

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des sciences et techniques

Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

N°26-2003

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : chimie appliquée – chimie des substances naturelles

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent CHALEIX

Le 24 septembre 2003

***Synthèse et caractérisation de nouvelles porphyrines
glucosylées peptidiques à motif RGD en vue de leur
application en photothérapie dynamique.***

Directeur de Thèse : Pierre Krausz

Jury :

Rapporteurs :

Mme Myriam MALET-MARTINO *Professeur*, Université Paul Sabatier-TOULOUSE

M. Eric ROSE *Directeur de recherche au CNRS*, Université PARIS VI

Examineurs :

M. Michel GUILLOTON *Professeur*, Université de Limoges

M. Pierre KRAUSZ *Professeur*, Université de Limoges

M. Marc LECOUEY *Maître de Conférences*, Université PARIS XIII

M. Vincent SOL *Maître de Conférences*, Université de Limoges

à mon père

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges. Je voudrais tout d'abord remercier son directeur, le professeur Pierre Krausz pour, au delà des moyens matériels qu'il a mis à ma disposition pour accomplir ce travail, la formation scientifique et humaine qu'il m'a dispensé. Je tiens également à vous remercier, professeur Krausz, pour m'avoir permis d'exercer les fonctions de moniteur et d'ATER au cours de mes quatre années de thèse. En effet, sans votre détermination à sans cesse vous battre contre les « lenteurs administratives » et à faire valoir les droits de vos étudiants je n'aurais peut-être jamais eu cette opportunité.

Au docteur Vincent Sol, je voudrais témoigner toute ma reconnaissance pour avoir encadré au quotidien « mes premiers pas » dans le monde de la recherche, pour m'avoir communiqué sa passion, son savoir-faire et sa rigueur scientifique. Je voudrais également te remercier, Vincent, pour tous les précieux conseils pédagogiques que tu m'a donnés et qui m'ont permis d'aborder mes activités d'enseignement avec beaucoup plus d'assurance.

J'adresse au Ministère de la Recherche mes remerciements pour m'avoir attribué un support financier de trois ans qui m'a permis de mener à bien mes recherches dans des conditions très satisfaisantes. Le conseil régional du Limousin, par son soutien financier, a également contribué au bon déroulement matériel de ce projet ; qu'il en soit ici vivement remercié.

J'exprime également toute ma gratitude au professeur Michel Guilloton. Vous avez été un des initiateurs de ce projet et vous avez grandement contribué à son bon déroulement. De plus, les études d'activité biologique que vous avez parfaitement dirigées ont incontestablement donné du poids à ce travail. Je remercie également à ce titre les docteurs Yi-Ming Huang et Michaela Enache.

Je remercie l'ensemble des membres du jury de cette thèse : le docteur Eric Rose et le professeur Myriam Malet-Martino pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, le docteur Marc Lecouvey pour l'honneur qu'il m'a fait d'examiner ce travail. Je vous remercie tous pour votre lecture critique de ce document et les corrections que vous y avez apportées.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Docteur Jean-Claude Blais, Directeur de recherche au CNRS (université Paris VI) que je remercie d'avoir effectué les spectres de masse MALDI.

Cette thèse, qui s'inscrit dans un vaste programme de recherche du LCSN est avant tout le fruit d'une réflexion et d'un travail collectif. J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire (enseignants, étudiants, ...) qui par leur aide matérielle, intellectuelle, ou simplement leur amitié ont contribué à la réalisation de ce travail. Je remercie également le docteur Yves Champavier qui est en charge du service commun de RMN

Je remercie enfin tous mes proches dont l'affection et le soutien ont été déterminants pour la réussite de mon parcours universitaire. J'ai bien sûr une pensée toute particulière pour ma compagne de chaque instant, Charlotte, dont l'amour est pour moi le moteur essentiel de ma vie.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Certaines porphyrines et analogues sont utilisés comme photosensibilisateurs en photothérapie dynamique des cancers. Les porphyrines glucosylées sont, dans ce domaine particulièrement intéressantes. En outre, il est connu que les cellules endothéliales constitutives de la néovascularisation tumorale, ainsi que certaines cellules cancéreuses, surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette glycoprotéine transmembranaire est capable de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de la séquence peptidique *Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD)*. Avec pour finalité leur application en photothérapie anticancéreuse, nous avons mis au point, au cours de ce travail, la synthèse de nouvelles *méso*-arylglucosylporphyrines portant le motif peptidique RGD. Ainsi, nous avons dans un premier temps synthétisé en phase solide une première famille de composés constituée de tritoyl et triglucosylporphyrines portant le tripeptide RGD fixé en position *ortho* ou *para* d'un groupement phényle. Par la suite, nous avons synthétisé une deuxième série de photosensibilisateurs portant un pentapeptide cyclique comportant la séquence RGD, cyclisé par réaction de métathèse sur support solide. Nous avons également formé par réaction de métathèse en phase solide un dimère de *méso*-arylglucosylporphyrines liées par un pont peptidique RGD. Tous les composés synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, RMN et spectrométrie de masse MALDI. De plus, certains de ces composés produisent de l'oxygène singulet et une étude préliminaire d'activité biologique a été réalisée sur la lignée promyélocytaire K562. Les résultats obtenus indiquent que cette nouvelle classe de photosensibilisateurs semble prometteuse pour la thérapie photodynamique.

Mots clés : Porphyrines, Peptide, RGD, Glycosylation, Métathèse, Photothérapie, Cancer.

ABSTRACT

Synthesis and characterization of a new class of glycosylated porphyrins bearing the RGD moiety and their application in photodynamic therapy.

The use of porphyrins and analogues as photosensitisers together with visible light is a new treatment of tumors (photodynamic therapy, PDT). Carbohydrate-substituted porphyrins are in this domain very promising compounds. In addition, it is known that endothelial cells of the neovascularisation in tumors express $\alpha_v\beta_3$ integrin. Extracellular domains of this transmembrane glycoprotein are able to bind components of the extracellular matrix (ECM) and more precisely the sequence Arg-Gly-Asp. With the aim of their utilization in photodynamic therapy of cancers, we describe the synthesis and characterization (UV-Visible, mass, NMR) of new glucosylated porphyrins bearing the RGD moiety. The first synthesised compounds were derived from tritolyl and triglucosylarylporphyrins where the peptidic moiety is linked to the phenyl group by a spacer arm by means of a solid phase reaction.. The second series consists of glucosylated porphyrin derivatives bearing a cyclical unsaturated pentapeptide including RGD sequence, obtained by ring closing metathesis in solid phase. We have also synthesized a dimer in which the two glucosylated porphyrins are linked by the RGD sequence. These compounds produced $^1\text{O}_2$ and photocytotoxicities against K562 leukemia cell line were favourably compared to Photofrin II[®]. Due to their sensitising abilities, these compounds are of considerable interest for photodynamic therapy.

Key Words : Porphyrins, Peptide, RGD, Glycosylation, metathesis, Phototherapy, Cancer

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
LES PORPHYRINES – STRUCTURE, PROPRIÉTÉS ET APPLICATIONS – MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.	3
1 - Structure	3
2 - Caractérisation des porphyrines	7
2-1 Spectroscopie UV-Visible	7
2-2 Résonance Magnétique Nucléaire	11
2-2-1 Spectroscopie RMN du proton	11
2-2-2 Spectroscopie RMN du carbone 13.	13
2-3 Spectrométrie de masse	14
3 - Méthodes de synthèse de porphyrines.	16
3-1 Synthèse de <i>méso</i> -porphyrines	16
3-2 Synthèse de porphyrines β -substituées	22
3-2-1 A partir d'unité monopyrrolique	22
3-2-2 A partir d'unité di et tripyrroliques	23
3-2-3 A partir de pigments naturels.	24
4 - Domaines d'applications des porphyrines	26
4-1 La catalyse d'oxygénation par les métalloporphyrines.	26
4-1-1 Réactions d'époxydation	26
4-1-2 Réactions d'hydroxylation	29
4-2 Porphyrines et dispositifs photoniques.	30
4-2-1 Cristaux liquides de porphyrines	31
4-2-2 Optoélectronique et porphyrines	33
4-3 La photothérapie dynamique des cancers	34
4-3-1 Principe	34
4-3-2 Bref historique.	34
4-3-3 Le processus photochimique	36
4-3-4 Les photosensibilisateurs actuellement utilisés en PDT.	37

4-3-5 Applications thérapeutiques autres que la PDT des cancers.	41
5 – But du travail	42
SYNTHÈSE DE TRITOLYLES ET TRIGLUCOSYLES PORPHYRINES PORTANT LE TRIPEPTIDE RGD	47
1 – Introduction	47
2 – Etude préliminaire – Stratégie de synthèse.	49
2-1 Etude préliminaire par modélisation moléculaire	49
2-2 Stratégie de synthèse	52
3 – Synthèses de mono <i>ortho</i> et <i>para</i>-hydroxyphénylporphyrines.	54
3-1 Mono <i>ortho</i> et <i>para</i> -hydroxyphényltritolylporphyrines 4a,b.	54
3-2 Mono <i>ortho</i> et <i>para</i> -hydroxyphényltrigluco-sylporphyrines 5a,b.	55
3-2-1 Synthèse du précurseur glucosylé.	55
a- Rappels bibliographiques.	55
b- Synthèse.	56
3-2-2 Synthèse des hydroxyphénylporphyrines trigluco-sylées 5a,b.	57
a- Synthèse selon Little.	57
a- Synthèse selon Lindsey.	58
4 – Synthèse des carboxypropyloxyphénylporphyrines.	60
4-1 Cas des tritolylporphyrines	60
4-1-1 Alkylation.	60
4-1-2 Saponification.	61
4-2 Cas des trigluco-sylporphyrines.	62
4-2-1 Préparation du précurseur bromé	62
4-2-2 Alkylation des porphyrines 5a,b	65
4-2-2 Hydrolyse.	65
5– Condensation des carboxyporphyrines sur le tripeptide RGD	66
5-1 Description du support.	67
5-2 Condensation	68
6– Décrochage-déprotection des porphyrines peptidiques	73

7– Déprotection totale des porphyrines glucosylées acétylées	74
8– Caractérisations.	75
8-1 Caractérisation des précurseurs	75
8-1-1 Spectroscopie UV-Visible	75
8-1-2 Spectrométrie de masse.	77
8-1-3 Spectroscopie RMN du proton	78
a- Etude du spectre de la porphyrine-ester triglucosylée 7a	83
b- Influence de l'orientation de la substitution - passage de la position para à la position ortho de la chaîne.	84
8-1-4 Spectroscopie RMN du carbone 13	85
8-2 Caractérisation des porphyrines peptidiques	89
8-2-1 Spectroscopie UV-Visible	89
8-2-2 Spectrométrie de masse.	93
8-2-3 Spectroscopie RMN.	95
SYNTHÈSE DE TRIGLUCOSYLES PORPHYRINES PORTANT UN PENTAPEPTIDE CYCLIQUE INSATURE A MOTIF RGD	99
1 – Introduction	99
2 – Etude préliminaire – Stratégie de synthèse.	101
2-1 Etude préliminaire par modélisation moléculaire	101
2-2 Stratégie de synthèse	103
3 – Cyclisation du peptide <i>allG-R-G-D-allG</i>	105
3-1 Réaction de métathèse	105
3-1-1 Généralités	105
3-1-2 Mécanisme de la réaction de métathèse	109
3-1-3 Réaction de métathèse en phase solide.	112
3-2 Application de la métathèse à la cyclisation du peptide <i>allGRGDallG</i>	115
3-2-1 Description du support	115
3-2-2 Réaction de métathèse	116
4– Déprotection du N-Fmoc-pentapeptide	128

5– Couplage des carboxyporphyrines au pentapeptide cyclique à motif RGD	130
6– Décrochage/déprotection des porphyrines peptidiques.	131
7– Désacétylation des unités glucidiques	132
8– Caractérisation structurale	133
8-1 Spectroscopie UV-Visible	133
8-2 Spectrométrie de masse	136
8-3 Spectroscopie RMN.	138
SYNTHESE D'UN DIMERE DE PORPHYRINES GLUCOSYLEES LIEES PAR LE MOTIF RGD	143
1– Introduction	143
2- Stratégie de synthèse	144
4- Essai de synthèse du dimère à motif RGD	147
5- Synthèse du dimère précurseur.	150
5-1 Réaction de métathèse	150
5-2 Formation du dimère par la réaction de Williamson	151
6- Synthèse du dimère à motif RGD	153
7- Caractérisation structurale	155
7-1 Caractérisation des précurseurs	155
7-1-1 Spectroscopie UV-Visible	155
7-1-3 Spectroscopie RMN	157
a- RMN du proton	157
7-2 Caractérisation du dimère à motif RGD.	164
7-2-1 Spectroscopie UV-Visible.	164
7-2-2 Spectrométrie de masse MALDI.	165
7-2-3 Spectroscopie RMN ¹ H	165
EVALUATION BIOLOGIQUE	169

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	172
PARTIE EXPERIMENTALE	173
1 - Réactifs et solvants	173
2 - Chromatographie	174
2-1 Chromatographie Analytique	174
2-1-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	174
2-2 Chromatographie Préparative.	175
2-2-1 Chromatographie préparative sur plaques de silice	175
2-2-2 Chromatographie sur colonne	175
2-2-3 Chromatographie sur colonne moyenne pression	175
2-2-4 Chromatographie d'exclusion stérique	175
1- Analyses	176
Température de fusion	176
Pouvoirs rotatoires	176
Analyses élémentaires	176
Spectroscopie infra-rouge	176
Spectroscopie UltraViolet-Visible	176
Spectroscopie RMN	176
Spectrométrie de masse MALDI	177
Spectrométrie de masse Haute Résolution.	177
Spectrométrie de masse par impact électronique (IE)	177
Réacteur utilisé pour les synthèses sur support solide.	177
Protocole établi pour l'étude de la phototoxicité des composés 12a,b 14a,b.	179
4- Synthèses	179
BIBLIOGRAPHIE	217

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II-1 : Résultats obtenus pour la synthèse du 4-bromobutanoate de tertiobutyle	63
Tableau II-2 : Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines 4a,b - 9a,b.	76
Tableau II-3 : Spectrométrie de masse MALDI.	77
Tableau II-4 : RMN ¹ H des tritolylporphyrines para-substituées 4a, 6a et 8a.	79
Tableau II-5 : RMN ¹ H des tritolylporphyrines ortho-substituées 4b, 6b et 8b δ en ppm (J en Hertz)	80 80
Tableau II-6 : RMN ¹ H des triglucosylporphyrines para-substituées 5a, 7a et 9a. δ en ppm (J en Hertz).	81 81
Tableau II-7 : RMN ¹ H des triglucosylporphyrines ortho-substituées 5b, 7b et 9b. δ en ppm (J en Hertz).	82 82
Tableau II-8 : variation des déplacements chimiques (Δδ) par passage d'une substitution para à une substitution ortho.	84 84
Tableau II-9 : RMN ¹³ C (100 MHz) des porphyrines 5a,b, 7a,b et 9a,b dans le CDCl ₃ (δ ppm).	86
Tableau II-10 : Spectre UV-Visible des porphyrines 12a,b, 13a,b et 14a,b.	89
Tableau II-11 : Spectrométrie de masse MALDI.	93
Tableau II-12 : Spectrométrie de Masse Haute Résolution.	94
Tableau II-13 : Spectroscopie RMN ¹ H des composés 12b, 14a et 14b. δ en ppm (J en Hertz).	97
Tableau III-1 : Quelques exemples de réactions de métathèse sur support solide.	114
Tableau III-2: Résultats obtenus pour la réaction de cyclisation par métathèse.	122
Tableau III-3 : Spectres RMN ¹ H des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique, δ en ppm, J en Hz	124
Tableau III-4 : Spectres RMN ¹³ C des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique. δ en ppm	125
Tableau III-5. Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines 18a,b et 19a,b.	133
Tableau III-6. Spectrométrie de masse MALDI.	137
Tableau III-7 : RMN ¹ H des composés 18a et 18b, δ en ppm J en Hz	139
Tableau III-8 : RMN ¹³ C des composés 18a et 18b, δ en ppm .	140
Tableau IV-1 : Résultats obtenus pour la réaction d'homodimérisation du composé 20	151
Tableau IV-2 : Résultats obtenus pour la synthèse du dimère 23.	153
Tableau IV-3 : Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines 20 et 21.	155
Tableau IV-4 : Spectrométrie de masse MALDI	156
Tableau IV-5 : RMN ¹ H (CDCl ₃) des porphyrines 20 et 21, δ en ppm (J en Hertz).	159
Tableau IV-5 : RMN ¹³ C (CDCl ₃) des porphyrines 20 et 21, δ en ppm.	162
Tableau IV-6 : Bandes caractéristiques du spectre UV-Visible du composé 23.	164
Tableau IV-7 : Spectre RMN ¹ H du composé 23 (CDCl ₃ /CD ₃ OD 9/1)	167
Tableau V-1 : réactifs et solvants utilisés	173

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : (a)- Porphyrine base libre ; (b)- Porphyrine base métallée ;	3
(c)- Représentation du système de 18 électrons π aromatiques.	3
Figure I-2 : Système de nomenclature conventionnel du macrocycle.	4
Figure I-3 : (a)- Les quatre modes de distorsion de porphyrine ; (b)- Octaéthylporphyrine base libre plane ; (c)- Octaéthylporphyrine de Nickel non plane (Ruffled)	5
Figure I-4 : Représentation schématique des atropoisomères de méso-arylporphyrines.	6
Figure I-5 : Exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels.	6
Figure I-6 : Profil des bandes Q pour les 4 principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres ^[9] .	8
Figure I-7 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : (a) Ni(II), (b) Zn(II), (c) Cd(II).	9
Figure I-8 : Représentation schématique des orbitales moléculaires HOMO et LUMO dans le cas d'une symétrie D_4H .	10
Figure I-9 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine.	11
Figure I-10 : Spectre RMN 1H de la porphine dans $CDCl_3$.	12
Figure I-11 : Exemple de l'effet du macrocycle sur les déplacements chimiques des substituants ^[11] .	13
Figure I-12 : Principe de la technique MALDI.	15
Figure I-13 : Méthode de Rothmund appliquée à la synthèse de la méso-tétraphénylporphyrine.	16
Figure I-14 : Méthode des aldéhydes mixtes.	17
Figure I-15 : Synthèse sur support solide.	18
Figure I-16 : Méthode de Lindsey.	19
Figure I-17 : Adaptation de la méthode MacDonald « 2+2 » à la synthèse de trans méso-porphyrines.	20
Figure I-18 : Arylation de la porphine.	21
Figure I-19 : Synthèse de la tétraéthyl-tétraméthylporphyrine.	23
Figure I-20 : Dipyrrométhènes utilisés par Fischer.	23
Figure I-21 : Exemple de synthèse par la méthode « 3+1 »	24
Figure I-22 : Structures de la protohème et dérivés.	25
Figure I-23 : Macrocycles tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a.	25
Figure I-24 : Mécanisme d'époxydation catalysée par une porphyrine de fer III.	27
Figure I-25 : Epoxydations catalysées par des porphyrines de fer III.	27
Figure I-26 : Exemples d'époxydations asymétriques d'après Rose et Coll. ^[40]	28
Figure I-27 : Mécanisme d'hydroxylation catalysée par une porphyrine de fer III.	29
Figure I-28 : Mécanisme d'hydroxylation catalysée par une porphyrine de fer III.	30
Figure I-29 : Représentation schématique de l'arrangement colonnaire d'une porphyrine de zinc discotique β -substituée par des groupements n-décyl.	31
Figure I-30 : Exemple de porphyrine présentant plusieurs mésophases.	32

Figure I-31 : Exemple de fils moléculaire constitué de porphyrines.	33
Figure I-32 : Représentation schématique du principe de la PDT.	34
Figure I-33 : Distribution des électrons pour l'oxygène à l'état triplet et singulet.	36
Figure I-34 : Mécanisme photochimique de la PDT.	37
Figure I-35 : a- Une structure active du Photofrin [®] , b- Foscan [®] .	39
Figure I-35 : Une sélection de photosensibilisateur de seconde génération.	40
Figure I-36 : Représentation schématique du réseau vasculaire irriguant une tumeur.	43
Figure I-37 : Implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans le développement tumoral.	44
Figure I-38-a et b : Structures des composés finals synthétisés au cours de ce travail	45
Figure I-38-c : Structures des composés finals synthétisés au cours de ce travail.	46
Figure II-1 : Structure des composés synthétisés.	48
Figure II-2 : (a)-Représentation des angles dièdres qui décrivent la conformation d'une chaîne peptidique. (b)- Conformation d'énergie minimale du peptide CRGDC (Hyperchem [®] , champ de force MM+).	50
Figure II-3 : Conformations les plus stables des porphyrines triglucosylées à motif RGD : (a)-peptide en ortho (14b), (b)-peptide en para (14a).	51
Figure II-4 : Schéma rétrosynthétique des porphyrines 12a,b et 14a,b.	53
Figure II-5 : Synthèse des mésoarylhdroxyphényltritolyporphyrines 4a,b.	54
Figure II-5 : Synthèse du 4-(2',3',4',6'tétra-O-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde.	57
Figure II-5 : Synthèse des mésohydroxyphényltriglucosylporphyrines 5a,b selon Little.	58
Figure II-6 : Synthèse des mésohydroxyphényltriglucosylporphyrines 5a,b selon Lindsey.	59
Figure II-7 : O-Alkylation des mono-hydroxyphényltritolyporphyrines 4a,b.	60
Figure II-8 : Saponification des porphyrines ester 6a,b.	61
Figure II-9 : Estérification de l'acide 4-bromobutaoïque par le tertiobutanol.	64
Figure II-10 : O-alkylation des glucosylporphyrines 5a,b.	65
Figure II-11 : Hydrolyse des porphyrines ester 7a,b.	66
Figure II-12 : Peptide RGD sur résine Wang	67
Figure II-13 : Comportement dans un solvant d'une chaîne peptidique greffée sur résine.	69
Figure II-14 : Condensation des porphyrines 8a,b et 9a,b sur le peptide RGD.	71
Figure II-15 : Mécanisme d'activation par le système DIC/HOBt.	72
Figure II-16 : Décrochage des porphyrines 12a,b et 13a,b de la résine Wang.	73
Figure II-17 : Désacétylation des porphyrines 13a,b.	75
Figure II-18 : Spectre UV-Visible du composé 7a (CHCl_3 , $C = 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$)	76
Figure II-19 : Spectre de masse MALDI du composé 7a.	78
Figure II-20 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN.	83
Figure II-21 : Exemple de l'influence de l'orientation du substituant sur les spectres RMN ^1H des composés 7a et 7b.	85
Figure II-22 : Spectre RMN ^{13}C du composé 7a.	88
Figure II-23 : Evolution de la bande de Soret (composé 14a) en fonction de la concentration.	90
Graphique (I) : concentration $> 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 10 mm ; graphique (II) : concentration $< 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 50 mm.	90

Figure II-24 : Evolution de la bande de Soret (composé 14b) en fonction de la concentration.	91
Graphique (I) : concentration $> 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 10 mm ; graphique (II) : concentration $< 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 50 mm.	91
Figure II-25 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration ; (▲, —) : composé 14a et (●, - -) : composé 14b.	92
Figure II-26 : Spectre de masse haute résolution du composé 14a.	95
Figure II-27 : Spectre RMN ^1H du composé 14a.	96
Figure II-1 : Structure des composés synthétisés.	100
Figure III-2 : Représentation du pentapeptide cyclique étudié, analogue du peptide cyclique CRGDC.	101
Figure III-3 : Conformations d'énergie minimale obtenues pour les deux isomères cis et trans du pentapeptide cyclique.	102
Figure III-5 : Schéma rétrosynthétique des composés 19a,b.	104
Figure III-6 : Réaction de métathèse des alcènes.	105
Figure III-7 : Les différentes possibilités de métathèse	106
Figure III-8 : Mécanisme de la réaction de métathèse proposé par Chauvin	107
Figure III-9 : Synthèse des catalyseurs A et B.	108
Figure III-10 : Bis-tricyclohexylphosphinedichlororuthénium benzylidène (catalyseur C).	108
Figure III-11 : Exemple de catalyseurs de métathèse développés récemment.	109
Figure III-12 : Dérivés du catalyseur A.	109
Figure III-13 : Mécanisme de la réaction de métathèse des oléfines terminales proposé par Grubbs et coll. ^[132]	111
Figure III-14 : Evolution de l'intermédiaire à 14 électrons induit par la perte d'une phosphine.	112
Figure III-15 : Métathèse sur support solide : les trois grands types d'applications.	113
Figure III-17 : Cyclisation du pentapeptide allylique	115
Figure III-16 : Description de la résine utilisée pour la réaction de cyclisation par métathèse.	115
Figure III-18 : Spectre de masse MALDI du mélange réactionnel obtenu après métathèse.	118
Figure III-19 : Quelques exemples de structures obtenues par métathèse croisée.	119
Figure III-20 : Les diverses réactions de métathèses résultant d'une trop forte substitution du polymère.	120
Figure III-21 : Spectre de masse MALDI et chromatogramme HPLC de la réaction de métathèse pour une substitution de $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$.	121
Figure III-22 : Numérotation adoptée pour décrire les pentapeptides allG(NHFmoc)RGDallG cyclique et linéaire.	123
Figure III-23 : Encombrement stérique des hydrogènes en α d'une double liaison Z	126
Figure III-24 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6) du mélange des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique.	127
Figure III-25 : Déprotection du N-Fmoc-pentapeptide.	128
Figure III-26 : Mécanisme du déblocage du Fmoc par la pipéridine.	129
Figure III-27 : Evolution de la quantité de composé d'addition F formé en fonction du temps.	129
Figure III-28 : Condensation des porphyrines 9a,b sur le pentapeptide cyclique greffé sur résine 16.	130

Figure III-29 : Décrochage de porphyrines 18a et 18b greffées sur résine.	131
Figure III-30 : Désacétylation des composés 18a,b.	132
Figure III-31 : Spectre UV-Visible du composé 19a - Comportement de la bande de Soret en fonction de la concentration.	134
Figure III-32 : Spectre UV-Visible du composé 19b - Comportement de la bande de Soret en fonction de la concentration.	135
Figure III-33 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration ; (■, —) : composé 19a et (▲, - · -) : composé 19b.	136
Figure III-34 : Spectre de MALDI du composé 18a	137
Figure III-35 : Spectre RMN ¹ H du composé 18a dans CDCl ₃ /CD ₃ OD.	138
Figure III-36 : Spectre RMN ¹³ C du composé 18a	141
Figure IV-1 : Structure du dimère synthétisé	143
Figure IV-2 : Schéma rétrosynthétique du dimère 23.	145
Figure IV-3 : Synthèse de la monoallyloxyphénylporphyrine 20 selon Little.	146
Figure IV-4 : Synthèse de la monoallyloxyphénylporphyrine 20 selon Lindsey.	147
Figure IV-5 : Couplage du composé 20 et du peptide allG-RGD-allG par métathèse.	148
Figure IV-6 : Structure du composé obtenu par réaction de métathèse.	149
Figure IV-7 : Synthèse du dimère 21 par métathèse.	150
Figure IV-8 : Synthèse du dimère 21 par réaction de Williamson.	152
Figure IV-9 : Couplage du composé 21 et du pentapeptide allG-RGD-allG par métathèse.	154
Figure IV-10 : Spectre UV-Visible du composé 21 (CHCl ₃ , C= 2,5.10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹).	155
Figure IV-11 : Spectre de masse MALDI du composé 21	156
Figure IV-12 : Numérotation adoptée pour les protons du groupement allyle.	157
Figure IV-13 : Spectres RMN ¹ H des composés 20 et 21 (CDCl ₃).	160
Figure IV-14 : Numérotation adoptée pour les carbones du groupement allyle du composé 20 et du pont but-2-ène du dimère 21	161
Figure IV-15 : Spectres RMN ¹³ C des composés 20 et 21 (CDCl ₃).	163
Figure IV-16 : Spectre UV-Visible du composé 23 (CHCl ₃ /MeOH 9/1, C= 0,6.10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹).	164
Figure IV-17 : Spectre de masse MALDI du composé 23	165
Figure IV-18 : Numérotation adoptée pour le composé 23.	166
Figure IV-19 : Spectre RMN ¹ H du composé 23 (CDCl ₃ /CD ₃ OD 9/1).	168
Figure V-1 : Schéma du réacteur Système 45 [®] utilisé pour les synthèses sur support solide	177
Figure V-2 : Schéma du montage mis au point pour la production d'oxygène singulet	178

INTRODUCTION

Les porphyrines, macrocycles tétrapyrroliques aromatiques, sont des molécules très largement représentées dans les milieux vivants. Elles participent, sous forme métallée, à de nombreux processus biologiques. Ainsi, l'hémoglobine ou la myoglobine, construites sur la base d'une porphyrine de Fer, assurent le transport et le stockage de l'oxygène moléculaire. De telles structures sont également impliquées dans l'oxydation de substrats par les cytochromes (notamment le cytochrome P450) ou encore dans la photosynthèse chez les plantes et les bactéries photosynthétiques. L'intérêt porté à la conception et au développement de nouvelles stratégies de synthèses de porphyrines n'a cessé de croître ces dernières années en raison de leur vaste domaine d'applications. En effet, construire, par exemple, des modèles d'hémoprotéines, mimant l'aptitude des enzymes pour la reconnaissance ou la catalyse, permet de comprendre leur fonctionnement dans les systèmes naturels. En outre, certaines porphyrines d'origine synthétique ou naturelle se révèlent être particulièrement efficaces en tant que catalyseurs régiosélectifs ou parfois stéréosélectifs d'époxydation et d'hydroxylation, en tant qu'agents de photodécomposition de l'eau ou encore en tant que matériaux pour l'optoélectronique. La photothérapie dynamique (PDT), technique en plein essor appliquée entre autres au traitement du cancer, est un autre domaine d'application des porphyrines qui a particulièrement retenu l'attention dans la dernière période. Cette technique est basée sur l'utilisation de photosensibilisateurs rendus cytotoxiques par irradiation lumineuse. Le Photofrin II[®] (mélange de porphyrines naturelles) et le Foscan[®] (porphyrine d'origine synthétique) sont deux photosensibilisateurs actuellement commercialisés pour ce type de thérapie. Face au manque de photosensibilisateurs efficaces à structure bien définie, capables de s'accumuler spécifiquement dans les cellules cancéreuses, le développement de nouvelles molécules reste un enjeu important. La recherche de nouveaux sensibilisateurs semble se diriger vers la conception de molécules constituées d'un macrocycle tétrapyrrolique associé à une structure assurant le transport et/ou la reconnaissance cellulaire. Dans ce domaine, les glucides se révèlent être d'excellents agents de vectorisation vers certaines cellules tumorales. Tout en permettant d'augmenter l'hydrophilie. Par ailleurs, une meilleure compréhension ces dernières années du phénomène de croissance tumorale et des différents facteurs mis en jeu, a permis d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques parmi lesquelles la néo-vascularisation

tumorale par l'intermédiaire de diverses glycoprotéines comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est capable de reconnaître spécifiquement la séquence peptidique RGD.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de synthèse de porphyrines glycosylées peptidiques entrepris dans notre laboratoire. Nous présentons, tout d'abord, la synthèse et la caractérisation structurale d'une série de *méso*-arylporphyrines portant le motif peptidique RGD. Ce dernier devrait assurer la spécificité de ces photosensibilisateurs pour les cellules endothéliales de la néo-vascularisation tumorale et pour certaines cellules cancéreuses. Avec le même objectif, des porphyrines glucosylées portant un pentapeptide incluant la séquence RGD, cyclisé par réaction de métathèse des alcènes, ont été préparées. Enfin, nous présentons la synthèse d'un dimère de porphyrines glucosylées dont les deux macrocycles sont liés par le peptide RGD. Tous ces composés ainsi que leur précurseurs ont été caractérisés par diverses méthodes spectrales (UV-Visible, RMN ^1H , ^{13}C , SM MALDI). Une étude biologique préliminaire a également été réalisée pour certains photosensibilisateurs sur la lignée cellulaire K562 afin d'évaluer leur activité anticancéreuse.

LES PORPHYRINES - STRUCTURE, PROPRIÉTÉS ET APPLICATIONS - MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.

1 - Structure

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthine. Le squelette de base est aromatique et l'aromaticité est due, conformément à la règle de Hückel, à un système de 18 électrons π (figure I-1). De ce fait, ces macrocycles sont d'une part particulièrement stables et d'autre part très fortement colorés. En outre, les porphyrines se comportent en fonction du pH comme des diacides ou des dibases et peuvent alors être métallées par presque tous les métaux de la classification périodique^[1]. Elles constituent sous cette forme d'excellents agents d'oxydoréduction, thermiques ou photochimiques.

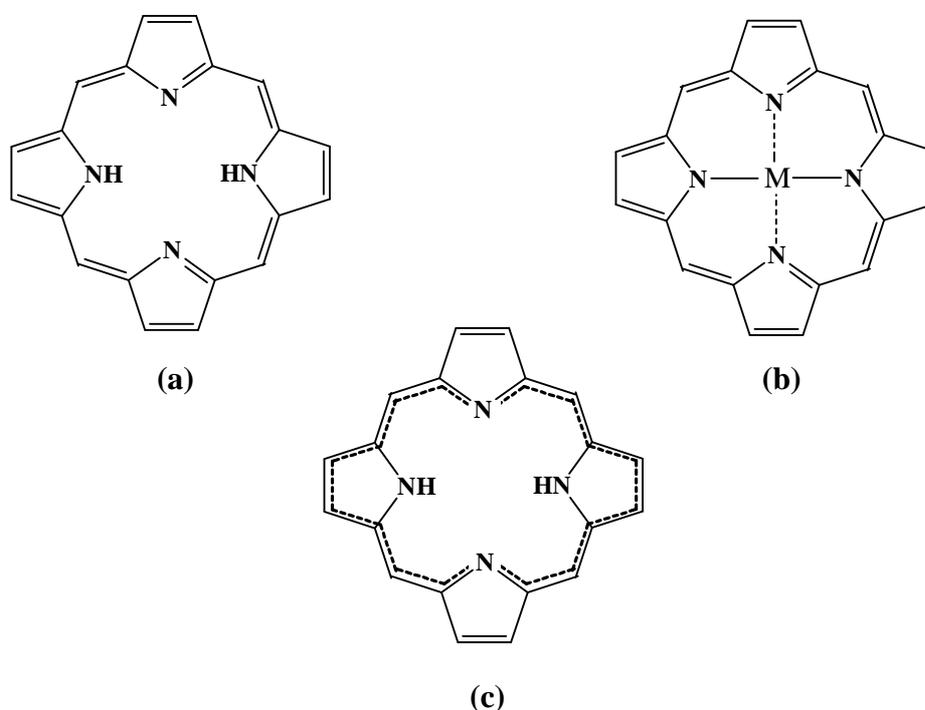


Figure I-1 : (a)- Porphyrine base libre ; (b)- Porphyrine base métallée ; (c)- Représentation du système de 18 électrons π aromatiques.

Dans les années 30, le chimiste allemand Hans Fischer^[2] propose pour la première fois un système de nomenclature encore utilisé de nos jours pour désigner les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques. Ainsi, les atomes de carbone des positions méthines, aussi appelés « méso » sont numérotés α , β , γ et δ et les carbones β -pyrroliques sont notés 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8. La complexité des porphyrines synthétisées augmentant, une numérotation systématique du macrocycle a été adoptée en 1987^[3] afin de simplifier la nomenclature de ces molécules. Les carbones méso portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 et enfin les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote.

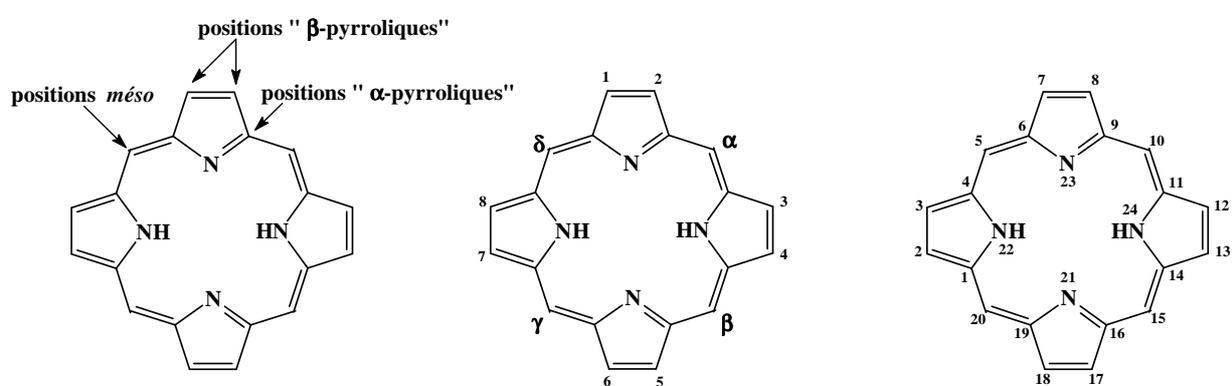


Figure I-2 : Système de nomenclature conventionnel du macrocycle.

Dans le cas des porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, les substituants peuvent être agencés de diverses façons les uns par rapport aux autres autour du macrocycle ce qui induit l'existence d'isomères de structure nommés « isomères types » par Fischer et numérotés en chiffres romains I, II, III, etc.

Le macrocycle porphyrinique, structure de géométrie normalement plane, est relativement flexible et peut adopter dans certains cas des conformations non planes. De telles distorsions peuvent être engendrées par la protonation des deux atomes d'azote non hydrogénés, la présence de groupements volumineux en position *méso* ou encore par la métallation. Les conformations de porphyrines non planes peuvent être décrites par essentiellement quatre modes de distorsion suggérés par Scheidt et Lee^[4] et nommés « Saddle », « Ruffled », « Domed » et « Wave ». Ainsi, la présence d'un petit ion métallique tel que le Ni(II) engendre une conformation de type « Ruffled » alors que la distorsion induite par un métal plus volumineux comme le Tl(III) est de type « Domed ».

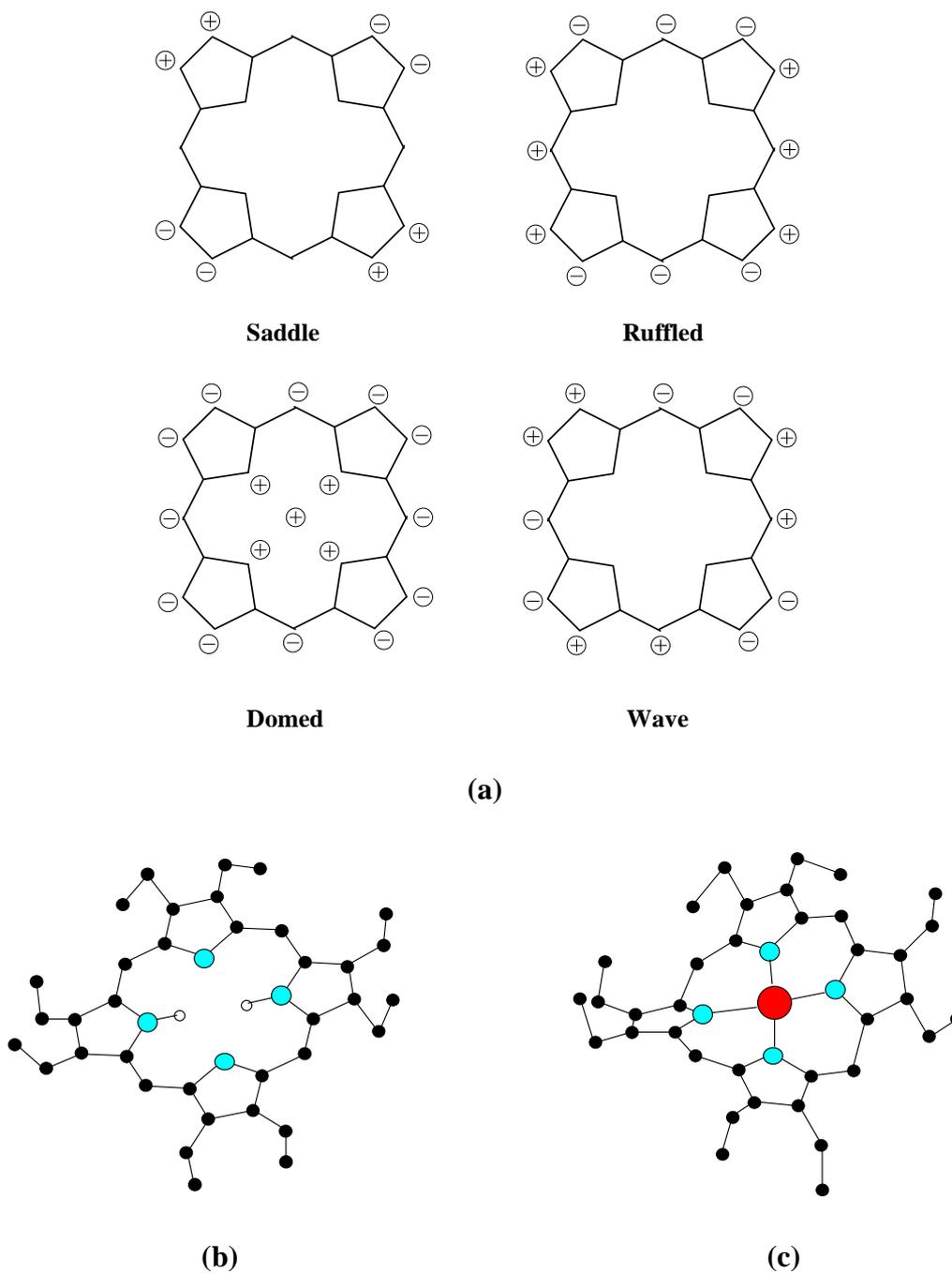


Figure I-3 : (a)- Les quatre modes de distorsion de porphyrine ; (b)- Octaéthylporphyrine base libre plane ; (c)- Octaéthylporphyrine de Nickel non plane (Ruffled)^[5]

Par ailleurs, les substituants portés par les carbones *méso*, comme des groupements phényle par exemple, s'orientent hors du plan du macrocycle de sorte à limiter les interactions stériques avec les hydrogènes β -pyrroliques. Ces interactions, dans le cas des *méso*-arylporphyrines substituées en ortho sont à l'origine de l'existence d'atropoisomères notés $\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\beta\alpha$, $\alpha\beta\alpha\beta$ et $\alpha\beta\beta\alpha$ (figure I-4).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les macrocycles tétrapyrroliques naturels sont impliqués dans des processus d'oxydoréduction thermique ou photochimique des milieux biologiques. Ainsi le transport des gaz respiratoires (O₂, CO₂) est assuré par l'hémoglobine^[6], protéine dont le groupe prosthétique est une porphyrine, la protoporphyrine IX métallée par du fer au degré d'oxydation +II (l'hème). La myoglobine quant à elle, protéine de structure très proche de celle de l'hémoglobine possédant également l'hème comme groupe prosthétique, participe au stockage de l'oxygène dans les tissus musculaires ainsi qu'à son transport vers les mitochondries. Les cytochromes constituent une autre classe de métalloprotéines construites autour d'un noyau héminique. L'environnement protéique de ces molécules permet à l'atome de fer central de passer réversiblement du degré d'oxydation III au degré d'oxydation II. De ce fait, les cytochromes de la chaîne respiratoire, comme le cytochrome c par exemple, jouent le rôle de transporteurs d'électrons lors du processus de respiration cellulaire. Le cytochrome P450 quant à lui métabolise des composés xénobiotiques en catalysant leur oxydation ou leur réduction^[7]. Nous pouvons également citer comme exemple de macrocycles tétrapyrroliques naturels la vitamine B12 dont la structure est celle d'une corrine métallée par un atome de cobalt pouvant se trouver à divers degrés d'oxydoréduction. La vitamine B12 est le cofacteur de réactions de transméthylation et de réactions d'isomérisation. Associée à l'acide folique, elle intervient dans la transformation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase. En outre, elle est impliquée dans la formation des globules rouges. Une carence en vitamine B12 se traduit par une anémie, une accumulation d'homocystéine dans le sang responsable de problèmes cérébrovasculaires ainsi que par une raréfaction de la méthionine impliquée dans la production de myéline ce qui altère les transmissions nerveuses. On rencontre également dans le monde végétal de tels pigments : les chlorophylles par exemple sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique métallé par du magnésium et portant comme substituant notable un alcool à longue chaîne, le phytol. Ces molécules, par absorption de photons et transfert d'énergie, sont à l'origine de la photosynthèse.

2 - Caractérisation des porphyrines

2-1 Spectroscopie UV-Visible

Si l'on recherche l'origine étymologique du mot « porphyrine », on constate qu'il dérive du mot grecque « *porphura* » qui désignait dans l'antiquité la teinte pourpre. Il n'y a

donc rien d'étonnant à ce que les pionniers de la Chimie des macrocycles tétrapyrroliques les aient dénommés ainsi compte tenu de leur très forte coloration. En effet, parce que les porphyrines possèdent un système d'électrons π fortement conjugué, ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique. Il résulte de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et se compose d'une bande intense ($\epsilon > 100000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre autres bandes situées entre 480 et 700 nm (Visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées bandes Q. La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible aux variations de structures, renseigne sur la substitution du macrocycle. En effet, les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants^[8]. On distingue ainsi essentiellement quatre types de spectres, appelés : *étio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo*^[9].

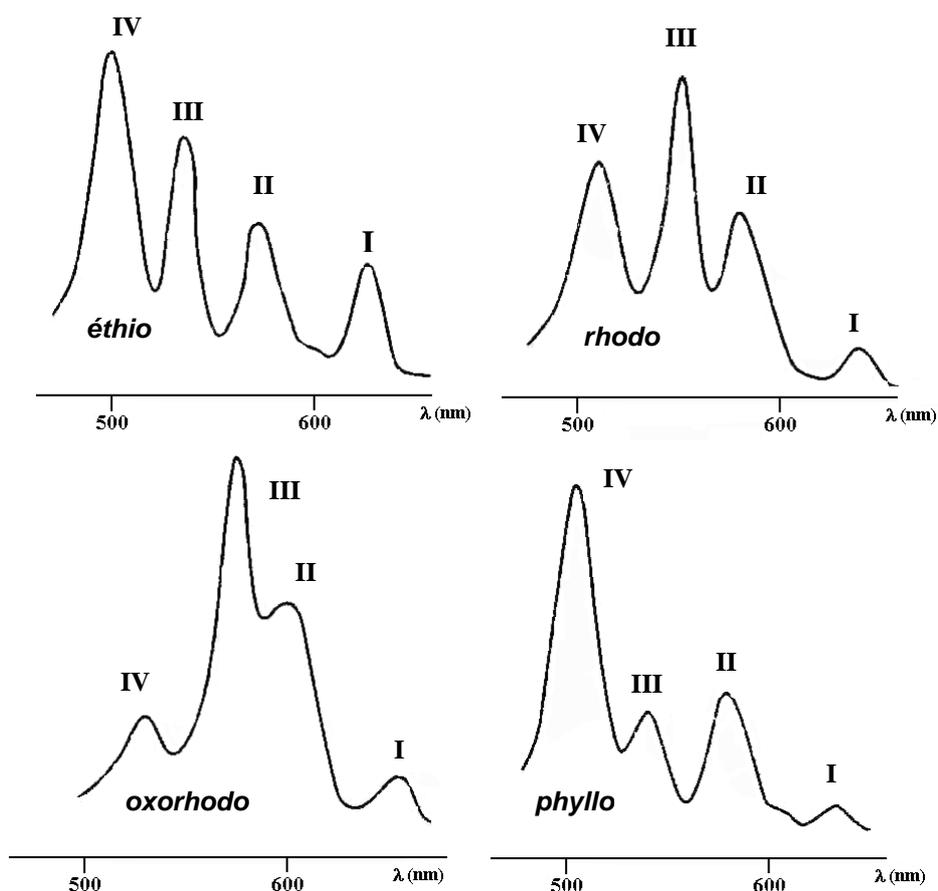


Figure I-6 : Profil des bandes Q pour les 4 principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres^[9].

Dans les années trente, l'équipe de Hans Fischer a mis en évidence une série de corrélations empiriques entre les structures de porphyrines et les intensités relatives des bandes Q. Bien qu'il existe d'assez nombreux contre-exemples on rencontre généralement le type *étio* dans le cas de porphyrines β -substituées par au moins 6 groupements ou dans le cas de la plupart des *mésoporphyrines*. Les *mésoporphyrines* portant un substituant saturé (par exemple une chaîne alkyle) auront généralement quant à elles un spectre de type *phyllo*. La présence de groupements riches en électrons π (carbonyle...) en position β -pyrrolique génère un profil de spectre de type *rhodo* alors que la présence de deux de ces mêmes groupements en position β -pyrrolique sur deux pyrrole opposés conduit à un spectre de type *oxorhodo*.

Pour le cas des porphyrines métallées ou protonées, le nombre de bandes d'absorption dans le domaine du visible est réduit à deux. Les deux bandes Q sont alors nomées α et β en partant des grandes longueurs d'onde.

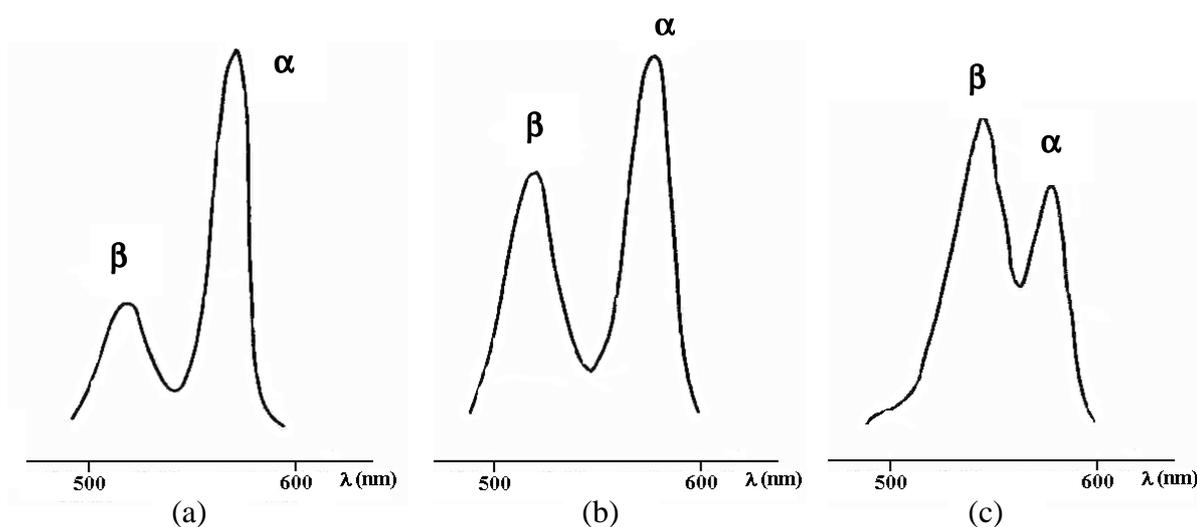


Figure I-7 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : (a) Ni(II), (b) Zn(II), (c) Cd(II).

La substitution du macrocycle n'a dans ce cas que très peu d'influence sur les intensités relatives des bandes α et β . En revanche, la nature de l'ion métallique fixé, et par conséquent la plus ou moins grande stabilité du complexe porphyrine-métal, engendre d'importantes modifications du rapport des intensités de ces deux bandes. En effet, un rapport $\alpha/\beta > 1$ indique généralement la présence d'un métal impliqué dans un complexe plan, stable avec la porphyrine (c'est le cas par exemple avec Ni(II) ou encore Zn(II)). Par contre, lorsque le métal peut être facilement remplacé par deux protons, on observe un rapport $\alpha/\beta < 1$ (par exemple avec Cd(II)).

Gouterman^[8] a développé dans les années 60 une théorie qui permet d'expliquer le profil des spectres électroniques des macrocycles tétrapyrroliques. La théorie de Gouterman est appelée « modèle des quatre orbitales » parce qu'il ne considère uniquement que les deux plus hautes orbitales moléculaires occupées (HOMO) et les deux plus basses orbitales moléculaires vacantes (LUMO) (figure I-8). D'autres modèles plus satisfaisants l'ont maintenant supplanté mais l'approche des quatre orbitales reste toujours la meilleure introduction à la théorie des spectres UV-Visible des porphyrines. Gouterman en s'appuyant sur les grands principes de la théorie des polyènes cycliques, qui à elle seule ne permet pas d'expliquer les variations du spectre UV induites par des variations du squelette de la porphyrine, a donné une signification physique satisfaisante à la théorie de Hückel qui a été appliquée aux macrocycles tétrapyrroliques pour la première fois par Longuet-Higgins. Ce dernier avait obtenu par le calcul deux orbitales HOMO non dégénérées, appelées a_{1u} et a_{2u} pour des raisons de symétrie (renommées respectivement b_2 et b_1 par Gouterman), et une paire d'orbitales LUMO dégénérées appelées e_g (renommées c_1 et c_2 par Gouterman).

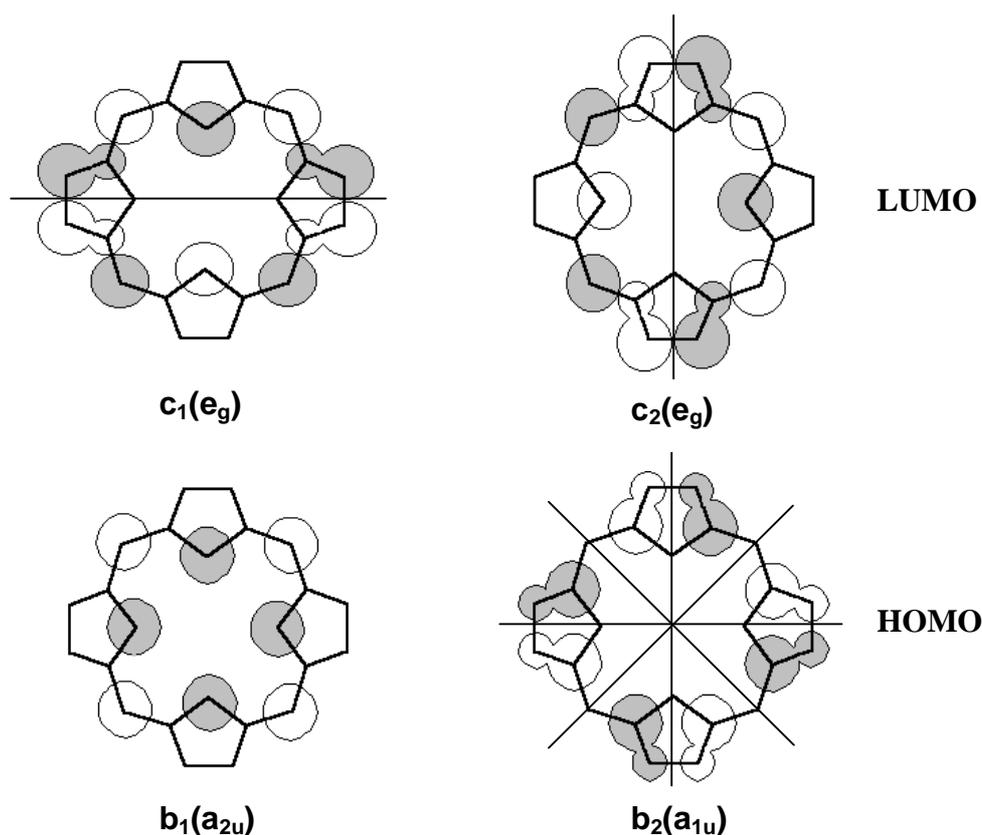


Figure I-8 : Représentation schématique des orbitales moléculaires HOMO et LUMO dans le cas d'une symétrie D_{4h} .

