certains problèmes liés à l'utilisation des porphyrines en tant que photosensibilisateurs dans la PACT, nous nous sommes intéressés, au cours de ce travail, à deux stratégies pour l'optimisation de cette thérapie. La première consiste à coupler une porphyrine à deux dérivés de maltodextrines (maltohexaose ou maltotriose) utilisés récemment comme agent de ciblage bactérien pour l'imagerie médicale, afin d'améliorer la sélectivité de la porphyrine vis-à-vis des cellules bactériennes. L'évaluation biologique de ces conjugués a montré que l'association des porphyrines avec les maltooligosaccharide augmente leur efficacité antibactérien *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. La deuxième stratégie vise à incorporer des porphyrines dans des hydrogels à base de xylane. Pour cela, trois voies ont été explorées : dans une première approche, l'hydrogel a été synthétisé d'abord par réticulation de xylane avant de le chargé par une porphyrine cationique. Dans la deuxième, les porphyrines sont fixées d'abord par liaisons covalentes sur le xylane, puis les hydrogels ont été obtenus à partir de ces xylanes fonctionnalisés par un agent de réticulation. Dans la troisième méthode, l'hydrogel est obtenu directement par une réticulation directe du xylane par les porphyrines. Tous les hydrogels obtenus ont montré une bonne intégrité mécanique et un taux de gonflement élevé et une forte activité photoantibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Mots-clés : PACT, photosensibilisateur, xylane, hydrogel, porphyrine, maltohexaose, maltotriose, ciblage

New photosensitive biomaterials for antimicrobial applications

Although photodynamic therapy was discovered over a hundred years ago for its ability to kill microorganisms, it has been developed mainly as an anti-cancer therapeutic treatment. Recently, with the increasing number of infections caused by multidrug-resistant bacteria, photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) is considered a promising alternative antimicrobial approach. PACT is a non-invasive therapeutic strategy and is fast acting. Furthermore, PACT does not appear to induce the development of resistance mechanisms by bacteria, making it an attractive alternative to, for example, conventional treatments for wound infections. The most commonly used photosensitizers in PACT are porphyrins and their derivatives. However, these compounds suffer from poor water solubility, self-quenching, and lack of selectivity against bacterial cells. In order to overcome some of the problems related to the use of porphyrins as photosensitizers in PACT, we have focused in this work on two strategies for the optimization of this therapy. The first one consists in coupling a porphyrin to two maltodextrin derivatives (maltohexaose or maltotriose) recently used as bacterial targeting agents for medical imaging, to improve the selectivity of the porphyrin towards bacterial cells. Biological evaluation of these conjugates has shown that the combination of porphyrins with maltooligosaccharide increases their antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The second strategy aims at incorporating porphyrins into xylan-based hydrogels. For this purpose, three routes were explored: in the first approach, the hydrogel was first synthesized by cross-linking xylan before loading it with a cationic porphyrin. In the second, the porphyrins are first attached by covalent bonds to the xylan, then the hydrogels were obtained from these xylans functionalized by a cross-linking agent. In the third method, the hydrogel is obtained directly by a direct cross-linking of the xylan by the porphyrins. All the hydrogels obtained showed a good mechanical integrity and a high swelling rate and a strong photoantibacterial activity towards Gram (+) and Gram (-) bacteria.

Keywords: PACT, photosensitizer, xylan, hydrogel, porphyrin, maltohexaose, maltotriose, targeting