Gouterman postule que les deux orbitales HOMO b_1 et b_2 sont accidentellement dégénérées. Ainsi, le modèle des quatre orbitales, en tenant compte des vibrations moléculaires du macrocycle et du concept des dipôles de transitions, permet de prévoir le nombre et les intensités relatives des bandes Q.

2-2 Résonance Magnétique Nucléaire

2-2-1 Spectroscopie RMN du proton

La résonance magnétique nucléaire du proton appliquée aux macrocycles porphyriniques fournit des spectres très caractéristiques. En effet, le courant de cycle induit par le champ magnétique imposé par l'appareil génère un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (figure I-9). Ainsi, les protons situés à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm^[10].

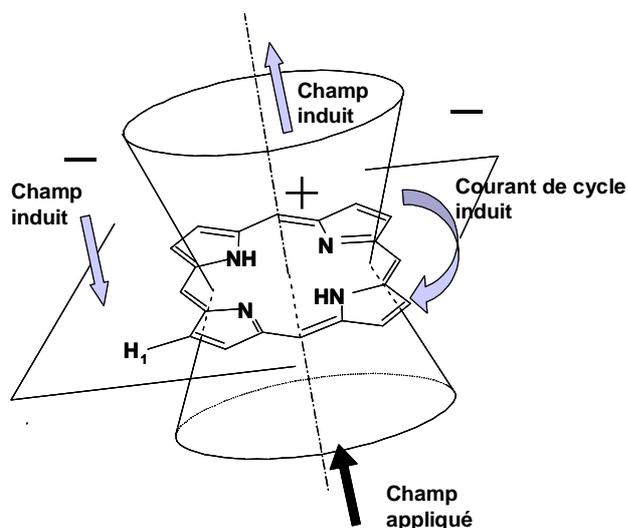


Figure I-9 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine.

Le spectre RMN ^1H de la porphine, porphyrine la plus simple non substituée, est constitué de 3 singulets à -3,76, 9,74 et 10,50 ppm. Ces signaux sont attribués respectivement aux protons liés aux atomes d'azote, aux protons des positions β -pyrroliques et aux protons *méso*.

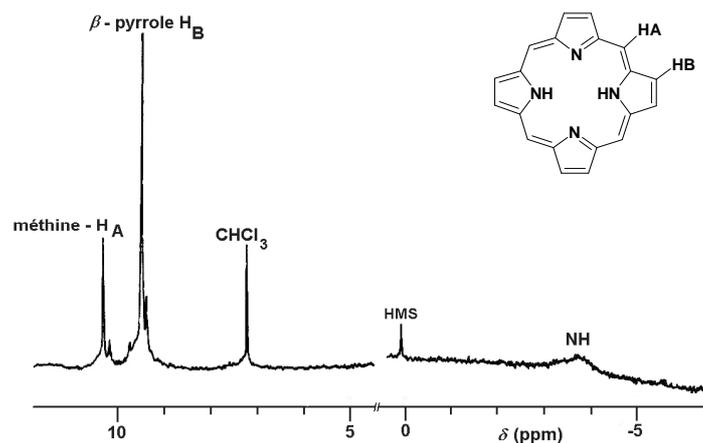


Figure I-10 : Spectre RMN ^1H de la porphine dans CDCl_3 .

L'existence du courant de cycle se traduit entre autres choses par un très fort blindage des protons NH pyrroliques. Notons par ailleurs que l'unicité du signal correspondant aux 8 protons β -pyrroliques résulte de la tautomérie des protons NH internes. Pour les porphyrines de structures plus complexes, les variations de déplacements chimiques sont plus difficiles à expliquer et résultent de changements du courant de cycle induits par les effets électroniques, stériques ou encore anisotropiques des substituants. D'une manière générale la substitution en position *méso* produit une diminution du courant de cycle. Néanmoins, on retrouve toujours les spectres caractéristiques des porphyrines quelle que soit la nature des substituants, présentant les signaux NH pyrroliques internes entre $-2,7$ et $-4,0$ ppm, les signaux H- β pyrroliques vers 9 ppm et les signaux méthines vers 10 ppm, dans le cas où ces positions ne sont pas substituées.

La figure I-11 présente un exemple d'étude de spectroscopie RMN ^1H montrant l'influence de la distance et de l'orientation d'un proton par rapport au cycle porphyrinique sur son déplacement chimique. Ponomarev et coll^[11] ont synthétisé et caractérisé par RMN les isomères *cis* et *trans* du 1,2-di(octaéthylporphyrinyl)éthylène. Les spectres RMN de ces deux dimères sont bien différents et témoignent de l'influence du courant de cycle. En effet, dans le cas de l'isomère *cis*, structure impliquant une orientation de type « face-à-face » des deux porphyrines, les protons *méso* et les protons NH internes subissent un important blindage ($\Delta\delta \approx 2,5$ ppm) par rapport à l'isomère *trans*, de structure plus ouverte. La multiplicité et le déplacement chimique des protons des groupements éthyle varient également considérablement d'un isomère à l'autre.

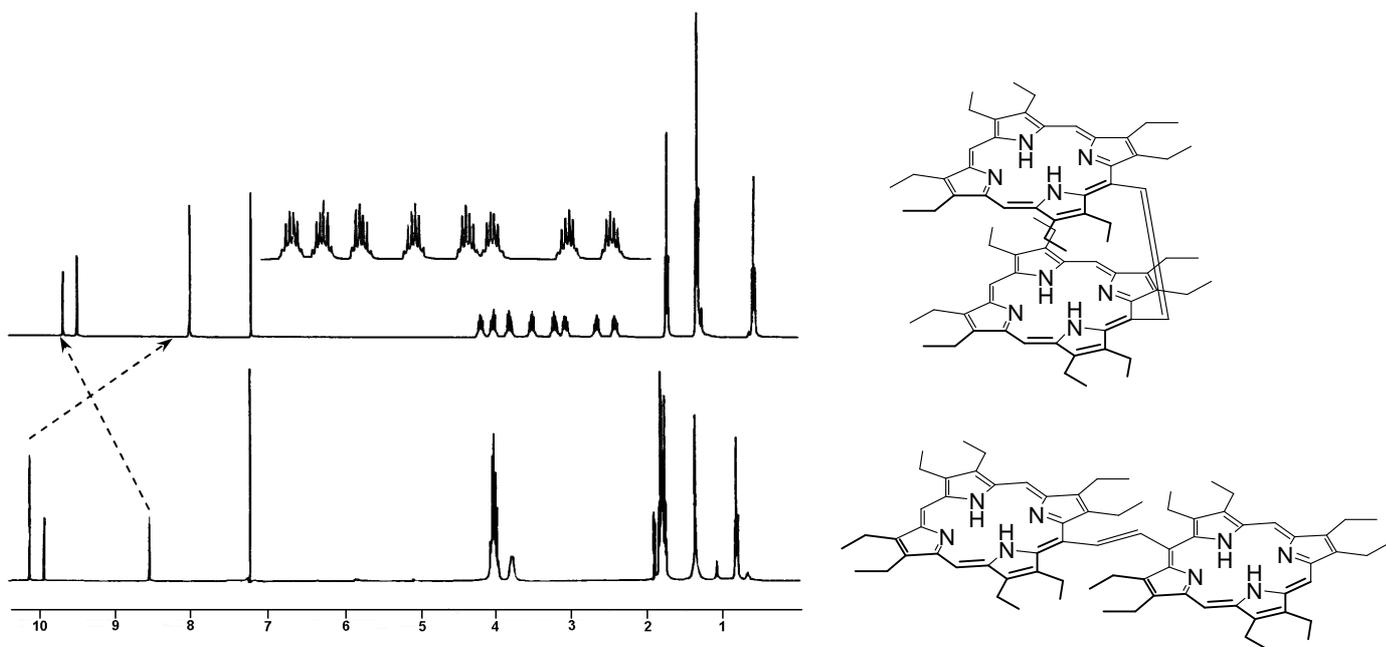


Figure I-11 : Exemple de l'effet du macrocycle sur les déplacements chimiques des substituants^[11].

La protonation du macrocycle tétrapyrrolique ainsi que la métallation affectent sensiblement le spectre RMN. L'augmentation du courant de cycle associée à un gain de symétrie de la molécule induits par la protonation sont responsables, selon Abraham^[12], d'un déblindage des protons périphériques et d'un blindage des protons internes. La métallation se manifeste quant à elle principalement par la disparition des signaux NH pyrroliques et conduit à des variations de déplacements chimiques des protons périphériques en fonction de la nature et du degré d'oxydation du métal ainsi que de la nature du ligand qui lui est associé.

Généralement, les constantes de couplage 3J entre les protons H- β pyrroliques sont comprises entre 4,0 et 4,5 Hz. En ce qui concerne les constantes de couplage des protons des substituants portés par le macrocycle, elles ne sont généralement pas remarquables et ne diffèrent pas de celles des substituants isolés.

2-2-2 Spectroscopie RMN du carbone 13.

Le spectre RMN ^{13}C du macrocycle porphyrinique se compose essentiellement de trois zones :

- ✓ Les carbones *méso* qui résonnent entre 95 et 120 ppm,
- ✓ Les carbones β -pyrroliques qui résonnent vers 130 ppm,
- ✓ Les carbones α -pyrroliques qui résonnent vers 145 ppm.

Le signal correspondant aux carbones α -pyrroliques est généralement élargi et assez mal défini. Ceci est la conséquence directe de la tautomérie des protons NH internes. Ce phénomène peut également affecter dans certains cas la forme des signaux des carbones β -pyrroliques. Un abaissement de température (-60°C) permet de ralentir la tautomérie et à cette température on observe pour les carbones α -pyrroliques deux pics correspondant chacun à quatre carbones^[13].

Notons par ailleurs qu'en RMN ^{13}C , la résonance des noyaux est relativement peu sensible aux courants de cycle.

2-3 Spectrométrie de masse

Les porphyrines se caractérisent entre autres par une très faible volatilité. De ce fait, les techniques classiques d'ionisation ne sont généralement pas adaptées à l'étude par spectrométrie de masse de ces composés. Néanmoins, en appliquant des méthodes d'ionisation plus douces, comme les techniques SIMS et MALDI, la spectrométrie de masse se révèle être une méthode d'investigation précieuse pour confirmer la structure d'une porphyrine, permettant d'observer la masse molaire et éventuellement des fragmentations correspondant à la perte de groupements périphériques.

La méthode MALDI (désorption/ionisation laser assistées par matrice) (figure I-12) permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes de haut poids moléculaire. Le composé à analyser, mélangé à un excès de molécules d'un composé servant de matrice, est adsorbé sur un support métallique. Le dépôt est ensuite irradié par des impulsions laser courtes (quelques nanosecondes) dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. L'énergie délivrée par le laser est absorbée de manière sélective par la matrice ce qui conduit à un phénomène de désorption et d'ionisation. Une faible partie de l'énergie absorbée est transmise sous forme d'énergie cinétique et d'énergie interne à la substance analysée ce qui provoque l'éjection d'espèces moléculaires essentiellement intactes. Les ions produits sont généralement $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}-\text{H}]^+$ ou peuvent être issus de processus de cationisation comme $[\text{M}+\text{Li}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$.

La nature de la matrice est importante. Elle doit être soluble dans les mêmes solvants que la substance étudiée de façon à obtenir un dépôt homogène. En outre, elle doit présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Si l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) est une matrice couramment utilisée pour l'étude des macrocycles tétrapyrroliques, il

existe néanmoins une gamme assez étendue de composés aux propriétés physico-chimiques variées pouvant être utilisés comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées^[14].

Les ions secondaires formés sont accélérés puis analysés grâce à un système à temps de vol.

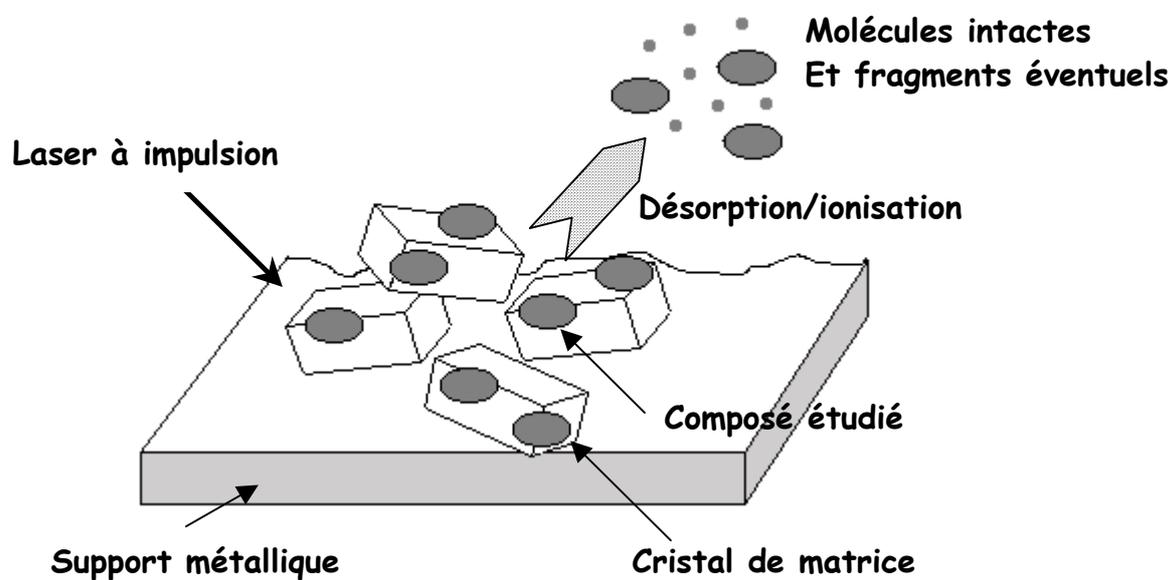


Figure I-12 : Principe de la technique MALDI.

3 - Méthodes de synthèse de porphyrines.

Au cours des 60 dernières années, l'intérêt pour les macrocycles tétrapyrroliques ne cessant d'augmenter, de nombreuses stratégies de synthèse de porphyrines ont été élaborées. Ainsi, deux grands types de porphyrines ont été développés :

- des porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, pour leur structures semblables aux porphyrines naturelles,
- des porphyrines substituées sur les positions *méso*.

Dans ce chapitre, nous détaillerons plus particulièrement les méthodes de préparations de *méso*-porphyrines.

3-1 Synthèse de *méso*-porphyrines

En 1935, Rothemund^[15] décrit pour la première fois la synthèse d'une porphyrine symétrique substituée en position *méso*. En faisant réagir, sous atmosphère d'azote, (figure I-13) l'acétaldéhyde et le pyrrole dans le méthanol à diverses températures il a obtenu, avec de très faibles rendements, la *méso*-tétraméthylporphyrine. Dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant un nombre varié d'aldéhydes, il a synthétisé diverses porphyrines portant comme substituants des groupes propyl, butyl, phényle ou encore 4-méthoxyphényle. En 1941, Rothemund améliore les très faibles rendements obtenus jusqu'alors. Ainsi en faisant réagir dans une ampoule scellée du pyrrole (3,6M), du benzaldéhyde (4,9M) dans la pyridine à 220°C, il a obtenu la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement de l'ordre de 5%^[16].

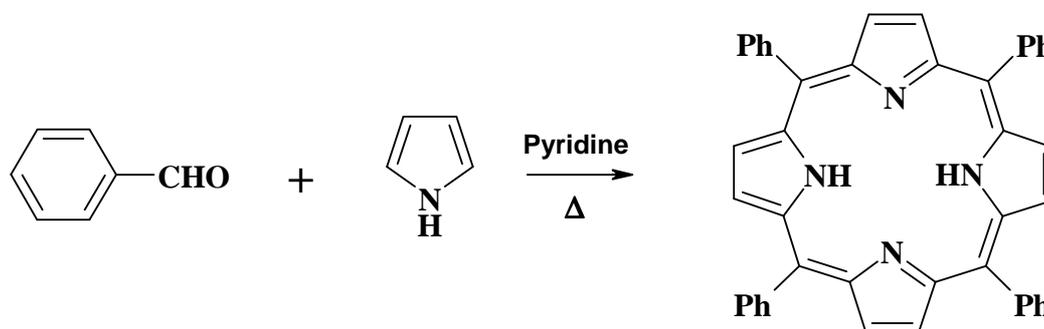


Figure I-13 : Méthode de Rothemund appliquée à la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine.

Calvin et *coll.* ont montré qu'il est possible dans les mêmes conditions de doubler le rendement en ajoutant au milieu réactionnel de l'acétate de zinc^[17]. De cette façon, ils ont synthétisé la *méso*-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc avec un rendement de 11%. Ces travaux sont les premiers d'une importante série de publications traitant des effets de la présence de métaux sur ce type de réactions.

En 1967, Adler et Longo^[18] ont amélioré de manière significative la synthèse de porphyrines par condensation d'aldéhydes et de pyrrole. En condensant le benzaldéhyde et le pyrrole dans l'acide propionique à reflux dans un réacteur ouvert à l'air libre, ils ont formé la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20%. La méthode de Adler-Longo, de part ces conditions de réactions plus douces, a permis l'utilisation d'une plus grande diversité d'aldéhydes, et par conséquent, la synthèse d'une importante variété de *méso*-tétraarylporphyrines symétriques.

En 1975, Little^[19] a adapté cette méthode à la synthèse de *méso*-arylporphyrines non symétriques. Cette méthode dite des « aldéhydes mixtes » consiste à condenser dans l'acide propionique à reflux du pyrrole et deux aldéhydes différents (figure I-14).

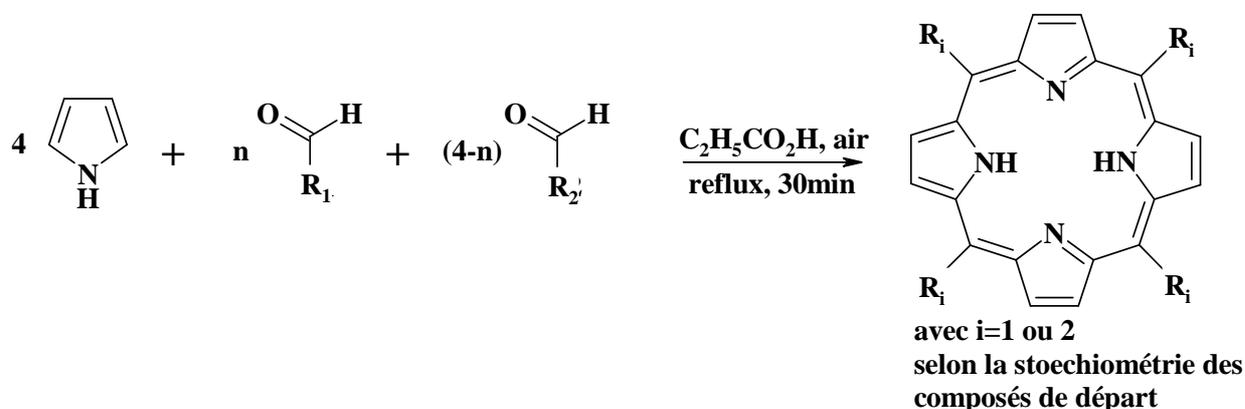


Figure I-14 : Méthode des aldéhydes mixtes.

En fonction des quantités stœchiométriques de réactifs employées, la réaction 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 dans les proportions 3 :1 conduit à six porphyrines que nous notons A₄ (pour la porphyrine formée à partir de quatre molécules de A), A₃B (pour celle formée à partir de trois molécules de A et

une unité de B), *cis*-A₂B₂ et *trans*-A₂B₂ (pour les isomères *cis* et *trans* de la porphyrine formée de deux unités de A et de deux unités de B), AB₃ et B₄. La distribution statistique théorique est la suivante^[20] : A₄ = 31,64% ; A₃B = 42,19% ; *cis*-A₂B₂ = 14,06% ; *trans*-A₂B₂ = 7,03% ; AB₃ = 4,69% et B₄ = 0,39%. En pratique, le rendement en porphyrine A₃B n'excède jamais 5 à 7% et l'existence de réactions de polymérisation du pyrrole au cours de toutes ces synthèses implique dans bien des cas de fastidieuses étapes de purifications chromatographiques. Néanmoins, la méthode de Little est couramment employée pour la synthèse de porphyrines pouvant être facilement isolées par cristallisation.

En 1978, Svirskaya et Lesnoff^[21] proposent, dans le but de synthétiser la 5-hydroxyphényl-10,15,20-tritolyporphyrine, un protocole, en phase solide, limitant les étapes de purification (figure I-15). Leur approche consiste dans une première étape à fixer le 3- (ou 4-) hydroxybenzaldéhyde sur une résine polystyrène portant 1,7 mmol de chlorure d'acide par gramme de polymère puis, dans une seconde étape, à faire réagir ce support avec le pyrrole et le *para*-tolualdéhyde dans l'acide propionique à reflux.

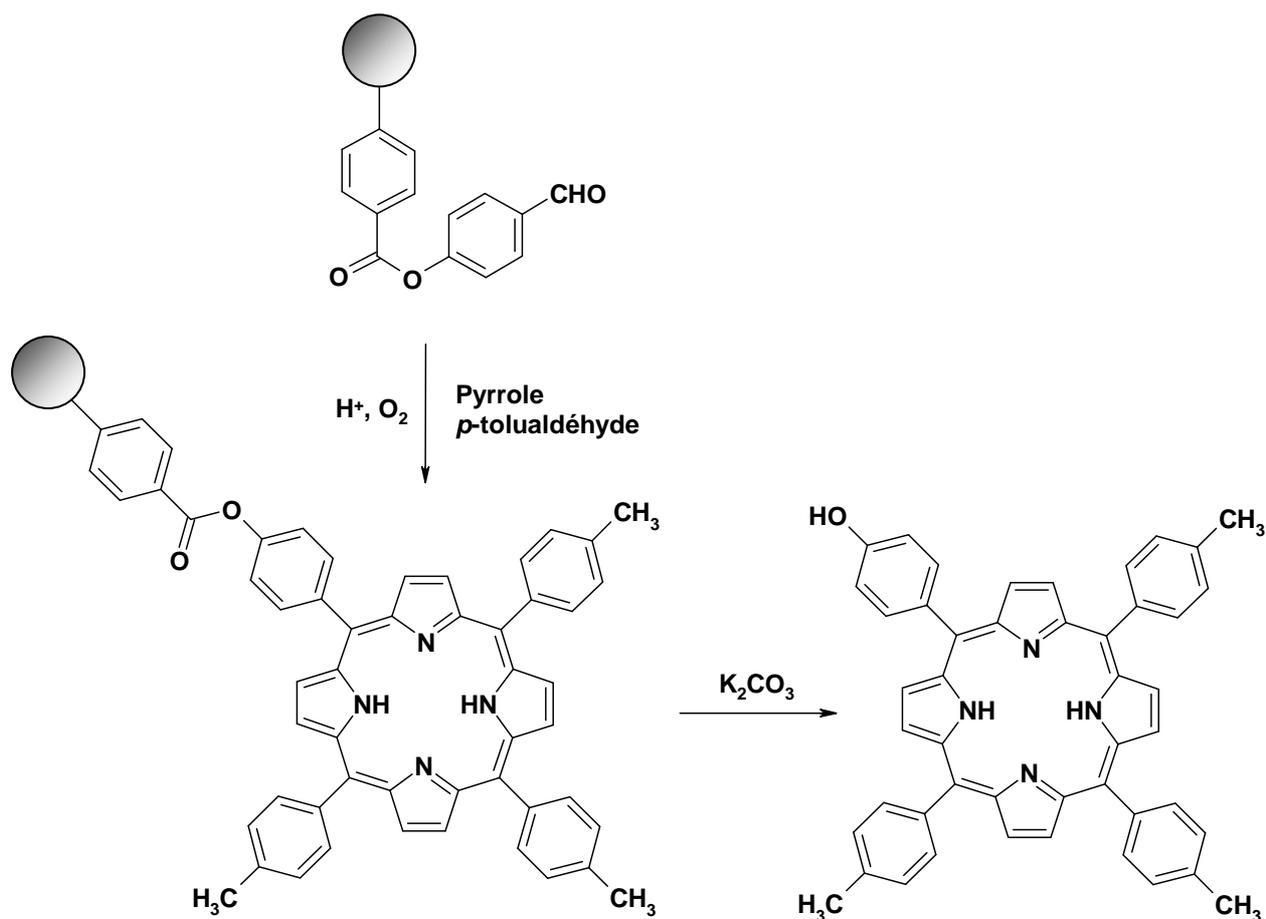


Figure I-15 : Synthèse sur support solide.

Malheureusement, les résultats qu'ils ont obtenus n'ont pas été à la hauteur de leurs espérances. Bien qu'ils soient parvenus à simplifier la purification, le rendement en monohydroxyphénylporphyrine reste par cette méthode très faible (de 2 à 4,5%). Aujourd'hui encore, ce rendement très modeste n'est toujours pas clairement expliqué. D'autre part, pour appliquer cette stratégie, il faut nécessairement que l'un des aldéhydes employés possède une fonction permettant de le fixer sur la résine ce qui limite son domaine d'application. Plus récemment, d'autres stratégies de synthèse en phase solide ont été développées mais les résultats restent peu concluants^[22].

En 1985, Gonsalves^[23] a montré qu'un mélange de pyrrole et d'alkylaldéhyde en présence d'acide trifluoroacétique en quantité catalytique conduisait à un porphyrinogène pouvant être oxydé en *méso*-tétraalkylporphyrine avec un bon rendement. En appliquant cette méthode, Lindsey^[24] a synthétisé un grand nombre de *méso*-tétraarylporphyrines. Ainsi, en utilisant le dichlorométhane rigoureusement anhydre, sous courant d'argon et en présence d'acide de Lewis en quantité catalytique, il a obtenu, après oxydation par une quinone, la tétraphénylporphyrine avec un rendement de 46% (figure I-16).

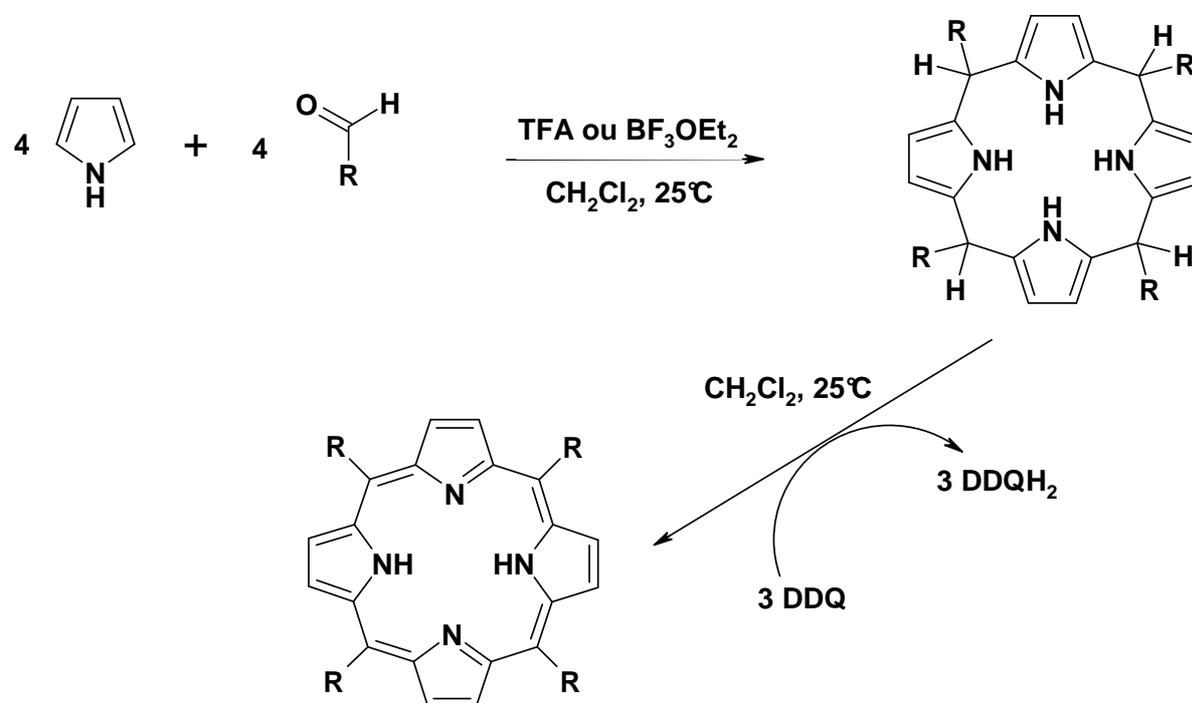


Figure I-16 : Méthode de Lindsey.

Depuis 1986, un très grand nombre de porphyrines symétriques a pu être synthétisé suivant ce protocole, les conditions douces de la méthode de Lindsey autorisant l'emploi d'aldéhyde même peu stable. Les rendements optimaux ont été obtenus pour des concentrations en réactif de 10^{-2} mol.L⁻¹, c'est à dire en milieu dilué et en utilisant comme catalyseur le TFA ou le BF₃-éthérate. Récemment, l'équipe de Lindsey^[25] a montré que l'utilisation conjuguée du TFA à la concentration de 15.10^{-3} mol.L⁻¹ et du BF₃-éthérate à la concentration de 3.10^{-3} mol.L⁻¹ permet d'améliorer les résultats de manière significative. Lindsey et Momenteau ont également adapté cette méthode à la synthèse de *méso*-arylporphyrines non symétriques. Pour cela, ils ont augmenté la dilution des réactifs (de l'ordre de 10^{-3} mol.L⁻¹) et la durée de la réaction^[26].

Une autre approche permettant de former des macrocycles tétrapyrroliques consiste à utiliser comme précurseur des dipyrrométhanés. Dans les années 60, Woolward et MacDonald^[27] ont synthétisé des porphyrines β-substituées par réaction d'un dipyrrométhane non substitué sur les positions 5 et 5' avec un 5,5'-bisformyldipyrrométhane. La méthode de MacDonald, connue sous le nom de méthode « 2+2 », conduit dans un premier temps à la formation d'un porphyrinogène qui est, dans un second temps, oxydé par une quinone. Cette stratégie a par la suite été très largement étudiée et appliquée à la synthèse de *méso*-porphyrines et plus particulièrement à la synthèse de *trans méso*-porphyrines. Ainsi, au cours des dix dernières années, Lindsey a réalisé une étude très détaillée de cette réaction et a montré notamment qu'il était possible d'obtenir spécifiquement une *trans*-porphyrine en utilisant des dipyrrométhanés encombrés comme le mésityldipyrrométhane^[28] (figure I-17). Il a obtenu de cette façon la 5,15-dimésityl-10,20-bis(4-méthylphényl)porphyrine avec un rendement de 48% sans observer la formation de l'isomère *cis*.

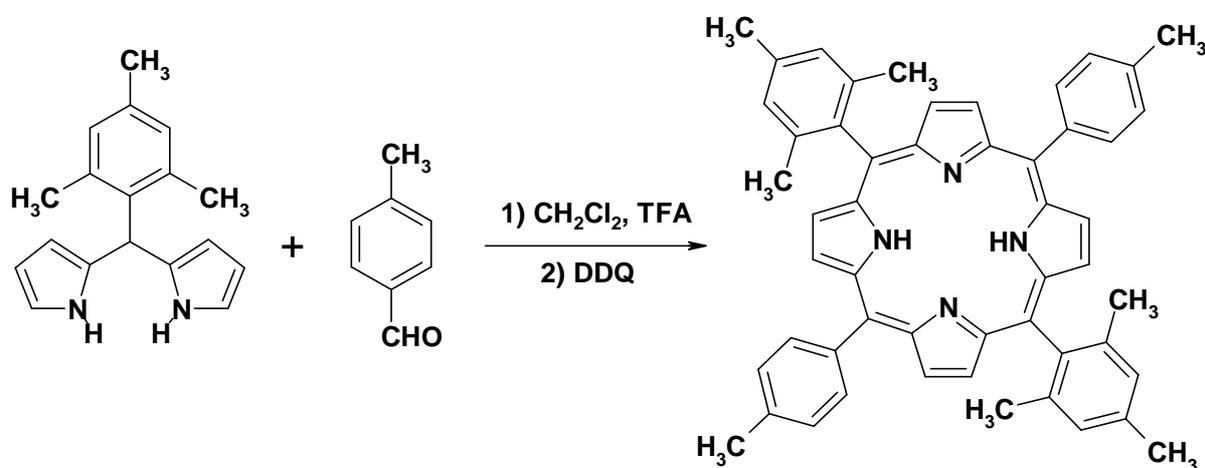


Figure I-17 : Adaptation de la méthode MacDonald « 2+2 » à la synthèse de *trans méso*-porphyrines.

Récemment, Wheelhouse et Shi^[29] ont obtenu une série de tétraarylporphyrines symétriques avec de très bons rendements en procédant à la *méso*-arylation de la porphine commerciale selon la méthode de Suzuki. Ils ont ainsi obtenu la tétra-3-méthylphénylporphyrine avec un rendement de 70%.

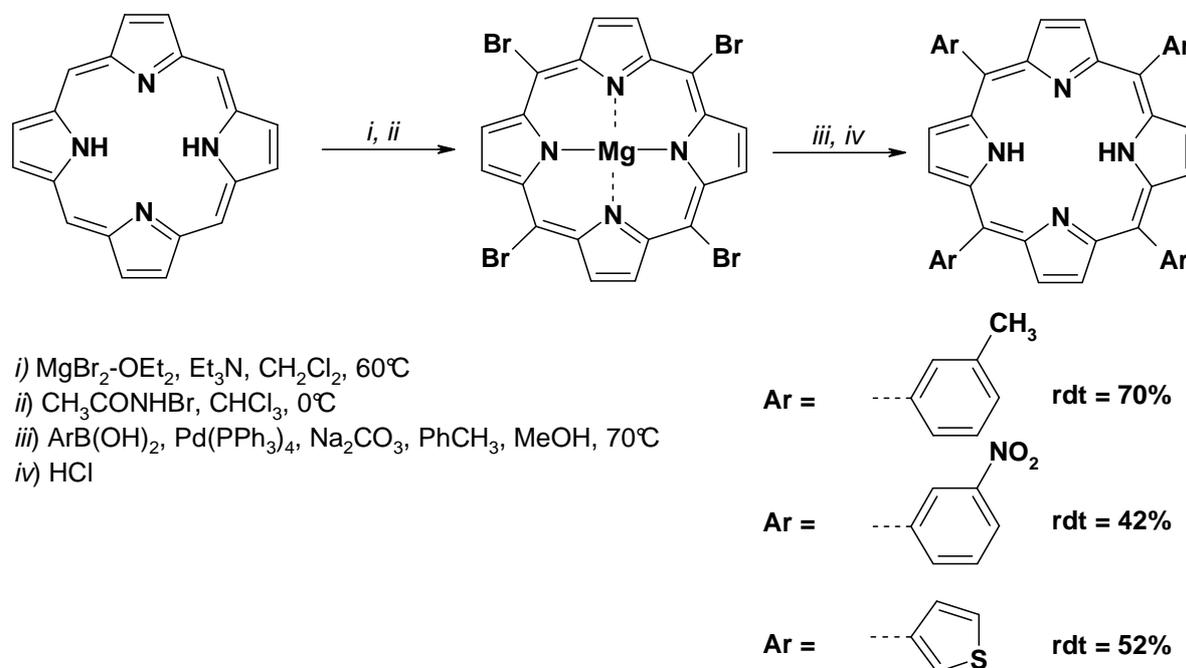


Figure I-18 : Arylation de la porphine.

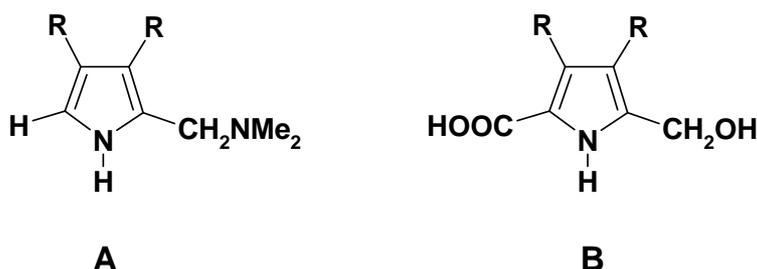
Cette méthode, qui permet de limiter les pertes d'aldéhyde, semble très intéressante particulièrement dans le cas où l'aldéhyde utilisé est difficile à synthétiser ou très coûteux. Si la synthèse de tétraarylporphyrines symétriques est aujourd'hui assez bien maîtrisée, la synthèse de porphyrines non symétriques reste délicate, les faibles rendements obtenus étant toujours la conséquence de la formation d'un mélange de porphyrines rendant bien souvent les purifications fastidieuses.

3-2 Synthèse de porphyrines β -substituées

3-2-1 A partir d'unité monopyrrolique

Plusieurs stratégies ont été développées pour synthétiser de telles porphyrines. La première méthode mise au point consiste à condenser des unités monopyrroliques substituées. Cette voie de synthèse ne se révèle satisfaisante que si les substituants des positions β sont identiques. L'une des principales stratégies de synthèse utilisant des unités monopyrroliques est la tétramérisation de pyrroles non substitués en positions α en présence de composés assurant la formation des ponts méthine. Ainsi, Treibs et Haberle^[30] ont obtenu l'octaméthylporphyrine par réaction de 3,4-diméthylpyrrole avec le formaldéhyde dans l'acide acétique en présence de pyridine avec un rendement de 77%.

Une autre approche importante passe par la condensation de pyrroles substitués en position 2 et/ou 5.



Siedel et Winkler^[31] ont synthétisé de cette façon plusieurs porphyrines β -substituées en chauffant, à sec ou en solution, des pyrroles semblables au composé **B**. Par ailleurs, la condensation de pyrrole de type **A** suivie d'une oxydation par l'air permet d'obtenir des porphyrines symétriques avec de bons rendements. Ce type de réactions ne donne des résultats satisfaisants que si les deux positions β -pyrroliques sont substituées.

En 1996, Smith^[32] a présenté une nouvelle méthode permettant d'obtenir, à partir d'unités monopyrroliques, des octaalkylporphyrines symétriques isomériquement pures portant deux types de substituants différents (figure I-19).

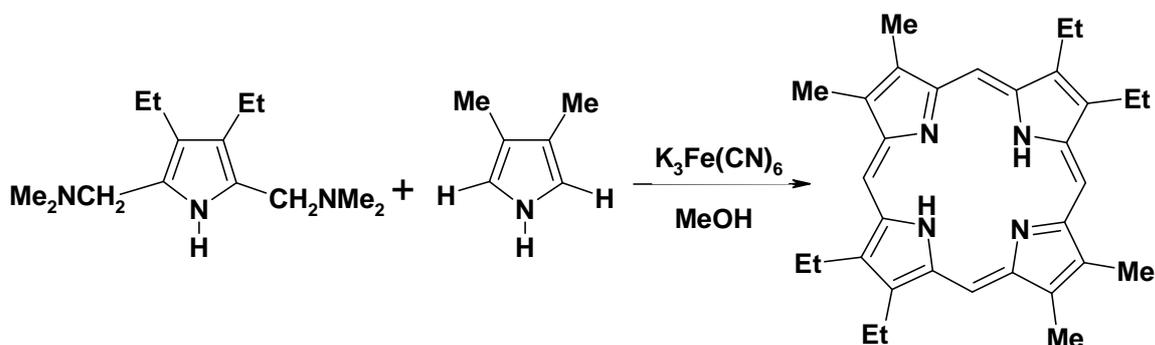


Figure I-19 : Synthèse de la tétraéthyl-tétraméthylporphyrine.

Il a ainsi obtenu un rendement de 19% en effectuant la réaction en présence de $K_3Fe(CN)_6$ dans le but d'éviter la redistribution des sous-unités pyrroliques qui en milieu acide conduit à un mélange complexe de porphyrines.

3-2-2 A partir d'unité di et tripyrroliques

Cette voie de synthèse utilisant des intermédiaires de type dipyrrométhane ou dipyrrométhène n'est adaptée qu'à la synthèse de porphyrines centrosymétriques ou ayant une symétrie dans l'une ou l'autre moitié de la molécule.

L'équipe de Fischer^[33] a synthétisé, dans les années 1920-1930, de nombreuses porphyrines β -substituées à partir de dipyrrométhènes (figure I-20) dans des solvants organiques acides à des températures supérieures à 200°C.

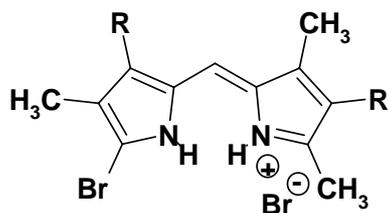


Figure I-20 : Dipyrrométhènes utilisés par Fischer.

En 1960, Woodward et MacDonald ont utilisé comme précurseurs des unités dipyrrométhane. La méthode « 2+2 », que nous avons décrite précédemment pour la synthèse

de *méso*-porphyrines, est souvent préférée à celle de Fischer pour ces conditions réactionnelles plus douces.

Ces dernières années, une nouvelle approche nommée « 3+1 » est apparue. Celle-ci consiste à condenser un tripyrrane sur un diformyl-pyrrole. Par cette méthode, il est possible de former des porphyrines β -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole^[34] avec des rendements de l'ordre de 35%.

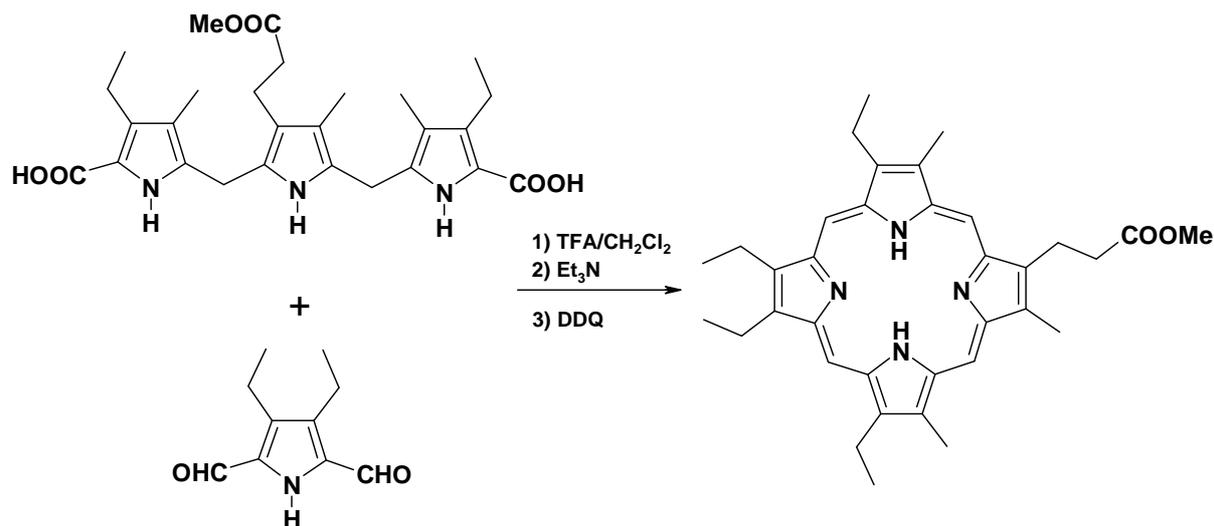


Figure I-21 : Exemple de synthèse par la méthode « 3+1 »

3-2-3 A partir de pigments naturels.

Nous ne présenterons ici que quelques exemples de macrocycles tétrapyrroliques issus de la dégradation de chromophores naturels.

La protohème, chloroporphyrine de fer(III), est le dérivé porphyrinique le plus abondant dans les organismes animaux supérieurs. Elle dérive entre autres de l'hémoglobine, de la myoglobine, du cytochrome P-450 et de nombreuses autres protéines. La méthode classique de Fischer^[35] est généralement utilisée pour isoler la protohème à partir de sang. Pour cela, 100 mL de sang, préalablement traité par un anticoagulant, sont filtrés sur plusieurs couches de gaze puis versés dans 300 mL d'acide acétique à 100°C. En refroidissant, des cristaux de porphyrines se forment. Ceux-ci sont filtrés à 60°C afin de ne pas les contaminer par les protéines dénaturées qui précipitent à leur tour si on refroidit la solution davantage. On obtient ainsi après plusieurs lavages environ 100 mg de cristaux d'hème.

L'hématoporphyrine IX, la mésoporphyrine IX ou encore la protoporphyrine IX sont quelques exemples de porphyrines préparées par modifications chimiques de la protohème.

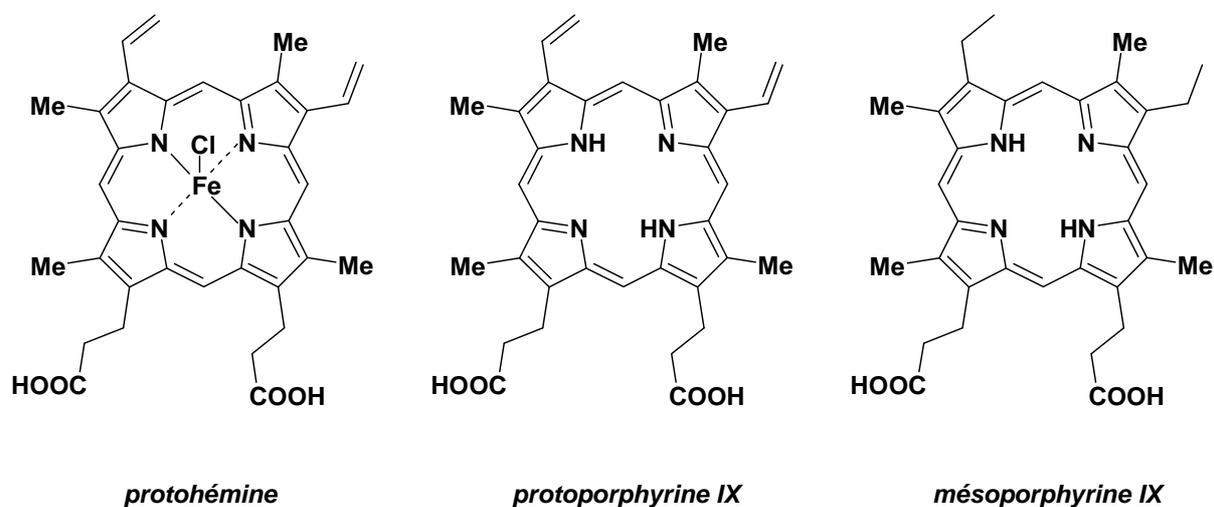


Figure I-22 : Structures de la protohème et dérivés.

Les chlorophylles a et b, qui peuvent être abondamment extraites des feuilles des végétaux, sont à la base d'un grand nombre de préparation de porphyrines et dérivés. La méthanolyse de la chlorophylle a fourni la chlorine-e6 triméthyl ester. De même, le traitement de la chlorophylle a suivant diverses conditions, suivie d'une méthanolyse permettent d'obtenir la phylloporphyrine XV diméthyle ester et la pyrroporphyrine XV diméthyle ester.

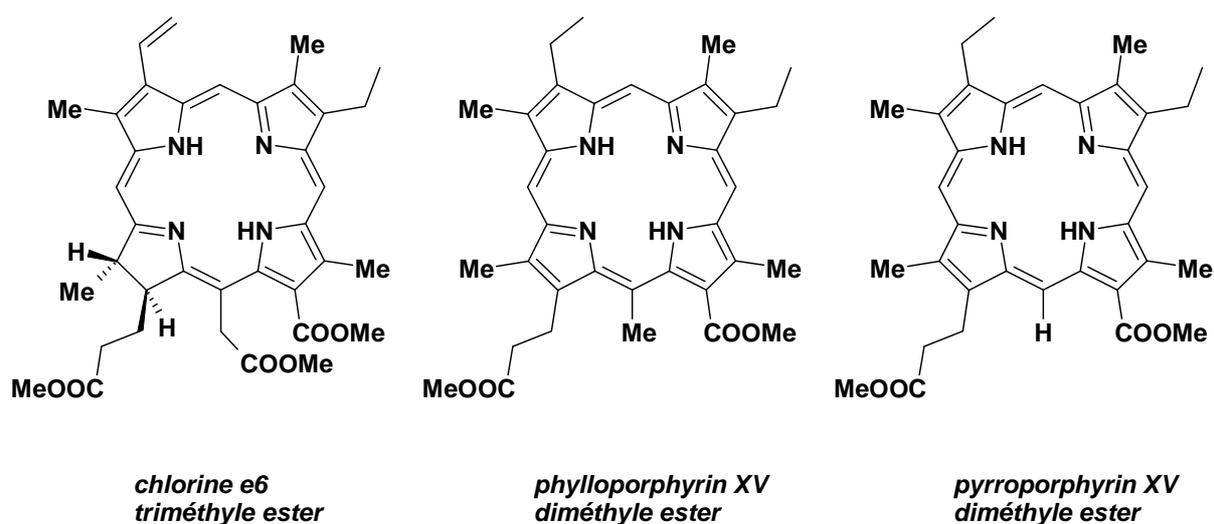


Figure I-23 : Macrocycles tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a.

4 - Domaines d'applications des porphyrines

Le champ d'applications des macrocycles tétrapyrroliques est très vaste : catalyseurs d'oxygénation de substrat organique, dégradation de matière organique, photodécomposition de l'eau, ou encore matériaux pour l'optoélectronique. Ces composés, très souvent photosensibles intéressent également fortement les chercheurs pour leur application en photothérapie. Nous présentons ici quelques exemples d'applications choisis parmi les plus significatifs.

4-1 La catalyse d'oxygénation par les métalloporphyrines.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, de nombreuses hémoprotéines jouent un rôle important dans les processus d'oxydations biologiques comme par exemple la dismutation du peroxyde d'hydrogène par les catalases ou encore l'oxygénation de substrats organiques catalysée par le cytochrome P450^[36]. Ce dernier, en présence de NADPH peut transférer un atome d'oxygène à une grande variété de substrats endogènes (comme les stéroïdes) ou exogènes (comme certains pesticides). La spécificité de ces catalyseurs résulte généralement des variations des structures protéiques environnantes et de l'interaction entre un acide aminé de ces protéines avec le métal du macrocycle tétrapyrrolique. Il était alors raisonnable de penser à la possibilité de concevoir des porphyrines métallées de synthèse, plus simples, capables de catalyser de telles réactions dans des conditions bien définies. Ainsi, dans le but de valoriser les dérivés du pétrole ou encore d'obtenir des composés chiraux purs, intéressant l'industrie pharmaceutique, de nombreuses métalloporphyrines ont été imaginées pour catalyser des réactions sélectives parmi lesquelles l'hydroxylation sélective d'alcane saturés en alcools, l'activation stéréospécifique d'une liaison C-H prochirale pour créer une liaison C-O ou l'époxydation asymétrique d'oléfines.

4-1-1 Réactions d'époxydation

Groves et *coll.* ainsi que Chang et *coll.* ont publié en 1979 les premiers travaux d'oxygénation thermique catalysée par des métalloporphyrines^{[37],[38]}. Ils ont décrit des réactions simples de transfert d'oxygène à des oléfines en présence de tétraphényl ou tétratolylporphyrines ferriques et d'iodosylbenzène.

Ces réactions d'époxydation suivent généralement le mécanisme suivant^[39] :

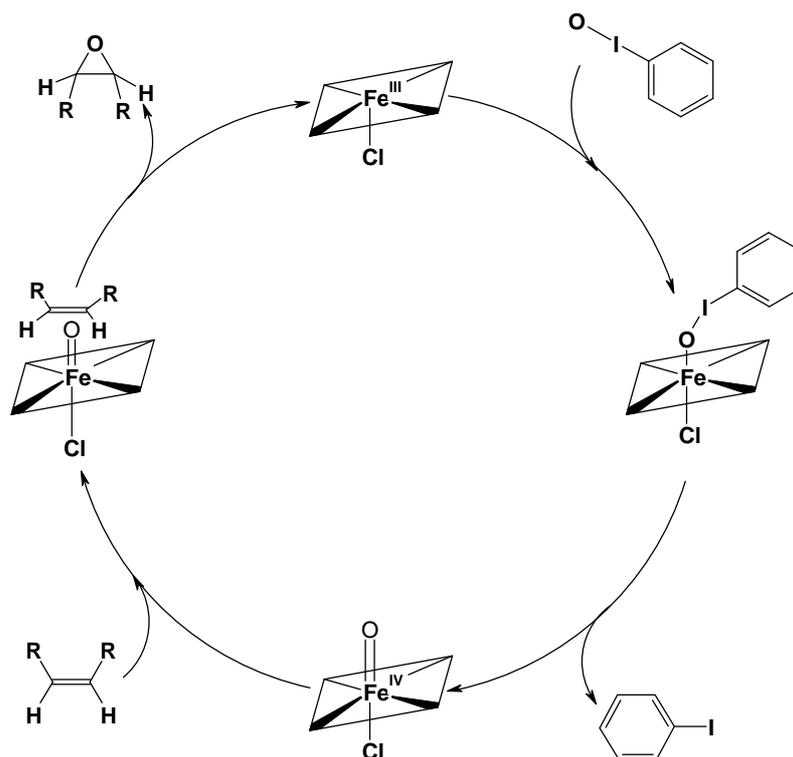


Figure I-24 : Mécanisme d'époxydation catalysée par une porphyrine de fer III.

Il est généralement observé que pour la réaction d'un mélange d'alcènes *cis* et *trans* en présence de FeTPPCl et d'iodosylbenzène, seul l'isomère *cis* réagit pour fournir l'époxyde correspondant contrairement aux réactions menées avec des agents d'époxydation classiques comme les peroxyacides qui réagissent sensiblement à la même vitesse avec les isomères *cis* et *trans*.

La figure I-25 présente quelques exemples de réactions d'époxydation rapportés par Groves.

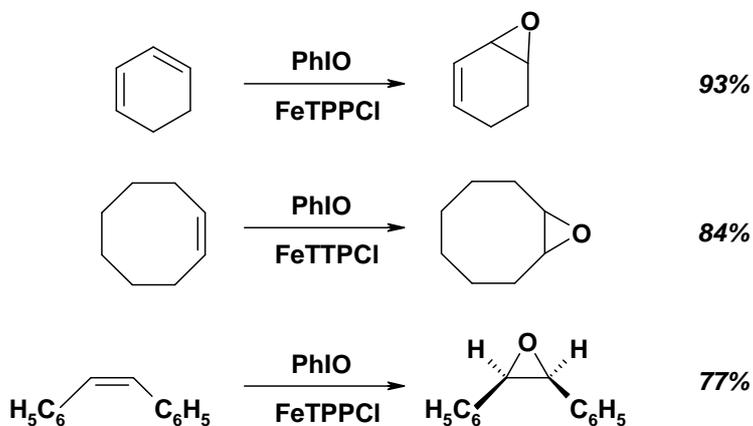


Figure I-25 : Epoxydations catalysées par des porphyrines de fer III.

De tels résultats, qui rendent compte de la régiosélectivité et de la spécificité de ce type de catalyseurs, ont suggéré qu'il était possible de concevoir en changeant l'environnement stérique des porphyrines une série de catalyseurs d'époxydation sélective. Par exemple, une métalloporphyrine convenablement substituée par deux groupements chiraux permet de catalyser l'époxydation stéréosélective d'oléfines en présence d'iodosylbenzène^[40].

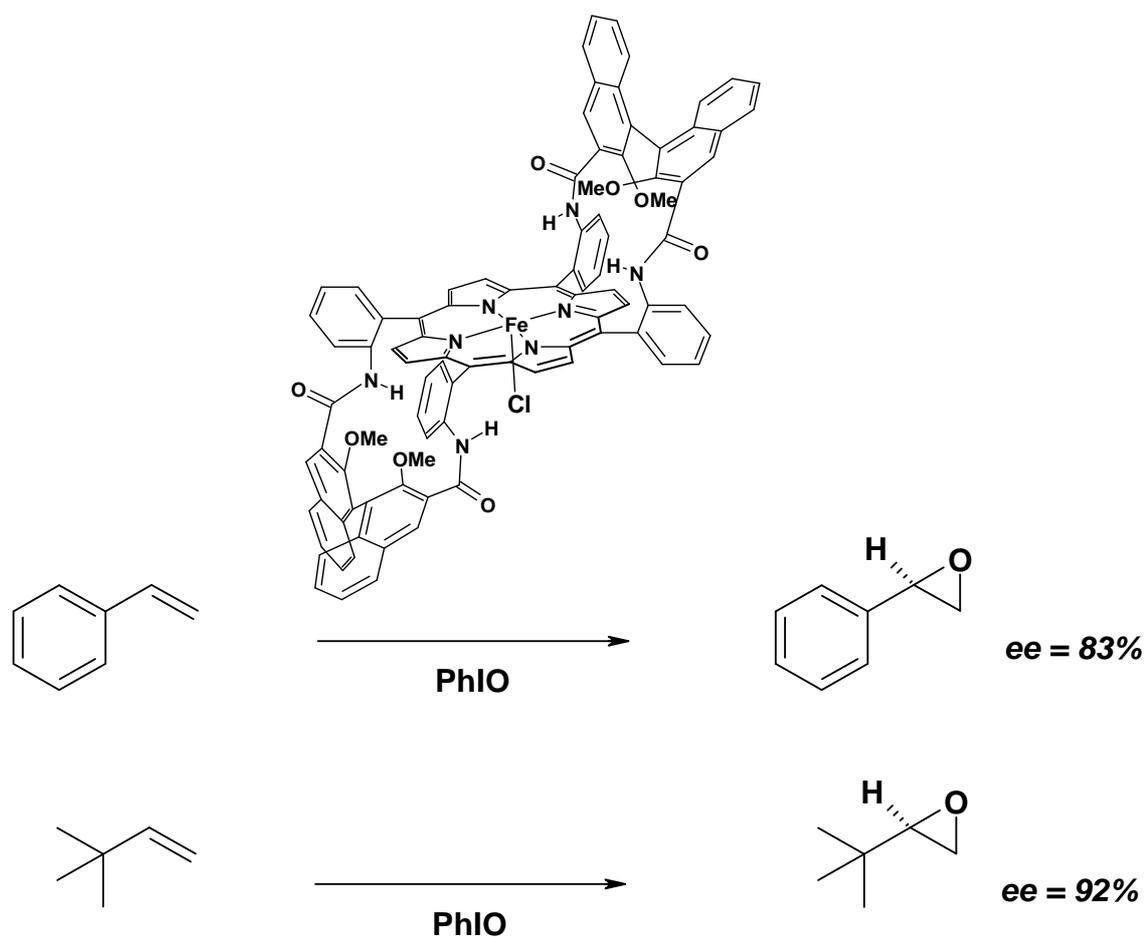


Figure I-26 : Exemples d'époxydations asymétriques d'après Rose et Coll.^[40]

Le pyrazole, le dioxygène ou encore des solutions aqueuses d'hypochlorite de sodium peuvent être également utilisés comme source d'oxygène pour ce type de réaction. D'autre part, la présence sur la porphyrine de groupements volumineux, en limitant la formation de dimères inactifs de type μ -oxo, conduit à des catalyseurs ayant une plus longue durée de vie.

Momenteau et coll. ont décrit des métalloporphyrines glycosylées présentant d'intéressantes propriétés de catalyse d'époxydation asymétrique^[41].

4-1-2 Réactions d'hydroxylation

Il est maintenant clairement établi que, dans les organismes vivants, les enzymes de la famille du cytochrome P450 peuvent convertir des alcanes en alcools avec souvent une grande régio et stéréosélectivité^[42]. Les chercheurs ont donc imaginé des macrocycles tétrapyrroliques capables de catalyser l'insertion sélective d'atomes d'oxygène dans des liaisons carbone-hydrogène inactivées dans des conditions douces.

Des études ont montré que, contrairement aux réactions d'époxydations décrites précédemment, le mécanisme de l'hydroxylation catalysée par des métalloporphyrines fait intervenir des espèces radicalaires^[43].

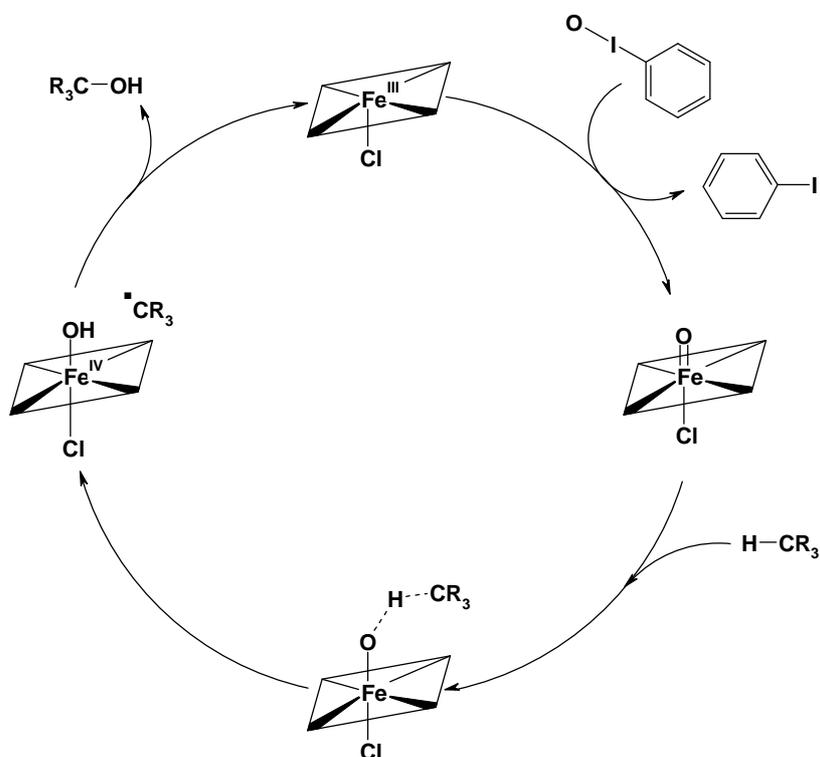


Figure I-27 : Mécanisme d'hydroxylation catalysée par une porphyrine de fer III.

Si l'époxydation énantiosélective catalysée par des porphyrines métallées chirales a été largement décrite dans la littérature, en revanche peu de résultats ont été présentés concernant l'hydroxylation d'alcane en alcools optiquement actifs. Groves et Viski ont étudié l'hydroxylation asymétrique de l'éthylbenzène catalysée par une binaphtylporphyrine de fer en présence d'iodosylbenzène. Nous pouvons également citer comme exemple

l'hydroxylation spécifique de certaines liaisons C-H de stéroïdes. Ainsi, Grieco et Stuck^[44] ont réalisé l'hydroxylation en position C9 et/ou C12 de 5- α -androstanes liés de façon covalente à une porphyrine de manganèse (III) (figure I-28).

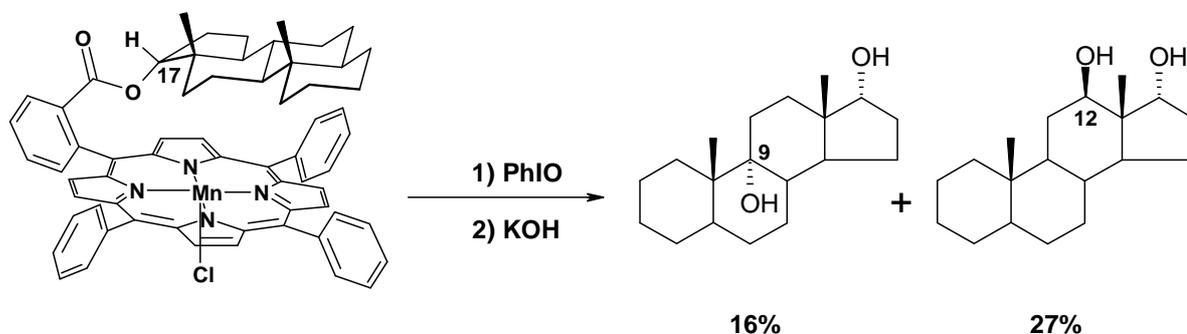


Figure I-28 : Mécanisme d'hydroxylation catalysée par une porphyrine de fer III.

L'hydroxylation régiosélective de stéroïdes est également possible en utilisant comme catalyseur des porphyrines de manganèse substituées par des cyclodextrines ou des cyclophanes^{[45],[46]}.

4-2 Porphyrines et dispositifs photoniques.

Ces dernières années, les porphyrines, métalloporphyrines et autres dérivés se sont révélés être d'excellents candidats pour la conception de dispositifs moléculaires photoniques. Dans ce domaine, le champ d'application des macrocycles tétrapyrroliques est vaste : élaboration de cristaux liquides, exploitation des propriétés d'optique non linéaire de matériaux résultant de l'assemblage de porphyrines pour le développement de système de communication optique, de stockage de données ou encore la conception de composants optoélectroniques.

4-2-1 Cristaux liquides de porphyrines

L'état de la matière appelé cristal liquide ou état mésomorphe possède à la fois des propriétés du cristal solide c'est à dire une structure ordonnée et aussi de nombreuses propriétés rhéologiques des liquides. Leur originalité tient au fait qu'il est très facile d'agir sur leur structure par des agents physiques extérieurs comme l'application d'un champ électrique. Découvert il y a plus d'un siècle, les cristaux liquides ont présenté pendant longtemps un intérêt purement académique. En revanche, depuis les années soixante dix, leur étude a connu un développement rapide pour répondre aux critères de qualité et de coût des afficheurs à cristaux liquides (LCD) qui équipe les produits issus des nouvelles technologies comme la téléphonie mobile en pleine expansion.

Il est généralement observé que des macrocycles tétrapyrroliques substitués par de longues chaînes alkyle peuvent conduire à des matériaux mésomorphes. De plus, la plupart des porphyrines, de forme discotique, impliquées dans ce type de matériaux sont généralement associées pour former un arrangement colonnaire^[47] (figure I-29).

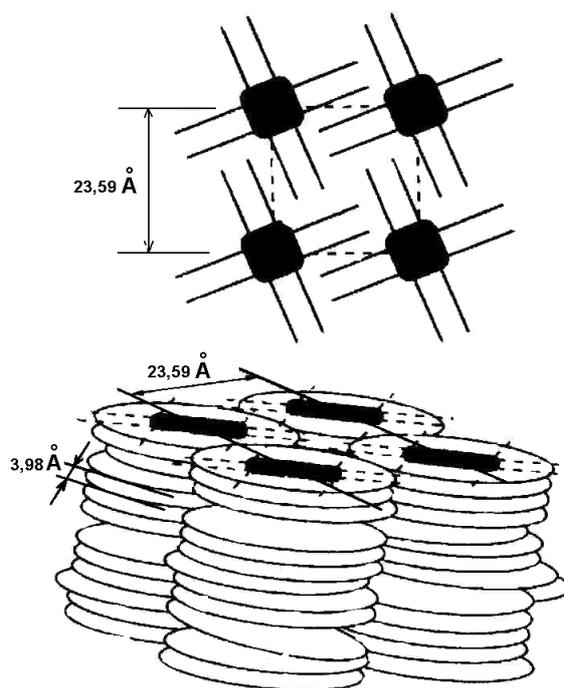


Figure I-29 : Représentation schématique de l'arrangement colonnaire d'une porphyrine de zinc discotique β -substituée par des groupements n-décyl.

De nombreuses porphyrines de synthèse ont été décrites dans la littérature pour leur comportement mésophasique. Le premier exemple rapporté dans la littérature est l'étude d'une porphyrine β -substituée par huit groupements n-dodécyle par Goodby et *coll.* en 1980^[48]. Plus tard, Fox et *coll.*^[49] ont synthétisé et étudié les propriétés physiques de plusieurs séries de porphyrines et métalloporphyrines β -substituées par huit groupes n-octyle via des liaisons éther ou ester. La formation de cristaux liquides a également été observée dans le cas de nombreuses *méso*-arylporphyrines tétra- ou disubstitués. Par exemple, la 5,10,15,20-tétra(4-n-dodécylphényl)porphyrine présente deux phases mésogéniques pour lesquelles des études de diffraction des rayons X ont montré la nature lamellaire discotique des cristaux liquides^[50]. Nous pouvons également citer comme exemple les travaux de Bruce et *coll.*^[51] (figure I-30) qui en 1997 ont présenté plusieurs *méso*-arylporphyrines di-substituées par de longues chaînes carbonées ayant des comportements mésophasiques intéressants.

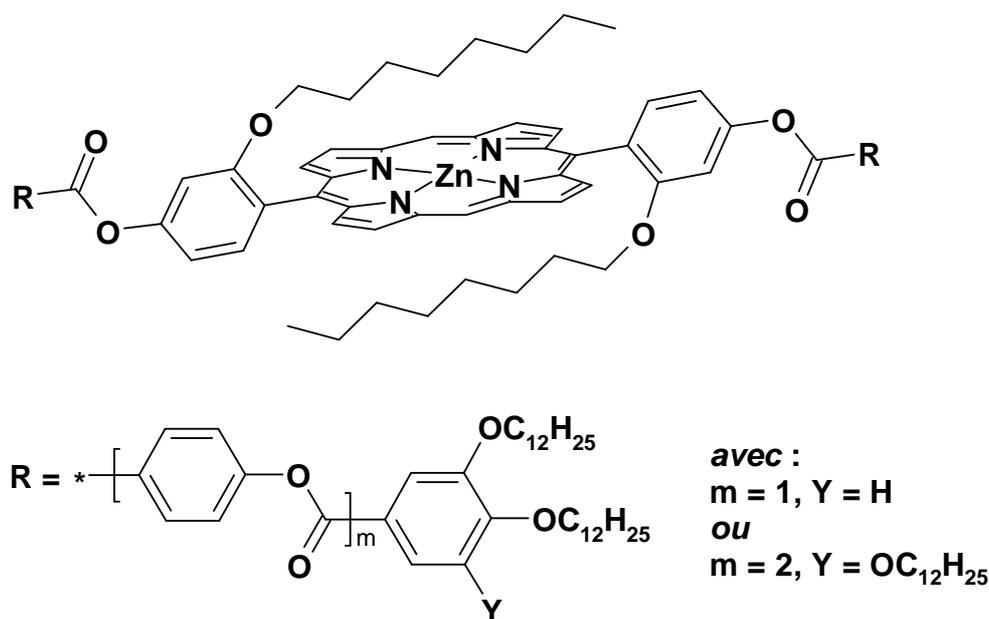


Figure I-30 : Exemple de porphyrine présentant plusieurs mésophases.

4-2-2 Optoélectronique et porphyrines

Avec comme principal enjeu une miniaturisation toujours plus importante des composants électroniques, un des principaux objectifs de la microélectronique est la conception d'interrupteurs, de fils, de transistors ou encore de portes logiques électroniques moléculaires. Nous ne présentons ici que quelques exemples de réalisations impliquant des macrocycles tétrapyrroliques. Ainsi, l'équipe de Wasielewski^[52] a présenté en 1996 un prototype d'interrupteur moléculaire basé sur le transfert électronique photo-induit dans un système de type donneur-accepteur. Plusieurs exemples de fils moléculaires constitués d'un enchaînement linéaire de porphyrines ont également été décrits dans la littérature. Crossley et Burn^[53] ont préparé un fil moléculaire composé de plusieurs méso-arylporphyrines liées entre elles de manière covalente sur les positions β -pyrroliques par l'intermédiaire d'un système aromatique coplanaire. Lindsey et Wagner^[54] ont quant à eux élaboré un fil moléculaire photonique formé par l'enchaînement de méso-arylporphyrines de zinc liées entre elles grâce à des ponts éthyne. Ce fil photonique comporte à une de ses extrémités un chromophore de type dipyrrométhène de bore qui constitue l'entrée du système et à l'autre extrémité une porphyrine base libre (figure I-31). L'absorption d'un photon par le chromophore situé à l'entrée engendre l'émission d'un autre photon à la sortie du fil. Le rendement en transmission d'énergie est de l'ordre de 76% pour ce dispositif.

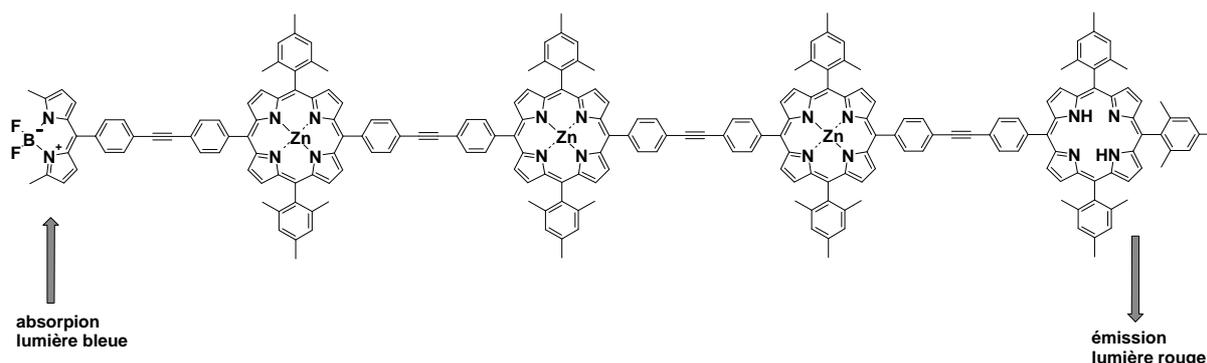


Figure I-31 : Exemple de fil moléculaire constitué de porphyrines.

Ces quelques exemples de résultats significatifs témoignent de l'intérêt sans cesse grandissant que les chercheurs portent aux macrocycles tétrapyrroliques pour des applications en photonique.

4-3 La photothérapie dynamique des cancers

4-3-1 Principe

Le principe de la photothérapie dynamique des cancers est basé sur l'utilisation de photosensibilisateurs, comme des porphyrines, rendus cytotoxiques par irradiation lumineuse (figure I-32). Les macrocycles tétrapyrroliques, généralement photosensibles, sont très largement étudiés pour leur application dans la détection ou le traitement de certains type de cancers. En effet, certaines porphyrines ont naturellement tendance à se concentrer dans les tumeurs cancéreuses et pas ou peu dans les tissus sains environnants. De telles molécules qui sont inoffensives à l'obscurité peuvent devenir très toxiques si, en présence d'oxygène, elles sont excitées par une source de lumière. Ainsi, l'irradiation d'un tissu présentant une tumeur devrait permettre de détruire les cellules cancéreuses, enrichies en porphyrines, tout en préservant les tissus sains dépourvus de chromophores. Cette technique implique que la zone à traiter soit accessible à la source d'irradiation directement ou par voie endoscopique

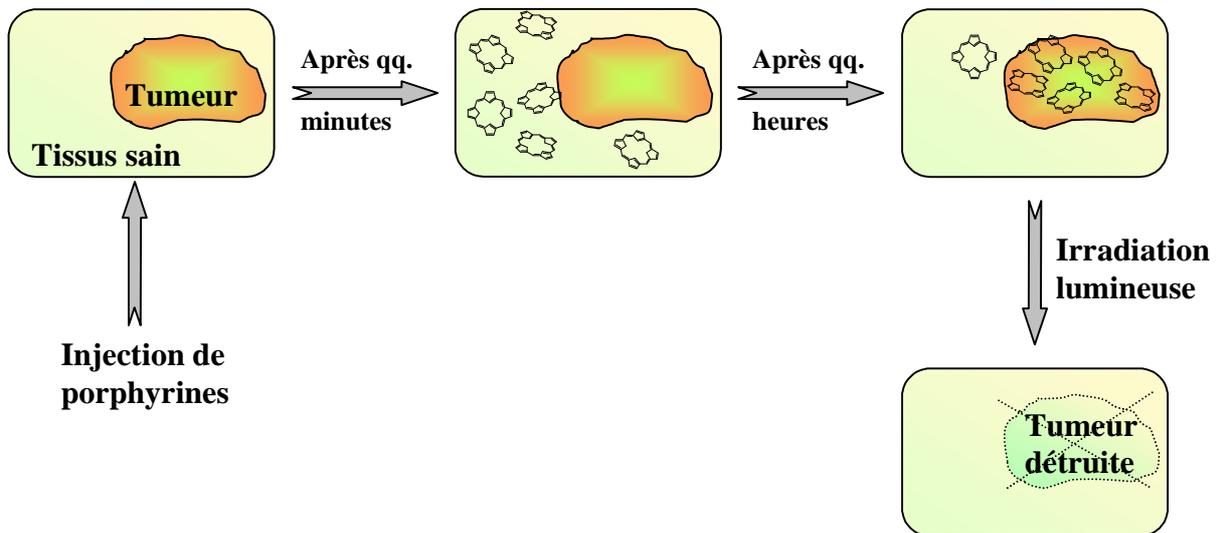


Figure I-32 : Représentation schématique du principe de la PDT.

4-3-2 Bref historique.

En 1900, Raab^[55] fut le premier à observer la sensibilisation de tissus d'origine animale par une irradiation lumineuse. Le concept de photothérapie dynamique est apparu trois années plus tard avec les travaux de Tappeiner et Jesionek^[56] mentionnant l'utilisation

conjuguée de l'éosine et de la lumière du soleil pour le traitement de cancers de la peau. En 1908, Hausmann^[57] montrent que des souris deviennent sensibles à une injection d'hématoporphyrine (HP) si elles sont exposées à la lumière et que la sensibilité est fonction de la quantité de sensibilisateur et de lumière. Cinq ans plus tard, Meyer-Betz^[58] s'injecte 200 mg d'hématoporphyrine et ressent pendant deux mois une forte sensibilité qui se traduit par un œdème et une hyperpigmentation. En 1924, la fluorescence rouge observée dans des tumeurs après irradiation par une source de lumière ultraviolette est attribuée par Policard^[59] à l'accumulation de porphyrines endogènes dans les cellules cancéreuses. Les travaux de Figge^[60] sont les premiers à montrer le potentiel des porphyrines, notamment de l'hématoporphyrine pour le traitement de certains types de cancers, néanmoins Lipson^[61] note que le manque de spécificité de ce chromophore pour les tissus cancéreux peut engendrer de graves lésions des tissus sains environnants lors du traitement photodynamique. Ces résultats les ont conduits à imaginer la synthèse d'un dérivé de l'hématoporphyrine noté HpD qui se révèle plus sélectif et qui permet une bonne localisation des cellules cancéreuses. Dans les années 70, Dougherty, Diamond, Kelly et Snell^[62] ont montré qu'il était possible de détruire une tumeur cancéreuse par l'action conjuguée de la HpD et de la lumière. Parallèlement à ces travaux, Weishaupt^[63] montre que l'absorption d'énergie lumineuse par la HpD provoque la formation d'oxygène singulet qui permet la destruction des tissus. En 1984^[64], Dougherty a obtenu par purification un sous-mélange de la HpD qu'il a appelé la dihématoporphyrine éther notée DHE plus connue sous le nom de Photofrin II[®] qui est un photosensibilisateur utilisé cliniquement de nos jours.

De nombreux laboratoires de part le monde travaillent à l'élaboration de nouveaux sensibilisateurs. Leur développement doit prendre en compte un certain nombre de critères comme :

- ✓ le composé doit être si-possible pur ou s'il s'agit d'un mélange il doit être parfaitement défini,
- ✓ une grande sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses pour ne pas détériorer les tissus sains environnants,
- ✓ une non toxicité en absence de lumière,
- ✓ une forte absorption dans le domaine du visible,
- ✓ une durée de vie plasmatique suffisamment longue,
- ✓ le composé doit induire la formation d'oxygène singulet...

4-3-3 Le processus photochimique

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les porphyrines absorbent la lumière rouge à une longueur d'onde voisine de 630nm. Ainsi, irradiée par une source de lumière à cette longueur d'onde, le photosensibilisateur passe de l'état fondamental à un état électronique singulet excité. A partir de là, soit le photosensibilisateur retourne à l'état fondamental avec émission de fluorescence soit, si la durée de vie de l'état singulet (figure I-33) est suffisamment longue (ce qui est le cas pour de nombreuses porphyrines) le photosensibilisateur passe dans un état excité triplet par inversion de spin électronique. Dans ce cas, le retour à l'état fondamental, transition théoriquement interdite, est très lent. La porphyrine peut se désactiver par phosphorescence ou en réagissant avec son environnement selon deux types de mécanismes :

- Le mécanisme dit de type **I** implique la participation du photosensibilisateur dans un processus de transfert d'électrons avec des substrats biologiques pour former des radicaux et des ions radicaux qui, après interaction avec l'oxygène, fournissent des espèces réactives de l'oxygène comme des ions superoxydes O^{2-} .
- Le mécanisme de type **II** implique quant à lui le transfert de l'énergie d'excitation vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour former une espèce d'oxygène excité de courte durée de vie mais extrêmement réactive qui est l'oxygène singulet^[65]. Ce dernier peut diffuser sur de courtes distances et réagir avec des substrats environnants comme par exemple certains acides aminés ce qui induit une altération de bon nombre de protéines membranaires. Il peut également conduire à la *peroxydation* de lipides insaturés.

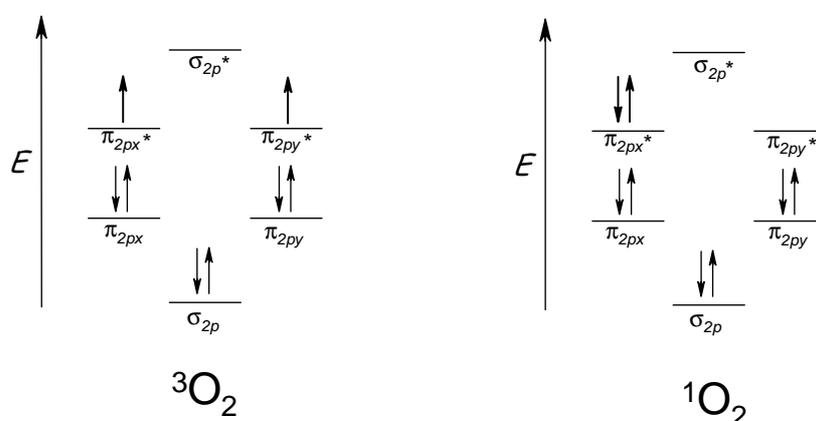


Figure I-33 : Distribution des électrons pour l'oxygène à l'état triplet et singulet.

Il est maintenant couramment admis que l'oxygène singlet est l'agent toxique principal en PDT bien que sa production soit extrêmement difficile à quantifier dans les milieux biologiques.

L'ensemble de ces processus va provoquer l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, d'un point de vue structural mais aussi métabolique ce qui va entraîner la mort de la cellule. Les mitochondries semblent être une cible majeure de la photothérapie dynamique mais d'autres cibles comme les membranes, les lysosomes ou encore le noyau ont été identifiées. En effet, il a été montré que la PDT pouvait se traduire directement ou indirectement par de très sérieux dommages de l'ADN.

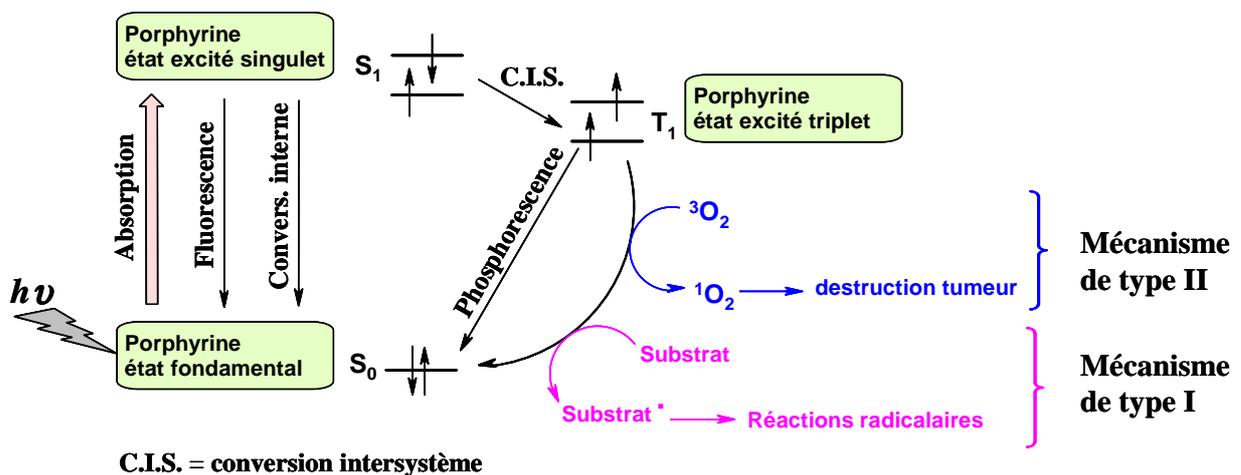


Figure I-34 : Mécanisme photochimique de la PDT^[66].

4-3-4 Les photosensibilisateurs actuellement utilisés en PDT.

A l'heure actuelle, deux photosensibilisateurs ont reçu l'agrément de l'Union Européenne pour leur utilisation dans le traitement clinique de cancers : le PHOTOFRIN II[®] en 1996 et plus récemment le FOSCAN[®] en 2002 (figure I-35).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la HpD est un mélange complexe obtenu par traitement de l'hématoporphyrine avec de l'acide acétique et de l'acide sulfurique puis par dissolution des produits acétylés formés dans une base alcaline. Une analyse par HPLC du mélange révèle la présence de plusieurs monomères parmi lesquels l'hématoporphyrine, l'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine ou encore la protoporphyrine mais aussi de nombreux oligomères (de 2 à plus de 10 unités) formés de ponts éthers, esters ou carbone-carbone. Ces monomères ne présentent pas de sélectivité pour les tumeurs. Le Photofrin II[®], sensibilisateur dit de première génération, est issu de la purification partielle par chromatographie de la HpD. Il contient sensiblement moins de monomères que la HpD. Dougherty et *coll.*^[64] ont synthétisé une série de dimères et trimères liés par des ponts éthers et esters afin d'identifier la fraction active du Photofrin. Leurs travaux ont montré que seuls les dimères et trimères pont éther présentent une activité anti-tumorale significative. Si les propriétés anti-tumorales du Photofrin[®] sont incontestables, l'utilisation de ce dernier révèle un certain nombre de limites. Son manque de sélectivité relatif pour les cellules cancéreuses est responsable d'une photosensibilité cutanée importante des patients traités. De plus, l'inadéquation relative entre sa longueur d'onde d'absorption maximale et les exigences liées à la pénétration tissulaire de la lumière limite son utilisation à des traitements superficiels.

La tétra-(*mé*ta-hydroxyphényl)chlorine, ou Foscan[®] (notée *m*-THPC), sensibilisateur dit de seconde génération, a été commercialisé en 2002. Ce photosensibilisateur présente de nombreux avantages par rapport au Photofrin. D'une part, il s'agit d'un composé pur ce qui limite les incertitudes des résultats pouvant être liés à la composition du médicament. D'autre part, il se caractérise par un coefficient d'extinction molaire vingt fois supérieur à celui du Photofrin[®] dans le rouge à 652 nm. A cette longueur d'onde, l'irradiation lumineuse pénètre plus profondément à l'intérieur des tissus traités ce qui lui confère un plus vaste domaine d'application. En outre, la durée de vie de l'état triplet de la *m*-THPC est sensiblement plus longue ce qui permet la production d'un plus grand nombre d'espèces réactives de l'oxygène. Toutes ces propriétés, associées à une plus grande sélectivité pour les cellules cancéreuses permettent à l'heure actuelle d'utiliser le Foscan[®] efficacement dans le traitement photodynamique de nombreux types de cancers comme des tumeurs des systèmes gastrique et respiratoire, de la tête, du cou ou encore du sein^[67].

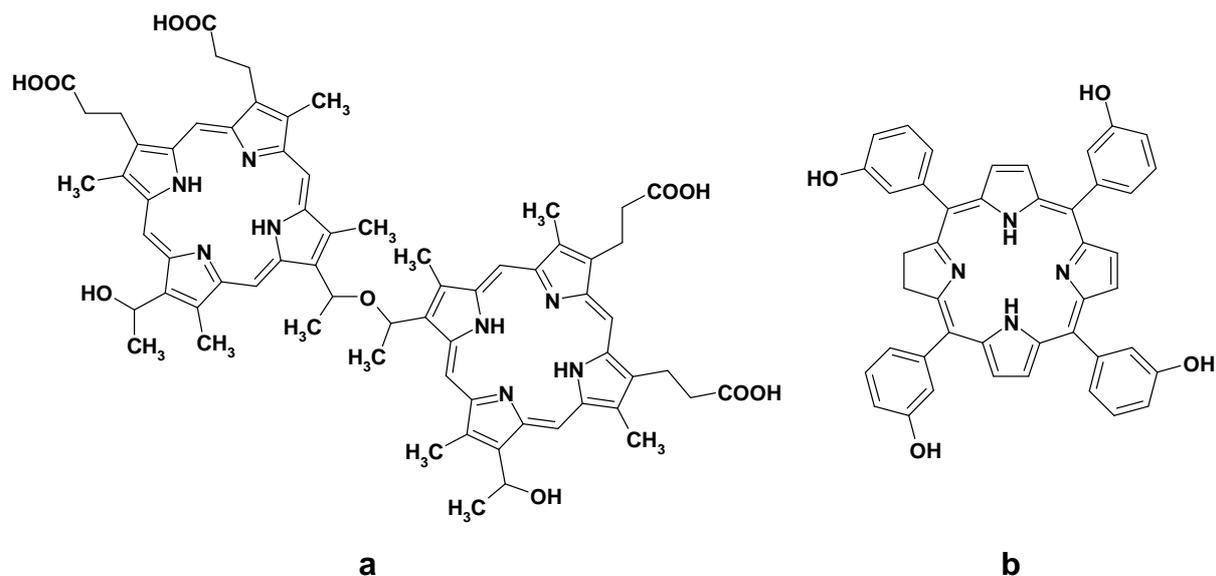
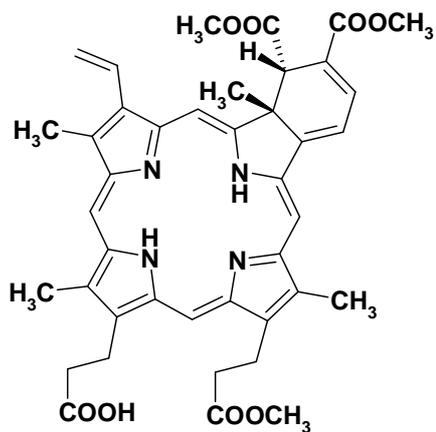


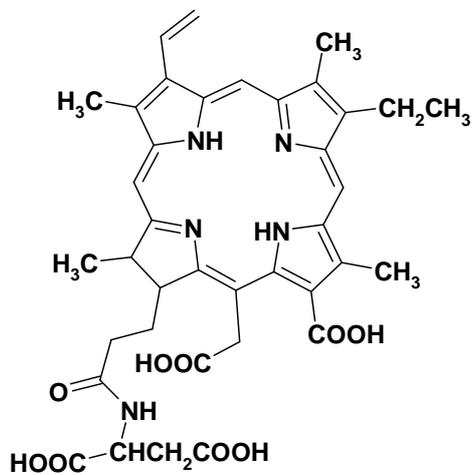
Figure I-35 : a- Une structure active du Photofrin[®], b- Foscan[®].

Plusieurs autres sensibilisateurs de seconde génération sont actuellement en phase de développement clinique. Nous citerons comme exemples, le Levulan[®] ou acide 5-aminolévulinique, précurseur de la protoporphyrine, pour lequel des essais cliniques de phase II montrent une activité fort intéressante pour le traitement de psoriasis et de carcinomes basocellulaires ou encore le Lutrin[®], téxaphyrine de lutétium, sensibilisateur en phase II d'essais cliniques pour le traitement de cancer du sein^[68]. Les purpurines, les benzoporphyrines ou encore les phtalocyanines, macrocycles tétrapyrroliques étendus, sont également d'excellents candidats pour la photothérapie dynamique. Ces molécules présentent une absorption importante aux grandes longueurs d'ondes et sont généralement plus stables que les chlorines. Ainsi, la BPD-MA, (une benzoporphyrine) et l'éthylétiopurpurine d'étain (notée SnET₂) sont en phase II et III d'essais cliniques^[69]. De nombreuses autres molécules comme la chlorine Npe6 font actuellement l'objet d'études précliniques.

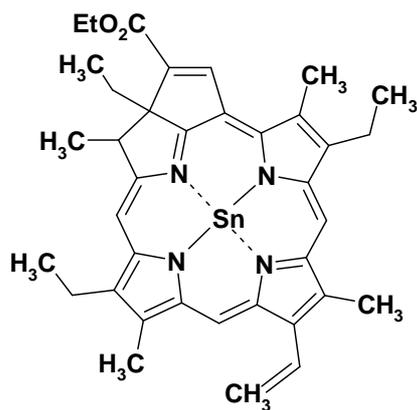
La plupart de ces photosensibilisateurs s'accumulent plus rapidement et plus sélectivement que le Photofrin[®] dans les tissus tumoraux. En outre, cette sélectivité peut être, dans bien des cas, améliorée en associant les sensibilisateurs à des liposomes ou des groupements permettant de cibler les cellules cancéreuses.



**Benzoporphyrine dérivée
BPD-MA (λ_{\max} = 690 nm)**



**N-aspartylchlorine e₆
NPe6 (λ_{\max} = 654 nm)**



**Ethylètiopurpurine d'étain
SnEt₂ (λ_{\max} = 650 nm)**

Figure I-35 : Une sélection de photosensibilisateur de seconde génération.

4-3-5 Applications thérapeutiques autres que la PDT des cancers.

Certaines porphyrines cationiques présentent une forte affinité pour l'ADN et sont capables de causer, par voie chimique ou photochimique des coupures simple ou double brin. Des études assez récentes ont démontré que la photosensibilisation de virus par des composés porphyriniques conduisait à leur inactivation. Ainsi, Perlin et *coll.*^[70] ont montré que certains virus pouvaient être inhibés *in vivo* par traitement photodynamique à l'aide de doses d'hématoporphyrine très peu toxiques pour les cellules saines. Les résultats les plus significatifs ont été observés avec le virus influenza A et le virus *herpès simplex* de type 1. Certains dérivés d'amino- ou hydroxyphénylporphyrines possèdent une activité inhibitrice du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Dans ce cas, l'activité n'est pas photochimique mais semble liée à l'inhibition de la rétrotranscriptase virale^[71].

Une étude menée dans notre laboratoire a montré l'effet antibactérien de porphyrines base libre sur des bactéries Gram positif^[72]. L'inhibition de bactéries Gram négatif est également possible par l'utilisation conjuguée d'un photosensibilisateur et d'un nonapeptide (PMNP)^[73] dont le rôle est de désorganiser la membrane bactérienne ce qui permet à la porphyrine de pénétrer à l'intérieur de la bactérie.

Le médicament photosensibilisateur le plus efficace actuellement ne concerne pas, curieusement, le traitement anticancéreux mais un traitement de la cécité. En effet, la vertéporfine plus connue sous le nom de Visudyne, agréée en avril 2000, est utilisée contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)^[74]. La DMLA est une maladie dégénérative de la rétine qui atteint un à deux pour cent des 50-60 ans et jusqu'à vingt pour cent des personnes âgées de plus de 80 ans. Dans la forme la plus grave, des vaisseaux sanguins anormaux non étanches prolifèrent sous la rétine ce qui altère la vision centrale. Jusqu'à présent, le seul traitement ayant fait ces preuves était la photocoagulation des néovaisseaux par un laser thermique. Malheureusement, le laser brûle une petite partie de la rétine. La vertéporfine a la faculté de s'accumuler très rapidement dans les vaisseaux rétiniens anormaux. Ainsi, l'activation du photosensibilisateur par un laser rouge non thermique entraîne l'obstruction des vaisseaux tout en épargnant la rétine. Les vaisseaux qui repoussent peuvent être régulièrement détruits par des traitements ultérieurs. Bressler et *coll.*^[75] ont montré que la thérapie photodynamique peut être administrée six ou sept fois sur une période de trois ans sans endommager la rétine.

5 – But du travail

Monsigny et coll.^[76] ont montré que certaines cellules cancéreuses sont enrichies en récepteurs glucidiques spécifiques tels que des lectines membranaires. Suite à ces travaux de nombreuses études effectuées au sein de notre laboratoire^[77] ont montré que les porphyrines glycosylées sont de bonnes candidates à la photothérapie dynamique dans la mesure où la présence d'unité glucidique assure une meilleur sélectivité et permet d'accroître le caractère amphiphile de la molécule, ce qui est favorable d'une part au transport du photosensibilisateur vers la tumeur et d'autre part à sa pénétration et à sa rétention au sein des cellules cancéreuses^[78]. Sur la base de ces résultats, et en cherchant à améliorer le système, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à d'autres cibles, liées à la vascularisation tumorale.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) est essentielle pour assurer le transport de l'oxygène, des éléments nutritifs et des déchets lorsque de nouveaux besoins se manifestent dans l'organisme. Celle-ci est stimulée dans de nombreuses situations pathologiques et notamment lors du développement de tumeurs cancéreuses. En effet, il a été montré que l'implantation de fragments de tumeurs dans la cornée de lapin a permis de mettre en évidence la capacité des cellules cancéreuses à stimuler l'angiogénèse^[79]. D'un point de vue macroscopique on peut distinguer schématiquement deux types d'organisation vasculaire :

- Une vascularisation périphérique associée à des vaisseaux pénétrant à l'intérieur de la tumeur. C'est le cas le plus fréquent représenté figure I-36.
- Une vascularisation centrale de la tumeur suivant une organisation vasculaire de type hilair qui existe plus rarement.

Les néo-vaisseaux s'opposent radicalement au réseau vasculaire non pathologique. Le néo-réseau tumoral présente un aspect désordonné voir chaotique. En outre, ces vaisseaux sont dilatés et présentent de nombreuses tortuosités alors que dans les réseaux non pathologiques les artérioles sont parfaitement rectilignes et les veinules ne sont que très peu sinueuses. Enfin, la plupart des vaisseaux situés dans la tumeur apparaissent particulièrement fragiles et relativement perméables ce qui permet aux cellules cancéreuses de migrer dans l'organisme par voie sanguine et d'établir des métastases.

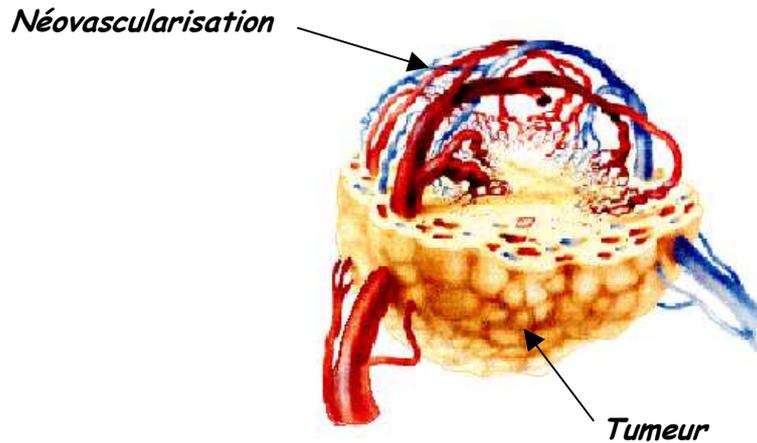


Figure I-36 : Représentation schématique du réseau vasculaire irriguant une tumeur.

L'adhésion des cellules endothéliales constitutives des vaisseaux sanguins tumoraux à la matrice extracellulaire (MEC) est en partie assurée par des glycoprotéines transmembranaires appelées intégrines. Les intégrines sont constituées de deux sous-unités, notées α et β , associées de manières non covalentes suivant diverses combinaisons. Il a été montré que les cellules endothéliales des néo-vaisseaux ainsi que de nombreuses cellules cancéreuses comme les ostéosarcomes, les neuroblastomes ou encore les carcinomes de la langue surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ce dernier étant très peu présent sur les tissus sains^[80]. En outre, il est connu que les intégrines sont capables de se fixer à la MEC par l'intermédiaire de la séquence d'acides aminés Arginine-Glycine-Ac. Aspartique (RGD)^[81]. La conformation de ce tripeptide présent dans les protéines de la MEC est déterminante : elle gouverne la sélectivité de chaque intégrine pour les constituants de la matrice extracellulaire. Ainsi, Ruoslahti et coll.^[82] ont montré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, spécifique de la vitronectine, présente une très forte affinité pour les peptides cycliques CRGDC et CDCRGDCFC. Dans les deux cas, la présence de ponts disulfures entre les unités de cystéines impose à la séquence Arginine-Glycine-Ac.Aspartique, une conformation relativement rigide. De plus, ils ont montrés qu'il est possible d'améliorer significativement la sélectivité d'une drogue anti-cancéreuse, la doxorubicine, vis-à-vis de cellules cancéreuses en utilisant comme vecteur l'un ou l'autre de ces peptides liés de manière covalente à la molécule active^[83].

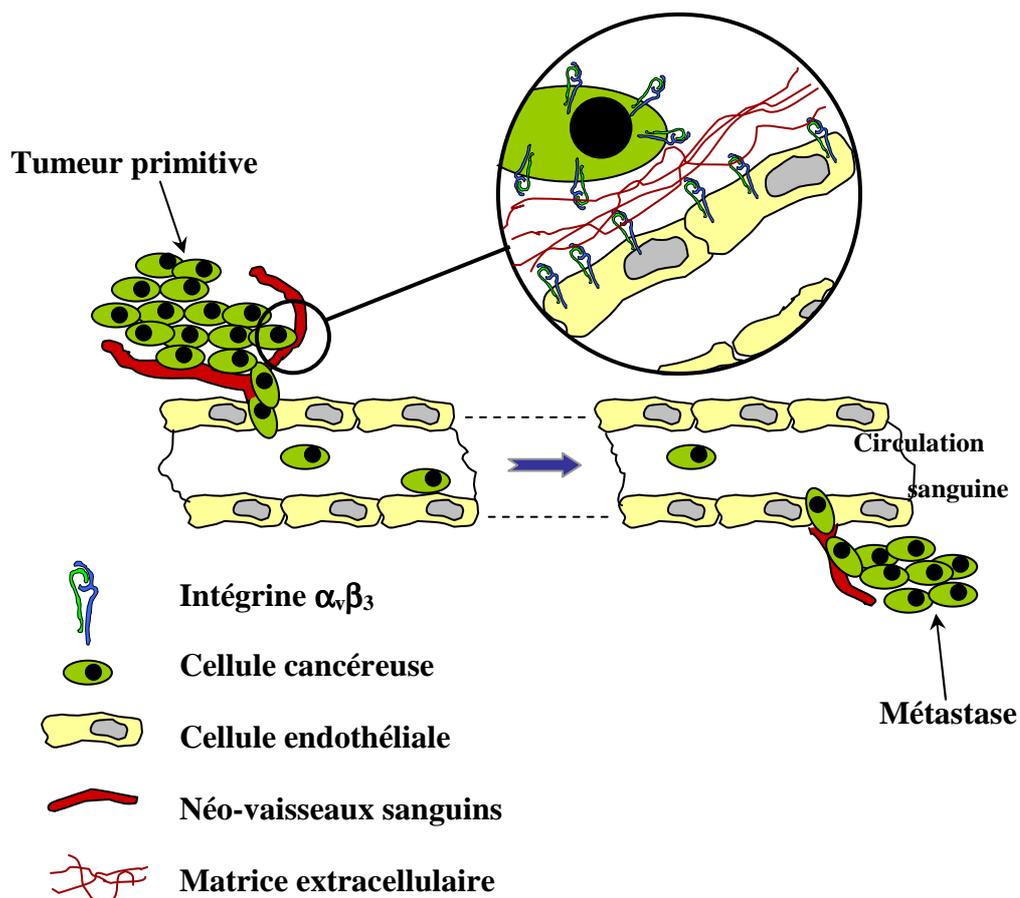


Figure I-37 : Implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans le développement tumoral.

Ces dernières années, de nombreuses autres équipes ont isolé plusieurs peptides simples à motif RGD présentant également une bonne sélectivité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ^[84].

Nous avons donc pensé que cette stratégie thérapeutique pouvait être adaptée efficacement à la PDT des cancers : la présence de la séquence RGD sur le photosensibilisateur devrait assurer la reconnaissance des tumeurs cancéreuses, réduisant ainsi les problèmes liés au manque relatif de sélectivité qui caractérise la plupart des porphyrines actuellement développées. En outre, comme nous l'avons mentionné précédemment, la présence d'unités glucidiques devrait permettre d'augmenter le caractère amphiphile des molécules.

Sur la base de tous ces résultats, nous avons développé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles la synthèse de porphyrines peptidiques glucosylées portant le motif RGD. Ainsi, nous avons synthétisé dans un premier temps une série de tritolyles et triglycosylporphyrines portant la séquence peptidique RGD (figure I-38-a) puis, dans un deuxième temps, des mésotriglycosylporphyrines portant un pentapeptide cyclique insaturé comportant le motif RGD (figure I-38-b). Pour compléter ce travail, nous avons synthétisé un

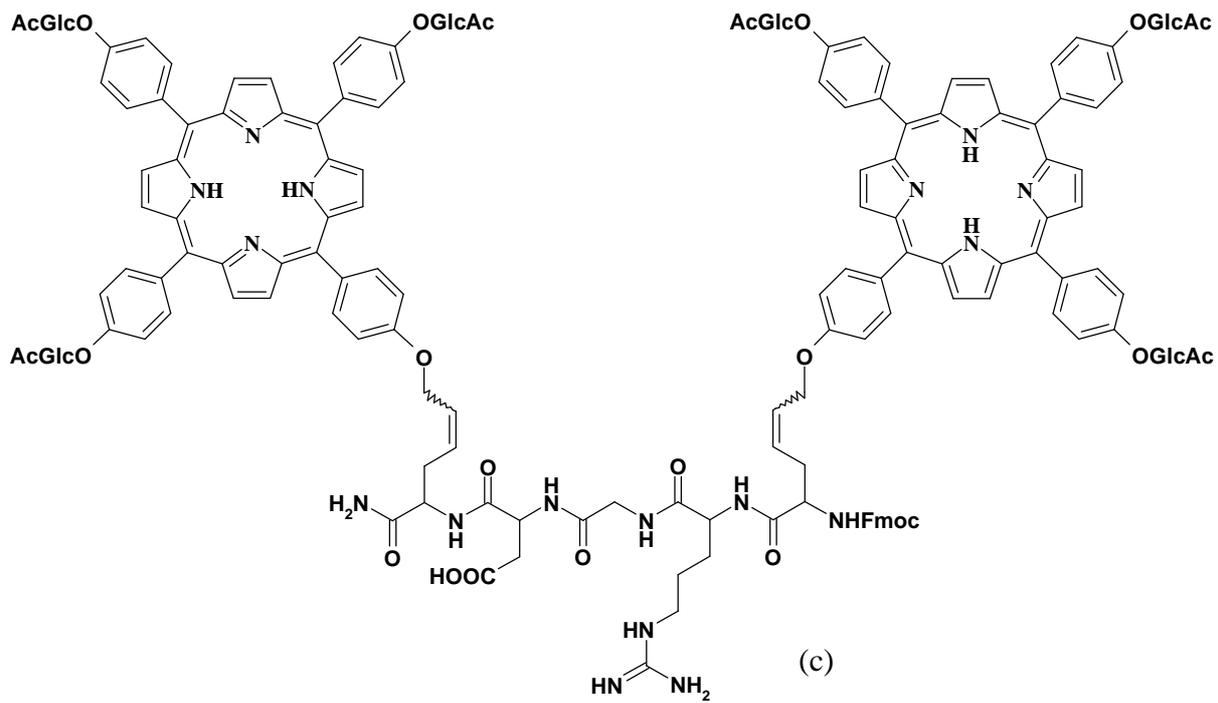


Figure I-38-c : Structures des composés finals synthétisés au cours de ce travail.

SYNTHÈSE DE TRITOLYLES ET TRIGLUCOSYLES PORPHYRINES PORTANT LE TRIPEPTIDE RGD

1 – Introduction

Dans le cadre du programme défini précédemment (*chapitre I*), nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la synthèse et à la caractérisation structurale des porphyrines **12a,b** et **14a,b** (figure II.1). Ces composés sont des *méso*-tritolyloxy et des *méso*-triglucoxyloxy porphyrines portant le motif peptidique RGD lié au macrocycle par l'intermédiaire d'une chaîne alkyle placée en position *ortho* ou *para* du groupement phényle.

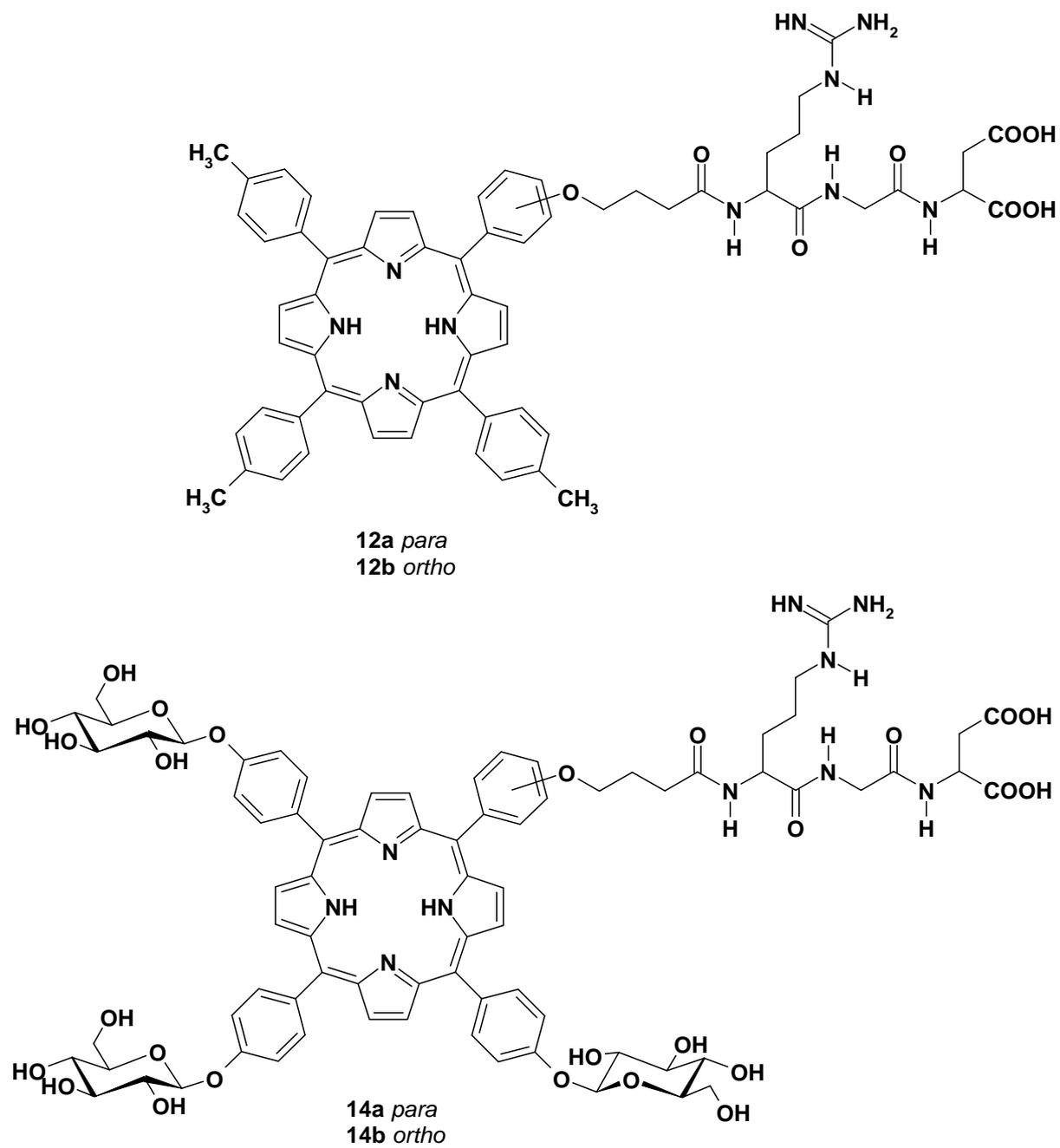


Figure II-1 : Structure des composés synthétisés.

2 – Etude préliminaire – Stratégie de synthèse.

2-1 Etude préliminaire par modélisation moléculaire

Comme nous l'avons précisé au chapitre I, la spécificité d'un peptide à motif RGD pour une intégrine donnée dépend essentiellement de la conformation adoptée par la séquence peptidique Arginine-Glycine-A.Aspartique. Il existe dans la littérature de très nombreux travaux traitant des interactions intégrines-ligands^[85]. Il est connu que ces interactions font intervenir le groupement guanidino de l'arginine et la fonction acide carboxylique en β de l'acide aspartique qui interagissent tous deux avec certains résidus de l'intégrine. Par ailleurs, il a été montré qu'une distance interatomique inférieure à 6,7Å entre les deux carbones portant les chaînes latérales de l'arginine et de l'acide aspartique est très favorable à une interaction spécifique avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (distance notée $C^{\alpha}_{Arg}-C^{\alpha}_{Asp}$ par la suite)^[86]. Ainsi, les peptides cycliques CRGDC et CDCRGDCFC présentés par Ruoslahti et *coll.* et ayant une très forte affinité pour cette intégrine possèdent cette caractéristique conformationnelle.

Dans une première étape de notre travail, nous avons cherché à estimer les caractéristiques géométriques des molécules que nous nous sommes proposé de synthétiser. Nous avons pour cela réalisé une étude par modélisation moléculaire de chaque porphyrine peptidique dans le but d'évaluer la distance interatomique $C^{\alpha}_{Arg}-C^{\alpha}_{Asp}$. Cette étude a été menée avec le logiciel de modélisation moléculaire HyperChem[®] 5.01. Nous avons utilisé le champ de force MM⁺ et le module de recherche conformationnelle Chem+. Ce dernier permet, en faisant varier aléatoirement plusieurs paramètres géométriques de la molécule, de trouver des conformations d'énergie minimale.

La conformation d'une chaîne peptidique peut être décrite par les angles dièdres notés ϕ_i , ψ_i et ω_i (figure II-2(a)). Du fait que la conformation d'une liaison peptidique est quasi exclusivement de type *trans*, les angles ω_i sont généralement égaux à 180°.

Dans un premier temps, nous avons recherché la conformation d'énergie minimale du pentapeptide cyclique CRGDC (molécule isolée, dans le vide) en faisant varier les angles ϕ_i , ψ_i et l'angle dièdre centré sur la liaison S-S, (les angles ω_i étant fixés à 180°). Nous avons ainsi obtenu une conformation d'énergie minimale présentant un tour de type $\beta II'$, et une distance interatomique $C^{\alpha}_{Arg}-C^{\alpha}_{Asp}$ de l'ordre de 6Å (figure II-2(b)), ce qui est en accord avec les résultats de la littérature^[87].

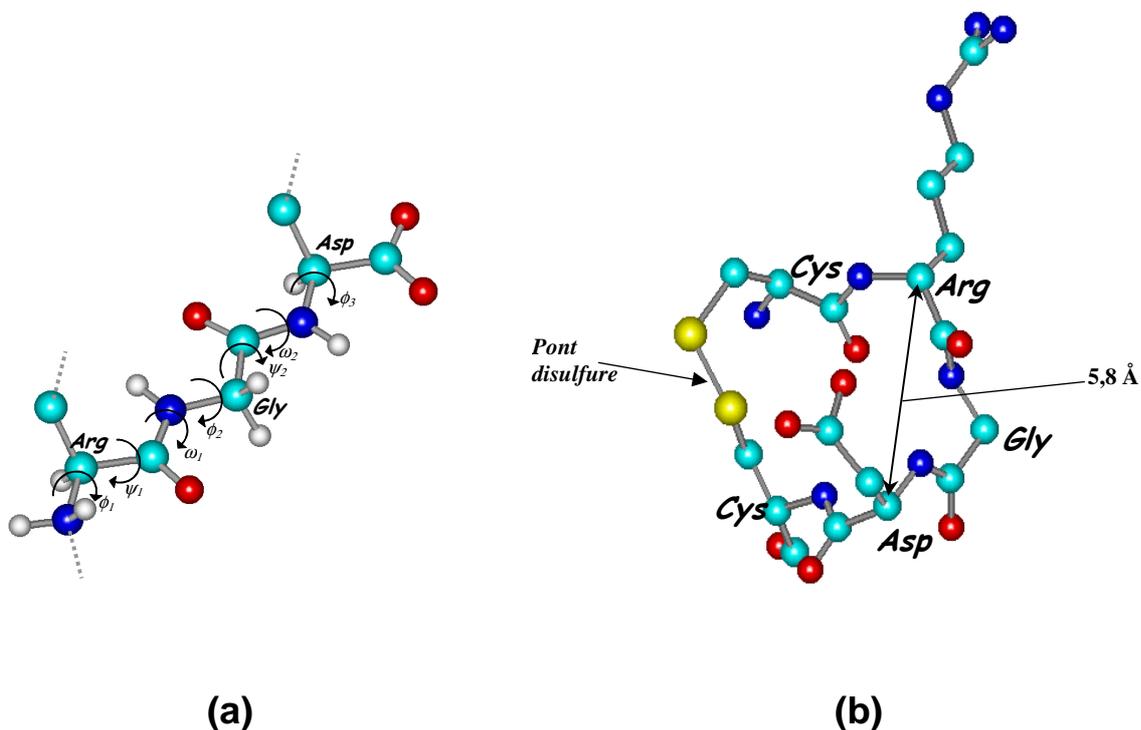


Figure II-2 : (a)-Représentation des angles dièdres qui décrivent la conformation d'une chaîne peptidique.
 (b)- Conformation d'énergie minimale du peptide CRGDC (Hyperchem[®], champ de force MM+).

Les calculs de recherche conformationnelle menés pour les porphyrines peptidiques, ont été réalisés en faisant varier les angles dièdres caractérisant le motif peptidique et également les angles dièdres qui décrivent la chaîne alkyle située entre le macrocycle et le tripeptide RGD. Dans tous les cas, on observe d'une part que le macrocycle est plan et d'autre part que les groupements phényles occupant les quatre positions *méso* et le macrocycle ne sont pas coplanaires. En outre, les résultats obtenus révèlent que les conformations d'énergie minimale résultent du repliement du peptide au-dessus du macrocycle tétrapyrrolique. Ce phénomène est couramment rencontré dans le cas de méso-arylporphyrines dans la mesure où le substituant est espacé du macrocycle par une chaîne suffisamment longue et flexible. De plus, les interactions entre le cycle porphyrinique et le tripeptide semblent imposer pour tous ces composés des distances interatomiques $C^{\alpha}_{Arg}-C^{\alpha}_{Asp}$ inférieures à 6 Å ce qui est, comme nous l'avons mentionné, favorable à la reconnaissance spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La figure II-3 représente les conformations obtenues dans le cas des triglycosylporphyrines.

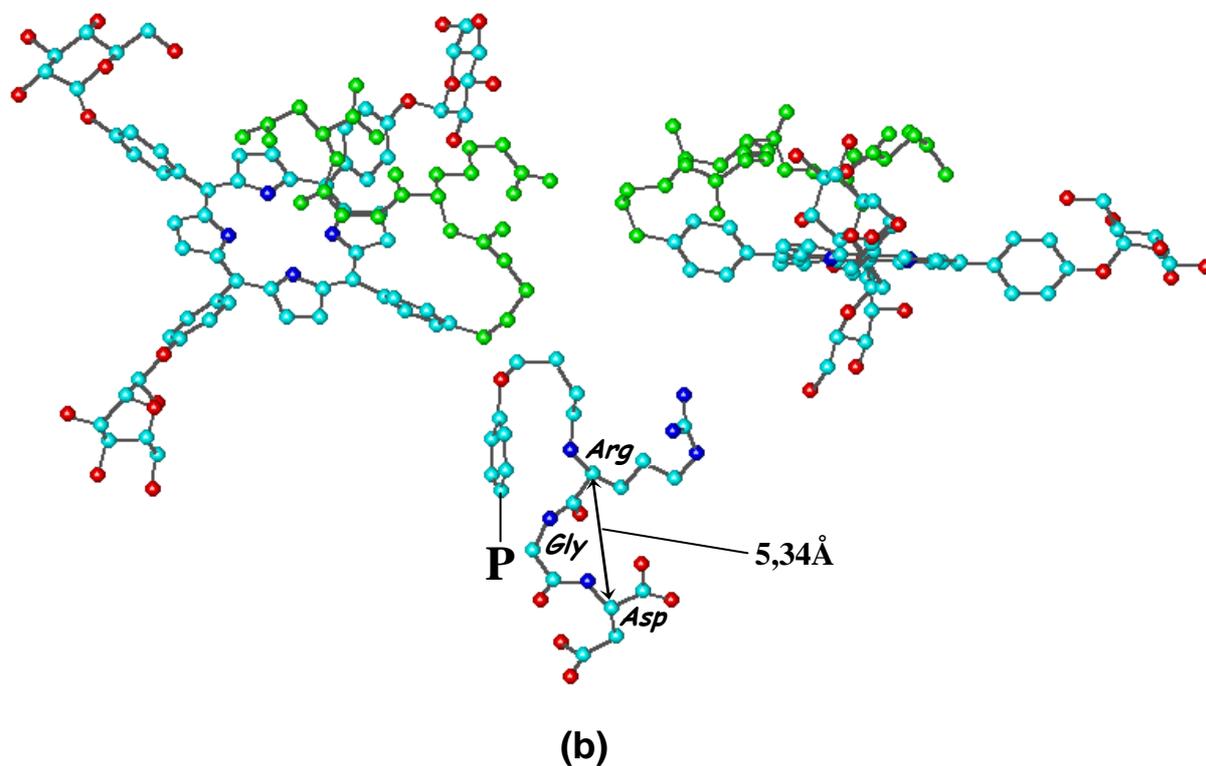
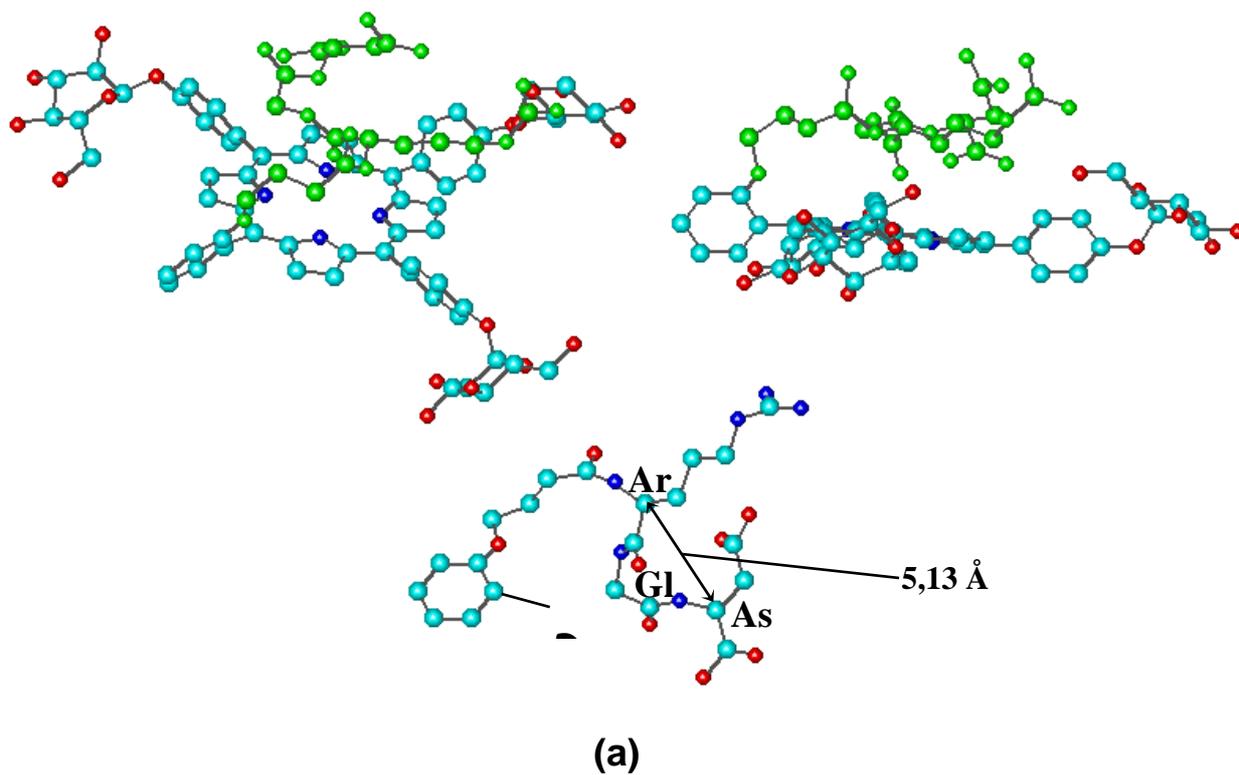


Figure II-3 : Conformations les plus stables des porphyrines triglucosylées à motif RGD :
 (a)-peptide en ortho (**14b**), (b)-peptide en para (**14a**).

2-2 Stratégie de synthèse

Les différentes étapes de synthèses de ces composés sont représentées sur le schéma rétrosynthétique de la figure II-4. Les synthons clefs sont des hydroxyphénylporphyrines *ortho* et *para* formées par condensation de pyrrole sur les aldéhydes appropriés. Après fixation d'une chaîne alkyle portant une fonction acide carboxylique, les porphyrines obtenues sont couplées au peptide RGD fixé sur résine et dont les fonctions latérales sont convenablement protégées. Les composés finals sont isolés par décrochage du support et déprotection simultanée des fonctions protégées des acides aminés.

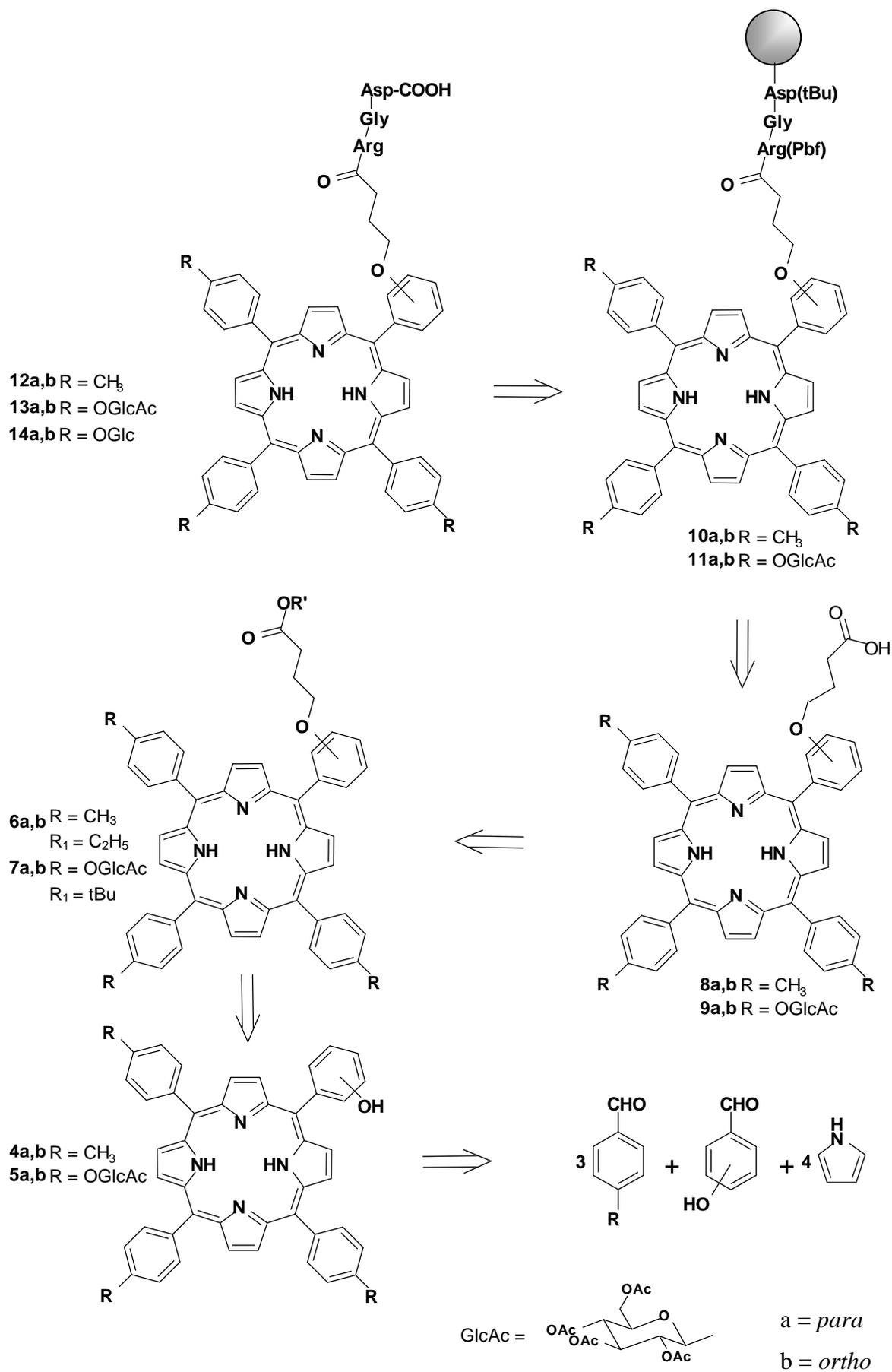


Figure II-4 : Schéma rétrosynthétique des porphyrines 12a,b et 14a,b.

3 – Synthèses de mono *ortho* et *para*-hydroxyphénylporphyrines.

3-1 Mono *ortho* et *para*-hydroxyphényltritolylporphyrines 4a,b.

Nous avons choisi pour cette synthèse la méthode dite des aldéhydes mixtes décrite par Little en 1975^[19] présentée en détail au chapitre I. Elle est bien adaptée à la synthèse de *mono*-hydroxyphényltritolylporphyrines et relativement simple à mettre en œuvre (figure II-5).

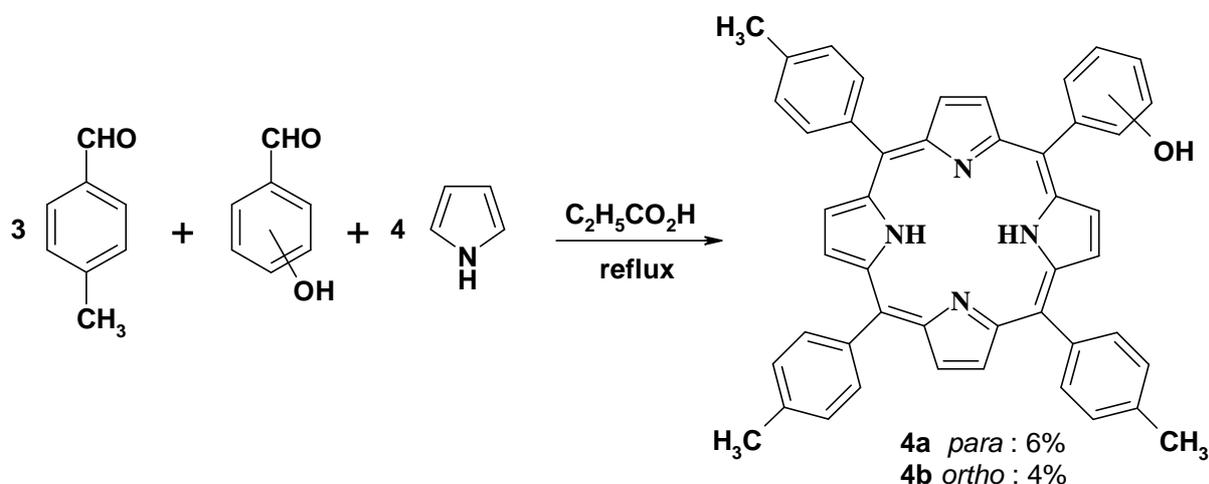


Figure II-5 : Synthèse des mésoarylhydroxyphényltritolylporphyrines 4a,b.

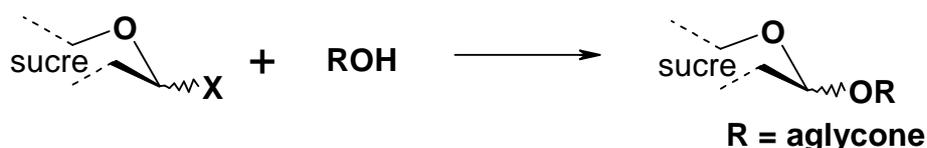
Cette méthode consiste à condenser dans l'acide propanoïque à 140°C des quantités stœchiométriques de pyrrole, de *para*-tolualdéhyde et d'*ortho* ou de *para*-hydroxybenzaldéhyde, tous les réactifs liquides étant fraîchement distillés. A l'issue de la réaction, le mélange réactionnel est laissé 18h à 5°C. La porphyrine mono-hydroxylée résultante cristallise ainsi que la tétratolylporphyrine et de petites quantités de porphyrines poly-hydroxylées. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé 4a est obtenu avec un rendement de 6%. Dans le cas du composé 4b, substitué en *ortho*, une pré-purification sur colonne de silice suivie d'une purification sur plaques préparatives de silice conduisent à la porphyrine souhaitée avec un rendement de 4%. Ces rendements faibles sont néanmoins conformes à ce type de réaction et résultent en partie de la polymérisation concomitante du pyrrole.

3-2 Mono *ortho* et *para*-hydroxyphényltrigluco-sylporphyrines 5a,b.

Pour former ces porphyrines, il est nécessaire dans une première étape de synthétiser un précurseur aldéhydique glucosylé, le 4-(2',3',4',6'tétra-*O*-acétyl- β -D-gluco-pyranosyloxy)-benzaldéhyde.

3-2-1 Synthèse du précurseur glucosylé.

a- Rappels bibliographiques.



Rappelons que la *O*-glycosylation est une réaction qui permet de modifier le carbone anomérique d'un glucide afin d'obtenir un hétéroside non réducteur comprenant le glucide et une partie non saccharidique appelée aglycone. Comme les dérivés glycosylés présentent un intérêt important en Chimie et en Biologie, leurs synthèses font l'objet d'une littérature très abondante. Si la réaction de Fischer^[88], grand classique de la Chimie des sucres, fournit de très bons résultats dans le cas de la préparation d'alkylglycosides, cette méthode ne permet généralement pas la formation d'arylglycosides, du fait vraisemblablement de la trop faible nucléophilie de l'hydroxyle phénolique. Sans dresser une liste exhaustive des procédés mis au point pour la glycosylation des phénols, nous présentons ceux qui nous semblent les plus représentatifs.

En 1879, le chimiste américain Arthur Michael^[89] présente pour la première fois la synthèse d'un *O*-phénylglucoside de configuration β obtenu par réaction du 1-chloro-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-gluco-pyranose avec le phénolate de sodium dans l'éthanol absolu. Depuis cette date, plusieurs modifications ont été apportées à cette stratégie permettant l'utilisation d'une plus grande variété de sucres et de phénols. En 1909, Fischer et Raske^[90] obtiennent la glucovanilline acétylée par réaction hétérogène d'une solution de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-gluco-pyranose dans l'éther diéthylique avec une solution aqueuse du sel de sodium du 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde. Mauthner, en 1915^[91], a introduit des conditions de réaction homogène en utilisant comme base une solution aqueuse de soude avec de l'acétone comme co-solvant organique. Cette modification de la procédure de Mickael

trouve encore de nos jours de très nombreuses applications pour synthétiser des glycosides protégés.

Les bromo-glycosides sont très largement utilisés comme glycosides donneurs dans ce type de réactions. Voznyi et *coll.* ^[92] ont obtenu quant à eux des aryl-1,2-*trans*-glycosides par réaction de 1,2-*trans*-fluoro-glycosides acétylés ou benzoylés avec des phénolates de sodium dans l'éthanol ou un mélange d'éthanol et de dichlorométhane. Il semble que cette méthode fournisse de bons résultats dans le cas où le phényle porte un ou des groupements donneurs. En outre, les auteurs expliquent la stéréochimie remarquable de cette réaction par la formation d'un époxyde 1,2 responsable d'une double inversion du centre anomérique.

Inch et *coll.* ^[93] ont développé une autre stratégie qui consiste à effectuer la glycosylation par catalyse de transfert de phase. Ils ont fait réagir le bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyle avec des phénols dans un système de solvant biphasique constitué de dichlorométhane et d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou de potassium (2,5 M) contenant du chlorure de triéthylbenzylammonium. Pour des phénol monosubstitués, les rendements sont généralement bons et ne semblent pas être affectés par la nature du substituant. Par contre, l'utilisation de sucres acétylés conduit à de faibles rendements. Halazy et *coll.* ^[94], en utilisant des conditions basiques plus douces (solution aqueuse de NaOH à 1,25 M) et en employant le bromure de tétrabutylammonium comme agent de transfert de phase, ont obtenu des β -glucopyranosides acétylés à partir de phénol relativement sensibles. En 1991, Roy ^[95] a réalisé la synthèse stéréosélective d'un arylsialoside avec un bon rendement à partir de 4-hydroxybenzaldéhyde par catalyse de transfert de phase utilisant le sulfate de tétrabutylammonium. Malheureusement l'application de cette méthode à la synthèse du 4-(2',3',4',6'tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde conduit à de plus faibles rendements. Momenteau et *coll.* ont obtenu ce même composé avec un rendement de 49% en utilisant comme agent de transfert de phase le bromure de tétrabutylammonium ^[96].

b- Synthèse.

Une analyse comparative de la littérature nous a amené à choisir d'appliquer pour cette synthèse le protocole décrit par Toshima et *coll.* ^[97] adapté de la méthode de Mauthner. Bien que le rendement moyen de 40%, dû à la désacétylation partielle de la partie glucidique, soit légèrement inférieur à celui obtenu par Momenteau, la simplicité de la purification dans ce cas reste très intéressante.

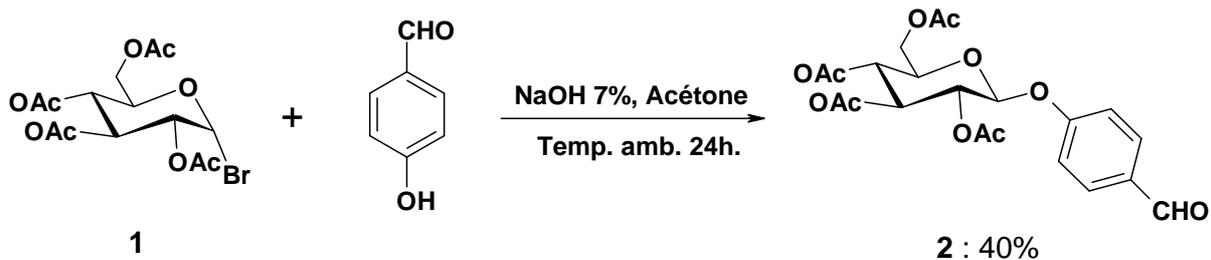


Figure II-5 : Synthèse du 4-(2',3',4',6'tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde.

La réaction est réalisée avec 1 équivalent de bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-α-D-glucopyranosyle (synthétisé selon Schuster et coll.^[98]), 2 équivalents de *para*-hydroxybenzaldéhyde, à température ambiante dans l'acétone en présence de soude. Après purification par recristallisation, le produit attendu est obtenu avec un rendement de 40%. La RMN du proton, la spectrométrie de masse et l'analyse élémentaire ont confirmé sa structure.

3-2-2 Synthèse des hydroxyphénylporphyrines triglucosylées 5a,b.

Ces composés ont été synthétisés selon deux méthodes : la méthode de Little, dans un premier temps, puis celle de Lindsey.

a- Synthèse selon Little.

Nous procédons dans ce cas de la même façon que pour la synthèse des tritolylporphyrines décrites précédemment.

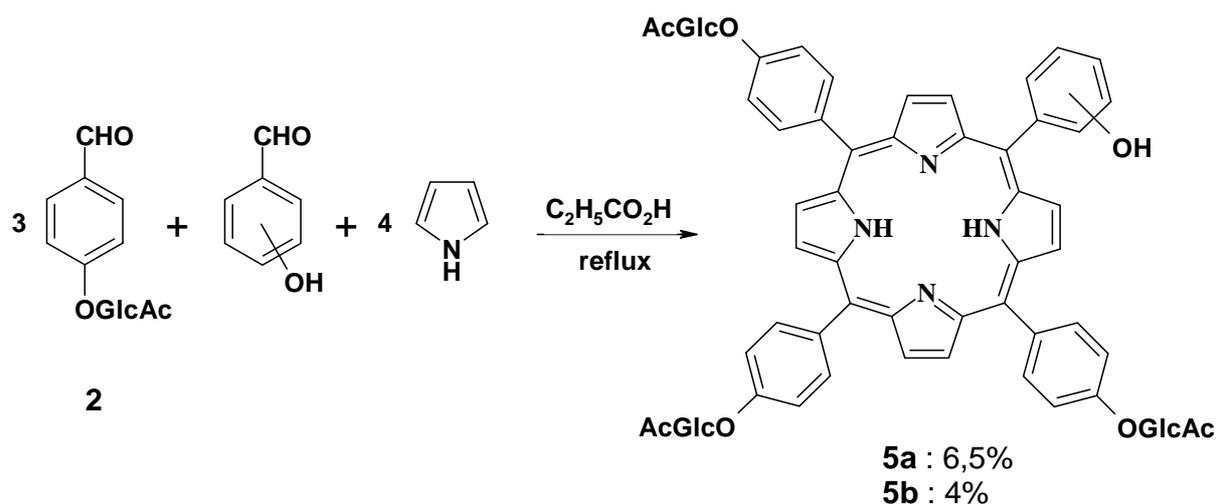


Figure II-5 : Synthèse des mésohydroxyphényltrigluosylporphyrines **5a,b** selon Little.

Le pyrrole, l'*ortho* ou *para*-hydroxybenzaldéhyde et l'aldéhyde glucosylé sont mis à réagir selon les proportions stœchiométriques 4/1/3. Contrairement aux tritolylporphyrines, les porphyrines glucosylées ne précipitent pas dans le milieu réactionnel après refroidissement. De ce fait, la présence de nombreux goudrons issus de la polymérisation du pyrrole rend la purification particulièrement délicate. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est dans un premier temps partiellement purifié par chromatographie sur colonne de silice. La purification est alors achevée par chromatographie préparative sur plaques de gel de silice. Les composés **5a** et **5b** sont isolés avec des rendements respectivement de 6,5% et 4%.

Si cette méthode s'est révélée intéressante dans le cas des tritolylporphyrines cristallines compte-tenu de la simplicité de la purification, son application dans le cas des porphyrines glucosylées nous est apparue incontestablement moins intéressante. Nous avons donc cherché à améliorer les résultats obtenus en utilisant la méthode de Lindsey.

a- Synthèse selon Lindsey.

La méthode présentée par Lindsey^[24] a surtout été développée pour la synthèse des porphyrines symétriques. Les rendements observés varient généralement de 25% à 30% (voir chapitre I). Néanmoins, elle peut être également avantageusement utilisée dans le cas de certaines porphyrines non symétriques.

Cette réaction s'effectue "one pot" en deux étapes (figure II-6). Dans un premier temps, le pyrrole fraîchement distillé (4 éq.), l'*ortho* ou le *para*-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.) et le 4-(2',3',4',6'tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde (3 éq.) sont mis à réagir dans le dichlorométhane rigoureusement anhydre et sous courant d'argon en présence d'un catalyseur acide, le BF_3OEt_2 . Au bout d'une heure, les porphyrinogènes formés sont oxydés par addition de *para*-chloranile. Après évaporation du solvant, les porphyrines formées sont purifiées suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Les rendements sont alors de 12% pour le composé **5a** et de 8% pour le composé **5b**.

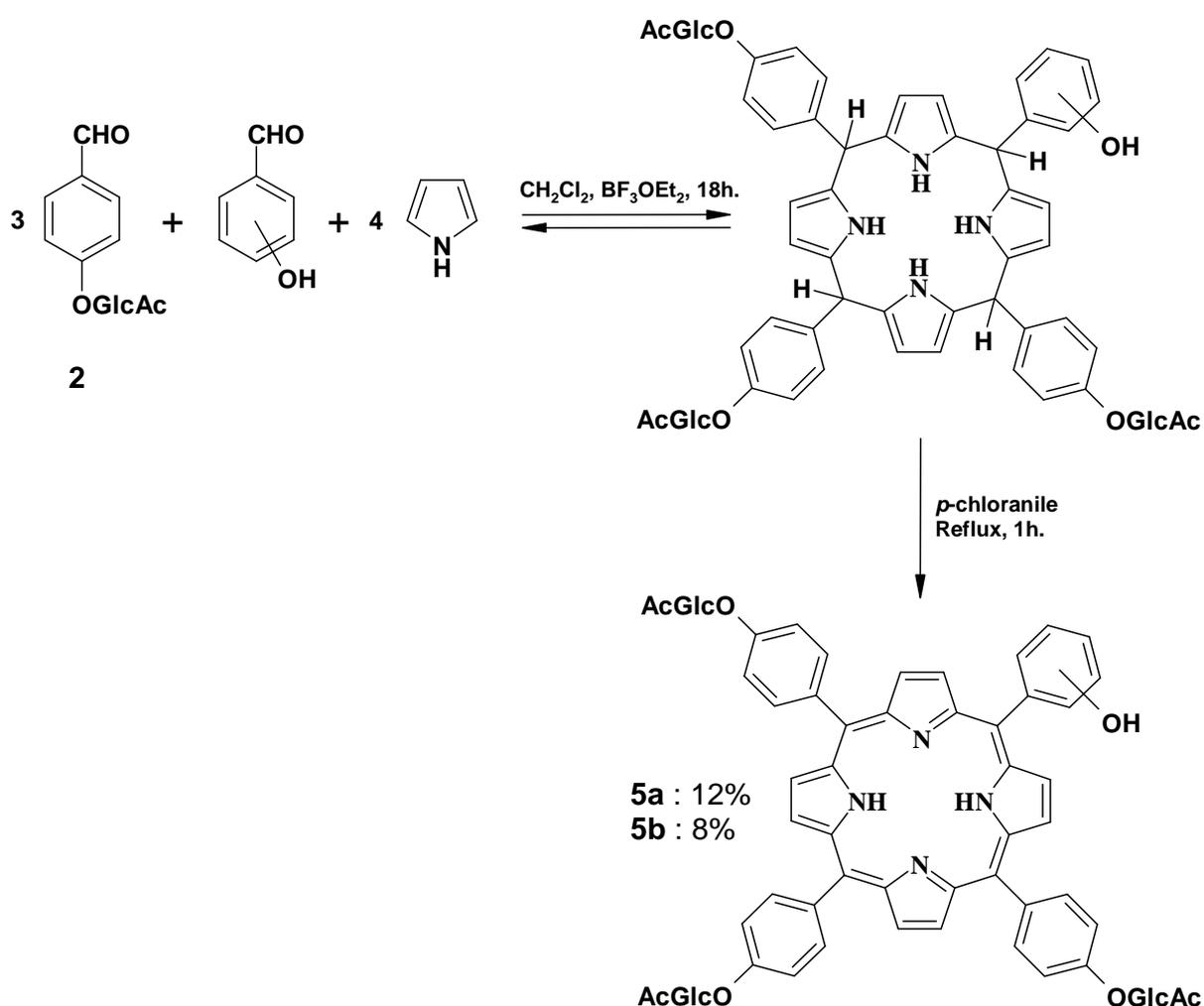


Figure II-6 : Synthèse des mésohydroxyphényltrigluco-sylporphyrines **5a,b** selon Lindsey.

Avec ces deux méthodes, on observe également la formation d'autres porphyrines telle que la tétraglucosylarylporphyrine ainsi que les di et tri-hydroxyphénylporphyrines glucosylées, en plus faible quantité.

Bien que la mise en œuvre du protocole de Lindsey soit plus délicate que la méthode de Little (sous atmosphère inerte et utilisant une grande quantité de solvant), elle s'est révélée dans ce cas plus intéressante en permettant de doubler les rendements.

4 – Synthèse des carboxypropoxyphénylporphyrines.

Nous avons poursuivi le travail par la synthèse de *méso*-carboxypropoxyphénylporphyrines. Ces composés ont été synthétisés en deux étapes. Nous avons tout d'abord fixé sur chaque mono hydroxyphénylporphyrine une chaîne alkyle portant une fonction qui est par la suite saponifiée ou hydrolysée suivant les cas.

4-1 Cas des tritolylporphyrines

4-1-1 Alkylation.

Les deux composés **4a** et **4b** ont été alkylés suivant la méthode de Williamson (figure II-7)

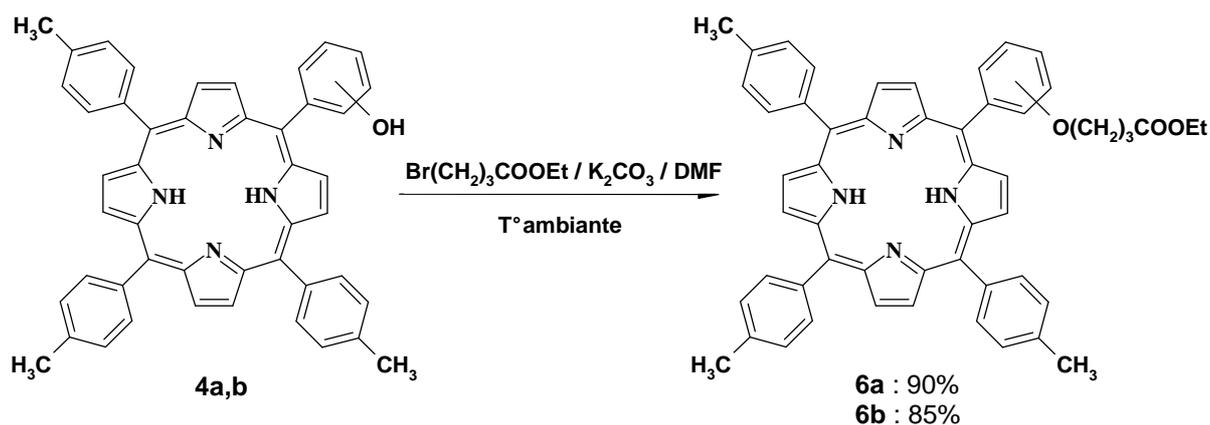


Figure II-7 : O-Alkylation des mono-hydroxyphényltritolylporphyrines **4a,b**.

Pour cela, nous avons fait réagir le 4-bromobutanoate d'éthyle sur le groupement hydroxyle des composés **4a** ou **4b** dans le diméthylformamide rigoureusement anhydre en présence d'un large excès de carbonate de potassium. Les deux composés sont purifiés, après un traitement classique, par chromatographie sur plaques préparatives de silice. Les rendements optimaux en produits *para* et *ortho* substitués **6a** et **6b**, obtenus après 18h de réaction à température ambiante sont respectivement de 90% et 85%. Nous avons constaté qu'une élévation de la température entraîne une augmentation de la vitesse de réaction mais également une dégradation partielle du produit formé, les rendements n'excédant pas dans ce cas 70%.

4-1-2 Saponification.

Nous avons appliqué pour cette réaction, des conditions classiques de saponification.

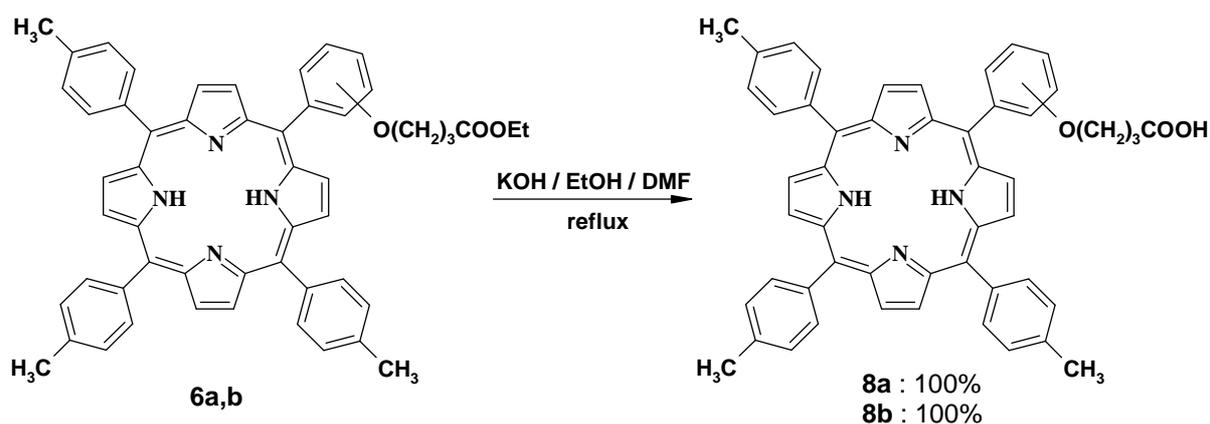


Figure II-8 : Saponification des porphyrines ester **6a,b**.

Les porphyrines **6a,b** sont mises à réagir dans le diméthylformamide en présence d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium de concentration 1 mol.L⁻¹. Après deux heures de réaction à reflux, le solvant est évaporé puis les deux composés sont neutralisés par une solution d'acide chlorhydrique à 5%. Les rendements obtenus après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice sont quantitatifs.

4-2 Cas des trigluco-sylporphyrines.

4-2-1 Préparation du précurseur bromé

Si le 4-bromobutanoate d'éthyle a pu être utilisé avec succès pour la synthèse des composés **8a,b**, il n'en est pas de même pour les *méso*-carboxypropyloxyphénylporphyrines glucosylées. En effet, comme les groupements acétyles protégeant les unités glucidiques sont très sensibles aux conditions de déprotection décrites précédemment, nous avons fait réagir les porphyrines monohydroxylées **5a** et **5b** avec le 4-bromobutanoate de *tertiobutyle* qui peut être très facilement hydrolysé en milieu acide, conditions n'affectant pas les groupements acétyles.

Il est bien connu que la formation d'un ester à partir d'un alcool tertiaire comme le *tertiobutanol* est difficile. Pourtant, l'utilisation d'esters *tertiobutyliques* se révèle précieuse dans de nombreux cas et plus particulièrement pour la synthèse peptidique multiétapes selon la méthode des Fmoc amino-acides, comme groupement protecteur des fonctions acide carboxylique. Ainsi, plusieurs méthodes de préparation de *tertiobutyle* esters ont été décrites dans la littérature. Nous en présentons ici quelques-unes choisies parmi les plus communes. En 1932, Norris et *coll.*^[99] ont préparé des *tertiobutyle* esters par réaction de chlorure d'acide avec le *tertiobutanol* en présence de pyridine. Ce protocole leur a permis d'estérifier l'acide benzoïque ainsi que plusieurs de ces dérivés.

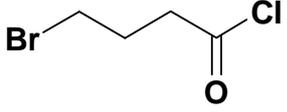
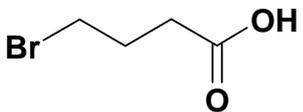
Il est également possible d'obtenir des esters en faisant réagir un dérivé halogéné avec un carboxylate de césium (obtenu par réaction de l'acide carboxylique correspondant avec le carbonate de césium). Malheureusement, la méthode semble peu adaptée à la synthèse de *tertiobutyle* esters. En effet, Wang et *coll.*^[100] ont montré que la réaction du 2-bromo-2-méthyl-propane avec la N-benzyloxycarbonyl-alanine en présence de carbonate de césium fournit l'ester correspondant avec un rendement de seulement 14%.

Lee et *coll.*^[101] ont préparé des benzoates de *tertiobutyle* avec de bons rendements par réaction du benzothioate de S-2-pyridyle, et plusieurs de ces dérivés, avec le 2-méthyl-propan-2-ol en présence de chlorure ou bromure de cuivre. Les auteurs ont montré que la nature du ou des substituants de l'acide benzoïque influence fortement le rendement de la réaction. De plus, ils proposent un mécanisme dans lequel l'halogénure de cuivre active la réaction en chélatant le thio-ester de départ. Cependant, leur travaux ne présentent aucun exemple d'application de ce protocole à la synthèse de *tertiobutyle* ester d'acides carboxyliques aliphatiques. Plusieurs exemples d'estérification du *tertiobutanol* par un acide carboxylique, activé par un carbodiimide comme le dicyclohexylcarbodiimide ont également

été décrits dans la littérature^[102]. Cette réaction est généralement catalysée par le DMAP. Si cette stratégie a été appliquée avec succès à la protection des fonctions acides de plusieurs acides aminés, la méthode de préparation de *tertiobutyle* esters qui est encore la plus couramment utilisée consiste à faire réagir l'acide carboxylique avec l'isobutylène en présence d'un catalyseur acide^[103]. L'utilisation de l'isobutylène impose d'employer un réacteur spécifique, résistant aux fortes pressions ce qui constitue la principale difficulté de cette procédure. Pour s'affranchir de ces contraintes matérielles, Wright et coll.^[104] ont proposé en 1997 une méthode séduisante qui consiste à former de l'isobutylène *in situ* à partir de *tertiobutanol* en présence de sulfate de magnésium et d'acide sulfurique. Dans ces conditions, ils ont estérifié, avec des rendements variant de 60 à 90% selon les cas, divers types d'acides aryl- ou alkyl-carboxyliques.

Compte-tenu des résultats de la littérature et en s'appuyant sur les travaux de notre laboratoire sur la réaction d'estérification par activation micro-ondes, nous avons envisagé la synthèse du 4-bromobutanoate de *tertiobutyle* selon diverses méthodes dont les résultats sont résumés dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Résultats obtenus pour la synthèse du 4-bromobutanoate de *tertiobutyle*

Réactifs	Méthode	Rdt
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>tBuOH</i> - DMAP - Micro-ondes 	traces
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>tBuOH</i> - DIC / DMAP - CH₂Cl₂ 	traces
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>tBuOH</i> - DIC / DMAP - CH₂Cl₂ 	10%
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>tBuOH</i> - MgSO₄ / H₂SO₄ - CH₂Cl₂ 	60%

Nous avons cherché dans un premier temps à former le 4-bromobutanoate de *tertiobutyle* par réaction du chlorure d'acide 4-bromobutanoïque avec un large excès de *tertiobutanol* en présence de DMAP par activation micro-ondes. Ce mode d'activation, très largement utilisé au sein de notre laboratoire, notamment dans le cas de l'estérification de polysaccharides naturels^[105], permet dans bien des cas une diminution des temps de réaction, associée à un meilleur rendement^[106]. Nous avons utilisé pour cela un four micro-onde de laboratoire Synthewave 402. Plusieurs essais ont été réalisés pour lesquels nous avons fait varier le temps de réaction ainsi que la puissance de l'irradiation micro-ondes. Malheureusement, l'utilisation de ce procédé ne nous a pas permis d'obtenir le produit désiré et dans tous les cas, seules des traces d'ester ont été observées par chromatographie analytique sur couche mince.

Les mauvais résultats obtenus par cette méthode nous ont conduit à changer de stratégie. Nous avons alors réalisé l'estérification de l'acide 4-bromobutanoïque par le *tertiobutanol* dans le dichlorométhane rigoureusement anhydre en présence de DMAP et d'un carbodiimide, le diisopropylcarbodiimide (DIC). Nous avons fait varier la température et le temps de réaction. Dans le meilleur des cas, c'est à dire à température ambiante et après 4 jours de réaction nous avons isolé le produit attendu après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de seulement 10%.

Face à ce second échec, nous avons appliqué la méthode de Wright et *coll.*.

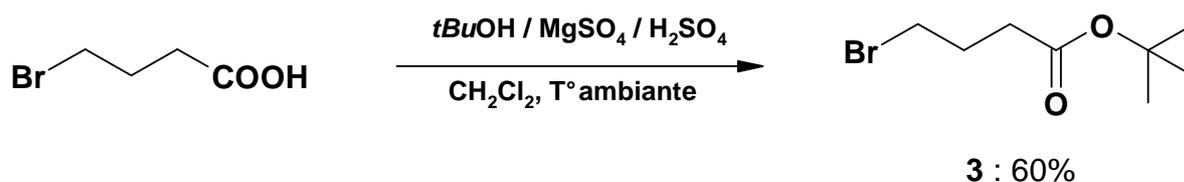


Figure II-9 : Estérification de l'acide 4-bromobutanoïque par le *tertiobutanol*.

Le protocole que nous avons appliqué consiste à faire réagir l'acide 4-bromobutanoïque (figure II-9) avec le *tertiobutanol* dans le dichlorométhane rigoureusement anhydre en présence de sulfate de magnésium et d'acide sulfurique. Après 48 heures de réaction, suivie par CCM, nous avons isolé le 4-bromobutanoate de *tertiobutyle* **3** avec un rendement de 60%. En outre, dans ces conditions, la purification du produit de réaction est simple. En effet, le sulfate de magnésium, l'acide sulfurique et l'acide carboxylique qui n'a pas réagi sont très facilement éliminés par lavages avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. Le 4-

bromobutanoate de tertibutyle a été caractérisé par RMN du proton, du carbone 13 et par spectroscopie infra-rouge.

4-2-2 Alkylation des porphyrines 5a,b

D'une manière analogue à **4a,b**, nous avons fait réagir le 4-bromobutanoate de *tert*ibutyle avec les porphyrines **5a** et **5b** dans le diméthylformamide à température ambiante en présence de carbonate de potassium (figure II-10).

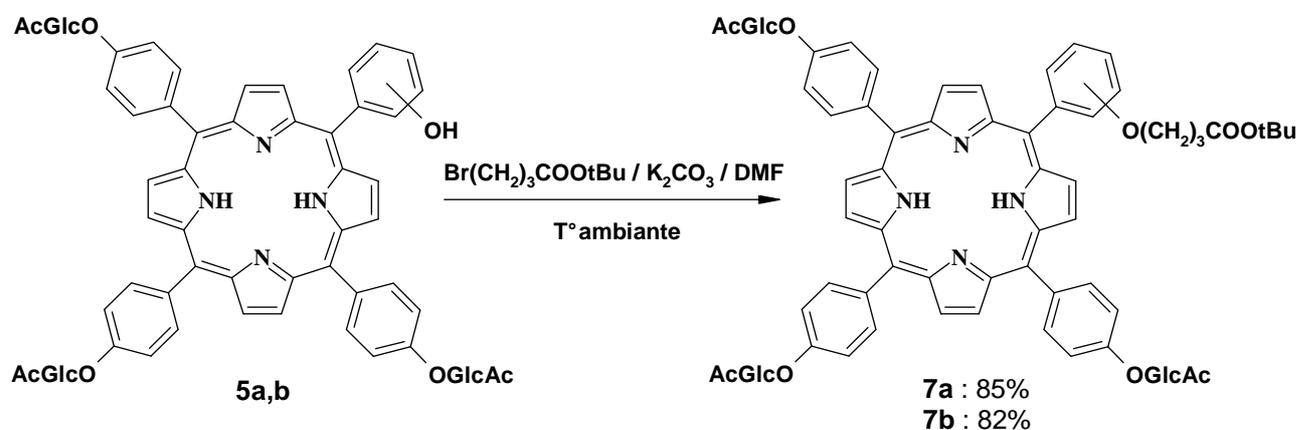


Figure II-10 : O-alkylation des glucosylporphyrines **5a,b**.

Comme dans le cas de la série des tritolylporphyrines décrites précédemment, les rendements obtenus par cette méthode, après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice, sont très bons. Les composés **7a** et **7b** sont isolés avec des rendements respectivement de 85% et 82%.

4-2-2 Hydrolyse.

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

Les glucosylporphyrines estérifiées sont mises à réagir, à température ambiante, dans un mélange de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (80% de DCM et 20% de TFA v/v). Dans tous les cas, le produit de départ est entièrement hydrolysé après 2 heures de réaction et nous n'avons observé, dans ces conditions, aucune dégradation des porphyrines.

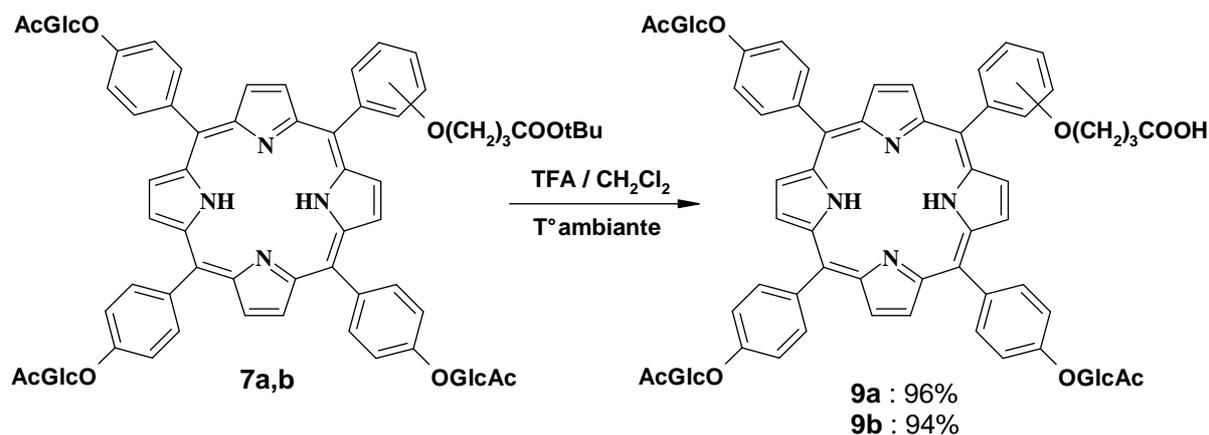


Figure II-11 : Hydrolyse des porphyrines ester **7a,b**.

Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice, les rendements obtenus sont de 96% et de 94% pour les composés **9a** et **9b** respectivement.

5– Condensation des carboxyporphyrines sur le tripeptide RGD

La suite de notre travail a consisté à condenser les *méso*-tritoyl et triglucosylporphyrines obtenues précédemment sur le tripeptide RGD en phase solide.

5-1 Description du support.

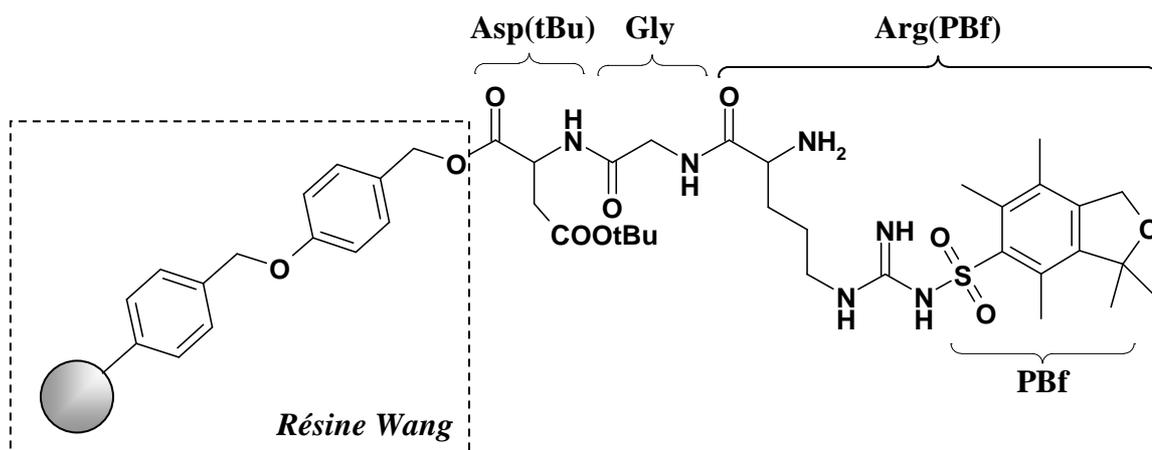


Figure II-12 : Peptide RGD sur résine Wang

Les réactions de condensation ont été réalisées en phase solide. Pour cela, nous avons utilisé une résine de Wang portant le motif RGD. Rappelons que la résine de Wang est une résine de type hydroxyméthylphénoxy^[107]. Elle est obtenue par modification d'un polymère de polystyrène comportant 1% ou 2% d'unité divinylbenzène avec l'alcool 4-hydroxybenzylique. La taille des billes de résine est généralement comprise entre 50-100, 100-200, ou 200-400 mesh.

Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé un support dont la dimension des billes est de 100-200 mesh et dont le polymère de base comporte 1% d'unité divinylbenzène. En outre, la fonction acide carboxylique de l'acide aspartique et le groupement guanidino de l'arginine sont protégés respectivement par un *tertiobutyle* et le 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyl (PBf). Comme nous l'avons mentionné précédemment, les *tertiobutyle* esters sont très fréquemment utilisés en tant que groupements protecteurs en synthèse peptidique multi-étapes. En ce qui concerne la guanidine de l'arginine, notre choix s'est porté sur le groupement PBf, décrit pour la première fois par Carpino en 1993^[108]. Si le Pmc (2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl) et le Mtr (4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzènesulfonyl) sont deux des groupements protecteurs de l'arginine les plus couramment utilisés, ils présentent cependant l'inconvénient d'être relativement difficiles à hydrolyser, ce qui implique, dans bien des cas, des temps de réaction de plusieurs heures en milieu acide fort pouvant conduire à une dégradation partielle de la molécule. Parce que la stabilité du PBf en milieu acide est plus faible que celle du Pmc ou du Mtr, son hydrolyse est plus rapide ce qui limite les risques de dégradation des composés.

Enfin, la résine employée se caractérise par une teneur en motif peptidique de $0,58 \text{ mmol.g}^{-1}$. Ce support a été synthétisé selon la méthode des Fmoc-aminoacides par la société Néosystème localisée à Strasbourg^[109].

5-2 Condensation

Dans les années 60, Merryfield^[110] a posé les bases de la stratégie de synthèse peptidique en phase solide. Si le principe général de la méthode est depuis resté le même, de très nombreuses améliorations techniques ont été apportées la rendant particulièrement efficace et attractive. Rappelons que la construction itérative d'un peptide sur support solide commence par la déprotection de la fonction amine terminale du peptide en croissance puis l'addition de l'acide aminé activé suivant, conduisant à un peptide protégé augmenté d'une unité, prêt pour un nouveau cycle. La synthèse peptidique en solution, qui implique la purification et la caractérisation de chacun des intermédiaires, est très fastidieuse. La force de la synthèse sur support solide réside dans le fait qu'à la fin de chaque cycle, un simple lavage de la résine suffit à éliminer l'ensemble des réactifs qui n'ont pas réagit.

L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer l'hydrogène de la fonction acide carboxylique par un bon groupe partant. Pour cela, de nombreuses solutions ont été apportées, les plus courantes étant l'utilisation d'esters actifs ou l'utilisation d'anhydrides symétriques. En effet, l'activation peut avoir lieu *in situ* en présence d'un carbodiimide comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le diisopropylcarbodiimide (DIC) ce qui conduit à la formation de l'anhydride symétrique correspondant. Le DIC est généralement préféré au DCC car l'urée secondaire formée à partir de ce dernier est peu ou pas soluble dans les solvants classiquement utilisés.

L'utilisation de divers esters actifs dérivés du *para*-nitrophénol, du 2,4,5-trichlorophénol ou du pentafluorophénol est également courante. Les esters pentafluorophénoliques, introduits à l'origine par Kisfaludy^[111] en synthèse de peptides en solution, sont très réactifs et, en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), ont une réactivité qui approche celle des anhydrides symétriques. Il en est de même pour les esters de 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-benzotriazine (DHBt). Les esters très réactifs du 1-hydroxybenzotriazole peuvent quant à eux être formés *in situ* soit en passant par l'intermédiaire de l'anhydride symétrique formé à partir d'un carbodiimide soit en utilisant le réactif de Castro (hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yloxy-tri-(diméthylamino)phosphonium ou BOP)^[112]. Parce que l'utilisation de ce dernier se révèle très toxique, il est peu à peu remplacé par l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-

xyloxy-tripyrrolidino-phosphonium ou PyBOP[®] sans aucune perte d'activité^[113]. Ce type d'esters peut également être obtenu par l'action d'hexafluorophosphate d'uronium comme l'héxafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTu) plus connu sous le nom de réactif de Knorr^[114].

Si l'activation de l'acyl-aminoacide est un paramètre important pour assurer avec succès le couplage en phase solide, la nature du support et le solvant utilisé sont déterminants. En 1989, Atherton et Sheppard^[115] expliquent les différents phénomènes pouvant survenir au peptide en croissance sur un polymère (figure II-13).

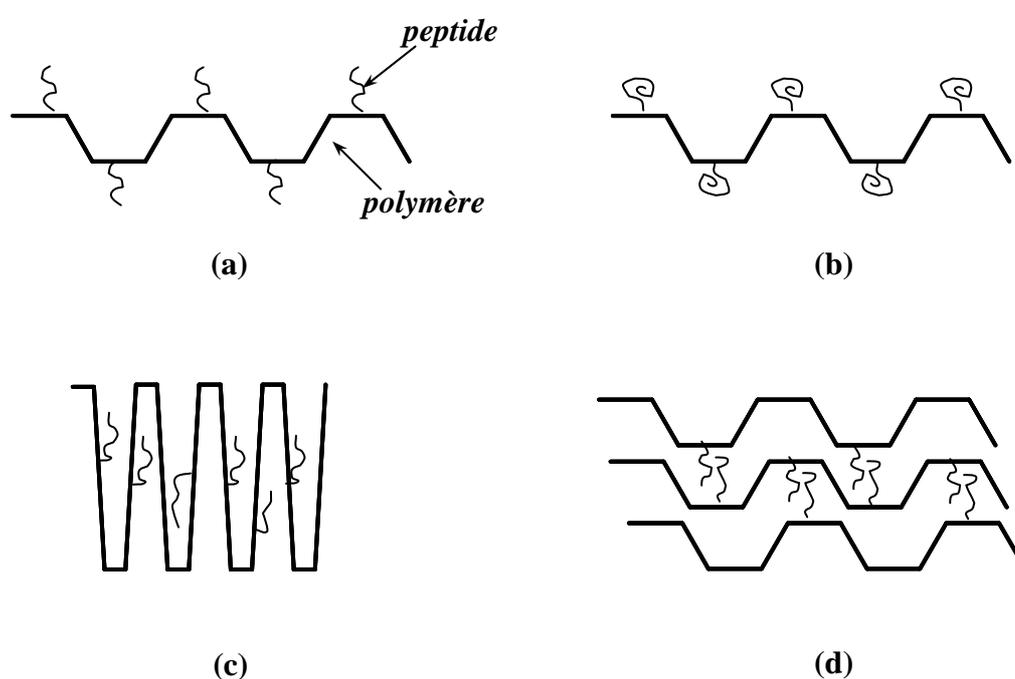


Figure II-13 : Comportement dans un solvant d'une chaîne peptidique greffée sur résine.

L'état (a) correspond à l'état idéal pour lequel le polymère et le peptide sont parfaitement solvatés et étendus librement dans l'espace. Ainsi, les centres réactifs sont parfaitement accessibles. Dans la situation (b), le polymère est encore bien solvaté mais les chaînes peptidiques sont repliées sur elles-mêmes ce qui correspond à un état de moindre solvation. Ceci a pour effet de diminuer la réactivité des fonctions amines terminales du fait de l'encombrement stérique. Cet encombrement stérique peut également résulter d'une faible solvation du polymère conduisant à un phénomène d'agrégation (cas (c)) ou encore d'

interaction interchaînes (cas (d)). Le choix du solvant est donc crucial pour garantir une réactivité optimale. Le diméthylformamide ou un mélange de diméthylformamide et de dichlorométhane sont les solvants les mieux adaptés à l'utilisation de la résine de Wang .

On trouve dans la littérature de nombreux exemples de synthèse en phase liquide de systèmes porphyrine-peptide, notamment comme modèle de l'Hème^[116] ou du cytochrome P450. Pour ces réactions en solution, diverses stratégies ont été appliquées comme l'utilisation de carboxyporphyrines activées selon les procédés décrits précédemment mais aussi l'utilisation d'aminoporphyrines comme précurseurs. Dans ce cas, il convient d'activer la fonction acide carboxylique terminale de l'unité peptidique ou alors la fonction amine portée par le macrocycle, par exemple par réaction avec le trichloroacétimide. Par contre, à ce jour, relativement peu d'exemples de synthèses de porphyrines peptidiques sur support solide ont été décrits. Ainsi, Morelli et coll.^[117] ont fixé une carboxyphénylporphyrine sur un oligopeptide, en phase solide, avec un rendement proche de 90% en utilisant comme agent de couplage le système PyBOP/HOBt. En appliquant la même stratégie, De Napolie et coll.^[118] ont formé une *méso*-porphyrine substituée par une lysine liée à un oligonucléotide.

Nous avons choisi d'activer les carboxyporphyrines **8a**, **8b**, **9a** et **9b** avec le système diisopropylcarbodiimide / 1-hydroxybenzotriazol. Nous avons utilisé pour chaque réaction de couplage un réacteur de type *System 45*[®] muni à sa base d'un disque en verre fritté associé à un robinet quart-de-tour (voir schéma du réacteur dans la partie expérimentale). Ce dispositif, parfaitement adapté à la synthèse sur support solide, permet de réaliser chaque cycle de réaction sans perte de support.

La méthode que nous avons appliquée consiste à faire réagir sur la résine préalablement gonflée avec un mélange de DMF et de CH₂Cl₂ rigoureusement anhydres dans les proportions 1/1, sous argon, 2 équivalents (par unité peptidique) de carboxyporphyrine **8a**, **8b**, **9a** ou **9b** en présence de 2 équivalents de DIC et de 2 équivalents de HOBt (figure II-14).

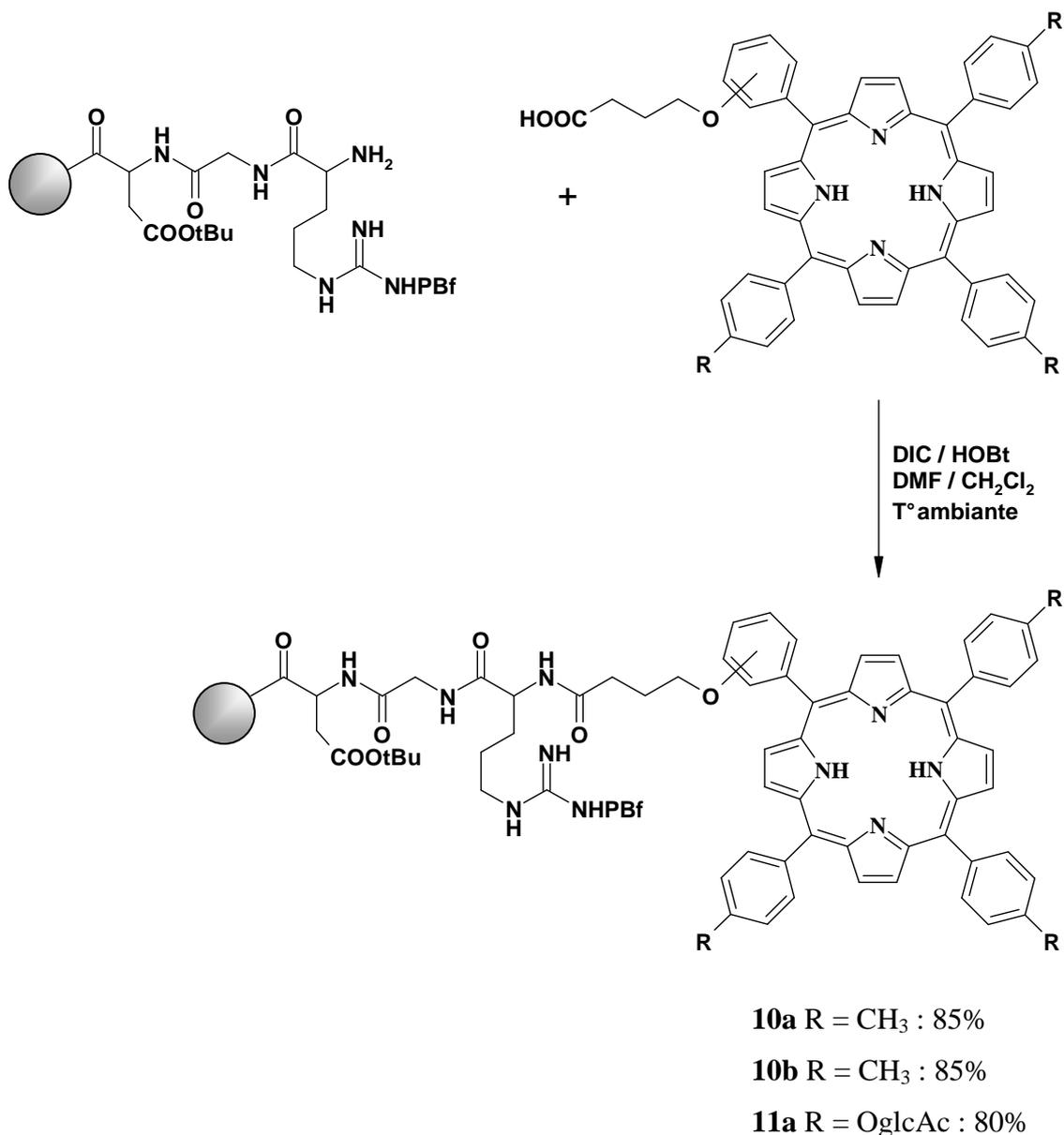
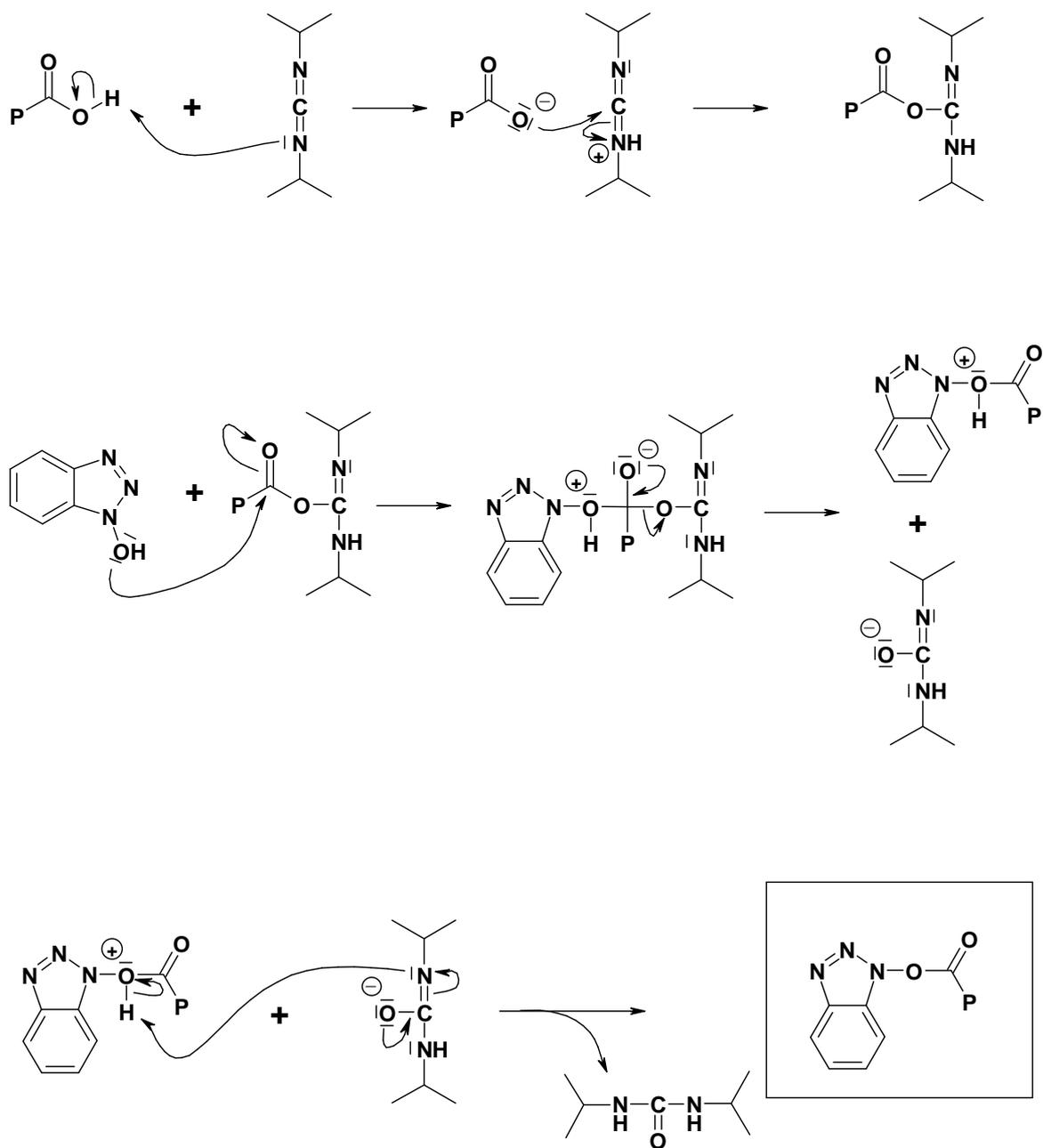


Figure II-14 : Condensation des porphyrines **8a,b** et **9a,b** sur le peptide RGD.

Les meilleurs résultats ont été obtenus après 24 heures de réaction. La résine est alors filtrée puis lavée abondamment par du diméthylformamide puis du méthanol et enfin du dichlorométhane. Dans ces conditions, les rendements, estimés par la mesure de l'augmentation de masse de la résine après séchage au dessiccateur, sont de 85% pour les supports **10a** et **10b** et de 80% pour **11a** et **11b**.

La figure II-15 présente le mécanisme classique de l'activation par le système DIC/HOBt.



$P = \text{Porphyrine}$

Figure II-15 : Mécanisme d'activation par le système DIC/HOBt.

6– Décrochage-déprotection des porphyrines peptidiques

Le décrochage des porphyrines peptidiques greffées sur résine Wang s'effectue en milieu acide, par réaction de l'acide trifluoroacétique. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, la liaison ester entre l'unité peptidique et le polymère constituant le support est très sensible à l'hydrolyse acide par le TFA. De plus, dans ces conditions, les groupements protecteurs de l'arginine et de l'acide aspartique sont particulièrement labiles. De ce fait, l'action du TFA sur les supports **10a,b** et **11a,b** permet d'isoler les porphyrines à motif RGD déprotégé attendues en une seule étape.

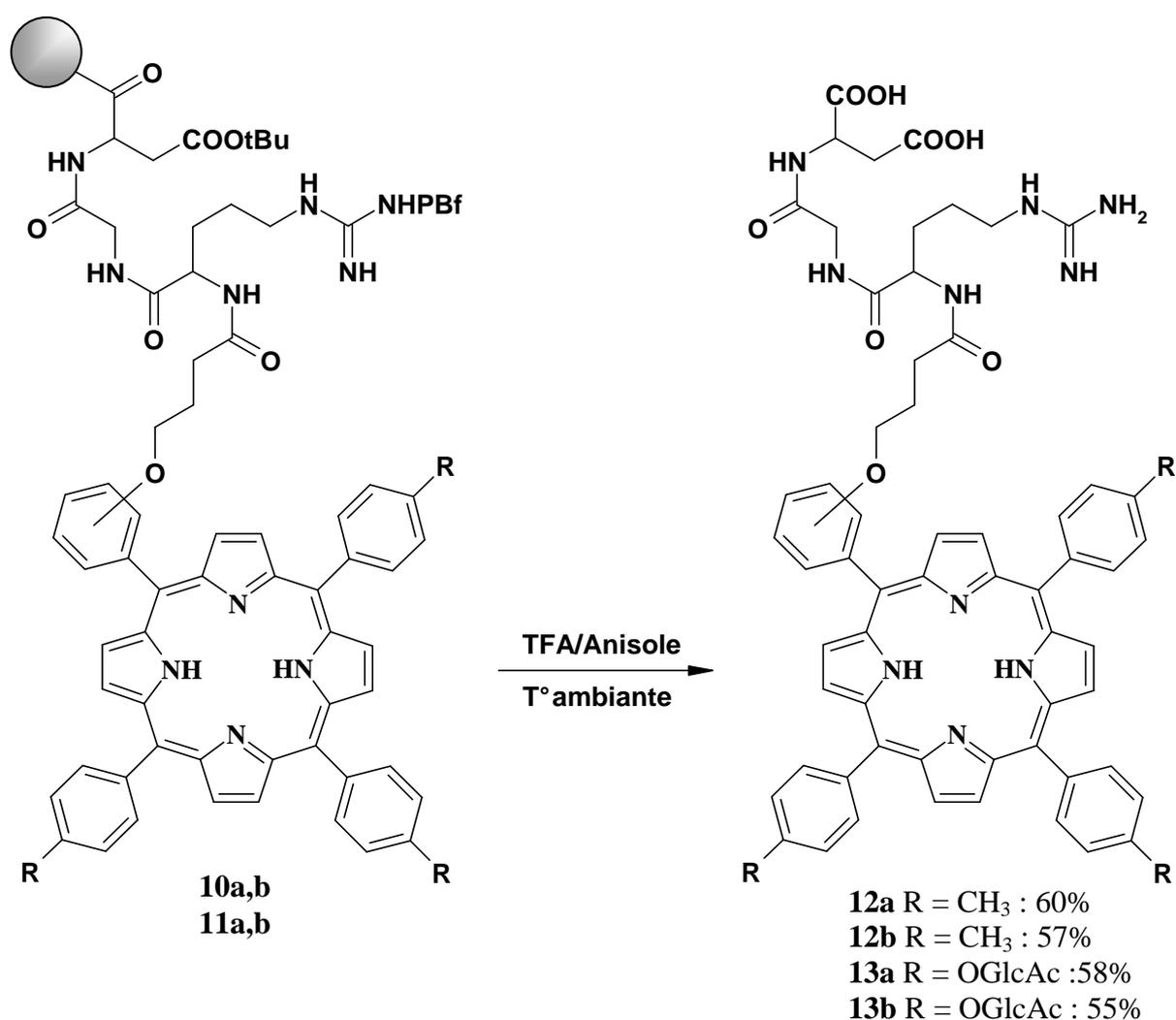


Figure II-16 : Décrochage des porphyrines **12a,b** et **13a,b** de la résine Wang.

En outre, nous avons ajouté au milieu réactionnel de l'anisole pour piéger les carbocations *tertiobutyliques* formés au cours de la réaction et susceptibles de conduire à des substitutions

électrophiles. Si dans notre cas, l'anisole s'est révélé suffisant pour empêcher de telles réactions secondaires, il est à noter que l'utilisation de réactifs de formulation plus compliquée est souvent nécessaire, notamment dans le cas de peptides plus complexes comportant des résidus comme le tryptophane, la cystéine ou encore la méthionine. Dans ce cas, le réactif couramment utilisé est constitué de 81,5% de TFA, 5% de thioanisole, 5% de phénol, 5% d'eau, 2,5% d'éthanedithiol et 1% de triéthylsilane^[119].

Dans tous les cas, un temps de réaction d'hydrolyse de 2 heures est nécessaire pour assurer une déprotection complète du groupement guanidino de l'arginine. Dans ces conditions, aucune désacétylation des unités glucidiques n'a été observée. Après évaporation de l'acide trifluoroacétique et purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice, les porphyrines à motifs RGD **12a**, **12b**, **13a** et **13b** souhaitées sont obtenues avec des rendements, calculés pour les deux réactions couplage/coupure, de l'ordre de 60%.

Il est à noter que les tritolylporphyrines **12a,b**, en milieu neutre, sont insolubles dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques usuels. Toutefois, le diméthylsulfoxyde permet de solubiliser ces composés, seulement partiellement dans le cas du macrocycle **12a** portant le peptide en position *para*.

7– Déprotection totale des porphyrines glucosylées acétylées

Plusieurs méthodes de désacétylation sont décrites dans la littérature. Cette réaction peut être effectuée en milieu basique en utilisant par exemple comme base des solutions méthanoliques de méthylate de sodium, de méthylate de baryum, de soude ou de diverses amines telles que la diéthylamine.

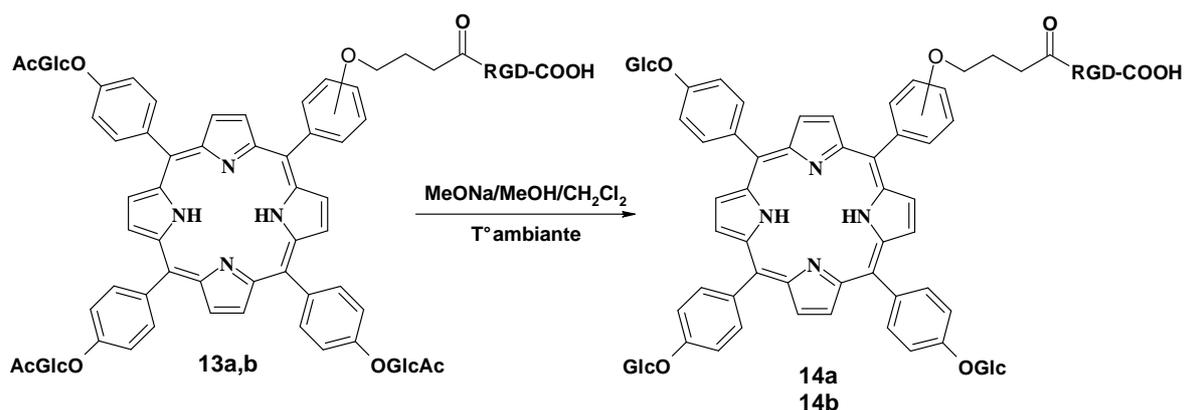


Figure II-17 : Désacétylation des porphyrines **13a,b**.

Dans notre cas, nous avons réalisé la réaction de désacétylation, compte tenu de la faible solubilité de ces composé dans le méthanol, dans un mélange de dichlorométhane/méthanol (8/2) en présence d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (2 équivalents par groupement acétyle). La réaction est totale en 45 minutes et ne donne lieu à aucune dégradation. Après précipitation dans le diisopropyl éther et purification par chromatographie sur colonne moyenne pression en phase inverse, les composés déprotégés **14a** et **14b** sont obtenus avec des rendements de l'ordre de 95%. De plus, ces deux porphyrines sont parfaitement solubles dans l'eau.

8– Caractérisations.

L'ensemble des porphyrines synthétisées a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible et spectrométrie de masse. De plus, nous avons réalisé une étude détaillée par spectroscopie RMN du proton de tous les macrocycles précurseurs **4a,b** - **9a,b**, complétée de l'analyse par RMN du carbone 13 pour la série des triglucosylporphyrines **5a,b**, **7a,b** et **9a,b**. Enfin, les structures des quatre porphyrines peptidiques **12a**, **12b**, **14a** et **14b** ont été confirmées par spectrométrie de masse haute résolution et par RMN du proton.

8-1 Caractérisation des précurseurs

8-1-1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres des composés **4a,b** - **9a,b** sont mesurés dans le chloroforme (Tableau II-2). Ils correspondent tous aux spectres généralement attendus pour les porphyrines bases libres de type *méso* et présentent une forte bande d'absorption vers 420 nm (bande de Soret) et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 590, 550 et 520 nm notées respectivement I, II, III et IV.

Tableau II-2 : Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines **4a,b** - **9a,b**.

λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C

composés	Soret	IV	III	II	I	ϵ_{II}/ϵ_I
4a	418 (363,0)	516 (13,5)	552 (7,4)	592 (4,0)	648 (4,3)	0,93
4b	418 (339,2)	516 (14,4)	552 (6,7)	592 (4,5)	648 (4,1)	1,09
5a	420 (422,0)	516 (14,2)	552 (8,2)	592 (4,0)	650 (4,4)	0,90
5b	420 (419,2)	516 (16,5)	550 (8,2)	592 (5,3)	648 (5,4)	0,98
6a	420 (354,0)	516 (14,3)	552 (7,2)	592 (4,7)	648 (4,2)	1,12
6b	420 (391,0)	516 (13,4)	552 (8,1)	592 (4,6)	648 (2,8)	1,64
7a	420 (390,0)	518 (13,8)	553 (8,7)	592 (4,9)	650 (4,5)	1,08
7b	420 (436,1)	516 (17,8)	552 (8,9)	591 (5,7)	648 (5,2)	1,09
8a	420 (355,7)	517 (13,4)	553 (7,2)	592 (4,0)	648 (3,8)	1,05
8b	420 (388,6)	517 (15,7)	553 (9,8)	592 (4,9)	648 (4,2)	1,16
9a	421 (432,0)	517 (13,1)	553 (11,0)	592 (5,2)	648 (3,8)	1,36
9b	420 (446,6)	517 (16,0)	552 (8,2)	591 (5,3)	647 (4,1)	1,29

La plupart de ces spectres appartiennent au type *étio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des petites aux grandes longueurs d'onde (IV>III>II>I). Les composés **4a**, **5a** et **5b** présentent de légères modifications dans l'intensité relative des bandes I et II conduisant à des spectres atypiques avec un coefficient ϵ_I supérieur à ϵ_{II} .

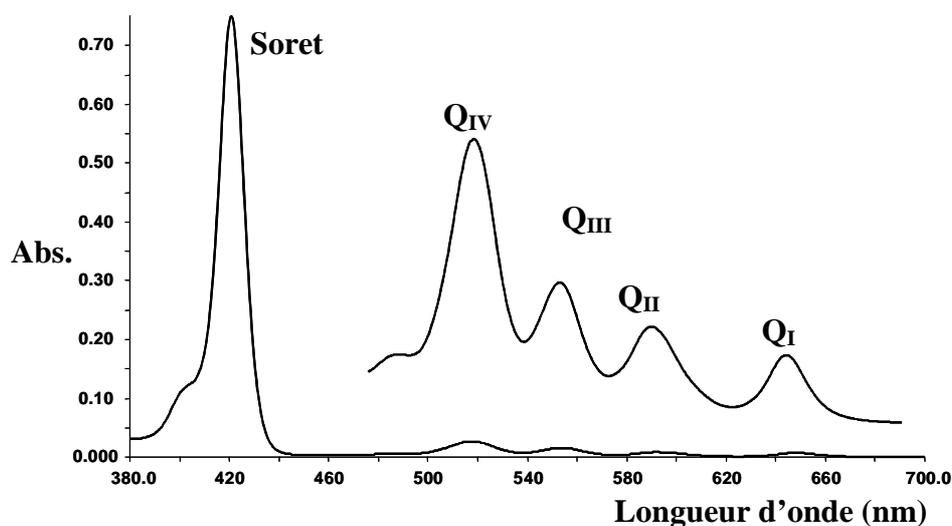


Figure II-18 : Spectre UV-Visible du composé **7a** (CHCl₃, C = 1,9.10⁻⁶ mol.L⁻¹)

8-1-2 Spectrométrie de masse.

L'analyse structurale des porphyrines a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces composés, non volatils ne se prêtent pas aux techniques classiques d'ionisation chimique ou d'ionisation par impact électronique. Pour cette raison, nous nous sommes tournés vers une technique particulière par désorption laser assistée par effet de matrice : le MALDI. La particularité de cette méthode est qu'elle permet l'observation de l'ion quasi-moléculaire généralement sans fragmentation. Les spectres ont été effectués au Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'université Pierre et Marie Curie (Paris) sous la direction du docteur Jean-Claude Blais. Le tableau II-3 présente les résultats obtenus pour les porphyrines **4a,b** - **9a,b** et un exemple de spectre est représenté figure II-19. Tous les spectres obtenus présentent, comme attendu, uniquement le pic quasi moléculaire $[M+H]^+$.

Tableau II-3 : *Spectrométrie de masse MALDI.*

composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
4a	672,28	673,6
4b	672,28	673,6
5a	1669,6	1671,3
5b	1669,6	1671,4
6a	786,37	787,9
6b	786,37	787,9
7a	1810,61	1811,6
7b	1810,61	1811,6
8a	758,32	759,9
8b	758,32	759,8
9a	1754,54	1755,6
9b	1754,54	1756,5

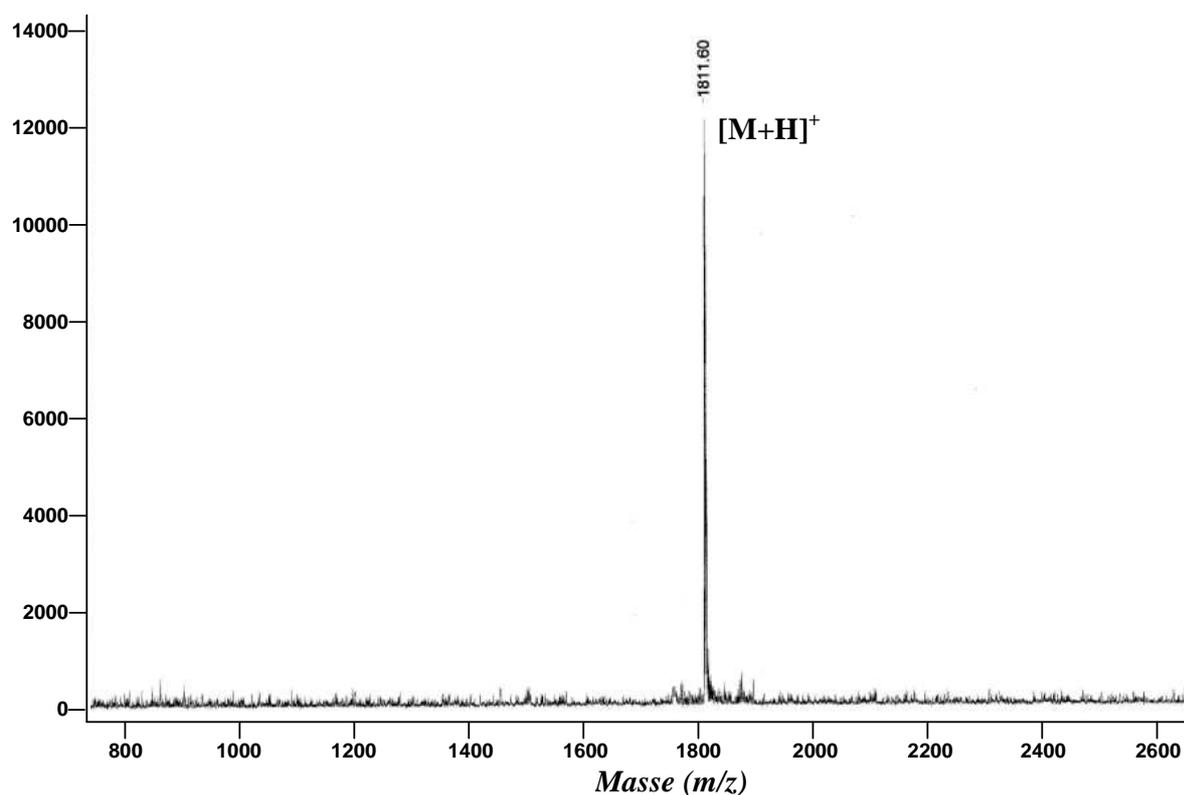


Figure II-19 : Spectre de masse MALDI du composé **7a**.

8-1-3 Spectroscopie RMN du proton

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des *méso*-tritolylporphyrines **4a,b**, **6a,b** et **8a,b** et des *méso*-trigluco-sylporphyrines **5a,b**, **7a,b** et **9a,b** ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutérié. Les tableaux II-4 et II-5 présentent les attributions détaillées des signaux observés.

D'une manière générale, le spectre RMN ^1H d'un composé de ce type se compose des groupes de signaux suivants :

- ✓ Les protons β -pyrroliques vers 8,8 ppm,
- ✓ Les protons phényles entre 7 et 8,3 ppm,
- ✓ Les protons de la chaîne carbonée entre 1,2 et 4,5 ppm,
- ✓ Les protons NH pyrroliques vers -2,7 ppm,
- ✓ Les protons méthyle des groupements tolyles vers 2,6 ppm,
- ✓ Et dans le cas des trigluco-sylporphyrines :
 - ✓ Les protons glucidiques entre 1,3 et 6 ppm,
 - ✓ Les protons méthyle des groupements acétyles vers 2,2 ppm.

Tableau II-4 : RMN ¹H des tritolylporphyrines para-substituées **4a**, **6a** et **8a**.

δ en ppm (J en Hertz).

H	4a	6a	8a
<u>Pyrroles</u>			
2,8	8,93 d (4,4)	8,88 s	8,83 s
3,7	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s
12	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s
13	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s
17	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s
18	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s
NH	-2,76 s él.	-2,71 s él.	-2,76 s él.
<u>phényle</u>			
2,6	8,03 d (8,2)	8,11 d (8,4)	8,07 d (7,7)
3,5	7,15 d (8,2)	7,26 d (8,4)	7,23 d él. (7,7)
<u>Tolyles</u>			
2,6	8,08 d (7,7)	8,12 d (7,7)	8,09 d (7,7)
3,5	7,53 d (7,7)	7,56 d (7,7)	7,52 d (7,7)
CH ₃	2,69 s	2,69 s	2,68 s
Bras espaceur			
α	-	4,30 t (6,0)	4,31 t (6,1)
β	-	2,31 quint. (6,0)	2,35 m
γ	-	2,66 t él. (6,0)	2,77 t (6,1)
CH ₂ - éthyle	-	4,25 quad. (7,2)	-
CH ₃ - éthyle	-	1,36 t (7,2)	-

Tableau II-5 : RMN ¹H des tritolylporphyrines ortho-substituées **4b**, **6b** et **8b** δ en ppm (J en Hertz)

H	4b	6b	8b
<u>Pyrroles</u>			
2,8	8,81 s	8,83 d (4,8)	8,86 m
3,7	8,81 s	8,77 d (4,8)	8,86 m
12	8,81 s	8,84 s	8,80 s
13	8,81 s	8,84 s	8,80 s
17	8,81 s	8,84 s	8,80 s
18	8,81 s	8,84 s	8,80 s
NH	-2,70 s él.	-2,72 s él.	-2,72 s él.
<u>phényle</u>			
3	7,2 m	7,30 d él (8,0)	7,33 m
4	7,7 m	7,73 dt (8,4-1,6)	7,70 dt (8,2-1,6)
5	7,2 m	7,34 t él. (7,2)	7,33 t él. (7,2)
6	7,9 m	8,02 dd (7,6-1,6)	8,02 dd (7,7-1,6)
<u>Tolyles</u>			
2,6	8,10 d (7,2)	8,10 d (7,6)	8,05 m
3,5	7,52 d (7,2)	7,53 d (7,6)	7,52 d (7,4)
CH ₃	2,70 s	2,69 s	2,69 s
<u>Bras espaceur</u>			
α	-	3,91 t (6,0)	3,80 t él (6,1)
β	-	1,30 m	1,28 m
γ	-	1,30 m	1,30 m
CH ₂ - éthyle	-	3,59 quad. (7,2)	-
CH ₃ - éthyle	-	0,73 t (7,2)	-

Tableau II-6 : RMN ¹H des triglucosylporphyrines para-substituées **5a**, **7a** et **9a**. δ en ppm (J en Hertz).

H	5a	7a	9a
<u>Pyrroles</u>			
2,8	8,89 d (4,5)	8,87 d (4,7)	8,86 d (4,7)
3,7	8,83 d (4,5)	8,83 d (4,7)	8,83 d (4,7)
12	8,86 s	8,84 s	8,83 s
13	8,86 s	8,84 s	8,83 s
17	8,86 s	8,84 s	8,83 s
18	8,86 s	8,84 s	8,83 s
NH	-2,76 s él.	-2,79 s él.	-2,79 s él.
<u>Phényle</u>			
2,6	8,05 d (8,3)	8,10 d (8,5)	8,07 d (8,5)
3,5	7,20 d (8,3)	7,28 d (8,5)	7,24 d (8,5)
<u>Aryles-Oses</u>			
2,6	8,15 d (8,4)	8,13 d (8,4)	8,10 d (8,3)
3,5	7,40 d (8,4)	7,38 d (8,4)	7,35 d (8,3)
<u>Bras espaceur</u>			
α	-	4,30 m	4,30 m
β	-	2,27 quint. (6,7)	2,34 quint (5,4)
γ	-	2,61 t (7,3)	2,78 t (7,1)
CH₃-tBu	-	1,53 s	-
<u>O-Glucosyles</u>			
1'	5,48 m	5,46 m	5,45 m
2'	5,48 m	5,46 m	5,45 m
3'	5,48 m	5,46 m	5,45 m
4'	5,35 t él. (9,5)	5,30 t él. (9,5)	5,30 m
5'	4,06 ddd (9,6-5,1-2,3)	4,06 ddd (9,9-5,4-2,3)	4,02 ddd (9,8-5,6-2,3)
6'a	4,44 dd (12,0-5,1)	4,42 dd (12,3-5,4)	4,39 dd (12,3-5,4)
6'b	4,31 d ap. (12,0)	4,30 m	4,28 m
<u>Acétyles</u>			
	2,11 s	2,10 s	2,08 s
	2,12 s	2,11 s	2,09 s
	2,22 s	2,12 s	2,10 s
		2,21 s	2,19 s

Tableau II-7 : RMN ¹H des trigluco-sylporphyrines ortho-substituées **5b**, **7b** et **9b**.*δ* en ppm (J en Hertz).

H	5b	7b	9b
<u>Pyrroles</u>			
2,8	8,88 m	8,83 m	8,83 m
3,7	8,86 m	8,83 m	8,83 m
12	8,86 m	8,80 s él.	8,78 m
13	8,86 m	8,80 s él.	8,78 m
17	8,86 m	8,80 s él.	8,78 m
18	8,86 m	8,80 s él.	8,78 m
NH	-2,78 s él.	-2,78 s él.	-2,75 s él.
<u>Phényle</u>			
3	7,33 d él (7,4)	7,33 m	7,28 dél. (8,3)
4	7,73 td (7,4-1,5)	7,75 td (8,0-1,6)	7,73 td (7,7-1,6)
5	7,35 t él (7,4)	7,33 m	7,33 m
6	7,98 dd (7,4-1,5)	8,00 dd (7,3-1,5)	8,01 dd (7,3)
<u>Aryles-Oses</u>			
2,6	8,12 d (8,5)	8,12 m	8,12 m
3,5	7,39 d (8,5)	7,37 d (8,4)	7,36 d (8,3)
<u>Bras espaceur</u>			
α	-	3,92 t (5,7)	3,93 t él. (5,8)
β	-	1,27 m	1,27 m
γ	-	1,31 t (5,1)	1,27 m
CH₃-tBu	-	1,01 s	-
<u>O-Glucosyles</u>			
1'	5,45 m	5,45 m	5,45 m
2'	5,45 m	5,45 m	5,45 m
3'	5,45 m	5,45 m	5,45 m
4'	5,30 t él. (9,6)	5,30 t él.(9,3)	5,30 t él. (9,5)
5'	4,04 ddd (9,6-5,1-2,1)	4,05 ddd (10,2-7,1-2,1)	4,03 ddd (9,0-4,9-2,5)
6'a	4,40 dd (12,4-5,4)	4,42 dd (12,3-5,4)	4,40 m
6'b	4,30 dd (12,4-2,1)	4,30 d ap. (12,3)	4,30 m
<u>Acétyles</u>			
	2,07 s	2,10 s	2,08 m
	2,08 s	2,11 s	2,09 s
	2,09 s	2,12 s	2,10 s
	2,10 s	2,21 s	2,19 s
	2,11 s	2,22 s	2,20 s
	2,12 s		2,21 s
	2,20 s-2,21s		

a- Etude du spectre de la porphyrine-ester triglucosylée 7a

Nous avons choisi, à titre d'exemple, de présenter l'étude détaillée du spectre RMN de la 5-(4-(3-terbutoxycarbonylpropyloxy)phényl)-10,15,20-tris(4-(2',3',4',6' tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl)porphyrine 7a. Cette triglucosylporphyrine est donc substituée en position *para* du groupement méso-aryl par un bras 3-terbutoxycarbonylpropyloxy.

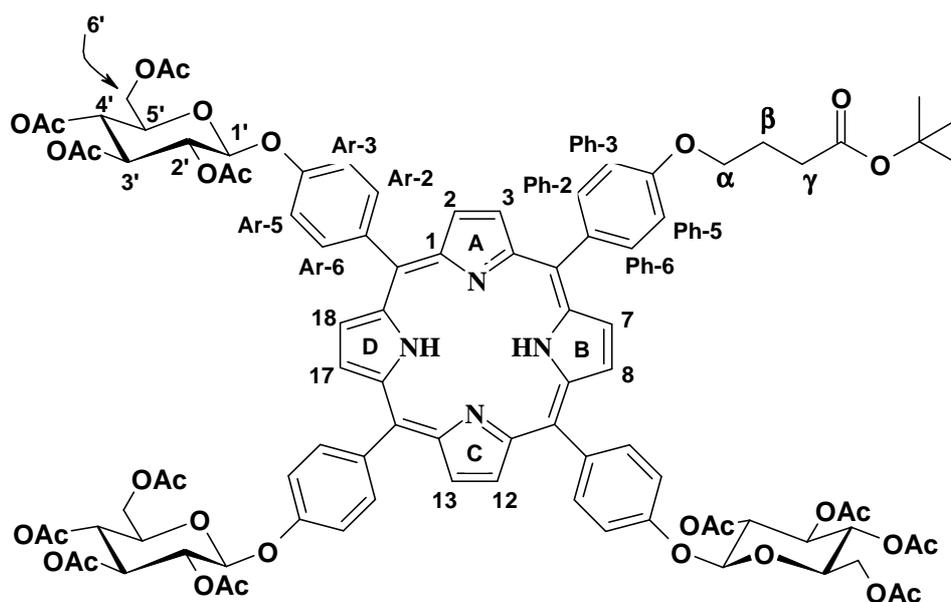


Figure II-20 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN.

Les protons aromatiques du phényl qui porte la chaîne hydrocarbonée en position *para* résonnent sous la forme de deux doublets à 7,28 ppm (H-Ph-3,5) et à 8,10 ppm (H-Ph-2,6) ($J = 8,6$ Hz). Les protons aromatiques des trois groupements phényle portant les unités glucidiques résonnent également, compte tenu de la symétrie de la molécule, sous forme de deux doublets situés à 7,38 ppm (H-Ar-3,5) et 8,13 ppm (H-Ar-2,6). Le rapport des intégrations des signaux correspondants aux protons aromatiques confirme les attributions. Les protons β-pyrroliques résonnent quant à eux sous la forme de trois signaux : à 8,84 ppm, on observe un singulet correspondant aux quatre protons des noyaux C et D (H-12,13,17 et 18). Les protons H-2,8 ainsi que les protons H-3,7 des noyaux A et B forment chacun un doublet situés respectivement à 8,87 ppm et 8,83 ppm avec une constante de couplage de 4,7 Hz. Le nombre et la multiplicité des signaux des protons β-pyrroliques est en accord avec la symétrie de la molécule. En ce qui concerne la partie osidique, les protons H-1', H-2' et H-3' se présentent sous la forme de multiplets vers 5,46 ppm. On observe également un multiplet

pour le proton H-4' à 5,30 ppm. Le proton H-5' conduit à un double double doublet à 4,06 ppm ($J = 9,9 ; 5,4$ et $2,2$ Hz). Enfin, les protons H-6'a,b sont observés sous la forme d'un double doublet à 4,42 ppm ($J = 12,3 ; 5,4$ Hz) et d'un multiplet à 4,30 ppm. Les protons des groupements acétyles donnent quatre singulets à 2,10 ppm, 2,11 ppm, 2,12 ppm et 2,21 ppm. Les protons α , β et γ de la chaîne alkyle résonnent respectivement sous la forme d'un multiplet à 4,30 ppm, d'un quintuplet à 2,27 ppm ($J = 6,7$ Hz) et d'un triplet situé à 2,61 ppm ($J = 7,2$ Hz). Les neuf protons équivalents du tertiobutyle donnent un singulet à 1,53 ppm. Finalement, on observe à $-2,79$ ppm un singulet élargi qui correspond aux protons NH pyrroliques internes.

b- Influence de l'orientation de la substitution - passage de la position para à la position ortho de la chaîne.

Le passage de la position de la chaîne en *para* du groupement phényle à la position en *ortho* entraîne un certain nombre de changements dans les spectres RMN du proton des tritolylyl et triglucosylporphyrines alkylées **6a,b**, **8a,b** et **7a,b**, **9a,b**. Les protons osidiques ne sont pas affectés par ce changement de substitution. Par contre, on constate une différence importante au niveau du bras *O*-alkyl. Ainsi, on observe un net blindage des protons de la chaîne hydrocarbonée (α , β , γ) suggérant que, pour les dérivés *ortho*, ces protons se trouvent dans le cône de blindage du macrocycle porphyrinique (tableau II-7). Les protons du groupement *tertiobutyle* subissent également dans ce cas l'effet du macrocycle. De plus, il est à noter que dans la série *ortho*, on observe une perte de symétrie de la molécule qui provoque la multiplication des signaux β -pyrroliques ainsi qu'un léger élargissement des protons aromatiques.

Tableau II-8 : variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) par passage d'une substitution para à une substitution ortho.

	tritolylyporphyrines		triglucosylporphyrines	
	$\Delta\delta(6b-6a)$	$\Delta\delta(8b-8a)$	$\Delta\delta(7b-7a)$	$\Delta\delta(9b-9a)$
α	-0,39	-0,51	-0,38	-0,37
β	-1,01	-1,05	-1,00	-1,07
γ	-1,36	-1,47	-1,30	-1,51
<i>tBu</i>	-	-	-0,52	-
<i>CH</i> ₂ -éthyl	-0,66	-	-	-
<i>CH</i> ₃ -éthyl	-0,63	-	-	-

Nous présentons sur la figure II-21, à titre d'exemple, les modifications observées pour les signaux des protons de la chaîne alkyle sur les spectres des porphyrines **7a** et **7b**.

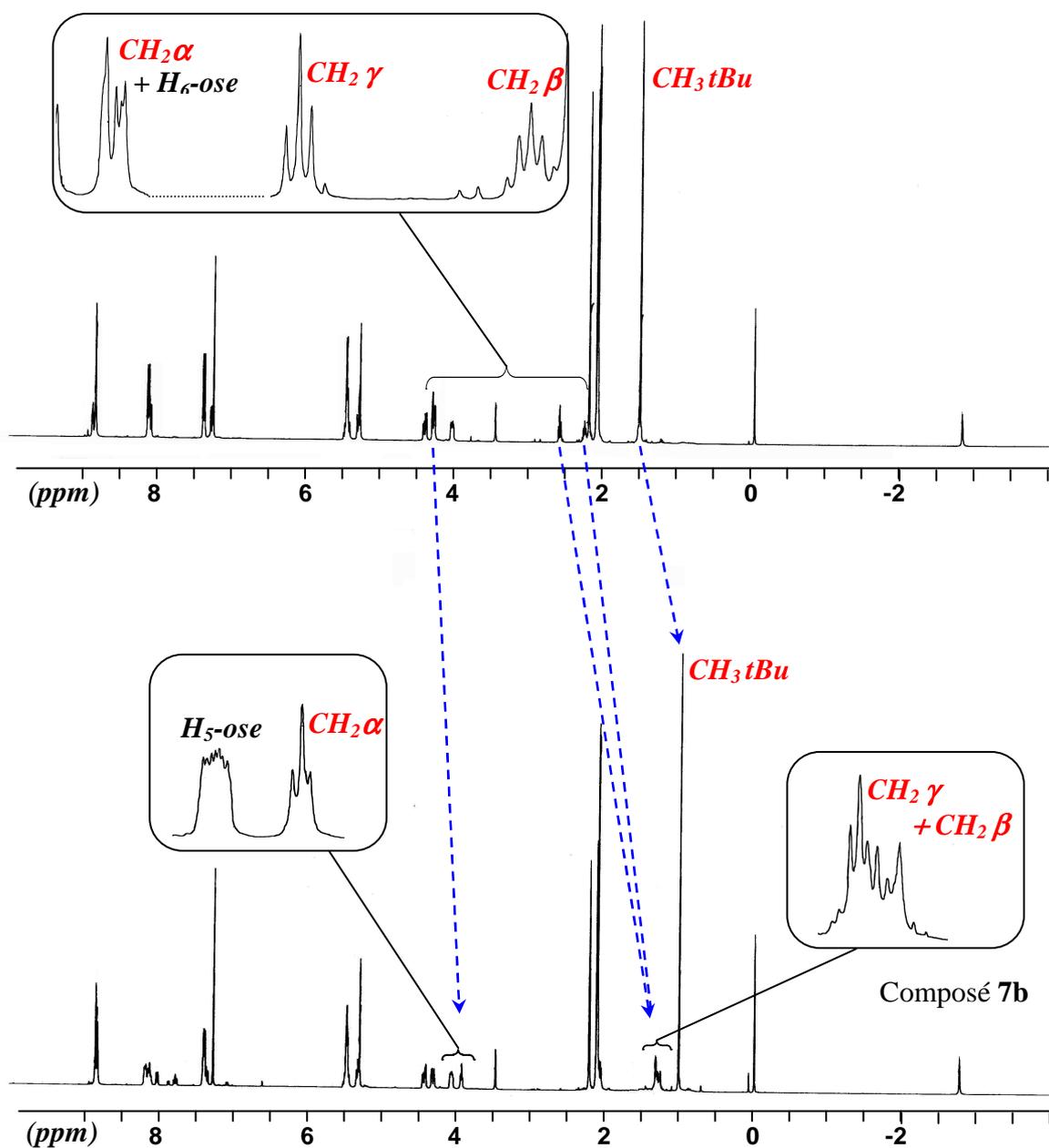


Figure II-21 : Exemple de l'influence de l'orientation du substituant sur les spectres RMN ^1H des composés **7a** et **7b**.

8-1-4 Spectroscopie RMN du carbone 13

Nous avons également réalisé les spectres RMN du ^{13}C de l'ensemble des précurseurs glucosylés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II-8. L'utilisation de la séquence

DEPT 135 a permis d'identifier les carbones secondaires. Les attributions ont été confirmées par les spectres 2D de corrélation hétéronucléaire directe ^1H - ^{13}C (HMQC).

Tableau II-9 : RMN ^{13}C (100 MHz) des porphyrines **5a,b**, **7a,b** et **9a,b** dans le CDCl_3 (δ ppm).

^{13}C	5a	5b	7a	7b	9a	9b
Pyrroles						
α	146,5	146,5	146,5	146,5	146,5	150,0
β	130,9	131,3	131,0	131,3	131,0	131,0
Méso						
5	120,2	120,5	120,3	120,5	120,2	119,7
10	119,2	119,7	119,2	119,7	119,2	119,3
15	119,1	119,6	119,1	119,6	119,1	119,1
20	119,2	119,7	119,2	119,7	119,2	119,3
Phényle						
1	134,4	137,0	134,4	137,0	134,5	137,2
2	135,7	155,6	135,6	155,6	135,6	156,3
3	113,7	115,5	112,8	115,5	112,7	112,0
4	156,0	130,5	158,9	130,5	158,7	129,9
5	113,7	119,6	112,8	119,6	112,7	119,7
6	135,7	135,0	135,6	135,0	135,6	135,5
Aryles-oses						
1	137,2	136,9	137,2	136,9	137,2	137,1
2,6	135,5	135,6	135,5	135,6	135,5	135,7
3,5	115,1	115,1	115,1	115,1	115,1	115,1
4	156,6	156,6	156,6	156,7	156,6	156,6
Bras espaceur						
α	-	-	67,2	67,4	66,9	66,9
β	-	-	25,0	24,1	24,8	23,6
γ	-	-	32,2	31,0	30,8	28,9
$\underline{\text{C}}=\text{O}$	-	-	172,6	172,1	178,4	175,0
$\underline{\text{C}}-(\text{CH}_3)_3$	-	-	53,4	53,4	-	-
$\underline{\text{C}}\text{H}_3$	-	-	28,2	27,7	-	-
O-Glucosides						
1'	99,2	99,1	99,2	99,2	99,1	99,1
2'	71,4*	71,3*	71,3*	71,3*	71,4*	71,3*
3'	72,9	72,8	72,8	72,8	72,9	72,8
4'	68,4	68,4	68,4	68,4	68,4	68,4
5'	72,3*	72,3*	72,3*	72,3*	72,3*	72,3*
6'	62,3	62,1	62,1	62,1	62,1	62,1
Acétyles						
	20,8	20,9	20,9	20,9	20,8	20,8
	20,7	20,8	20,8	20,8	20,7	20,7
	170,6	20,7	20,7	20,7	20,6	20,6
	170,3	20,6	20,6	20,6	170,6	170,7
	169,5	170,6	170,6	170,6	170,3	170,6
		170,3	170,3	170,3	169,7	170,3
		169,5	169,4	169,5		169,5

* : valeurs interchangeables

Nous avons pris comme base d'étude la porphyrine monohydroxylée **5a**. Elle présente les groupes de signaux suivants :

- ✓ Les carbones des acétyles CO sont les noyaux les plus déblindés et apparaissent vers 170 ppm
- ✓ Les deux carbones quaternaires portant les oxygène de la fonction hydroxyle et des unités glucidiques sont observés à 156,6 ppm et 156,0 ppm. Ils correspondent respectivement aux carbones notés C4-Aryle et C4-Phényle.
- ✓ Les carbones α et β pyrroles, qui se présentent sous la forme de figures élargies du fait de la tautomérie des protons NH pyrroliques, résonnent respectivement à 146,5 et 130,9 ppm.
- ✓ On observe à 137,2 ppm le carbone C1-Aryle et à 134,4 ppm le carbone C1-phényle.
- ✓ Les autres carbones des cycles aromatiques résonnent entre 113,7 ppm pour les carbones C3,5-Phényle et 135,7 ppm pour les carbones C2,6 phényles
- ✓ Les carbones *méso* apparaissent sous la forme de trois signaux situés à 119,2 pour les carbones C-10 et C-20, à 120,2 ppm et 119,1 ppm pour les carbones C-5 et C-15 respectivement.

En ce qui concerne les unités glucidiques, ont distingué également les signaux suivants :

- ✓ Le carbones anomérique C-1' résonne à 99,2 ppm, ce qui est caractéristique d'un β -glucoside. Les carbones C-3', C-4' et C-6' résonnent respectivement à 72,9 ppm, 68,4 ppm et 62,3 ppm.
- ✓ Quant aux deux carbones C-2' et C-5', ils résonnent sous la forme de deux signaux à 72,3 ppm et 71,4 ppm que nous n'avons pas réussi à attribuer avec précision.
- ✓ Enfin, on trouve vers 20 ppm les signaux des carbones méthyle des acétyles.

Le spectre du composé monohydroxylé **5b** substitué en position *ortho* présente très peu de variation par rapport au spectre que nous venons de détailler à l'exception des signaux des carbones du cycle aromatique portant la fonction hydroxyle. La présence de la chaîne alkyle pour les composés **7a,b** et **9a,b** n'entraîne également que peu de modification. En effet, la RMN du carbone 13 est peu sensible à l'anisotropie. Viennent s'ajouter aux signaux des carbones caractéristiques du macrocycle triglucosylé les signaux correspondant aux carbones α , β et γ du bras ainsi que les signaux des carbones du *tertiobutyl* ester dans le cas des composés **7a,b** et du carbone du carbonyle de la fonction acide carboxylique dans le cas des composés **9a,b**.

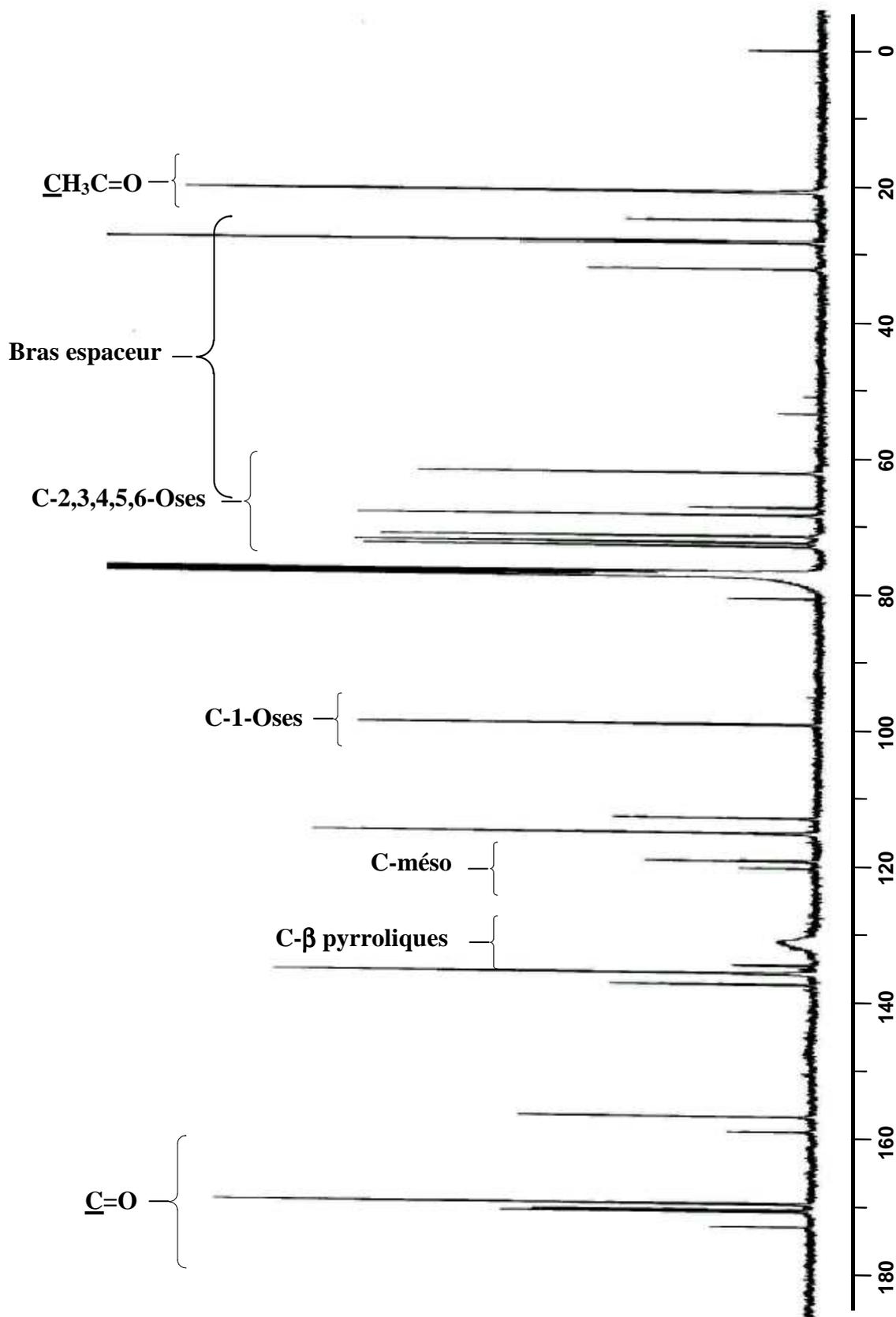


Figure II-22 : Spectre RMN ^{13}C du composé 7a.

8-2 Caractérisation des porphyrines peptidiques

8-2-1 Spectroscopie UV-Visible

L'ensemble des porphyrines **12a,b**, **13a,b** et **14a,b** à motif peptidique RGD a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible. Les spectres des composés **12a** et **12b** ont été mesurés dans le DMSO. Les spectres des composés **14a** et **14b** ont quant à eux été réalisés dans l'eau. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II-9. Comme dans le cas des précurseurs étudiés précédemment, ils correspondent tous aux spectres généralement attendus pour les *méso*-porphyrines bases libres et présentent une forte bande d'absorption vers 420 nm (bande de Soret) et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 590, 550 et 520 nm notées respectivement I, II, III et IV.

Tableau II-10 : Spectre UV-Visible des porphyrines **12a,b**, **13a,b** et **14a,b**.

composés	Solvant	Soret	IV	III	II	I
12a	DMSO	421 (191,2)	515 (8,6)	552 (5,5)	592 (2,3)	648 (1,2)
12b	DMSO	420 (320,0)	516 (19,8)	550 (12,8)	596 (5,9)	646 (5,8)
13a	CH ₃ Cl ₂ /MeOH (8/2)	420 (302,0)	516 (12,3)	552 (7,2)	592 (4,7)	648 (4,2)
13b	CH ₃ Cl ₂ /MeOH (8/2)	420 (296,0)	516 (11,4)	551 (7,1)	594 (4,2)	648 (2,8)
14a	H ₂ O	417 (282,7)	518 (6,3)	553 (5,8)	593 (4,0)	646 (3,2)
14b	H ₂ O	417 (216,3)	524 (5,9)	561 (5,9)	594 (3,2)	650 (2,5)

λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C

En revanche, nous avons constaté que les spectres des triglucosylporphyrines, complètement déprotégées, **14a,b** subissent d'importantes modifications en fonction de la concentration (figure II-23 et II-24). En effet, nous avons observé dans les deux cas une diminution de l'absorption pour des mesures effectuées à des concentrations relativement importantes ou, en d'autres termes, un comportement qui ne suit plus la loi classique de Beer-Lambert. Afin d'analyser plus en détail ce phénomène, nous avons réalisé pour ces deux composés un ensemble de mesures dans la gamme de concentration 10^{-8} - $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en utilisant des cuves de 10 mm ou 50 mm de largeur. Les courbes présentées figure II-25, qui représentent l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration, révèlent un écart à la linéarité à partir d'une concentration de l'ordre de $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

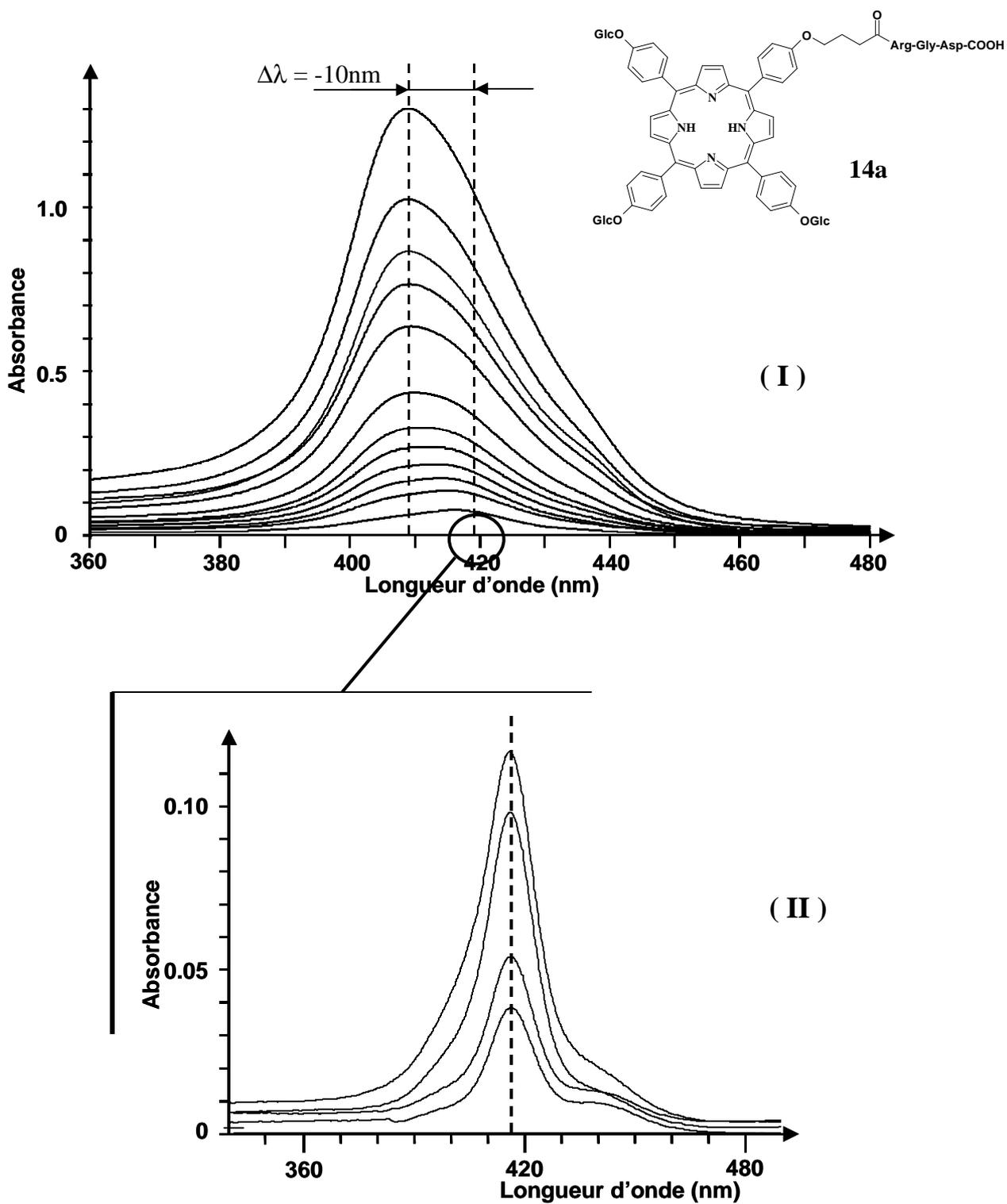


Figure II-23 : Evolution de la bande de Soret (composé **14a**) en fonction de la concentration.
 Graphique (I) : concentration $> 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 10 mm ; graphique (II) : concentration $< 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ -
 cuve de 50 mm.

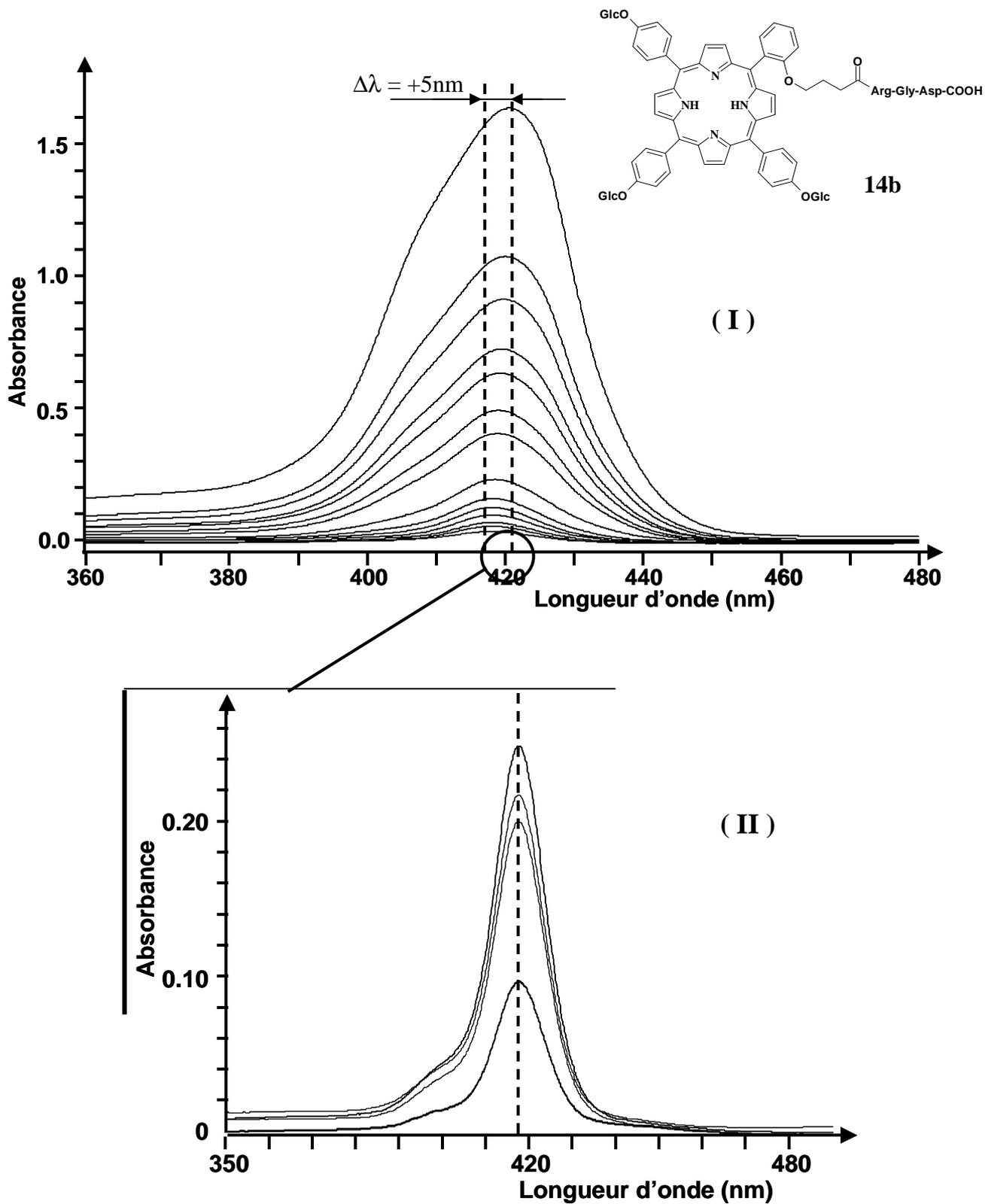


Figure II-24 : Evolution de la bande de Soret (composé **14b**) en fonction de la concentration.
 Graphique (I) : concentration $> 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - cuve de 10 mm ; graphique (II) : concentration $< 2.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ -
 cuve de 50 mm.

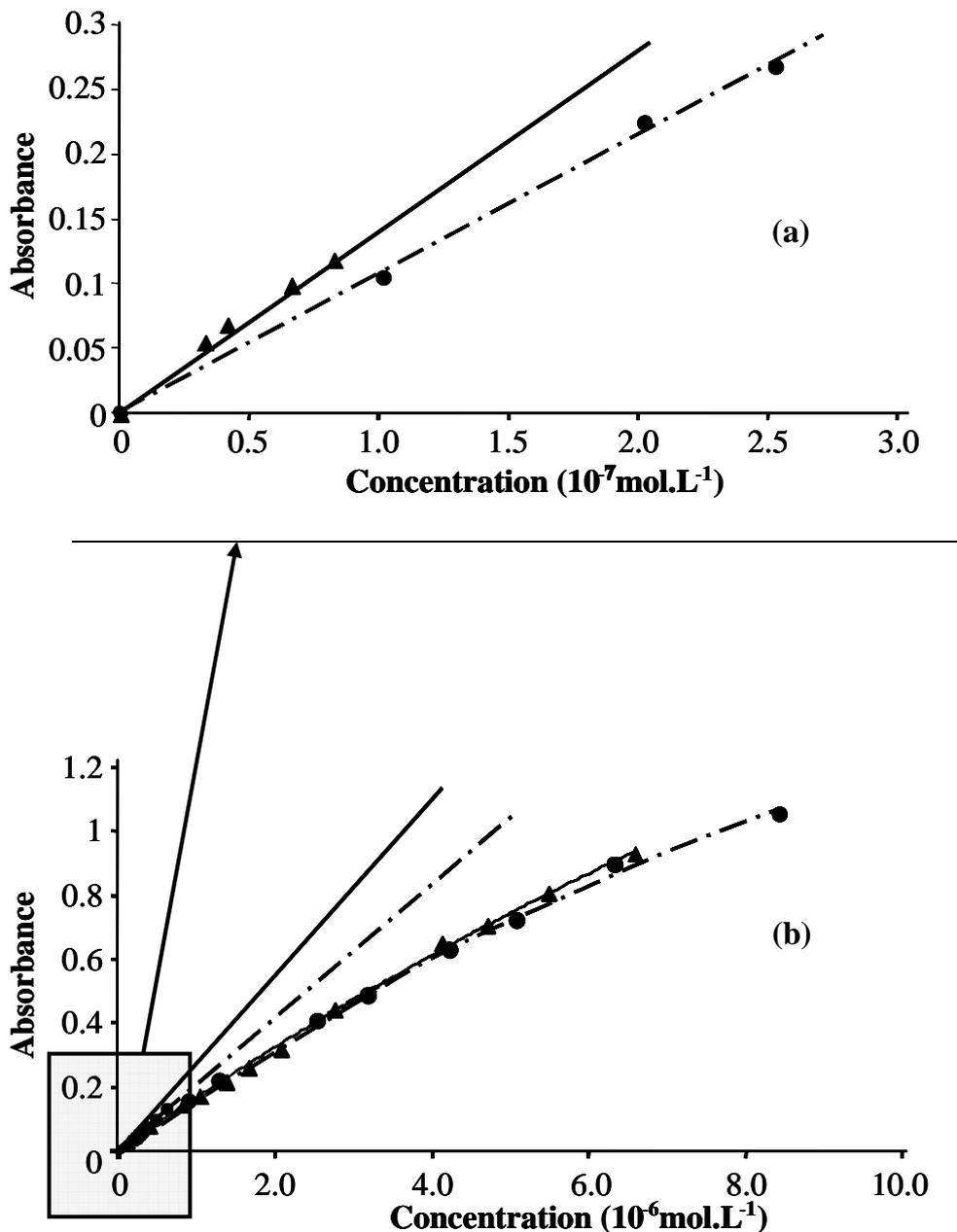


Figure II-25 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration ;
 (\blacktriangle , —) : composé **14a** et (\bullet , - · -) : composé **14b**.

De plus, la superposition des spectres obtenus à chaque concentration (figure II-23 et figure II-24) indique que la diminution de l'absorbance s'accompagne, dans le cas de la porphyrine **14a**, d'un déplacement de la bande de Soret vers le bleu ($\Delta\lambda = -10\text{nm}$) et dans le cas du composé **14b** d'un déplacement vers le rouge de la bande de Soret ($\Delta\lambda = +5\text{nm}$).

L'élargissement de la bande de Soret associé à une diminution de son coefficient d'absorption et d'un déplacement vers le bleu ou vers le rouge peut être interprété par la formation d'agrégats. Conformément au modèle de l'exciton^[120], un déplacement vers les faibles longueurs d'onde indique des interactions de type « face-to-face » (cas du composé **14a**) alors qu'un déplacement vers les grandes longueurs d'ondes suggère la formation d'agrégats de type « edge-to-edge » (cas du composé **14b**).

Les coefficients d'absorption molaire donnés dans le tableau II-9, ont été calculés pour des concentrations inférieures à 2.10^{-7} mol.L⁻¹.

8-2-2 Spectrométrie de masse.

Nous avons poursuivi l'analyse structurale des porphyrines peptidiques **12a,b** – **14a,b** par spectroscopie de masse MALDI. Comme dans le cas des précurseurs, seul le pic quasi moléculaire $[M+H]^+$ est observé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II-10.

Tableau II-11 : Spectrométrie de masse MALDI.

composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
12a	1086,2	1087,4
12b	1086,2	1087,4
13a	2081,7	2082,8
13b	2081,7	2082,7
14a	1578,5	1579,7
14b	1578,5	1579,7

Nous avons également effectué pour les composés **12a,b** et **14a,b** une analyse par Spectrométrie de Masse Haute Résolution dans le but de vérifier l'authenticité de ces composés par la détermination de leur formule brute sans aucune ambiguïté. Les spectres ont été réalisés au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) situé à Rennes à l'aide d'un spectromètre de masse ZABSpec. TOF de Micromass possédant une géométrie EBE TOF (Secteurs magnétique et électrique avec Temps de Vol orthogonal). Ils ont été

réalisés en Electronébulisation (ESI) en mode positif avec comme solvant un mélange CH₃CN/H₂O 5/5. Les ions sont accélérés avec une tension de 4000V. La détermination des masses précises est réalisée par balayage du champ électrique en utilisant les ions du polyéthylène glycol (PEG) comme référence interne. La précision obtenue est alors inférieure à 5 ppm.

Rappelons que la technique ESI consiste à introduire une solution d'échantillon dans un capillaire soumis à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant et par divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés dans un ensemble d'échantillonneurs vers l'analyseur où règne un vide poussé. Le mécanisme de formation des ions à partir des gouttelettes chargées est encore mal compris.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II-11. Dans tous les cas, ils confirment la formule brute attendue. Nous présentons figure II-26 à titre d'exemple, le spectre obtenu pour le composé **14a**.

Tableau II-12 : *Spectrométrie de Masse Haute Résolution.*

composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
12a	Calculée pour C ₆₃ H ₆₁ N ₁₀ O ₈ m/z = 1085,4736	1086,4821 [M+H] ⁺ (C ₆₃ H ₆₂ N ₁₀ O ₈ , m/z théo. = 1086,4814)
12b	Calculée pour C ₆₃ H ₆₁ N ₁₀ O ₈ m/z = 1085,4736	1086,4817 [M+H] ⁺ (C ₆₃ H ₆₂ N ₁₀ O ₈ , m/z théo. = 1086,4814)
14a	Calculée pour C ₇₈ H ₈₆ N ₁₀ O ₂₆ m/z = 1578,5713	1601,5627 [M+Na] ⁺ (C ₇₈ H ₈₆ N ₁₀ O ₂₆ Na, m/z théo = 1601,5612)
14b	Calculée pour C ₇₈ H ₈₆ N ₁₀ O ₂₆ m/z = 1578,5713	1601,5650 [M+Na] ⁺ (C ₇₈ H ₈₆ N ₁₀ O ₂₆ Na, m/z théo = 1601,5612)

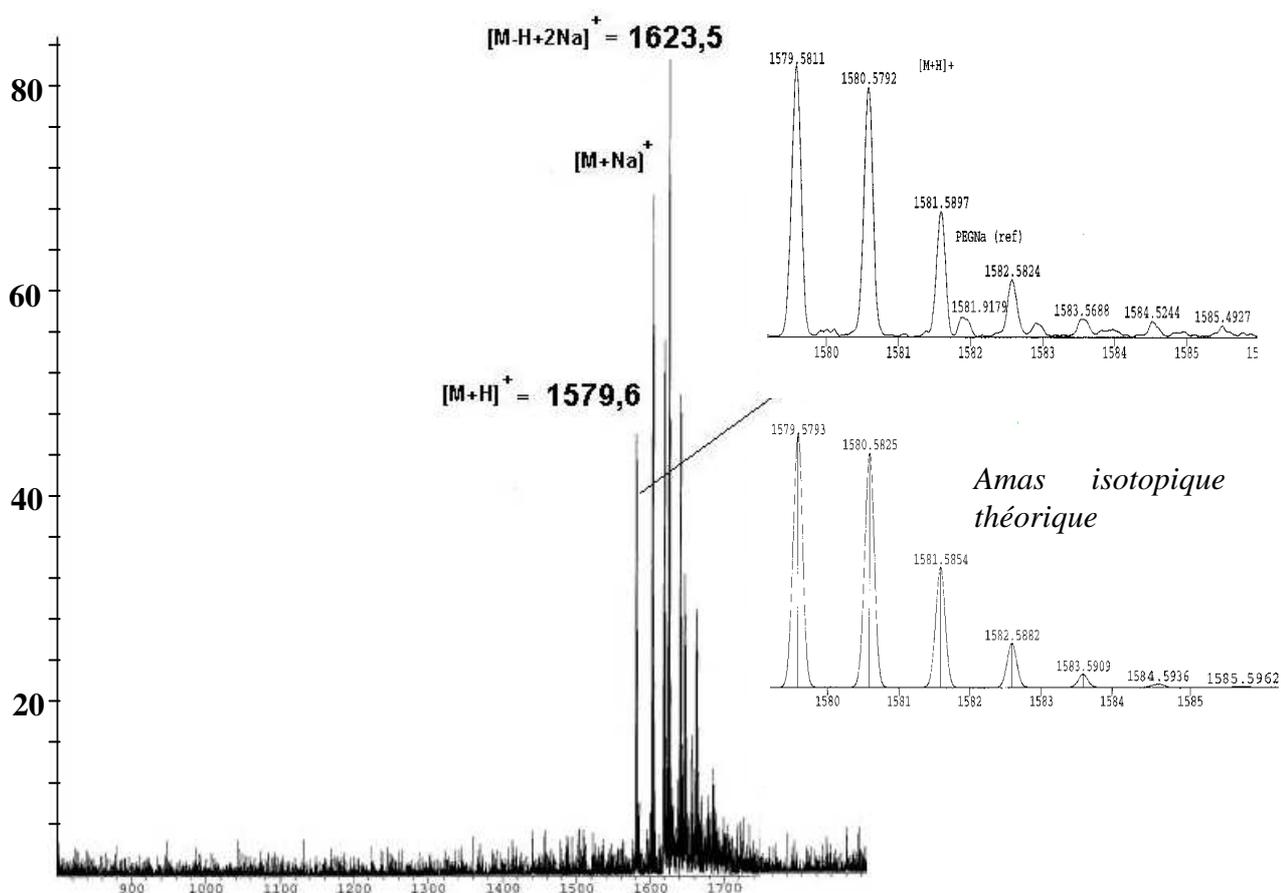


Figure II-26 : Spectre de masse haute résolution du composé **14a**.

8-2-3 Spectroscopie RMN.

Compte tenu de l'aptitude des porphyrines à motif peptidique déprotégé à s'auto-associer en solution, il nous a été particulièrement difficile de réaliser leur spectres de RMN ^1H . En outre, dans le cas du composé **12a** l'analyse s'est révélée infructueuse en raison d'une trop faible solubilité dans les solvants classiques. Le spectre du composé **12b** a, quant à lui, été enregistré dans le DMSO. En ce qui concerne les porphyrines peptidiques glucosylées **13a,b** et **14a,b**, les spectres obtenus dans des solvants variés montrent des signaux très déformés et fortement élargis pour lesquels il nous a été impossible d'assigner sans ambiguïté chaque proton des molécules. Toutefois, dans tous les cas, l'étude de la courbe d'intégration indique le bon nombre de protons. Bien que ce résultat soit couramment rencontré pour ce type de composés, nous avons tenté d'améliorer la résolution des spectres en effectuant plusieurs essais pour lesquels nous avons fait varier la nature du solvant mais aussi la température ou encore la concentration. Les meilleurs résultats pour les porphyrines **14a** et

14b ont été obtenus en les solubilisant dans un mélange de $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (50/50) contenant 5 équivalents molaires d'acide trifluoroacétique par porphyrine. En effet, il a déjà été observé que, sous leur forme diprotonée, les macrocycles tétrapyrroliques présentent une plus faible aptitude à l'agrégation. L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée grâce à l'étude des courbes d'intégration et des spectres de corrélation 2D proton-proton (COSY). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II-12 et la figure II-27 présente le spectre RMN ^1H du composé **14a**.

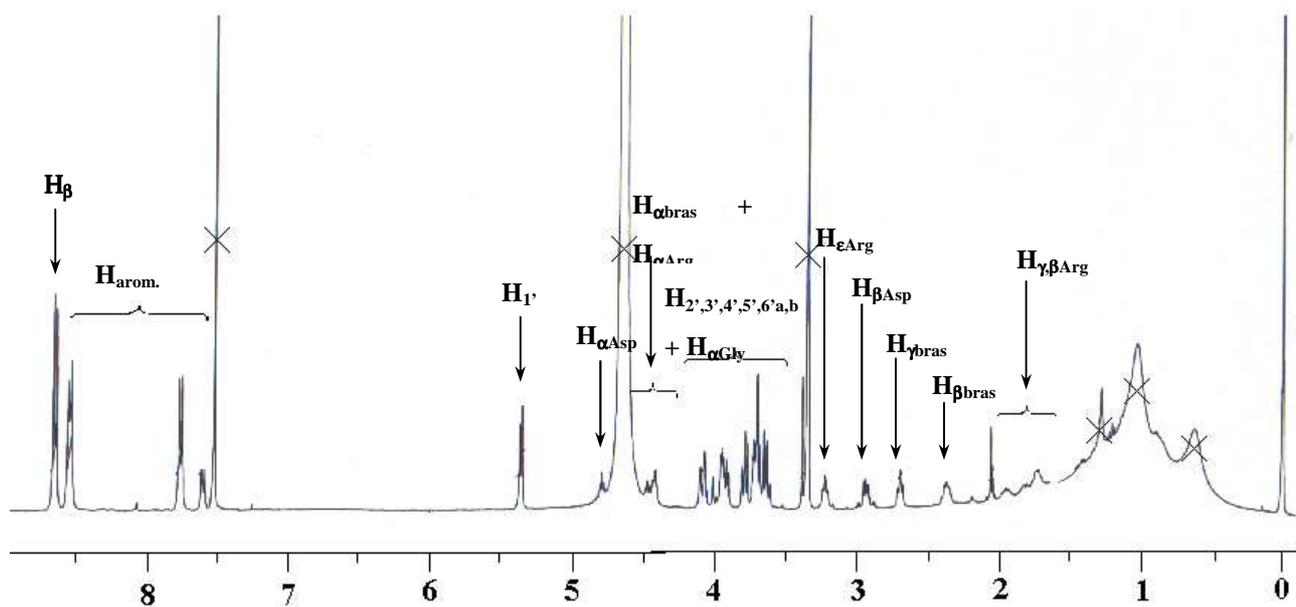


Figure II-27 : Spectre RMN ^1H du composé **14a**.

Tableau II-13 : Spectroscopie RMN ¹H des composés **12b**, **14a** et **14b**. δ en ppm (J en Hertz).

<i>H</i>	12b	14a	14b
Pyrroles			
2,8	8,81 m	8,67 s	8,79 m
3,7	8,74 m	8,67 s	8,79 m
12,13,17,18	8,74 m	8,65 s	8,79 m
NH	-2,86 s él.	-	-
Phényl			
2	-	8,55 d (8,4)	-
3	7,31 m	7,61 d (8,4)	7,63 d él. (7,0)
4	7,78 t él. (7,9)	-	8,01 t él. (7,4)
5	7,31 m	7,61 d (8,4)	7,65 m
6	7,95 m	8,55 d (8,4)	8,33 d (7,4)
Aryl			
3,5	7,57 d (7,5)-7,61 d (7,0)	7,77 d (8,5)	7,84 d (7,3)-7,85 d (7,3)
2,6	8,07 d (6,4)-8,04 d (6,4)	8,56 d (8,2)	8,58 m
CH ₃ toyles	2,65 s él.	-	-
Bras espaceur			
α	3,93 t él. (6,2)	4,31 t él (6,0)	3,61 t él. (6,0)
β	1,20 m	2,37 q él (6,5)	1,66 m
γ	1,20 m	2,70 t (7,0)	1,69 m
Glucoses			
1'	-	5,38 d (6,7)	5,36 d (7,0)
2'	-	3,79 t (8,0)	3,80 t (9,0)
3'	-	3,71 m	3,74 m
4'	-	3,64 t (8,0)	3,65 t (9,0)
5'	-	3,71 m	3,74 m
6'a	-	4,09 d ap. (10,5)	4,12 dd ap. (12,0-6,0)
6'b	-	3,93 dd (12,0-5,2)	3,93 m
Arg			
α	4,12 m	4,49 t (6,7)	3,96 m
β	1,28 m	1,82 m	1,22 m
γ	1,23 m	1,73 m	1,22 m
ε	2,28 m	3,22 m	2,86 m
NH-C=O	7,86 d él. (7,3)	-	-
Gly			
α(CH ₂)	4,01 d él. (6,4)	3,96 m	4,26 m
NH-C=O	7,49 t (7,8)	-	-
Asp			
α(CH)	4,28 quad. él. (7,2)	4,80 t (5,6)	4,64 t (5,6)
β(CH ₂)	1,28 m	2,94 m	2,80 d él. (6,0)
NH-C=O	8,32 m	-	-

Les spectres sont effectués dans le DMSO pour **12b** et dans CHCl₃/CD₃OD/TFA pour **14a** et **14b**.

On distingue pour chacun de ces composés les signaux caractéristiques du macrocycle tétrapyrrolique, des groupements phényle ainsi que les protons des unités glucidiques dans le cas des composés **14a,b**. S'ajoutent à ceux-ci les signaux correspondant aux protons portés par la chaîne peptidique. On peut noter que, comme dans le cas des porphyrines précurseurs, le passage d'une substitution *para* à *ortho* se traduit par un blindage général des protons du substituant périphérique. De plus, la substitution *ortho* engendre une perte de symétrie qui se traduit par la multiplication des signaux β -pyrroliques et un dédoublement des signaux correspondant aux protons aromatiques 3,5 et 2,6 des phényle portant les unités glucidiques.

SYNTHÈSE DE TRIGLUCOSYLES PORPHYRINES PORTANT UN PENTAPEPTIDE CYCLIQUE INSATURE A MOTIF RGD

1 – Introduction

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, la conformation du motif peptidique RGD est essentielle pour assurer un ciblage tumoral par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le pentapeptide cyclique Cys-Arg-Gly-Asp-Cys, dont le cycle est formé *via* un pont disulfure, présente une très forte affinité pour cette intégrine. Cependant, il est connu que les liaisons soufre-soufre présentes sur des peptides ou des protéines peuvent être réduites sous l'action d'enzymes spécifiques de la famille des thiorédoxines ce qui a pour conséquence de diminuer la durée de vie plasmatique de tels composés biologiquement actifs^[121]. Nous avons pensé que la substitution de la liaison soufre-soufre par une double liaison carbone-carbone permettrait d'assurer une plus grande stabilité au peptide tout en conservant une conformation suffisamment rigide de la séquence RGD, voisine de celle décrite par Ruoslahti, et donc favorable à une interaction spécifique avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Dans ce chapitre, nous présentons la synthèse et la caractérisation de deux nouvelles porphyrines glucosylées portant un pentapeptide cyclique à motif RGD analogue de la séquence CRGDC décrite par Ruoslahti et *coll.*^[81].

L'unité peptidique, cyclisée par réaction de métathèse des alcènes, est fixée, comme pour les macrocycles **12a,b** et **14a,b**, en position *para* ou *ortho* du groupement phényle par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

2 – Etude préliminaire – Stratégie de synthèse.

2-1 Etude préliminaire par modélisation moléculaire

Nous nous sommes proposé dans un premier temps d'étudier les caractéristiques conformationnelles d'une telle structure par modélisation moléculaire. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel de modélisation moléculaire HyperChem[®] 5.01 en appliquant le champ de force MM⁺ et le module de recherche conformationnelle Chem+ dans le but de déterminer des conformations d'énergie minimale des deux isomères *cis* et *trans* du pseudo-peptide cyclique représenté figure III-2, analogue du pentapeptide cyclique CRGDC.

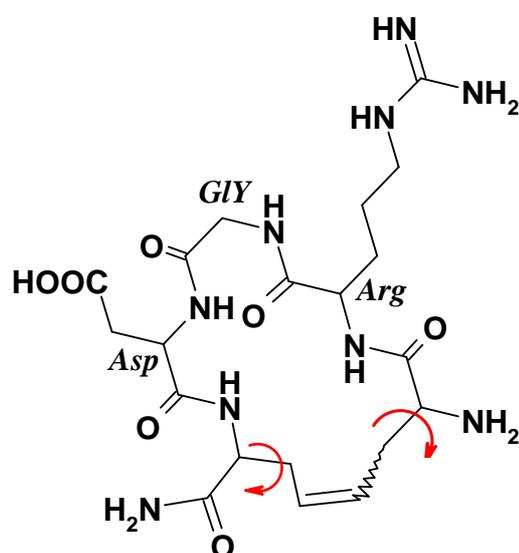


Figure III-2 : Représentation du pentapeptide cyclique étudié, analogue du peptide cyclique CRGDC.

Nous avons fait varier aléatoirement les angles ϕ_i , ψ_i définissant en partie la géométrie de la chaîne peptidique ainsi que les angles dièdres situés de part et d'autre de la double liaison (représentés par deux flèches rouges sur la figure III-2). Les angles ω_i ont été quant à eux fixés à 180° .

Dans les deux cas, les résultats obtenus montrent que la conformation du motif RGD engagé dans le cycle est proche de celle que nous avons présentée pour le peptide cyclique CRGDC au chapitre précédent. Les distances $C^{\alpha}_{Arg}-C^{\alpha}_{Asp}$ indiquées figure III-3 sont alors de $5,94\text{\AA}$ et de $5,34\text{\AA}$ pour les isomères *cis* et *trans* respectivement, caractéristique conformationnelle qui devrait permettre, rappelons-le, une bonne sélectivité vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

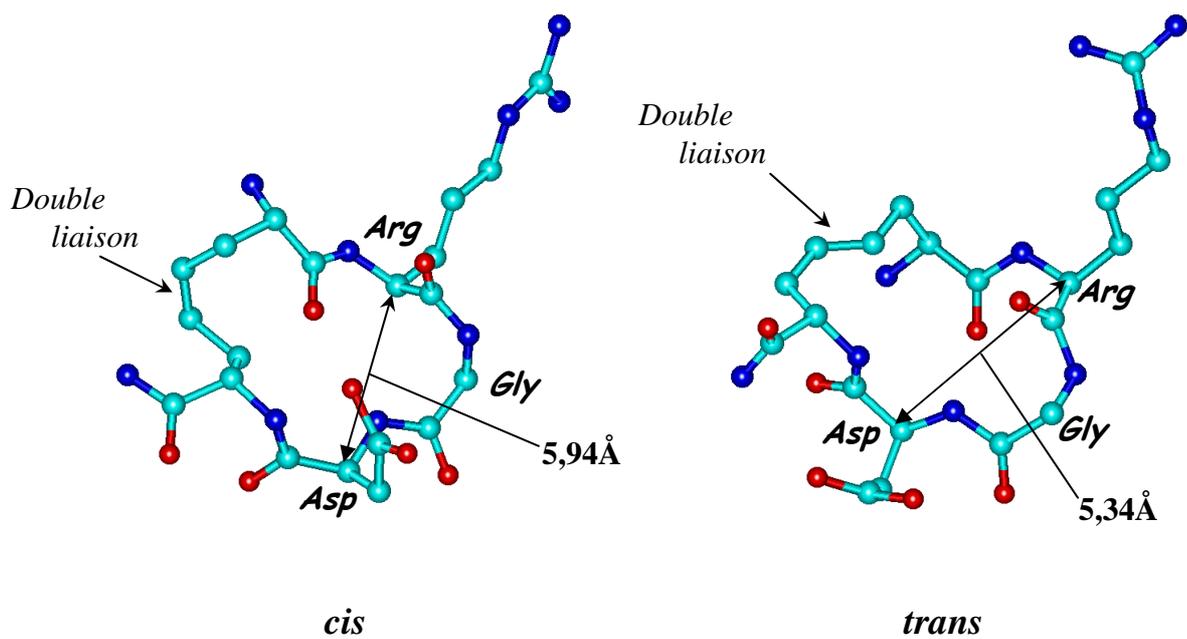


Figure III-3 : Conformations d'énergie minimale obtenues pour les deux isomères *cis* et *trans* du pentapeptide cyclique.

Dans la suite de notre travail, nous nous sommes proposé de synthétiser les deux *méso*-triglycosylporphyrines **19a** et **19b** portant cette séquence peptidique.

2-2 Stratégie de synthèse

Les différentes étapes de synthèse de ces composés sont représentées sur le schéma rétrosynthétique de la figure III-4. La cyclisation du peptide constitue l'étape clef de cette synthèse. La double liaison carbone-carbone est obtenue par réaction de métathèse des alcènes, en phase solide, à partir du pentapeptide *L-allylGly-Arg-Gly-Asp-L-allylGly* immobilisé sur une résine Rink-Amide-MBHA. Les carboxypropyloxyphényl-triglucoylporphyrines **9a** et **9b** sont alors fixées sur ce peptide, après déprotection de la fonction amine terminale protégée par un groupement Fmoc. Les composés finals **19a** et **19b** sont isolés par décrochage du support et déprotection simultanés des fonctions protégées des acides aminés.

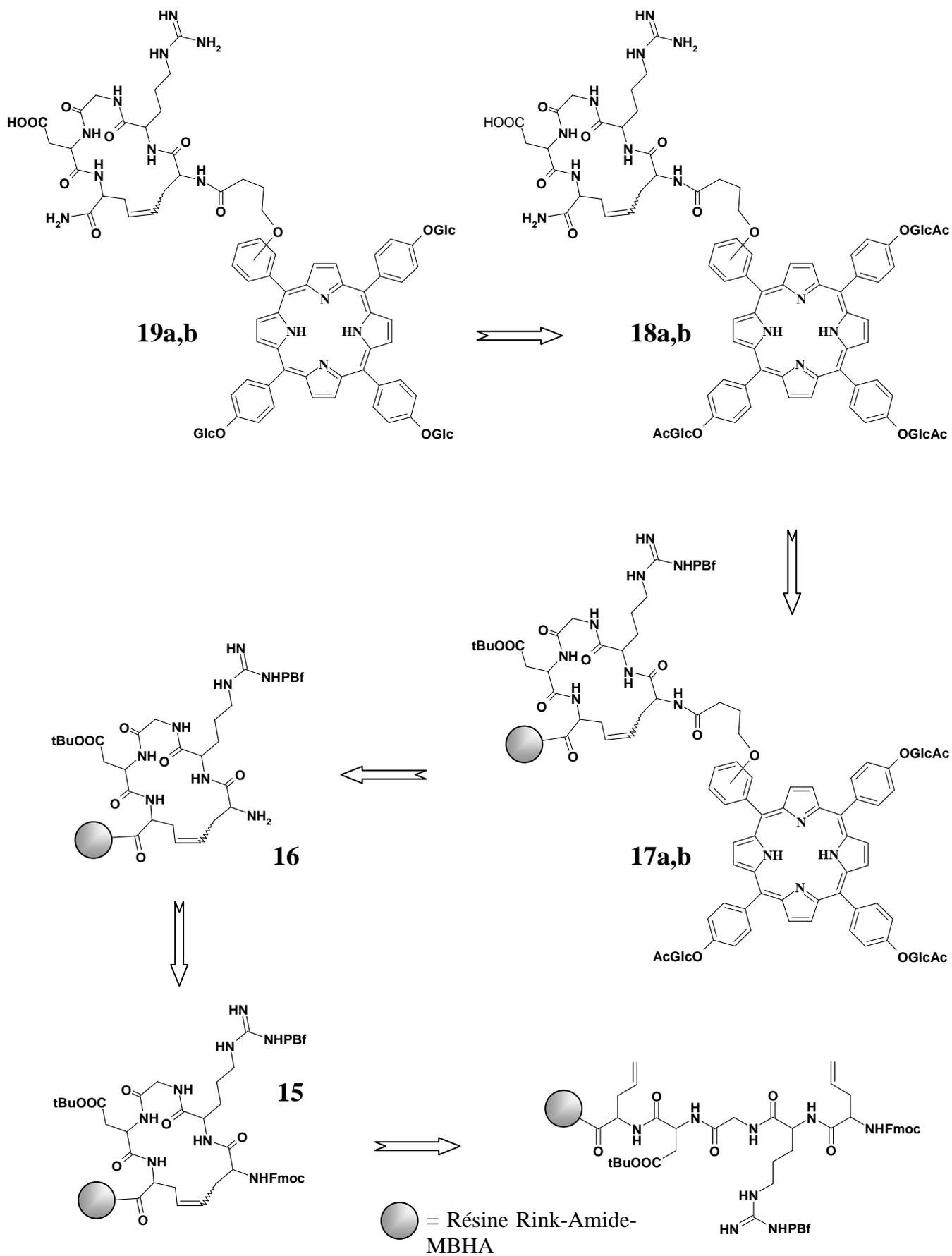


Figure III-5 : Schéma rétrosynthétique des composés **19a,b**.

3 – Cyclisation du peptide *allG-R-G-D-allG*

Nous avons choisi comme substrat de départ pour cette synthèse le pentapeptide *allG-RGD-allG* greffé sur support solide. Celui-ci, synthétisé selon la méthode des Fmoc amino-acides, nous a été fourni par la société Néosystème. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la première étape de la synthèse consiste alors à cycliser le peptide *via* les deux groupements allyles, situés à chaque extrémité, par réaction de métathèse des alcènes. Nous nous proposons tout d'abord de faire un bref rappel sur la réaction de métathèse.

3-1 Réaction de métathèse

3-1-1 Généralités

La réaction de métathèse, d'une manière générale, consiste à faire réagir entre eux deux alcènes pour former deux nouvelles molécules d'alcènes résultant de l'échange des groupement alkylidènes substituant les alcènes initiaux (figure III-6).

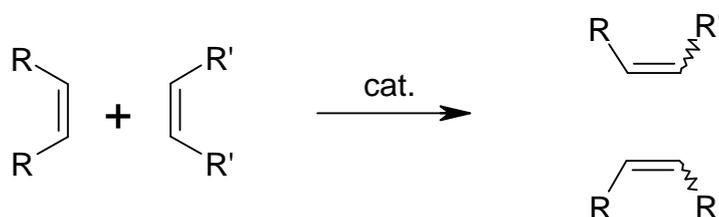


Figure III-6 : Réaction de métathèse des alcènes.

On dénombre sous l'appellation métathèse cinq types de réactions (figure III-7) :

- ✓ **la métathèse croisée « CM » pour *Cross Metathesis*** qui permet l'échange des groupements alkylidènes portés par des alcènes identiques ou différents donnant naissance à deux nouvelles molécules.
- ✓ **L'ouverture de cycle par métathèse « ROM » pour *Ring Opening Metathesis***. Dans ce cas, un cycle insaturé est ouvert par réaction avec une oléfine simple.
- ✓ **La polymérisation de diènes acycliques par métathèse « ADMET » pour *Acyclic Diene METathesis***. Elle permet de former des polymères insaturés par métathèse de diènes acycliques.

✓ La polymérisation par ouverture de cycle par métathèse « ROMP » pour *Ring Opening Metathesis Polymerisation*, qui permet de former des polymères insaturés à partir de monomères cycliques insaturés.

✓ La fermeture de cycle par métathèse « RCM » pour *Ring Closing Metathesis* qui permet d'obtenir des cycles de tailles variées.

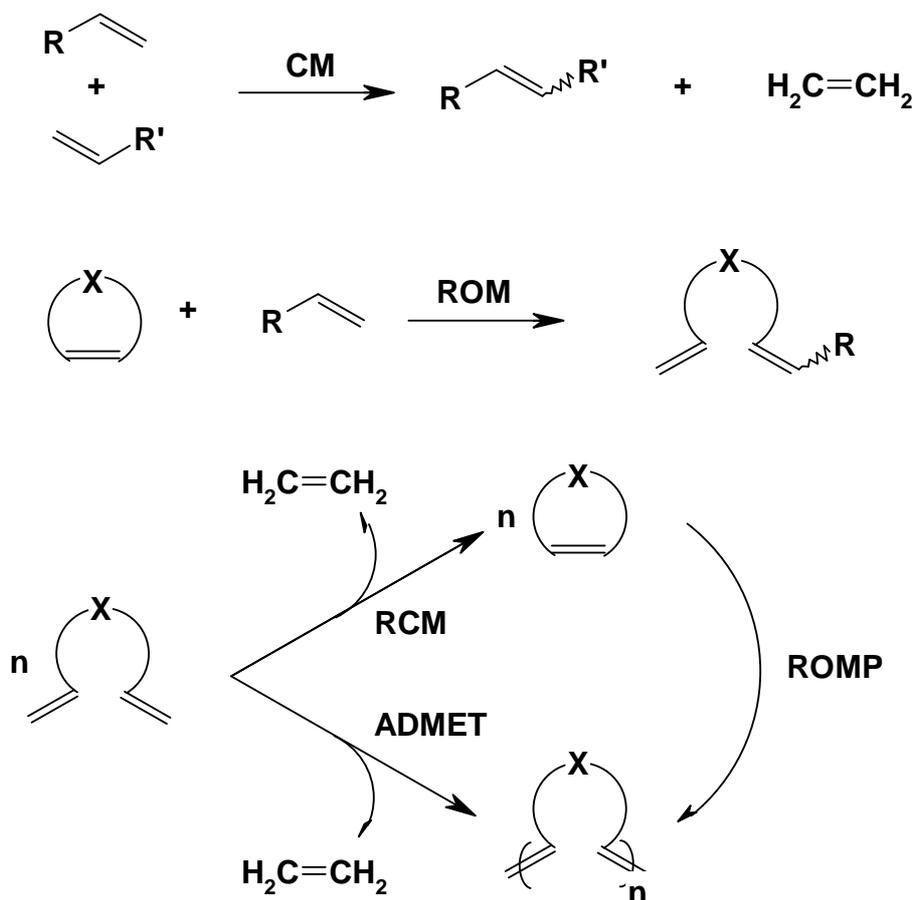


Figure III-7 : Les différentes possibilités de métathèse

En 1955, Anderson et Merckling ont découvert cette réaction en observant la polymérisation du norbornène en présence de dérivé du titane II. Natta et *coll.* ont quant à eux rapporté plus tard la polymérisation d'oléfines cycliques par ouverture de cycle avec un catalyseur. Par la suite, Calderon et *coll.* ainsi que Mol et *coll.* ont étudié cette réaction et ont montré que la métathèse induisait un échange de groupement alkylidènes^[122]. En 1971, Hérisson et Chauvin ont proposé un mécanisme pour cette réaction basé sur le postulat qu'un intermédiaire métallocyclobutane se forme par l'alternance de cycloaddition [2+2] et de cycloréversion (figure III-8)^[123].

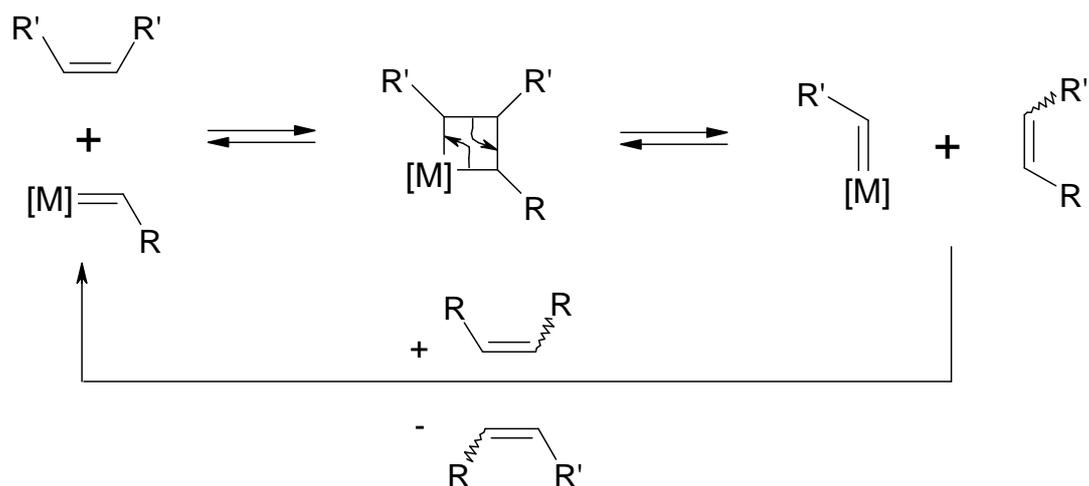


Figure III-8 : Mécanisme de la réaction de métathèse proposé par Chauvin

Parce que les catalyseurs utilisés jusqu'au milieu des années 70, constitués de sels métalliques et d'agents alkylants comme par exemple $\text{WCl}_3/\text{Bu}_3\text{Sn}$, $\text{WOCl}_4/\text{EtAlCl}_2$, $\text{MoO}_3/\text{SiO}_2$, $\text{W}(\text{CO})_6/h\nu$ ou encore $\text{Re}_2\text{O}_7/\text{Al}_2\text{O}_3$, ne toléraient pratiquement aucune fonction hétéroatomique, cette réaction n'a pas connu beaucoup d'applications en synthèse organique^[124]. A la fin des années 80, de nouveaux catalyseurs, mieux définis, à base de tungstène, de titane ou de molybdène ont émergé. Ils ont permis d'effectuer les réactions dans des conditions plus douces. Ainsi, des catalyseurs comme les alkylidènes de molybdène (de formule générale $(\text{NAr})(\text{OR}')_2\text{MCHR}$) ont été très largement utilisés^[125], notamment celui pour lequel $\text{Ar} = 2,6\text{-iPr-C}_6\text{H}_3$, $\text{R} = \text{CMe}_2\text{Ph}$ et $\text{R}' = \text{C}(\text{CH}_3)(\text{CF}_3)_2$.^[126] Ce dernier présente une forte activité catalytique mais il est également très sensible à l'humidité et au dioxygène de l'air. De ce fait, les conditions de réaction doivent être très rigoureuses, avec une atmosphère parfaitement inerte et les substrats de départ bien choisis. Il a été observé que la tolérance des catalyseurs pour les fonctions hétéroatomiques peut être améliorée lorsque la nature du métal de transition utilisé varie dans la classification périodique de gauche à droite et de bas en haut dans une colonne. Les métaux les plus prometteurs se révèlent être le molybdène et surtout le ruthénium. En effet, les progrès sans doute les plus importants ont été réalisés grâce à la synthèse des catalyseurs au ruthénium développés par Grubbs et *coll.*, et ceux au molybdène développés par Schrock et *coll.*

Les premiers catalyseurs au ruthénium synthétisés sont le triphénylphosphine-3,3-diphénylprop-2-èn-1-ylidènedichlororuthénium^[127] obtenu par ouverture du cycle d'un 3,3-diphénylcyclopropène par un précurseur phosphine ruthénium, et un de ces dérivés, le tricyclohexylphosphine-3,3-diphénylprop-2-èn-1-ylidènedichlororuthénium^[128], obtenu par

le remplacement des groupes triphénylphosphines par des tricyclohexylphosphines. Ces deux composés sont notés respectivement **A** et **B** sur la figure III-9.

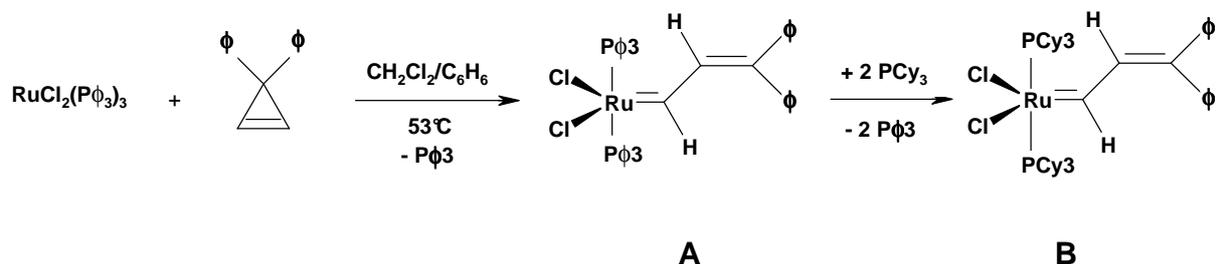


Figure III-9 : Synthèse des catalyseurs **A** et **B**.

Si ces deux catalyseurs présentent une activité très importante aussi bien en ROMP qu'en RCM^[129], ils restent néanmoins relativement peu performants au niveau de l'initiation de la réaction. Pour améliorer ce point, Grubbs et *coll.*^[130] ont remplacé le groupement diphenylvinyle carbène par un groupement benzylidène. Ils ont ainsi obtenu entre autres le bis-tricyclohexylphosphinedichlororuthénium benzylidène, noté **C** (figure III-10), qui s'est révélé être un catalyseur de choix, très stable, ouvrant la voie à un très vaste éventail de réactions de métathèse.

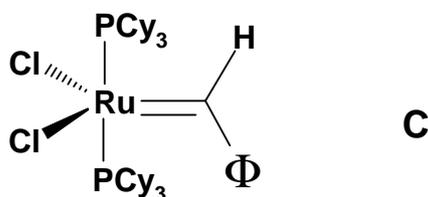


Figure III-10 : Bis-tricyclohexylphosphinedichlororuthénium benzylidène (catalyseur **C**).

Il serait fastidieux d'énumérer toutes les synthèses réalisées avec ce catalyseur en raison du nombre très important de travaux publiés au cours de ces dernières années. Toutefois nous pouvons dire que ce catalyseur permet de réaliser tous les types de métathèse sur des substrats possédant diverses fonctions comme des esters, des acétals, des alcools protégés, des amides, des amines ou encore des acides aminés dont la fonction acide n'est pas protégée^[131].

Toujours dans le but d'améliorer les propriétés catalytiques, de nombreux autres catalyseurs au ruthénium ont été synthétisés parmi lesquels le 4,5-dihydro-1,3-diméthyl-imidazolidin-2-ylidène(tricyclohexylphosphine)dichlororuthéniumbenzylidène (catalyseur noté **E**) développé par Grubbs et récemment mis sur le marché (figure III-11).

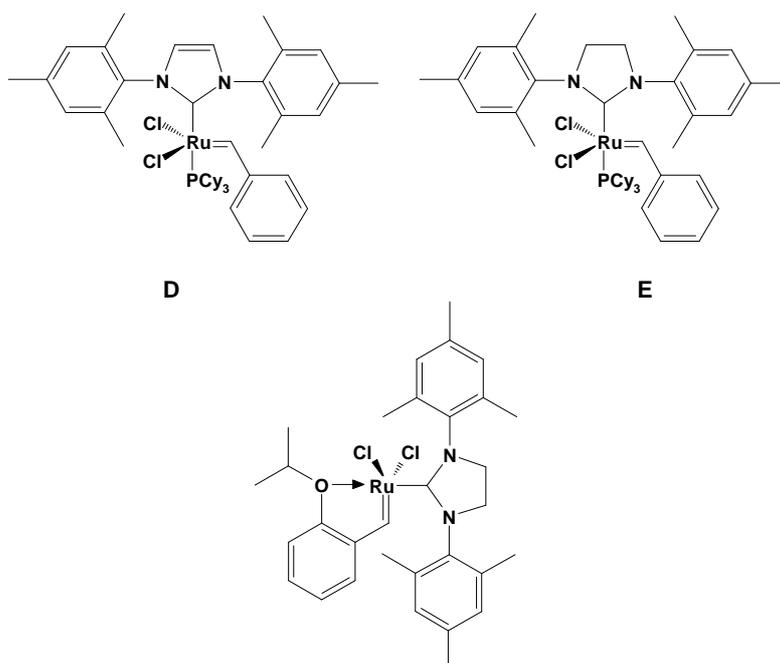


Figure III-11: Exemple de catalyseurs de métathèse développés récemment.

3-1-2 Mécanisme de la réaction de métathèse

Le mécanisme couramment admis pour cette réaction est celui proposé par Chauvin. On distingue dans ce mécanisme deux cycles : un cycle appelé cycle *non-productif* au cours duquel l'oléfine de départ et le catalyseur sont régénérés, le deuxième, dit *productif*, permettant d'obtenir l'alcène souhaité. En 1997, Grubbs et coll.^[132] ont effectué une étude très complète pour mettre en évidence les différentes étapes de la réaction de métathèse ainsi que l'influence des ligands sur l'activité des dérivés du catalyseur que nous avons noté A (figure III-12).

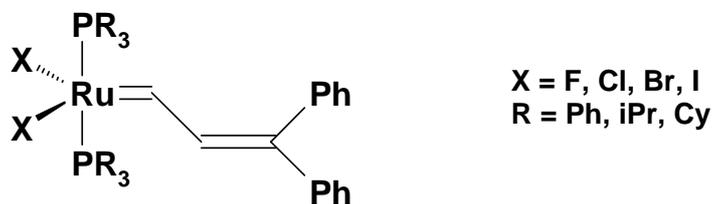


Figure III-12 : Dérivés du catalyseur A.

Grubbs a montré dans un premier temps que les phosphines les plus encombrées et les plus électro-donneuses conduisaient aux catalyseurs les plus actifs. Ainsi, le classement de la réactivité en fonction du substituant R de la phosphine est le suivant :

$\text{PPh}_3 < \text{PiPr}_2\text{Ph} < \text{Pcy}_2\text{Ph} < \text{PiPr}_3 < \text{Pcy}_3$. De plus, le remplacement du ligand chlore sur ces différentes structures par d'autres halogènes à montrer que le ligand Cl était celui qui conduisait généralement aux meilleurs rendements. Il a également été montré que le carbène $\text{Ru}=\text{CH}=\text{C}\phi_2$ sert d'initiateur et l'espèce réactive qui permet la propagation de la réaction est le carbène $\text{Ru}=\text{CH}_2$ noté **1**. Le cycle productif du mécanisme de la métathèse est représenté sur la figure III-13. Le complexe **1** est l'espèce réactive : c'est de sa stabilité et de sa réactivité que dépendra la réaction de métathèse. Plus généralement, l'étape d'initiation dépendra de la capacité du catalyseur à fixer l'oléfine de départ.

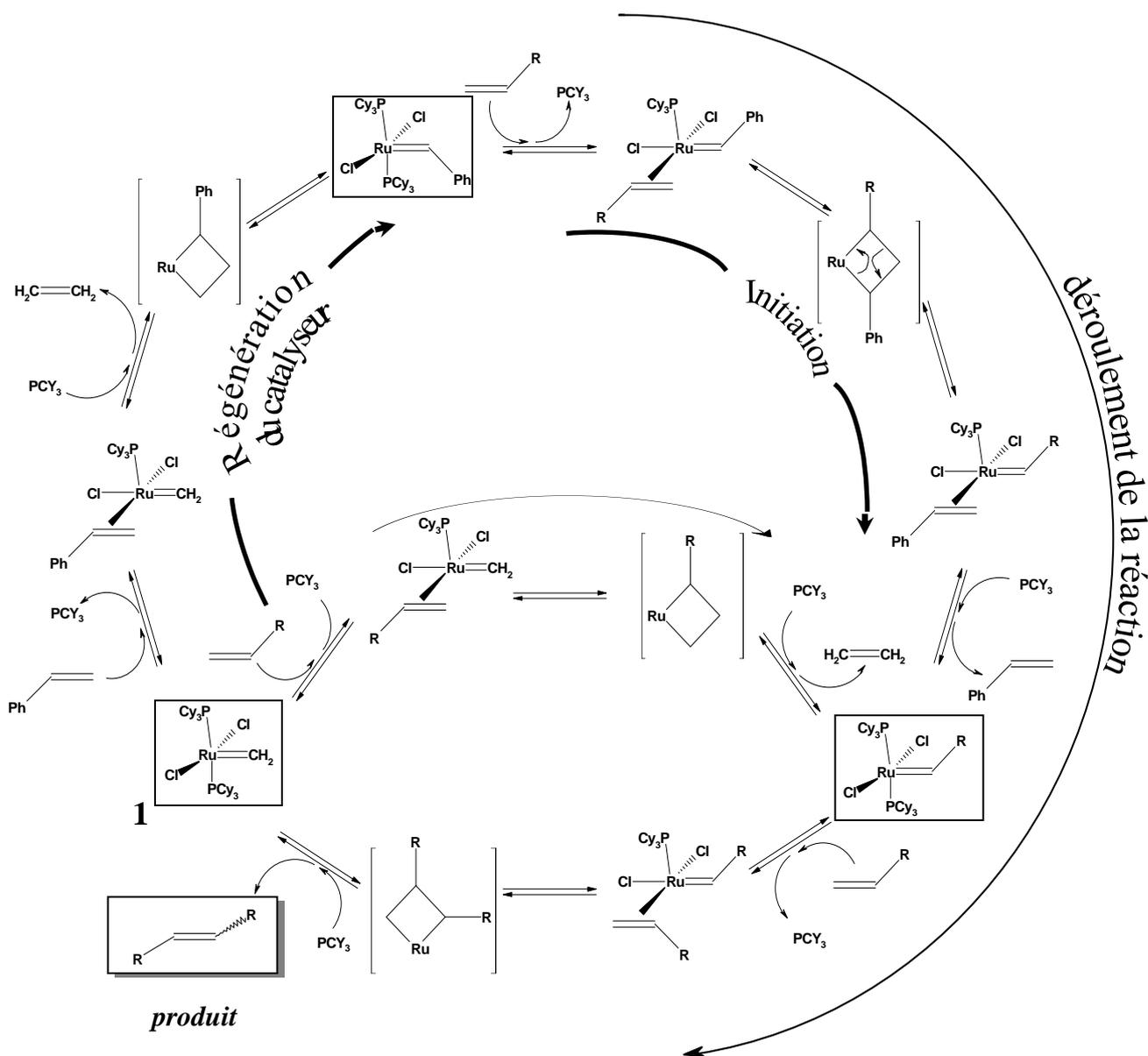


Figure III-13 : Mécanisme de la réaction de métathèse des oléfines terminales proposé par Grubbs et coll.^[132]

Grubbs et coll.^[133] ont par la suite réalisé une étude mécanistique encore plus poussée en utilisant le catalyseur que nous avons noté **E** (figure III-11). Cette étude a permis de mettre en évidence que l'étape de dissociation de la phosphine est l'étape cruciale de la réaction de métathèse. Ainsi, il a été suggéré que la grande activité de ce catalyseur et de ces dérivés pouvait être due à l'augmentation de la capacité de ses ligands à promouvoir cette étape. Il est *a priori* possible d'envisager deux cas : soit l'oléfine est fixée avant la perte du groupe PCy₃, soit la phosphine se dissocie pour générer un intermédiaire à 14 électrons avant l'arrivée de l'oléfine. Une étude cinétique a montré que l'étape d'initiation de la réaction de métathèse est indépendante de la concentration en oléfine ce qui suggère que l'étape déterminante est la dissociation de la phosphine. L'intermédiaire à 14 électrons, de formule générale

$\text{LCl}_2\text{Ru}=\text{CH}\phi$ (L étant le ligand dérivant de l'imidazole) ainsi obtenu, peut évoluer de deux manières : d'un coté, il peut être piégé par la phosphine libérée et régénérer l'alkylidène de départ (constante de vitesse k_1), ou alors, il peut se lier au substrat oléfinique pour permettre la réaction de métathèse (constante de vitesse k_2). Les rapports k_1/k_2 dans le cas des catalyseurs **C** et **E** valent respectivement 15300 et 1,25 ce qui signifie qu'une petite quantité de l'intermédiaire à 14 électrons est capable d'induire de nombreux cycles productifs de métathèse dans le cas du catalyseur **E**.

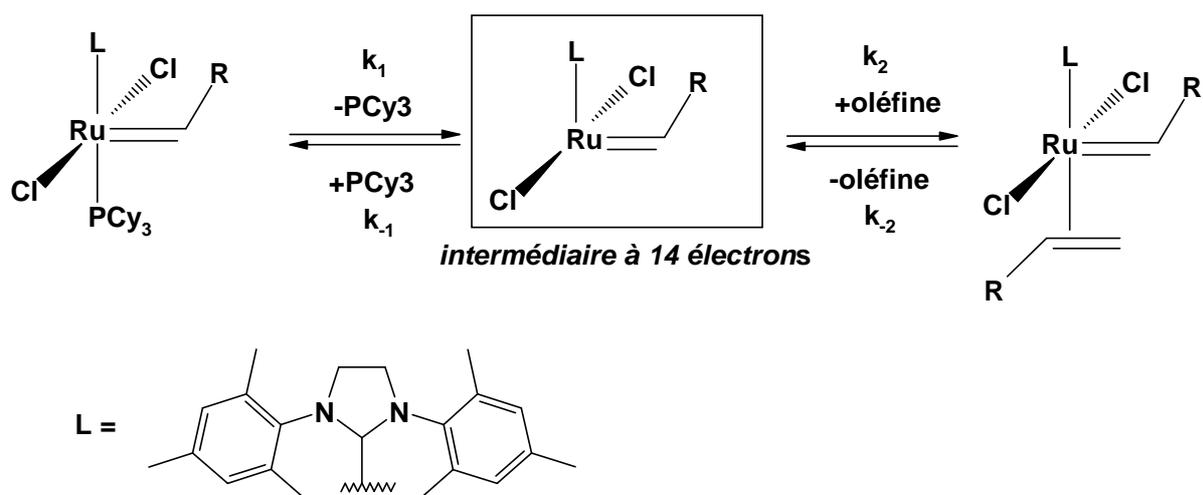


Figure III-14 : Evolution de l'intermédiaire à 14 électrons induit par la perte d'une phosphine.

3-1-3 Réaction de métathèse en phase solide.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le champ d'applications de la réaction de métathèse s'est considérablement étendu ces dernières années. Parmi l'ensemble des réactions décrites dans la littérature, un grand nombre met en jeu des oléfines greffées sur support solide. Nous ne présentons dans le tableau III-1 que quelques exemples qui nous ont semblé les plus significatifs. On distingue essentiellement trois grands types d'applications de cette stratégie, représentés sur la figure III-14.

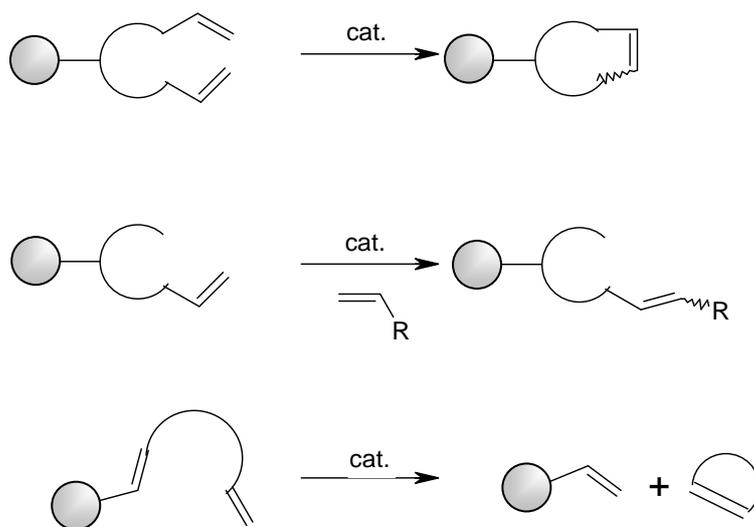


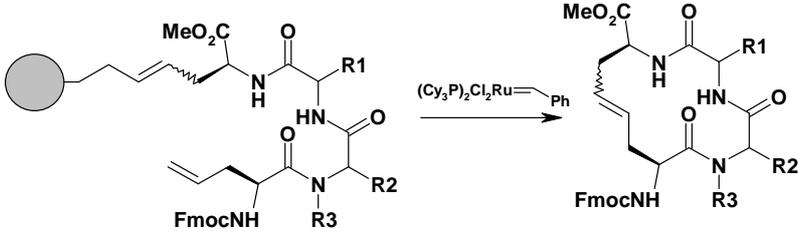
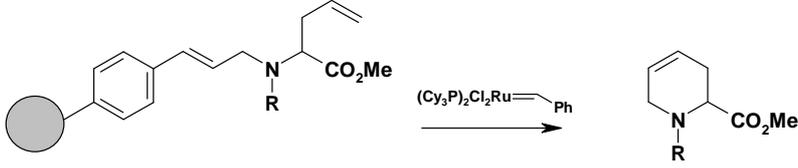
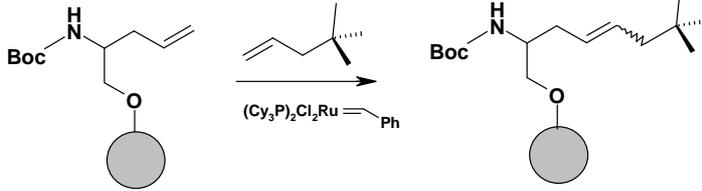
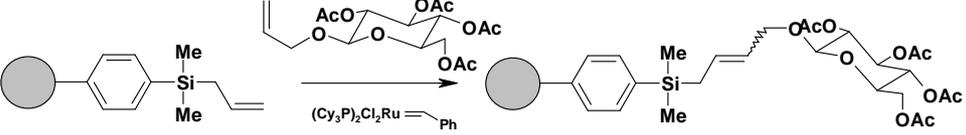
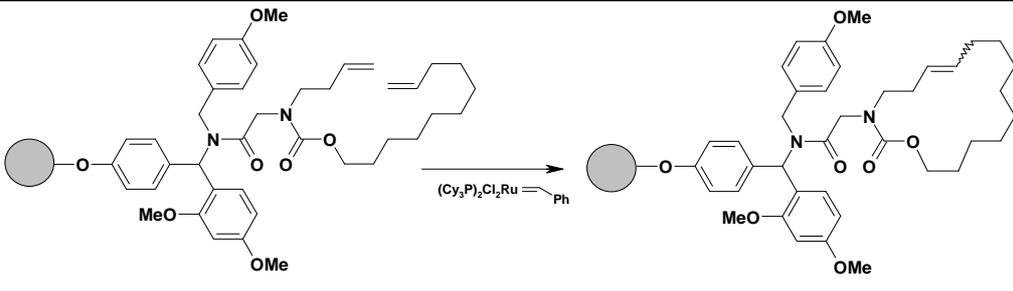
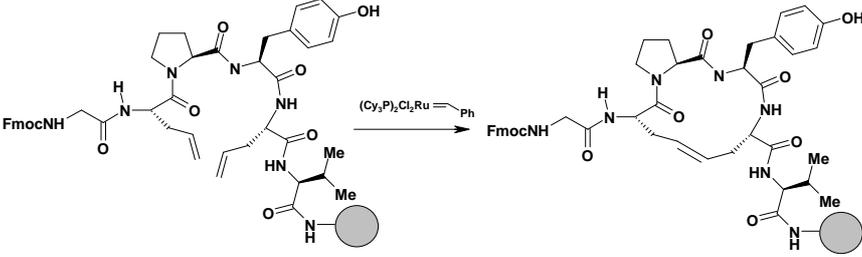
Figure III-15 : Métathèse sur support solide : les trois grands types d'applications.

Il est ainsi possible de former en phase solide des doubles liaisons carbone-carbone internes par dimérisation de deux oléfines par métathèse croisée. Pour cela, un des deux alcènes est greffé sur le support solide et le deuxième alcène ainsi que le catalyseur sont en solution. Cette stratégie a, par exemple, permis à Blechert et coll.^[134] de synthétiser plusieurs dérivés du N-Boc-N-allylglycinol et du N-Boc-C-allylglycinol.

Il est également possible de synthétiser des cycles insaturés par fermeture de cycle par métathèse sur support solide. Dans ce cas, deux approches sont possibles : soit le diène fixé sur le support porte deux doubles liaisons carbone-carbone terminales ce qui conduit à la formation d'un cycle insaturé greffé sur la résine, soit le diène de départ est fixé au polymère par l'intermédiaire d'une de ces doubles liaisons ce qui permet en une seule réaction d'effectuer la cyclisation et de couper la liaison avec le support. On obtient alors dans ce deuxième cas de figure une oléfine cyclique en solution. Cette approche s'avère particulièrement intéressante lorsque la cyclisation constitue la dernière étape d'une séquence de synthèse en phase solide. Il existe plusieurs avantages à effectuer la réaction de métathèse sur support solide. En ce qui concerne la métathèse croisée, il est possible d'augmenter les rendements en utilisant un large excès de l'oléfine présente en solution. Cet excès est par la suite très facilement éliminé par simple filtration. En outre, dans le cas de la fermeture de cycle par métathèse, il est plus facile de contrôler la cyclisation car les réactions concomitantes de dimérisation ou plus généralement d'oligomérisation sont moins favorables que dans le cas d'une réaction en phase liquide. Enfin, il est important de noter que pour ces

deux grands types de réactions, la purification du produit formé est considérablement simplifiée.

Tableau III-1 : Quelques exemples de réactions de métathèse sur support solide.

Réactions	Réf.
	[135]
	[136]
	[134]
	[137]
	[138]
	[139]

3-2 Application de la métathèse à la cyclisation du peptide *allGRGDallG*

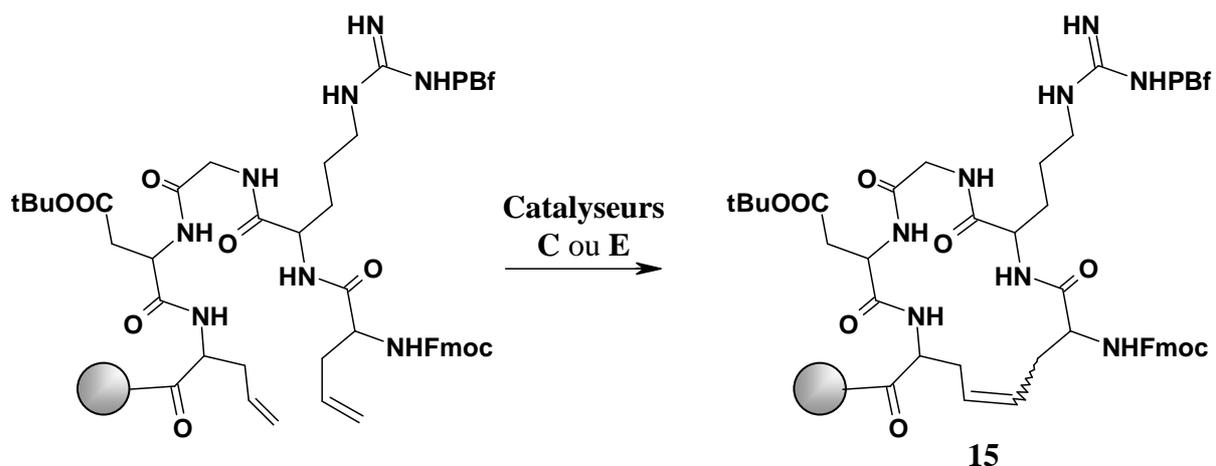


Figure III-17 : Cyclisation du pentapeptide allylique

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes appuyé sur les travaux de Grubbs^[139]. Ainsi, pour minimiser les différences de réactivité liées à la nature du support nous avons choisi de réaliser notre étude avec une résine de même nature soit une résine de type Rink amide (figure III-17).

3-2-1 Description du support

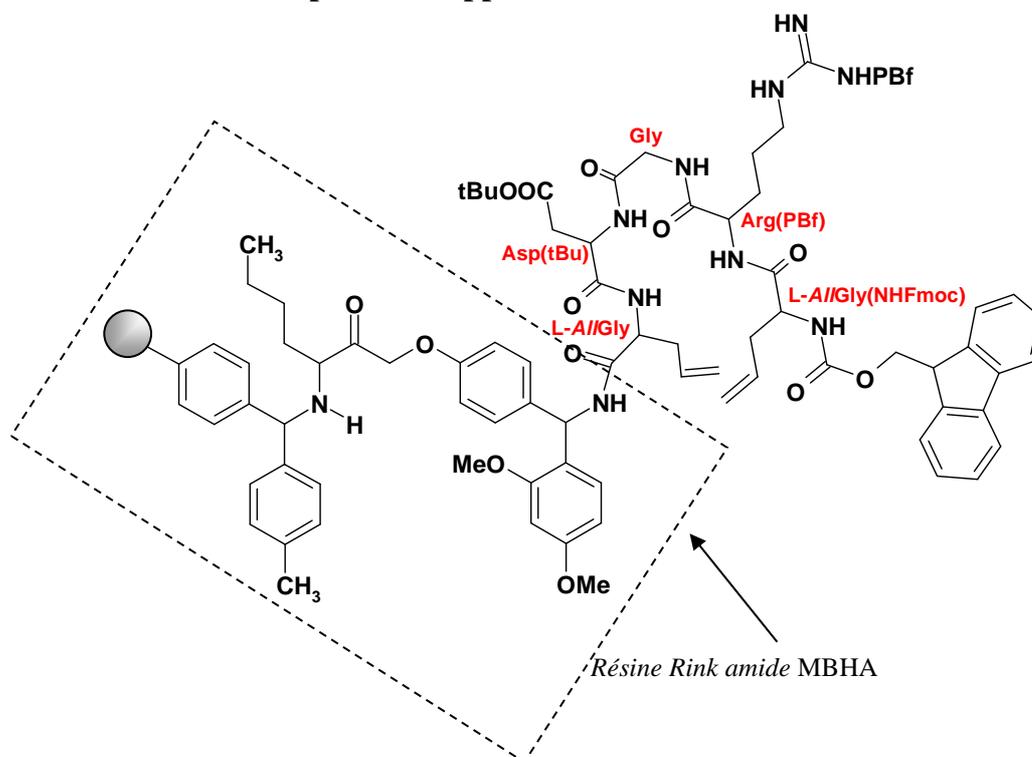


Figure III-16 : Description de la résine utilisée pour la réaction de cyclisation par métathèse.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous avons utilisé une résine Rink Amide, de même nature que celle utilisée par Grubbs et *coll.* La résine Rink-Amide-MBHA (résine 4-(2',4'-Diméthoxyphénylaminométhyl)-phénoxyacétamido-norleucyl-(4-Méthylbenzhydrylamine) ^[140] qui nous a été proposée par la société Néosystème peut être facilement hydrolysée en milieu acide par le TFA. En outre, en synthèse peptidique, le choix du maillon permettant de lier le peptide au polymère est délicat en raison de nombreuses réactions secondaires comme notamment la racémisation pouvant se produire lors de la fixation du premier acide aminé. Ce phénomène, observé lors du couplage de la cystéine, de la proline ou encore d'acides aminés non naturels peut être évité par l'emploi de certaines résines comme les supports de type chlorotriyl ou encore Rink amide MBHA.

L'hydrolyse par le TFA de la liaison amide entre le support et l'unité peptidique fournit un amido-peptide ou, en d'autres termes un peptide dont la fonction terminale n'est plus un acide carboxylique mais un amide primaire. Compte tenu du fait que seules les fonctions guanidine de l'arginine et acide carboxylique en β de l'acide aspartique participent aux interactions avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons pensé que cette légère modification structurale ne modifierait en rien le phénomène de reconnaissance de cette intégrine.

Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé une résine dont la dimension des billes est de 100-200 mesh et dont la matrice du polymère est du polystyrène comportant 1% d'unité divinylbenzène.

Pour les mêmes raisons que celles exposées au chapitre II, nous avons choisi comme groupements protecteurs de l'arginine et de l'acide Aspartique respectivement le Pbf et un *tertiobutyle*. En outre, la fonction amine terminale est protégée par le groupement 9-Fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc). Ce dernier est facilement éliminé par traitement en milieu faiblement basique.

3-2-2 Réaction de métathèse

Dans ce travail, nous avons utilisé comme catalyseur le bis(tricyclohexylphosphine)-dichlororuthénium (IV) benzylidène ou le (4,5-dihydro-1,3-dimésityl-imidazolin-2-ylidène)(tricyclohexylphosphine)-dichlororuthénium (IV) benzylidène tous deux commerciaux, catalyseurs notés **C** et **E** (figure III-10 et III-11). Si ces composés sont relativement peu sensibles à l'air, nous les avons néanmoins prélevés dans tous les cas sous atmosphère d'argon. Ceux-ci, solubilisés dans un minimum de solvant, sont par la suite incorporés au milieu réactionnel par l'intermédiaire d'une canne de transfert. Pour cette étude,

nous avons utilisé comme solvant du dichlorométhane et/ou du tétrahydrofurane parfaitement anhydres et dégazés par barbotage d'argon. Enfin, pour chaque essai effectué nous avons suivi la réaction par HPLC. Pour cela, une fraction de la résine obtenue après métathèse est mise à réagir avec un mélange de TFA et d'anisole (95/5 v/v) puis le résidu, après traitement est injecté dans le système chromatographique. Le pentapeptide non cyclique *allG(NHFmoc)-R-G-D-allG*, obtenu par traitement acide de la résine initiale est utilisé comme témoin. Cette technique nous a également permis de déterminer les rendements. Pour chaque essai, la résine est préalablement gonflée dans une quantité appropriée de solvant.

Nous avons, dans un premier temps, effectué la réaction avec une résine dont la proportion de pentapeptide diallylique est de $0,48 \text{ mmol.g}^{-1}$. De plus, les premiers essais réalisés ont été menés avec le catalyseur **C** dans le dichlorométhane. Nous avons fait varier d'une part la quantité de catalyseur mais aussi le temps de réaction et la température. Dans tous les cas, l'analyse par HPLC des produits de réactions obtenus, après traitement d'un échantillon de résine, fournit des chromatogrammes relativement complexes indiquant la présence de nombreux produits. Une étude complémentaire du brut réactionnel par spectrométrie de masse MALDI (figure III-18) nous a permis de déterminer la nature des produits formés. Dans ces conditions, la fermeture de cycle par métathèse est largement concurrencée par notamment des réactions de métathèse croisée conduisant à des dimères de peptides dont quelques structures sont présentés figure III-19.

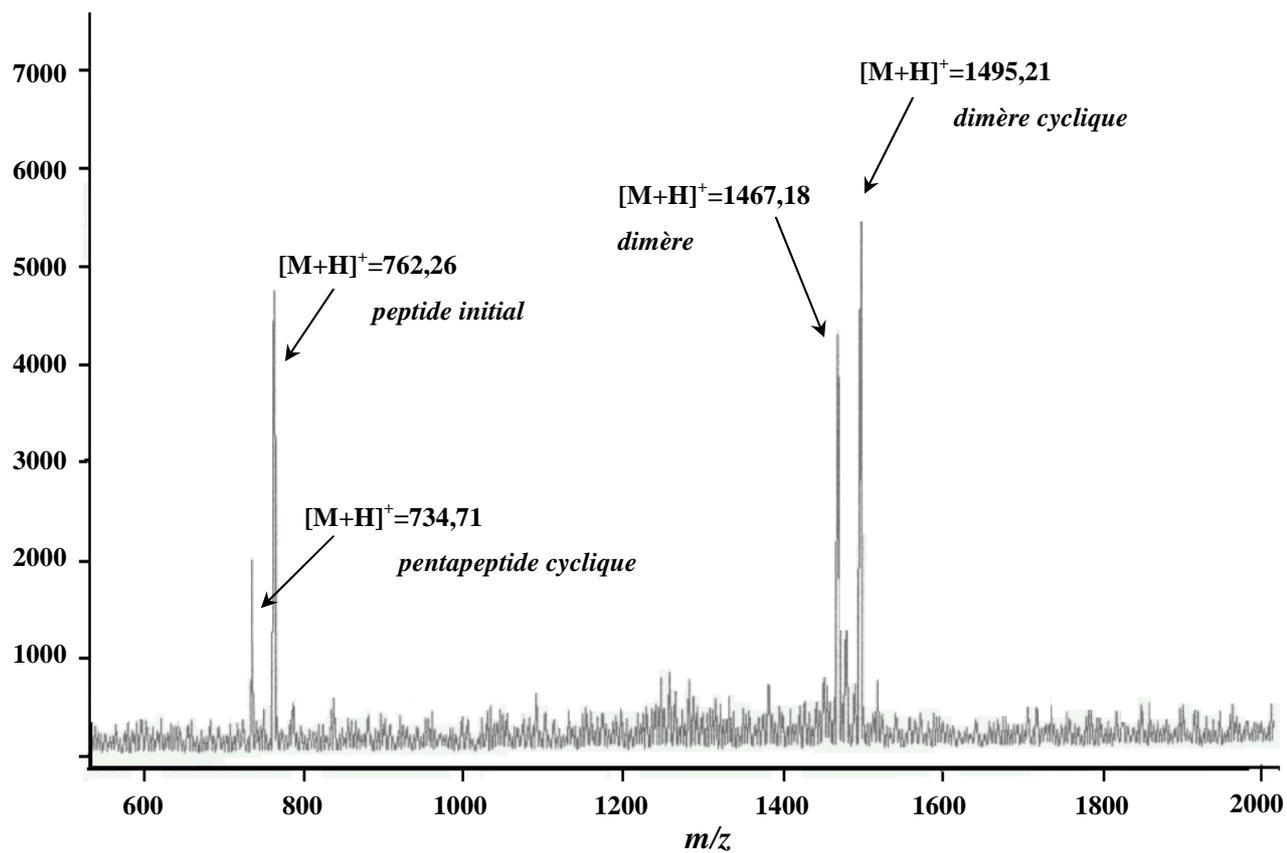


Figure III-18 : Spectre de masse MALDI du mélange réactionnel obtenu après métathèse.

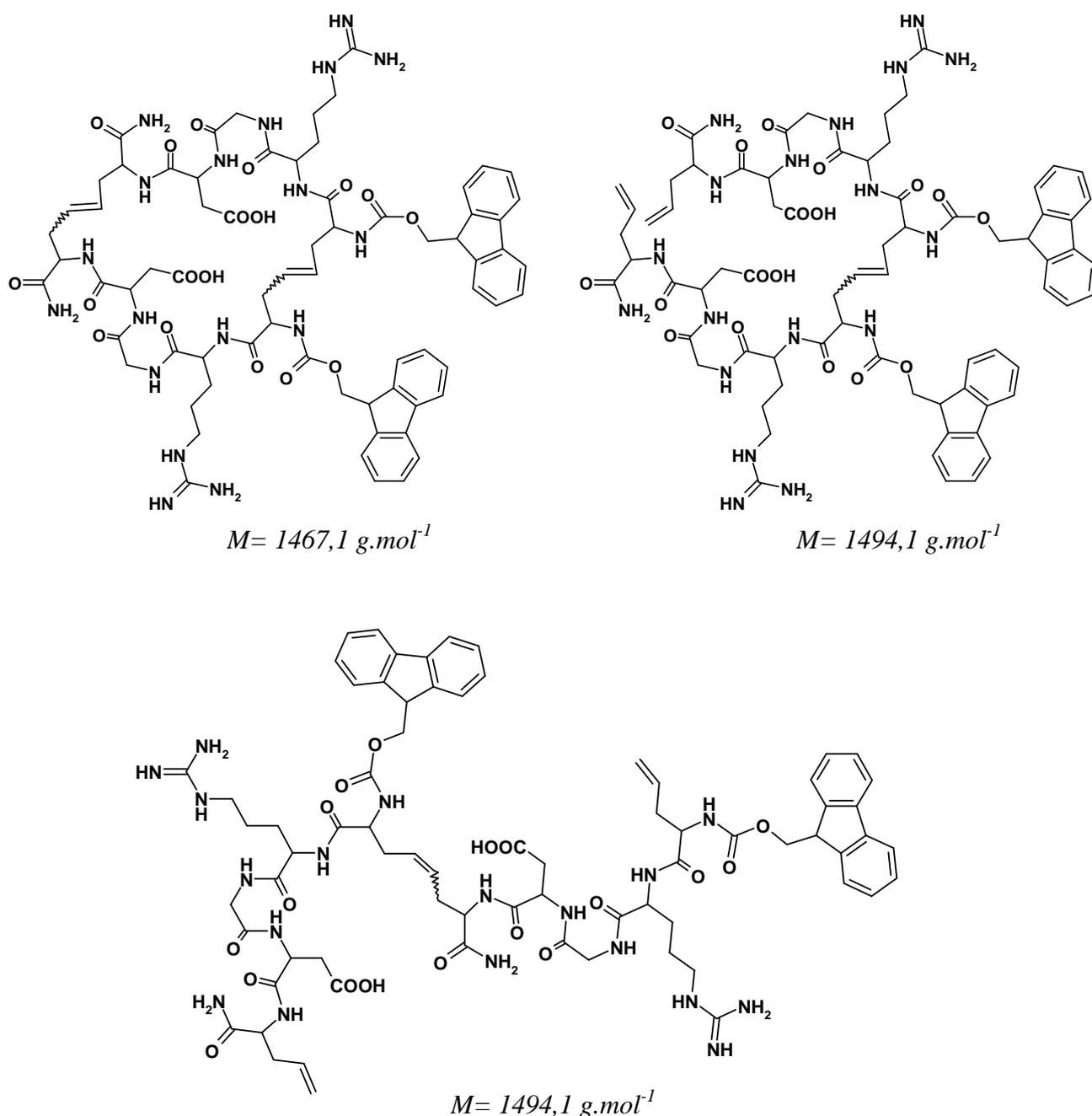


Figure III-19 : Quelques exemples de structures obtenues par métathèse croisée.

La variation de la température de réaction ou encore la variation de la quantité de catalyseur n'ont apporté aucune amélioration à ces résultats. Ce comportement peut être attribué à une trop forte substitution de la résine ce qui engendre des réactions entre les chaînes peptidiques (figure III-20). Bien que ce phénomène ait déjà été décrit dans la littérature^[138], il est difficile d'estimer la quantité d'unité peptidique que doit porter le polymère pour que seule la fermeture de cycle par métathèse ne soit observée. En effet, cela

dépend de la proximité des chaînes les unes par rapport aux autres mais aussi de la longueur des peptides, de la position des doubles liaisons ou encore de la conformation spatiale du peptide qui dépend entre autres de la nature des acides aminés mis en jeu.

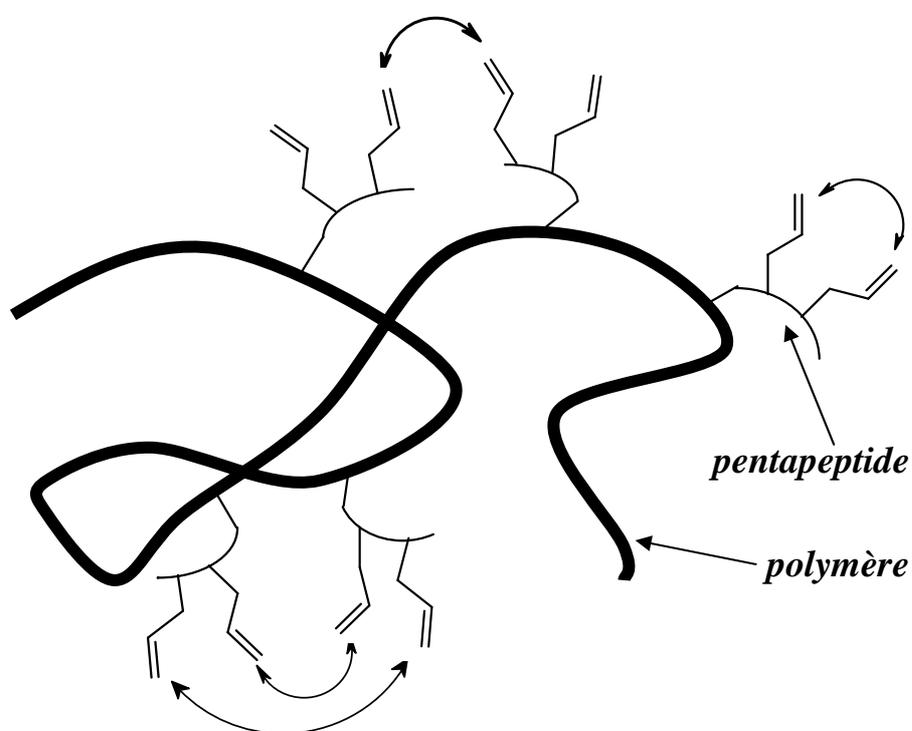


Figure III-20: Les diverses réactions de métathèses résultant d'une trop forte substitution du polymère.

Dans ces conditions, le rendement en peptide cyclique recherché, n'excède pas 10%.

Afin d'améliorer ces résultats, nous avons poursuivi ce travail en utilisant une résine à plus faible densité en peptide ($0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$). Un premier essai de réaction, pour lequel nous avons utilisé le catalyseur **C** dans le dichlorométhane montre que pour une telle substitution, seule la fermeture de cycle par métathèse est observé par spectrométrie de masse MALDI et HPLC (figure III-21). Nous avons par la suite cherché à optimiser le rendement en pentapeptide cyclique en faisant varier différents paramètres de la réaction. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III-2. L'utilisation du catalyseur **E** permet d'augmenter très légèrement les rendements. Il est connu que ce catalyseur présente une meilleure tolérance des fonctions hétéroatomiques, comme les amines. Compte tenu de la nature du substrat de départ, cette propriété peut expliquer ce gain de rendement. De plus, pour les réactions menées dans le dichlorométhane, nous avons constaté que le rendement augmente avec la température.

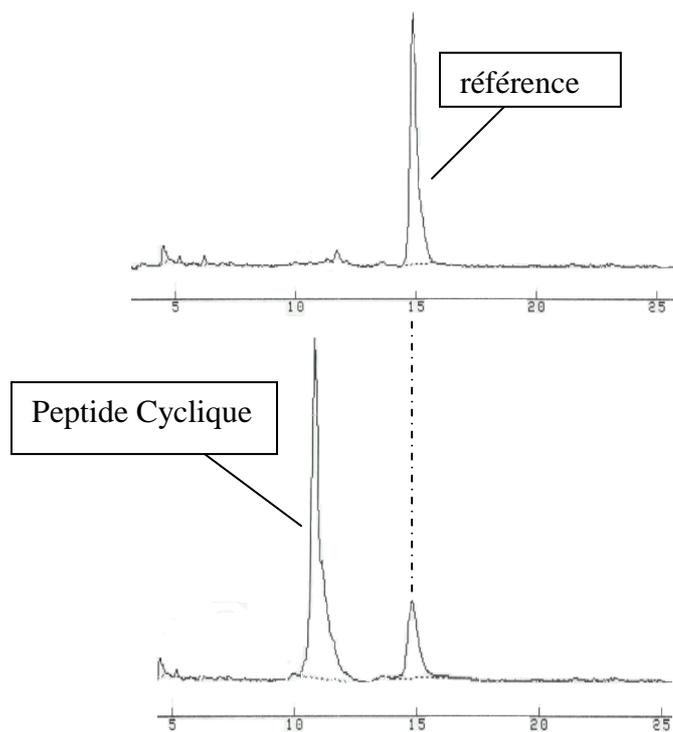
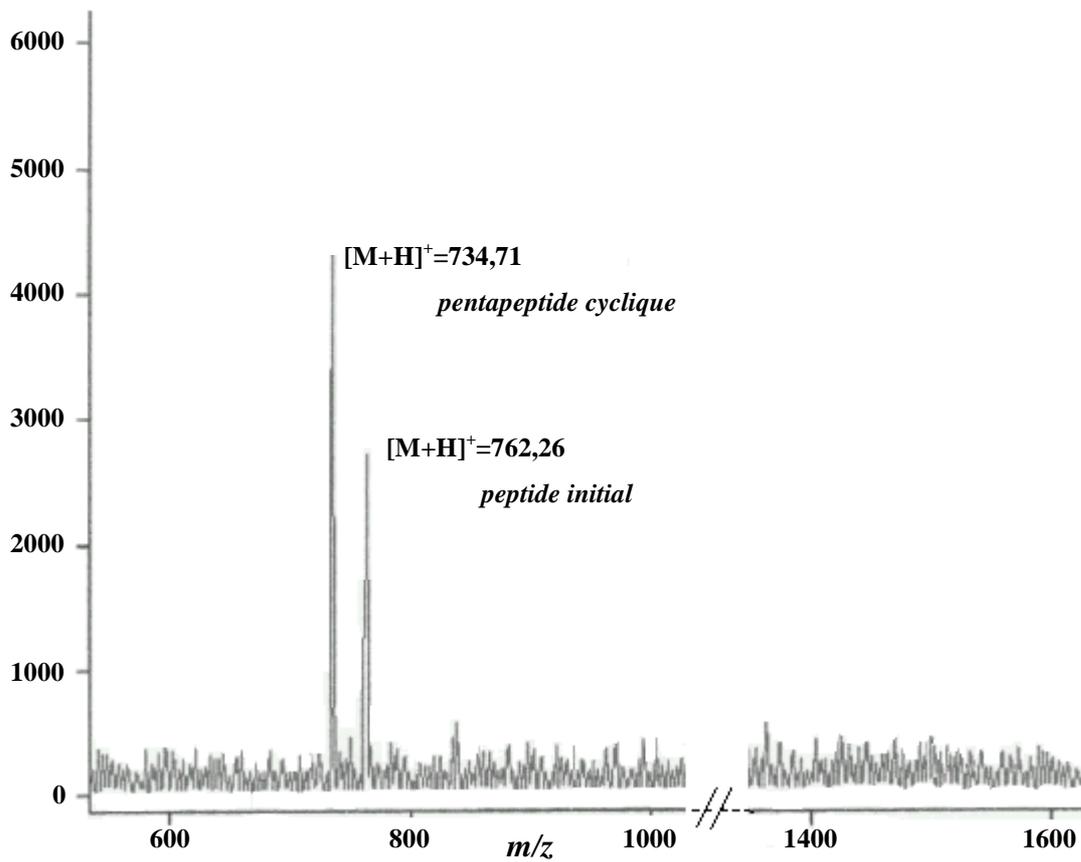


Figure III-21: Spectre de masse MALDI et chromatogramme HPLC de la réaction de métathèse pour une substitution de $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$.

Sur la base de ce résultat, nous avons pensé que l'utilisation d'un autre solvant, permettant une gamme de températures plus large, pourrait permettre d'améliorer sensiblement la réactivité. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser du tétrahydrofuranne. Outre le fait que ce solvant permet d'atteindre des températures de l'ordre de 70°C, il a été montré qu'il pourrait contribuer à stabiliser le catalyseur de Grubbs. Malheureusement, dans notre cas, l'utilisation du THF engendre une diminution du rendement qui peut s'expliquer raisonnablement par une modification de l'état de solvation du peptide dans ce solvant et une moindre accessibilité des groupements allyliques.

Enfin, il est à noter que les meilleurs résultats ont été obtenus pour un temps de réaction de 48 heures avec le catalyseur de Grubbs **E** ajouté en trois fois. Dans ces conditions, l'ajout de 30% molaire de catalyseur permet d'obtenir le pentapeptide cyclique souhaité **15** avec un rendement de 71%.

Tableau III-2: Résultats obtenus pour la réaction de cyclisation par métathèse.

Entrée	Solvant	Température	Catalyseur	Temps	Rendement
1	CH ₂ Cl ₂	20°C	C	24	31%
2	CH ₂ Cl ₂	20°C	E	24	31%
3	CH ₂ Cl ₂	40°C	C	24	40%
4	CH ₂ Cl ₂	40°C	E	24	43%
5	CH ₂ Cl ₂	40°C	C	48	51%
6	CH ₂ Cl ₂	40°C	E	48	52%
7	CH ₂ Cl ₂	40°C	C ajouté en 3 fois	48	65%
8	CH ₂ Cl ₂	40°C	E ajouté en 3 fois	48	71%
9	THF	70°C	C ajouté en 3 fois	48	30%
10	THF	70°C	E ajouté en 3 fois	48	32%
11	THF/CH ₂ Cl ₂ 70/30	70°C	C ajouté en 3 fois	48	33%
12	THF/CH ₂ Cl ₂ 70/30	70°C	E ajouté en 3 fois	48	36%

Il ne nous a malheureusement pas été possible de séparer par chromatographie HPLC les deux isomères *cis* et *trans* susceptibles de se former au cours de la réaction. Par conséquent, nous n'avons pas pu déterminer par cette méthode la proportion de l'un et de l'autre.

Pour déterminer la configuration de la double liaison, nous avons étudié les spectres RMN ^1H et ^{13}C du pentapeptide cyclique obtenu par traitement classique à l'acide trifluoroacétique d'une fraction de la résine **15**. Comme le peptide cyclique et le peptide non cyclisé par réaction de métathèse (environ 30% du mélange) n'ont pas pu être séparés, nous avons effectué l'analyse RMN du mélange, dans le DMSO deutérié, en prenant comme référence d'étude les spectres du pentapeptide non cyclisé obtenu par traitement acide classique de la résine commerciale. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux III-3 et III-4 et le spectre de RMN ^{13}C est présenté figure III-24.

La figure III-22 présente quant à elle la numérotation retenue pour la présentation des résultats.

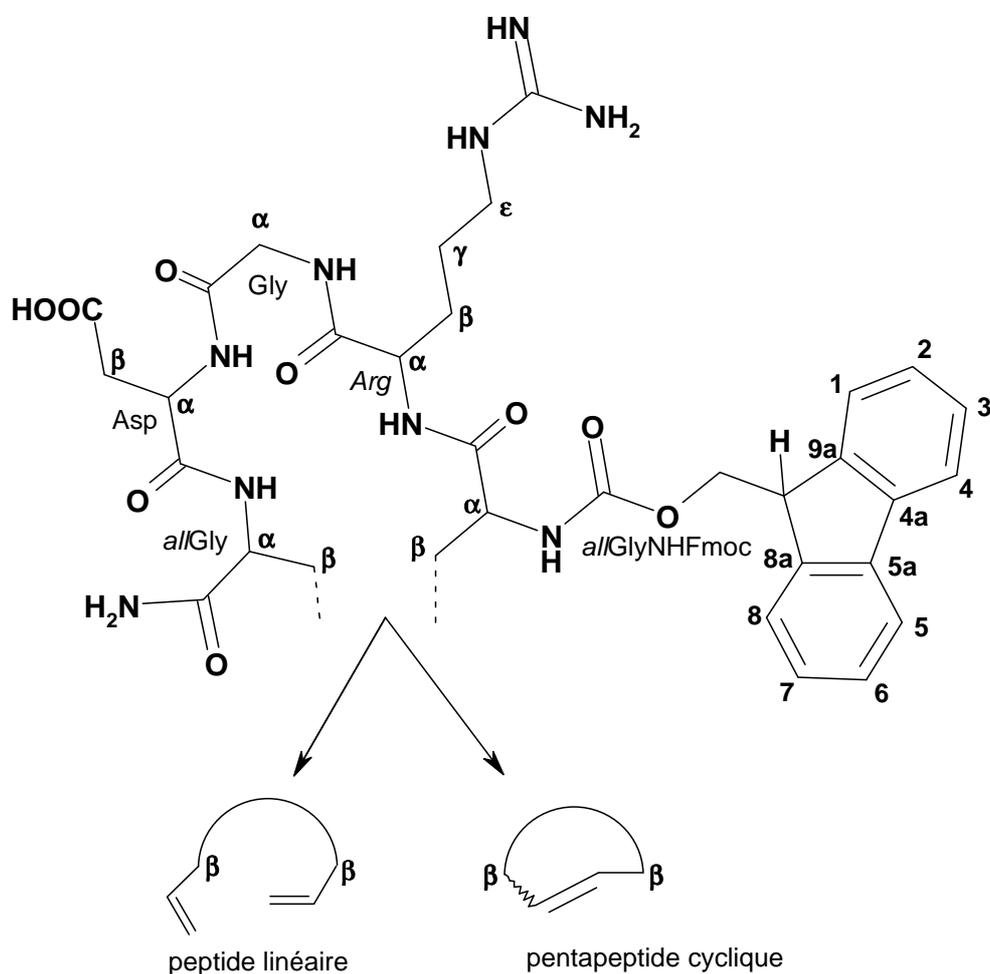


Figure III-22 : Numérotation adoptée pour décrire les pentapeptides allG(NHFmoc)RGDallG cyclique et linéaire.

Les attributions de l'ensemble des signaux ont été réalisées d'une part sur la base des courbes d'intégrations et d'autre part à l'aide des spectres de corrélations proton-proton et proton-carbone ainsi que la séquence DEPT.

Tableau III-3 : Spectres RMN¹H des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique, δ en ppm, J en Hz

H	allG(NHFmoc)RGDallG linéaire	allG(NHFmoc)RGDallG cyclique
allGlycine(NHFmoc)		
α	4,20 m	4,21 m
β	2,44 dd él. (5,6)	2,40 m
$\underline{\text{CH}}=$	5,73 ddt él. (17,8-10,0-6,9)	-
$=\underline{\text{CH}}_2$	5,03 d él. (18,2)-4,96 d él. (9,9)	-
$\text{NH}\underline{\text{C}}=\text{O}$	7,35 m	7,36 m
$\text{CH}_2(\text{Fmoc})$	4,33 m	4,31 m
9	4,21 t él. (5,80)	4,22 m
1	7,88 d (8,0)	7,87 d él. (7,8)
2	7,32 t (7,4)	7,32 t (7,3)
3	7,40 t (7,4)	7,41 t él (7,3)
4	7,70 d (7,2)	7,69 d él. (7,0)
Arginine		
α	4,13 m	4,12 m
β	2,32 quad él (7,2)	2,32 m
γ	1,50 m	1,50 m
ϵ	3,75 dt él. (6,8)	3,72 m
$\text{NH}\underline{\text{C}}=\text{O}$	7,66 m	7,64 m
Glycine		
α	4,21 d él. (5,0)	4,22 m
$\text{NH}\underline{\text{C}}=\text{O}$	8,31 m	8,29 m
A. Aspartique		
α	4,50 quad él. (6,3)	4,48 m
β	2,56 d (6,7)	2,54 m
$\text{NH}\underline{\text{C}}=\text{O}$	8,07 m	8,02 m
allGlycine		
α	4,20 m	4,21 m
β	2,44 dd él. (5,6)	2,40 m
$\underline{\text{CH}}=$	5,73 ddt él. (17,8-10,0-6,9)	-
$=\underline{\text{CH}}_2$	5,03 d él. (18,2)-4,96 d él. (9,9)	-
$\text{NH}\underline{\text{C}}=\text{O}$	7,35 m	7,34 m
Double liaison interne		
$-\underline{\text{CH}}=\underline{\text{CH}}-$	-	5,38 m

Tableau III-4 : Spectres RMN¹³C des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique. δ en ppm

C	allG(NHFmoc)RGDallG linéaire	allG(NHFmoc)RGDallG cyclique
allGlycine(NHFmoc)		
α	52,2	51,8
β	36,1	33,9
$\underline{\text{CH}}=$	134,1	-
$=\underline{\text{CH}}_2$	117,13	-
$\text{NHC}=\underline{\text{O}}$	157,0	157,1
$\text{CH}_2(\text{Fmoc})$	65,6	65,5
9	46,6	46,5
1,8	119,9	120,0
2,7	126,9	126,9
3,6	127,5	127,5
4,5	125,2	125,1
4a,5a	140,6	140,9
8a,9a	143,7-143,8	144,0
Arginine		
α	52,1	52,1
β	35,7	35,7
γ	24,7	24,6
ϵ	42,0	42,5
$\underline{\text{C}}$ -guanidino	156,8	156,8
$\text{NHC}=\underline{\text{O}}$	170,4	170,3
Glycine		
α	45,6	45,5
$\text{NHC}=\underline{\text{O}}$	171,0	171,1
A. Aspartique		
α	49,6	49,9
β	39,13	39,3
$\text{NHC}=\underline{\text{O}}$	172,5	172,5
$-\underline{\text{C}}\text{OOH}$	174,5	174,3
allGlycine		
α	52,2	51,8
β	36,1	34,8
$\underline{\text{CH}}=$	134,3	-
$=\underline{\text{CH}}_2$	117,4	-
$\text{NHC}=\underline{\text{O}}$	172,5	172,5
Double liaison interne		
$-\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}-$	-	128,81-128,86

On constate que la fermeture de cycle n'induit que de faibles variations des signaux en RMN du proton et du carbone 13 hormis bien sûr les signaux qui traduisent la transformation des deux groupements allyles en une double liaison interne. Dans le cas du pentapeptide linéaire, les groupes allyles fournissent en RMN ^1H deux familles de signaux à 5 ppm pour les CH_2 et à 5,7 ppm pour les CH. En RMN du ^{13}C , ces mêmes groupements conduisent à quatre pics caractéristiques, deux situés à 134,1 et 134,3 ppm correspondant aux carbones des CH et deux autres pics à 117,1 et 117,4 ppm correspondant aux carbones des CH_2 . Pour le pentapeptide cyclique, on observe en RMN du proton un signal à 5,28 ppm correspondant aux CH de la double liaison. La figure obtenue pour ce signal ne nous a pas permis d'étudier la configuration de la double liaison. En revanche, la RMN du carbone 13 nous permet de déterminer la nature de l'isomère formé^[141]. La double liaison interne ne fournit que deux signaux à 128,81 et 128,86 ppm. Les carbones en α de cette liaison résonnent quant à eux sous la forme de quatre pics, deux à 34,8 et 33,9 ppm et deux de plus faible intensité à 29,9 et 29,2 ppm, ce qui indique qu'un isomère est nettement majoritaire. En effet, il est connu que les carbones en α d'une double liaison permettent l'identification de la configuration de celle-ci : pour une configuration Z, les signaux de ces carbones auront un blindage supérieur à celui de la configuration E. L'explication avancée est une répulsion du nuage électronique intervenant entre les atomes d'hydrogène du carbone en position α et les atomes d'hydrogène sur le carbone en α' d'une double liaison de configuration Z conduisant à l'augmentation de la densité électronique sur les carbones α et α' et donc au blindage de son signal de plusieurs ppm.

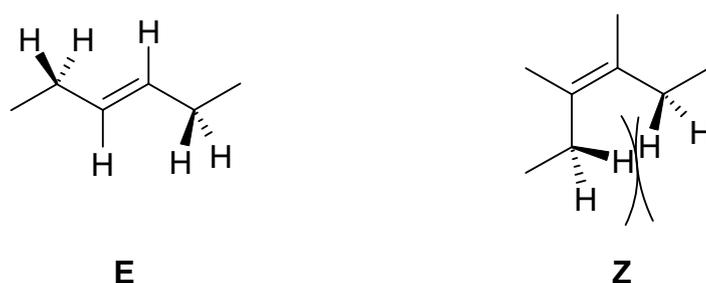


Figure III-23 : Encombrement stérique des hydrogènes en α d'une double liaison Z

Pour cette raison, les signaux à 34,8 et 33,9 ppm sont attribués à l'isomère E et les signaux à 29,9 et 29,2 ppm sont quant à eux attribués à l'isomère Z. Bien que la RMN du carbone 13 ne soit pas dans ces conditions une méthode d'analyse quantitative, il semble néanmoins, compte tenu de la différence très importante d'intensités des pics correspondants aux carbones en α

de la double liaison des isomères *cis* et *trans*, que la réaction de fermeture de cycle conduise quasi exclusivement à l'isomère *trans*.

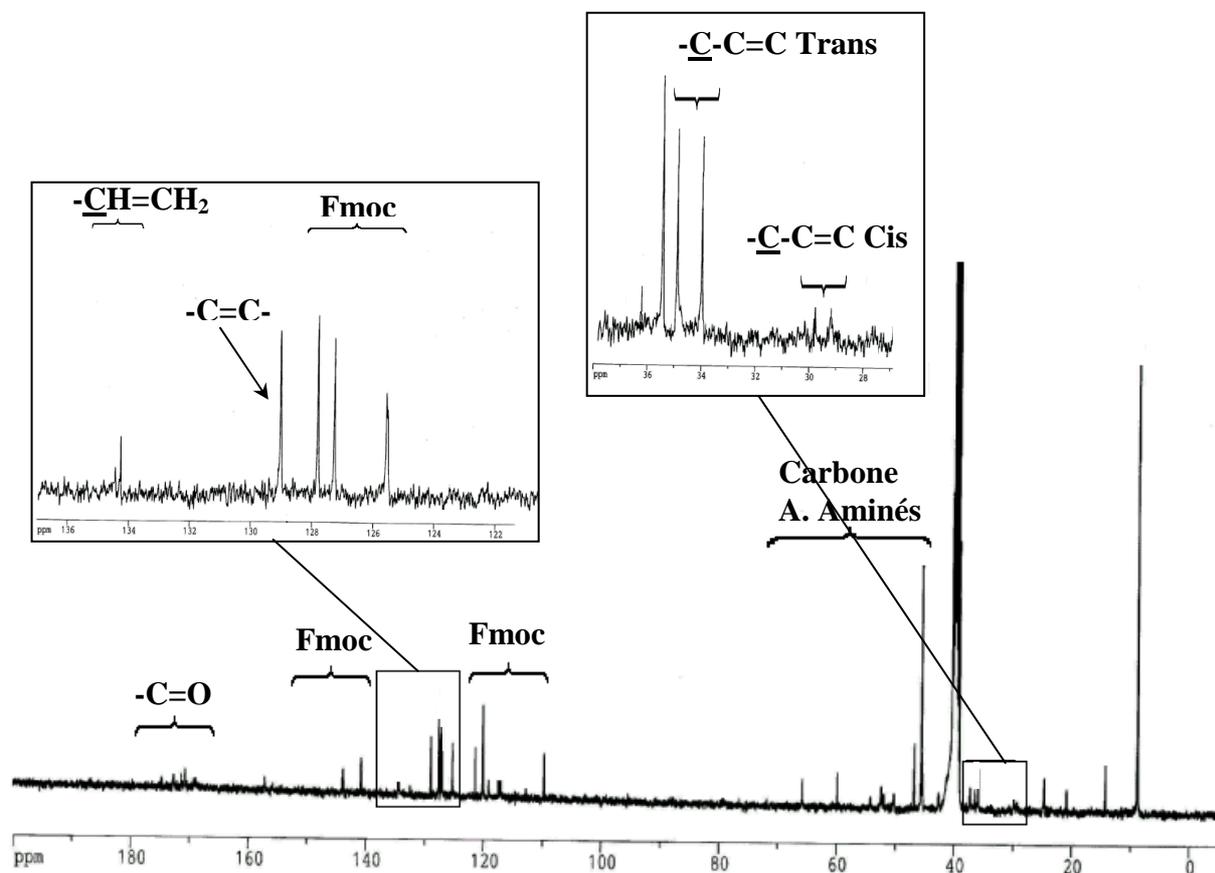


Figure III-24 : Spectre RMN ^{13}C (DMSO-d_6) du mélange des peptides allG(NHFmoc)RGDallG linéaire et cyclique.

4– Déprotection du N-Fmoc-pentapeptide

La réaction de déprotection d'une fonction amine protégée par le groupement Fmoc s'effectue en milieu basique faible.

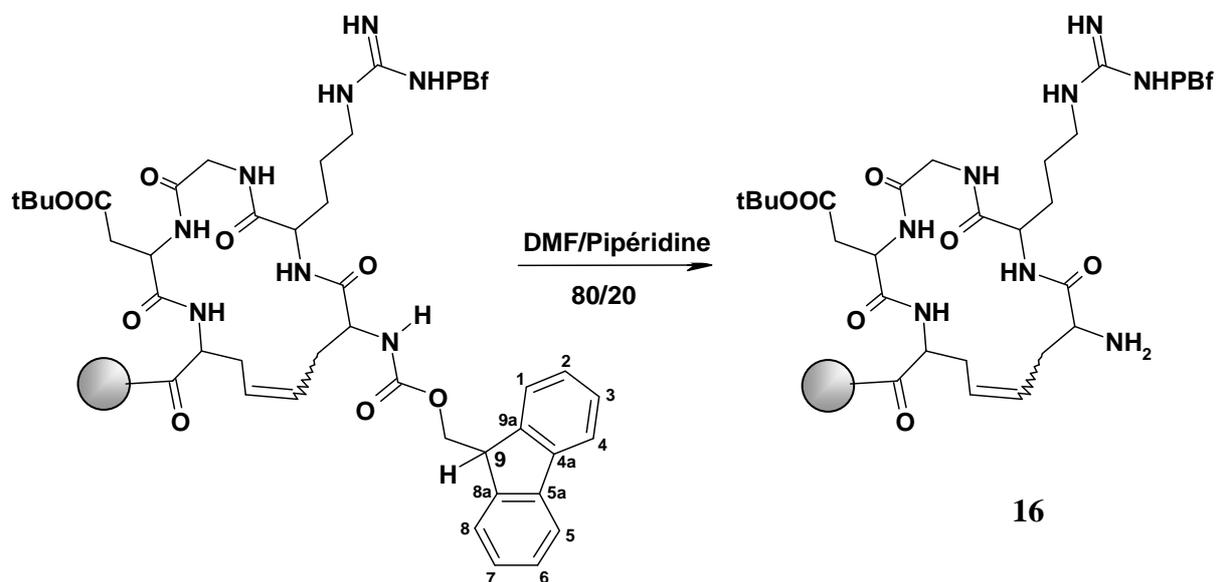


Figure III-25 : Déprotection du N-Fmoc-pentapeptide.

C'est la structure dibenzocyclopentadiénique qui est responsable de cette labilité en milieu basique. La stabilisation par résonance de l'anion fluorényle explique l'acidité exceptionnelle de l'atome d'hydrogène 9 permettant sa capture par une base et l'initiation d'une réaction de β -élimination selon un mécanisme E1_{cb}. La morpholine et la pipéridine sont les deux bases les plus couramment employées pour cette réaction^{[142],[143]}. Néanmoins, la pipéridine, à l'inverse de la morpholine permet d'obtenir des rendements quasi quantitatifs. Ceci s'explique par le fait que la pipéridine piège le dibenzofulvène libéré pour former un composé d'addition ne présentant aucune réactivité vis-à-vis de l'amine primaire formée au cours de la réaction. Si la morpholine est utilisée, le dibenzofulvène qui n'est pas piégé peut donner lieu à une réaction secondaire d'alkylation de l'amine primaire terminale ce qui engendre une diminution du rendement.

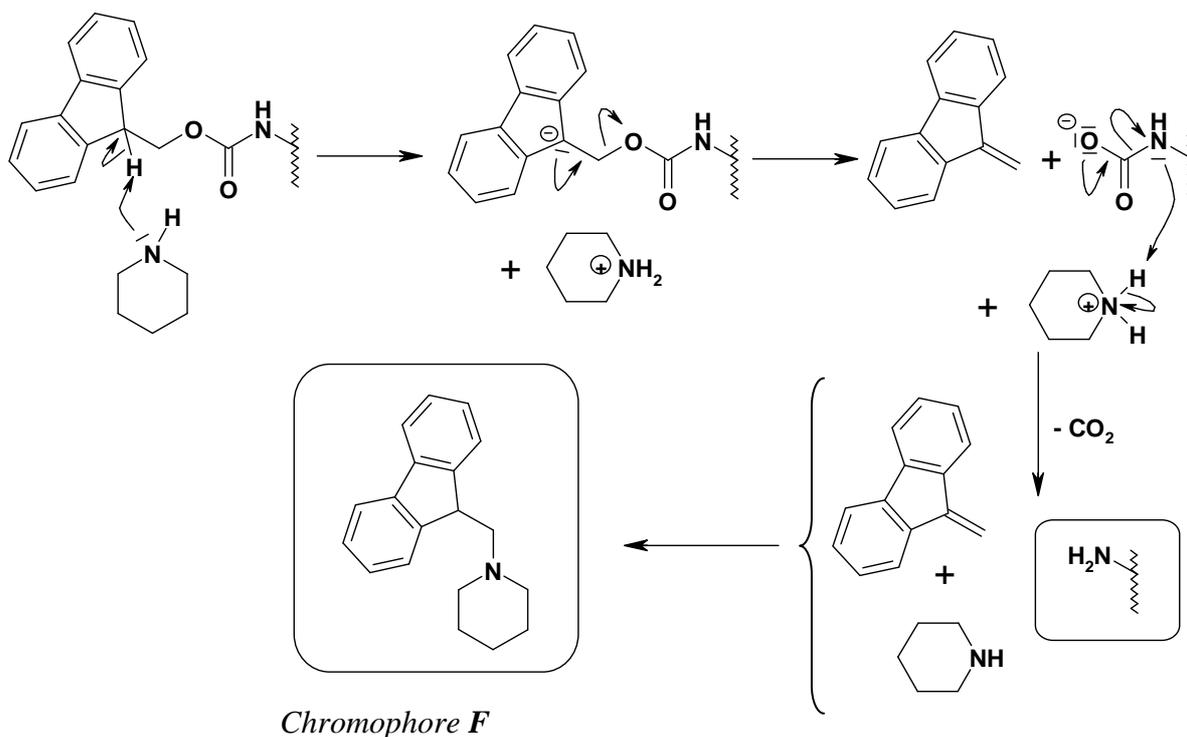


Figure III-26: Mécanisme du déblocage du Fmoc par la pipéridine.

La réaction est effectuée dans un réacteur de type *système 45*[®] muni à sa base d'un disque en verre fritté associé à un robinet quart de tour. Le réactif utilisé est une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Nous avons cherché à optimiser le temps de la réaction. Pour cela, nous avons dosé au cours du temps la quantité de dibenzofulvène libérée en phase liquide par spectroscopie UV-Visible ($300 < \lambda < 320$ nm). La courbe présentée figure III-27, qui indique l'évolution en fonction du temps de la quantité de chromophore libéré, noté **F**, montre que la réaction est terminée au bout d'environ 8 minutes. En outre, l'estimation de la perte de masse du support après traitement et séchage au dessiccateur indique que le rendement en résine **16** est quasi quantitatif.

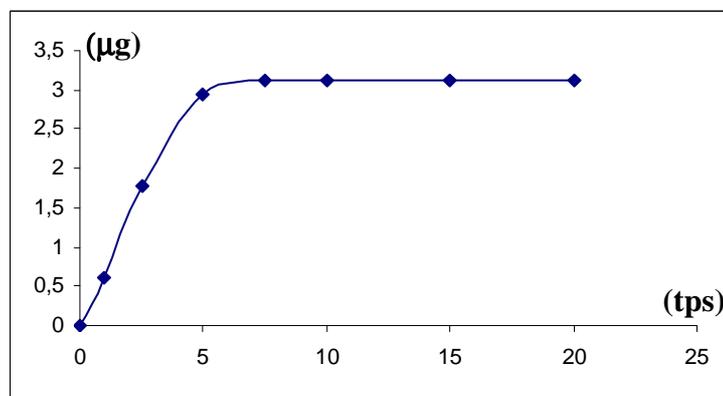


Figure III-27: Evolution de la quantité de composé d'addition **F** formé en fonction du temps.

5– Couplage des carboxyporphyrines au pentapeptide cyclique à motif RGD

La suite de notre travail a consisté à fixer sur la résine **16** précédemment obtenue les carboxytriglycosylporphyrines **9a** et **9b** dont la synthèse a été décrite au chapitre précédent. Pour cela, nous avons appliqué le protocole expérimental déjà exposé pour la formation des résines **11a** et **11b**.

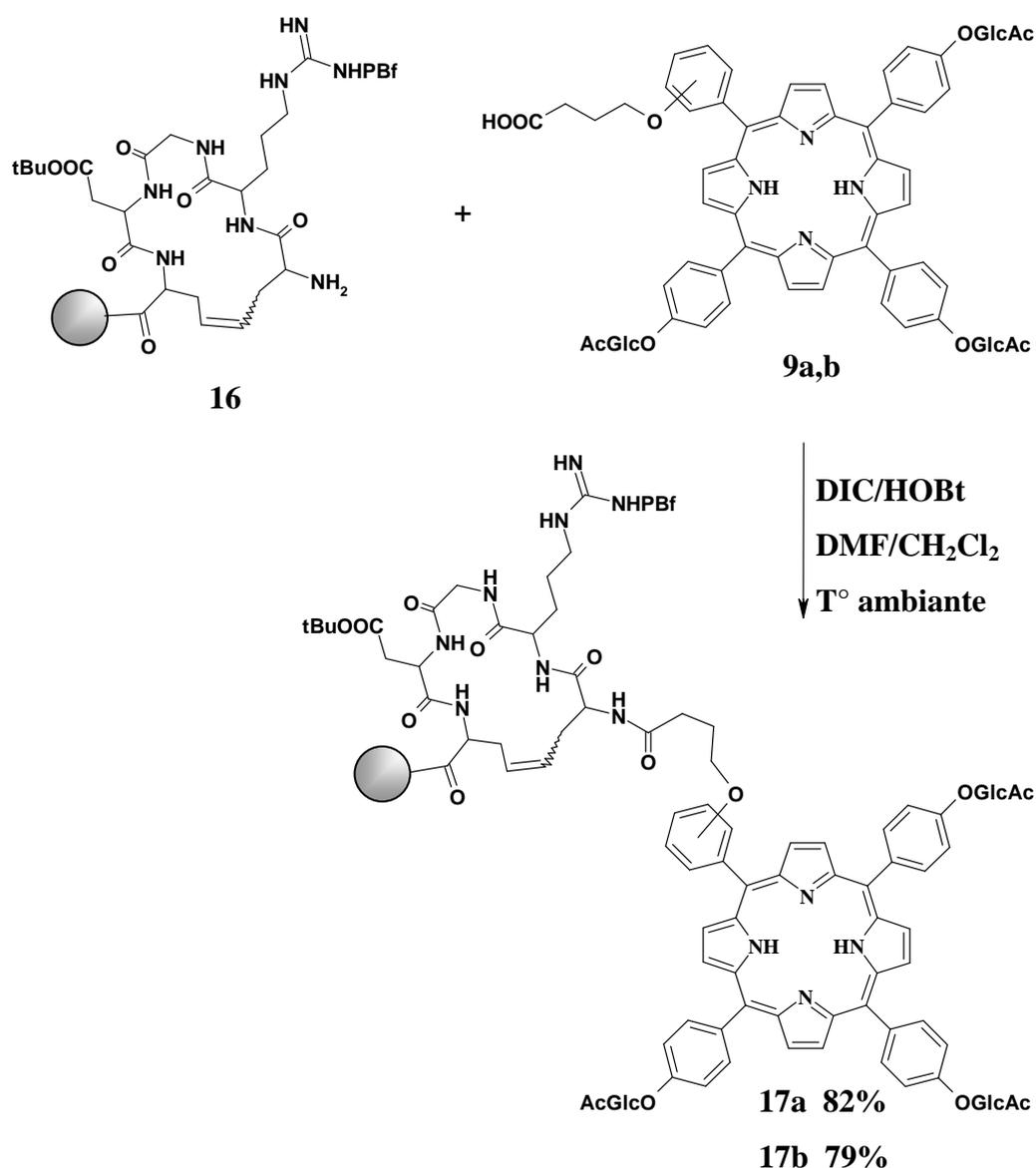


Figure III-28 : Condensation des porphyrines **9a,b** sur le pentapeptide cyclique greffé sur résine **16**.

La réaction est effectuée dans un mélange de diméthylformamide et de dichlorométhane (5/5 v/v). Les carboxyporphyrines sont activées par le système DIC/HOBt. Après 24 heures de réaction, les résines **17a** et **17b** sont obtenues avec des rendements, déterminés par estimation du gain de masse du support après séchage au dessiccateur, de 82% et 79% respectivement.

6– Décrochage/déprotection des porphyrines peptidiques.

Le décrochage des porphyrines peptidiques greffées sur résine Rink-amide MBHA s'effectue en milieu acide, par réaction de l'acide trifluoroacétique. Comme dans le cas des porphyrines **12a,b** et **13a,b** décrites au chapitre précédent, nous avons ajouté au milieu réactionnel 0,5 % d'anisole pour jouer le rôle de piègeur de carbocation. Toutefois, dans ce cas, le réactif acide est ajouté par petites fractions (voir partie expérimentale) de façon à limiter des réactions secondaires d'hydrolyse du polymère qui induiraient des sous produits extrêmement difficiles à éliminer par chromatographie^[144]. Dans ces conditions, nous avons obtenu les porphyrines **18a** et **18b**, après traitement et purification, avec des rendements proches de 60%, sur les deux étapes couplage/décrochage. Rappelons que dans ce cas la configuration de la double liaison est essentiellement *trans*.

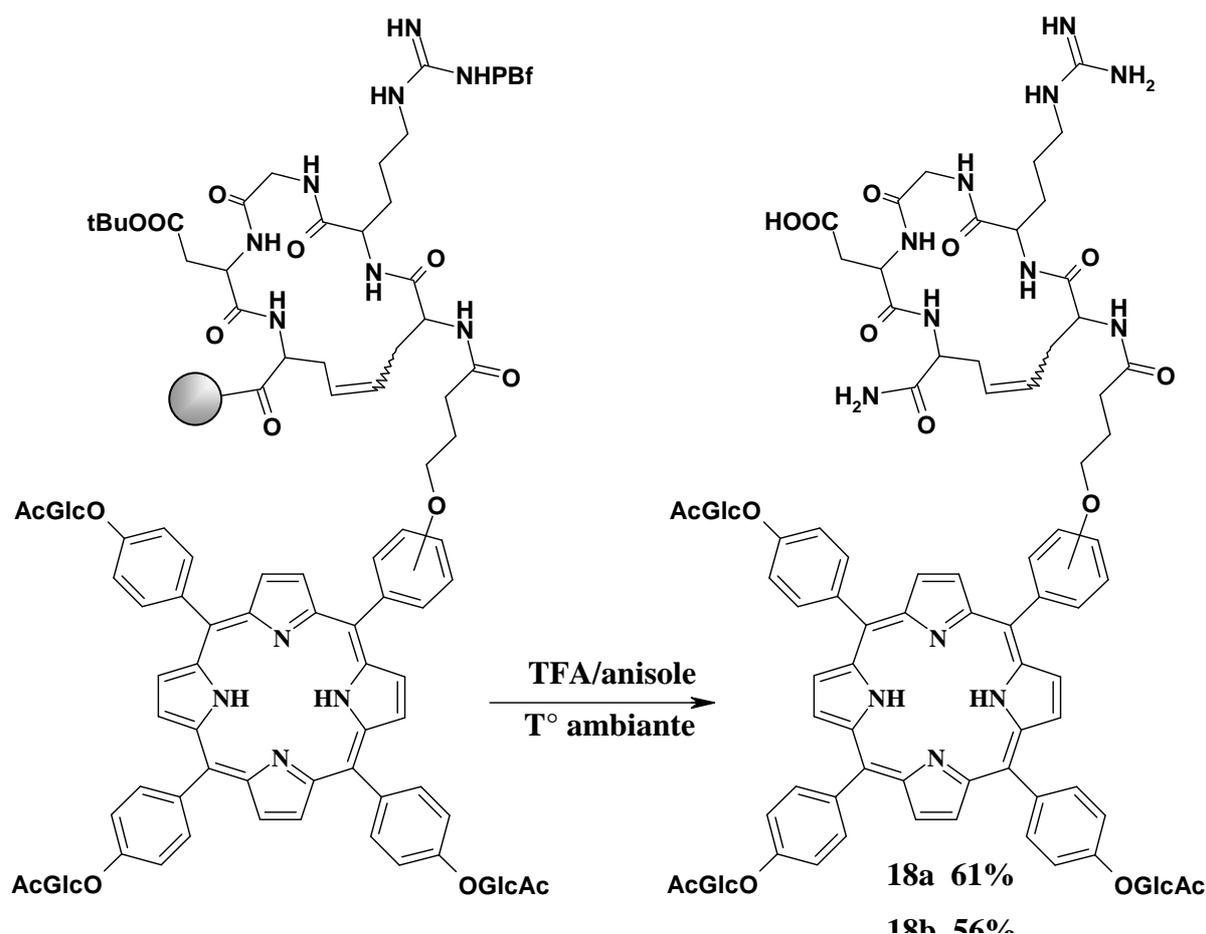


Figure III-29 : Décrochage de porphyrines **18a** et **18b** greffées sur résine.

7- Désacétylation des unités glucidiques

Nous avons employé la même méthode que celle utilisée pour les composés glucosylés **14a** et **14b** (chapitre II).

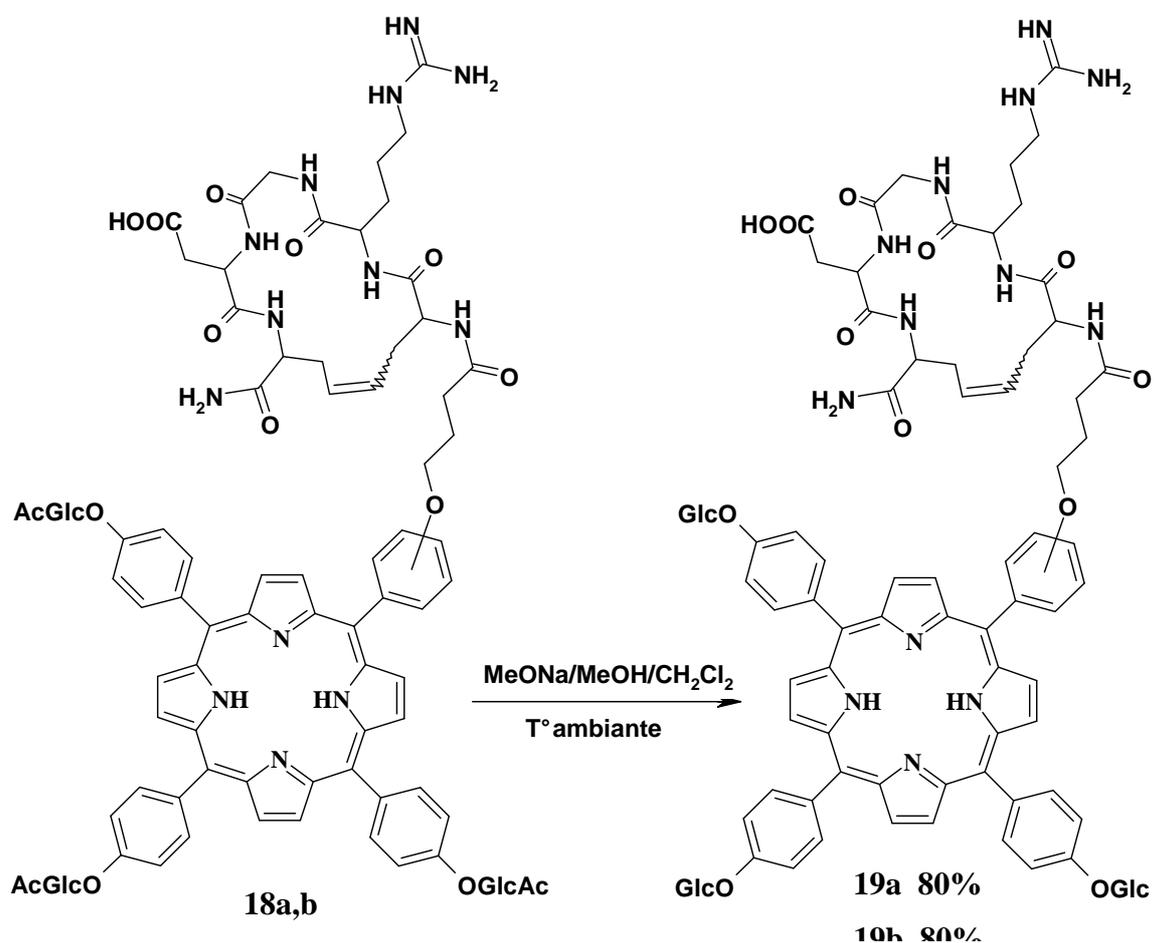


Figure III-30 : Désacétylation des composés **18a,b**.

Les composés **18a** et **18b** n'étant pas solubles dans le méthanol pur, nous avons effectué comme pour les composés **14a,b** la réaction de désacétylation dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol (8/2) en présence d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (2 équivalents par groupement acétyle). Après séparation, les rendements obtenus sont de 80%.

8– Caractérisation structurale

Les porphyrines acétylées et désacétylées **18a,b** et **19a,b** ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible et spectrométrie de masse MALDI. De plus les formules brutes des composés finals **19a,b** ont été confirmées par spectrométrie de masse haute résolution. Enfin, une étude par RMN du proton confirme les structures attendues.

8-1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV-Visibles des porphyrines acétylées **18a** et **18b** ont été réalisés dans un mélange de chloroforme et de méthanol dans les proportions 8/2. Pour les composés **19a** et **19b** complètement déprotégés, les mesures ont été effectuées dans l'eau. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III-5. Les spectres des porphyrines **19a,b** sont présentés sur les figures III-31 et III-32.

Dans tous les cas, le profil du spectre observé est de type *étio*.

Tableau III-5. Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines **18a,b** et **19a,b**.

composés	Solvant	Soret	IV	III	II	I
18a	CHCl ₃ /MeOH 80/20	420 (312,0)	516 (12,5)	552 (6,9)	592 (4,2)	648 (4,0)
18b	CHCl ₃ /MeOH 80/20	420 (333,2)	516 (13,4)	552 (7,2)	592 (4,4)	648 (4,1)
19a	H ₂ O	419(282,0)	516 (9,3)	552 (7,2)	592 (3,7)	648 (2,2)
19b	H ₂ O	417 (256,0)	516 (11,3)	552 (8,1)	592 (3,6)	648 (2,1)

λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C

Le comportement en solution aqueuse des porphyrines **19a** et **19b** est similaire à celui des macrocycles **14a,b** décrits au chapitre précédent. En effet, pour des concentrations inférieures à $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration alors que pour des concentrations supérieures on observe un écart à la linéarité de la loi de Beer-Lambert associé d'une part à un élargissement important de la bande de Soret et d'autre part à un déplacement de sa longueur d'onde maximale d'absorption dans le rouge pour le composé **19b** ou dans le bleu pour la porphyrine **19a**.

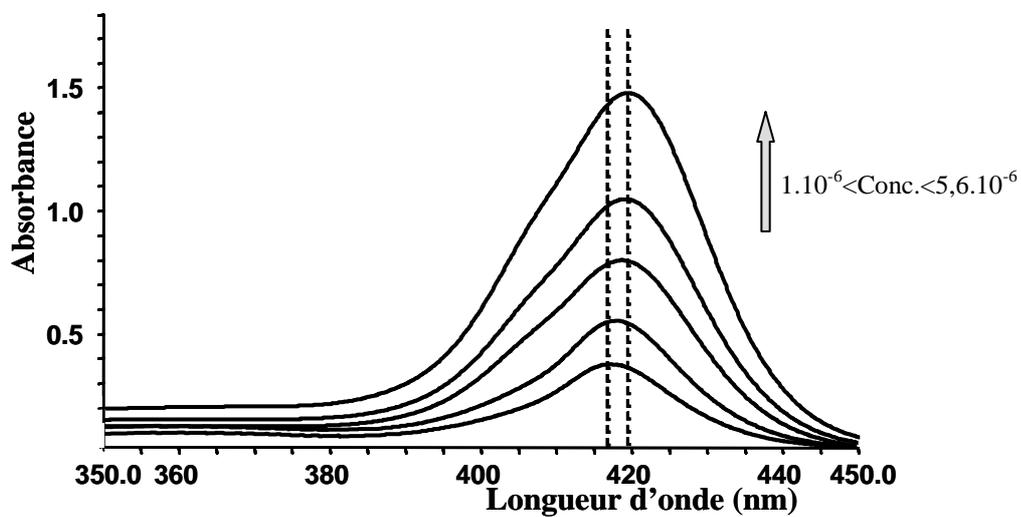
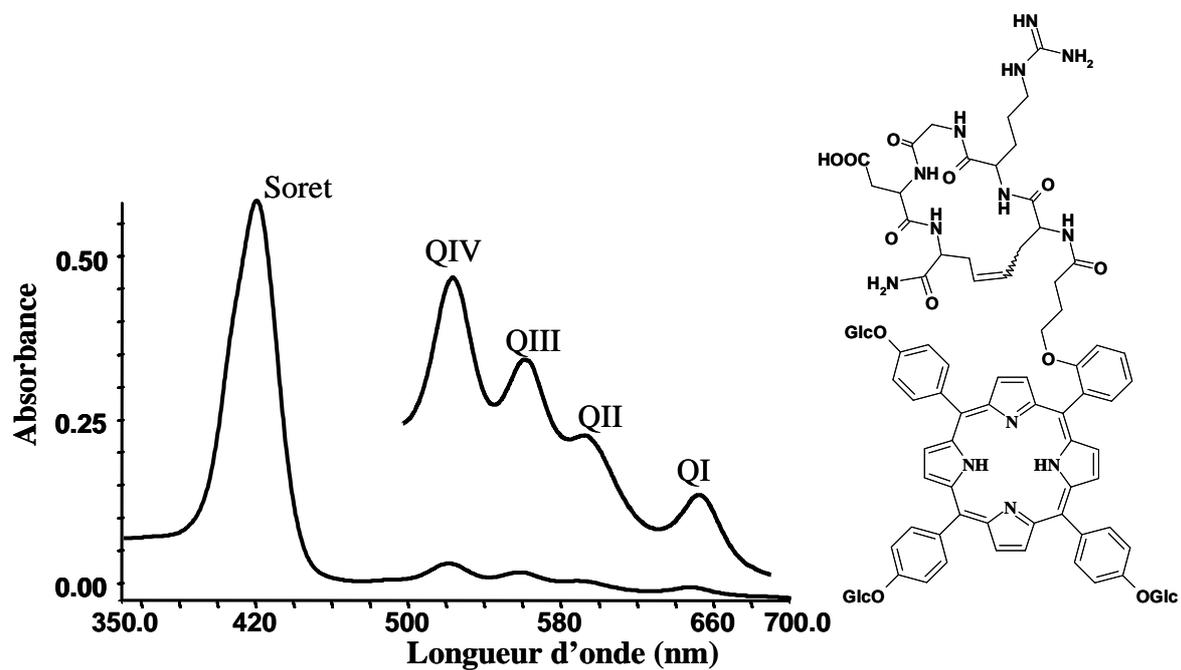


Figure III-32 : Spectre UV-Visible du composé **19b** - Comportement de la bande de Soret en fonction de la concentration.

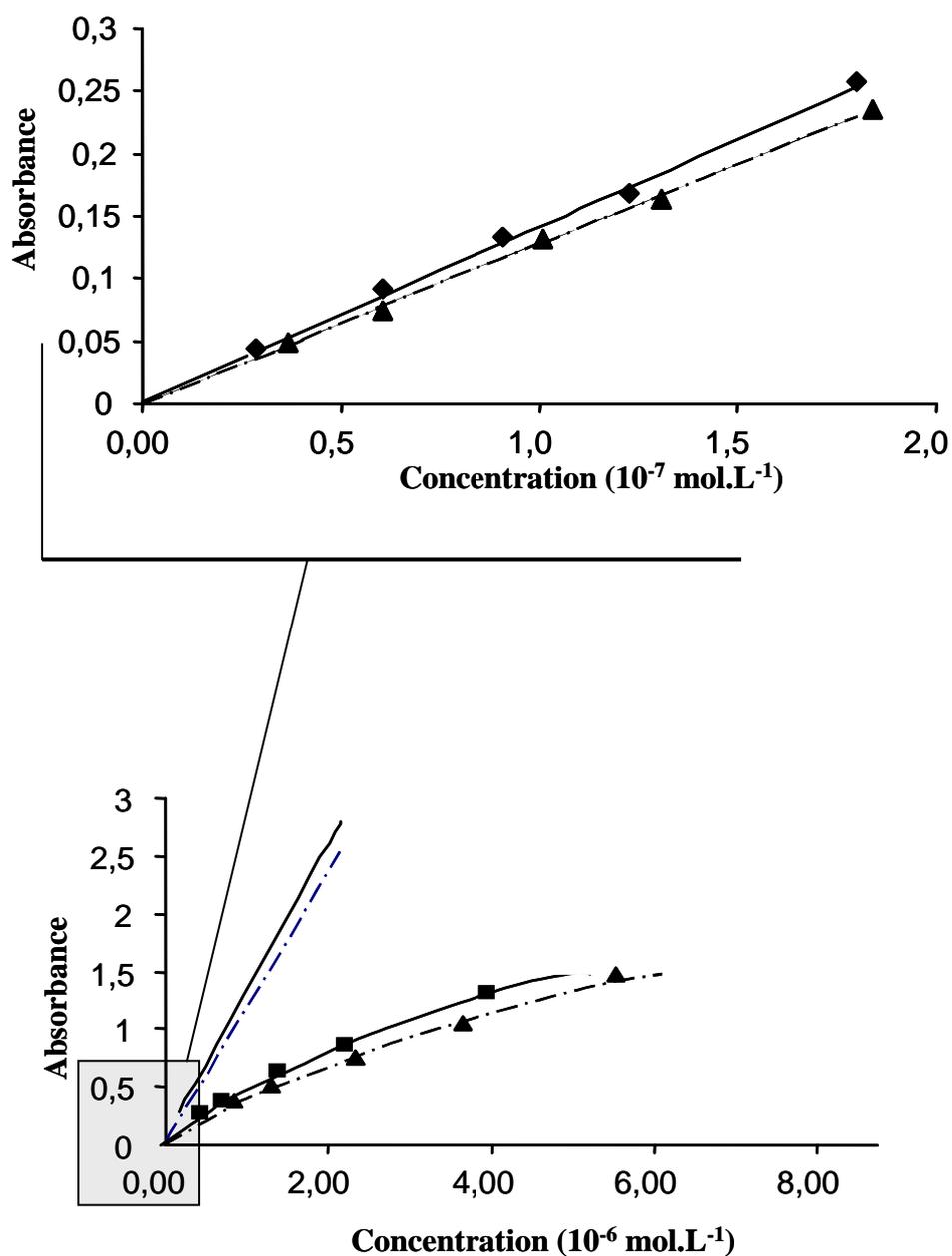


Figure III-33 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration ;
 (■, —) : composé **19a** et (▲, - · -) : composé **19b**.

8-2 Spectrométrie de masse

L'ensemble des porphyrines **18a,b** et **19a,b** a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III-6.

Les spectres obtenus fournissent pour ces quatre porphyrines le pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ attendu. En outre, on observe dans tous les cas un pic de faible intensité correspondant à un fragment produit par la perte du substituant peptidique.

Tableau III-6. Spectrométrie de masse MALDI.

composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
18a	2247,8	2248,74
18b	2247,8	2248,64
19a	1743,6	1744,56
19b	1743,6	1744,61

Nous donnons, à titre d'exemple sur la figure III-34, le spectre obtenu pour le composé **18a**.

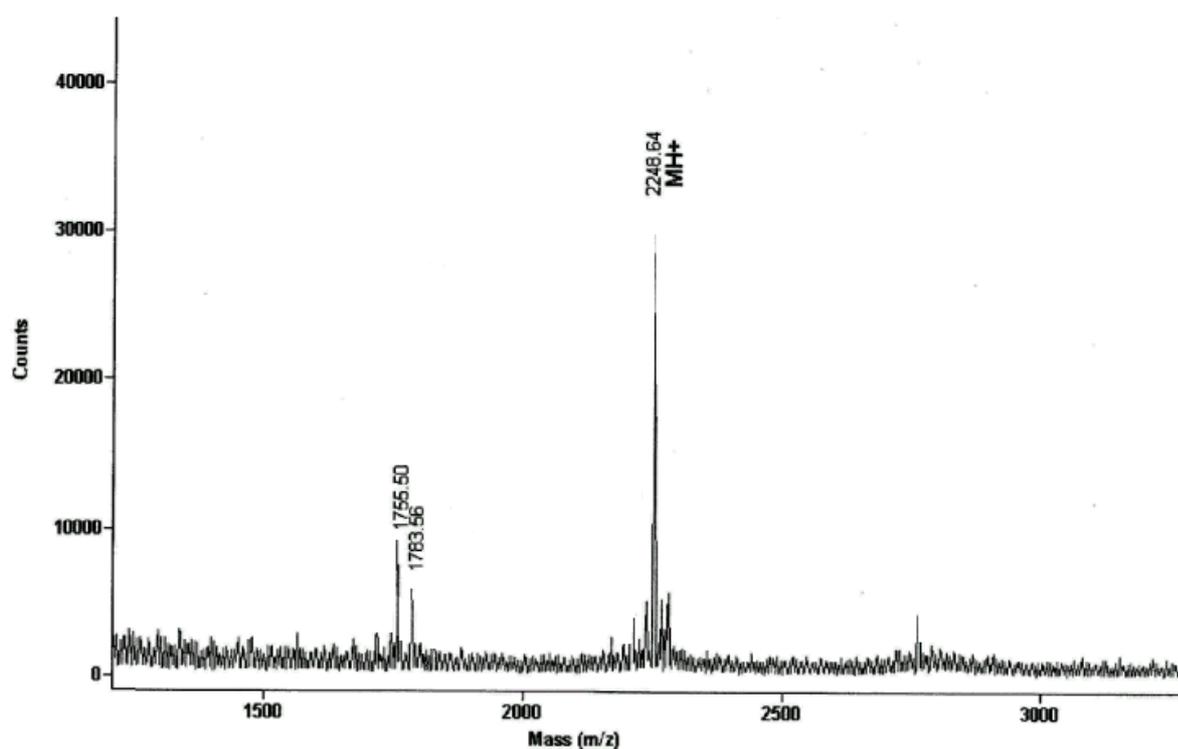


Figure III-34 : Spectre de MALDI du composé **18a**

Une étude par spectrométrie de masse haute résolution a également été effectuée pour les composés finals **19a** et **19b**. Les résultats (voir partie expérimentale) confirment les formules brutes attendues.

8-3 Spectroscopie RMN.

Les porphyrines *peracétylées* **18a** et **18b** ont été analysées par spectroscopie RMN du proton et du carbone 13. L'attribution des signaux a été effectuée sur la base des courbes d'intégrations et en s'appuyant sur les spectres de corrélation proton-proton et proton-carbone ainsi que la séquence DEPT. En revanche, les spectres obtenus pour les composés complètement déprotégés **19a** et **19b** n'ont pas pu être exploités car ils présentent des signaux beaucoup trop élargis. Tous les efforts produits pour améliorer ces résultats (essais de plusieurs solvants, augmentation de la température) ont échoué. En outre, la méthode utilisée pour les composés **14a** et **14b** décrite précédemment et qui consiste à réaliser la mesure en milieu acide (TFA) conduit dans ce cas à une dégradation partielle des produits. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été mesurés dans un mélange de chloroforme et de méthanol (9/1). Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux III-7 et III-8. Les figures III-35 et III-36 présentent à titre d'exemple les spectres du composé **18a**.

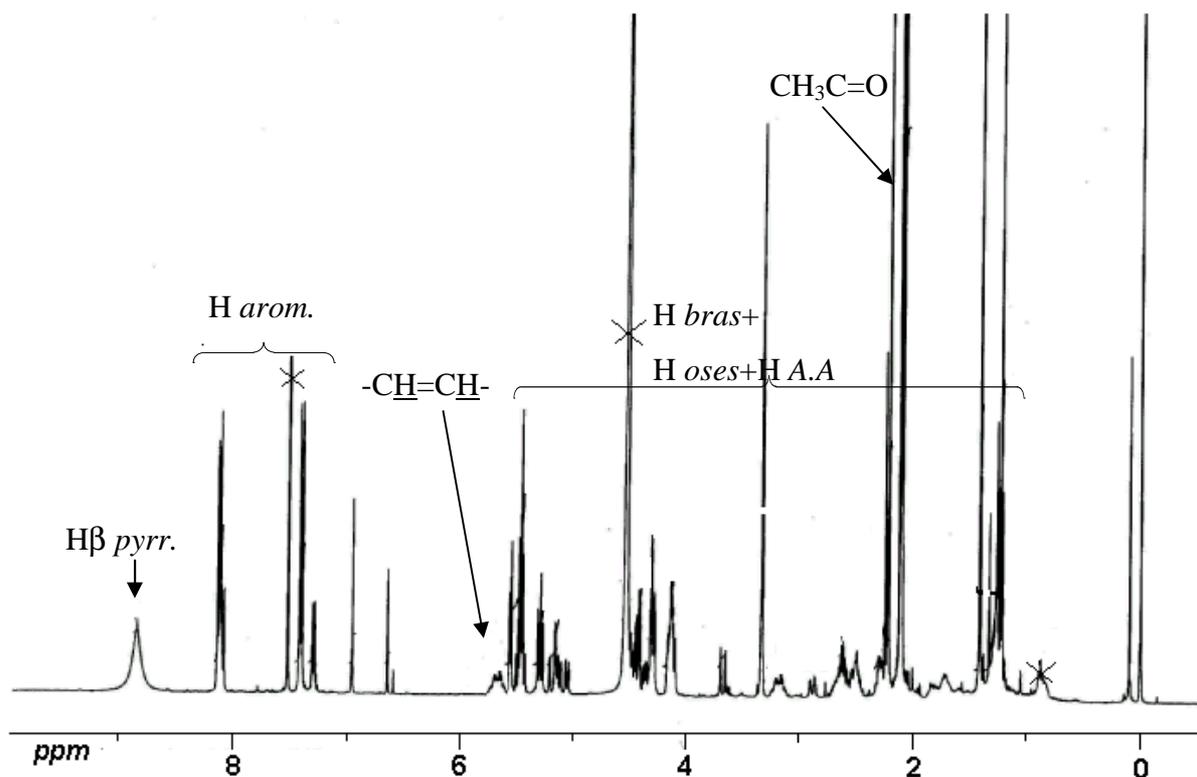


Figure III-35 : Spectre RMN ^1H du composé **18a** dans $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.

Tableau III-7 : RMN ¹H des composés **18a** et **18b**, δ en ppm J en Hz

H	18a	18b
<u>Pyrroles</u>		
Hβ	8,87 m	8,85 m - 8,88 m
NH	-	-
<u>Phényle</u>		
2	8,11 d (8,2)	-
3	7,31 d (8,2)	7,34 d (8,2)
4	-	7,76 dt (7,4-1,2)
5	7,31 d (8,2)	7,35 m
6	8,11 d (8,2)	8,10 d (8,2)
<u>Aryles-Oses</u>		
2,6	8,15 d (8,2)	8,15 d (8,2)
3,5	7,42 d (8,2)	7,42 d (8,2)
<u>Bras espaceur</u>		
α	4,31 m	4,02 m
β	2,30 quint. (6,7)	1,31 m
γ	2,61 t (7,3)	1,32 m
<u>O-Glucosyles</u>		
1'	5,58 d (7,2)	5,57 d (7,1)
2'	5,48 m	5,48 m
3'	5,48 m	5,48 m
4'	5,30 t (9,6)	5,30 t (9,4)
5'	4,15 m	4,15 m
6'a	4,42 dd (12,3-5,4)	4,42 dd (12,2-5,6)
6'b	4,30 dd (12,3-2,0)	4,31 dd (12,4-2,1)
Acétyles	2,12-2,13-2,23-2,26 s	2,11-2,12-2,13-2,23-2,26 s
<u>allGlycine</u>		
α	4,20 m	3,78 m
β	2,51 m	1,90 m
<u>Arginine</u>		
α	4,16 m	3,85 m
β	1,70 m	1,26 m
γ	1,63 m	1,13 m
ε	3,20 m	2,80 m
<u>Glycine</u>		
α	4,15 m	3,95 m
<u>Ac. Aspartique</u>		
α	4,50 m	4,17 m
β	2,65 m	2,63 m
<u>AllGlycine (carboxamide)</u>		
α	4,21 m	3,83 m
β	2,50 m	1,92 m
<u>Double liaison</u>		
-CH=CH-	5,63 m	5,02 m

Tableau III-8 : RMN ¹³C des composés **18a** et **18b**, δ en ppm .

13C	18a	18b
Pyrroles		
α	148,0	146,5
β	130,9	131,3
Méso		
5	120,7	120,5
10	119,8	119,7
15	119,7	119,6
20	119,8	119,7
Phényle		
1	134,9	137,0
2	136,0	155,8
3	113,3	115,5
4	157,2	130,7
5	113,3	119,6
6	136,0	135,1
Aryles-oses		
1	137,2	136,9
2,6	136,0	135,6
3,5	115,5	115,1
4	157,9	156,6
Bras espaceur		
α	67,7	67,7
β	24,7	24,3
γ	33,0	32,5
O-Glucosides		
1'	99,3	99,1
2'	72,0	71,3*
3'	72,5	72,8
4'	68,9	68,4
5'	73,5	72,3*
6'	62,6	62,1
Acétyles		
	20,7-20,9 170,5-170,6-170,7	20,9-20,8-20,7-20,6 170,3-170,6-171,2-171,4
<i>all</i> Glycine		
α	53,7	53,1
β	34,1	33,9
C=O	175,3*	175,1*
Arginine		
α	52,8	52,1
β	35,9	35,7
γ	26,0	25,7
ε	41,0	40,5
C=O	174,1*	174,1*
C guanidino	157,2	157,1

<i>13C (suite)</i>	<i>18a (suite)</i>	<i>18b (suite)</i>
Glycine		
α	44,5	44,3
C=O	174,7*	174,7*
Ac. Aspartique		
α	51,4	51,1
β	37,9	37,8
C=O	172,6*	172,6*
COOH	178,1	178,1
<i>all</i> Glycine(carboxamide)		
α	53,7	53,0
β	34,5	33,4
C=O	172,9*	172,9*
Double liaison		
-C=C-	128,8-128,9	128,6-128,7

*: valeurs interchangeables dans une même colonne

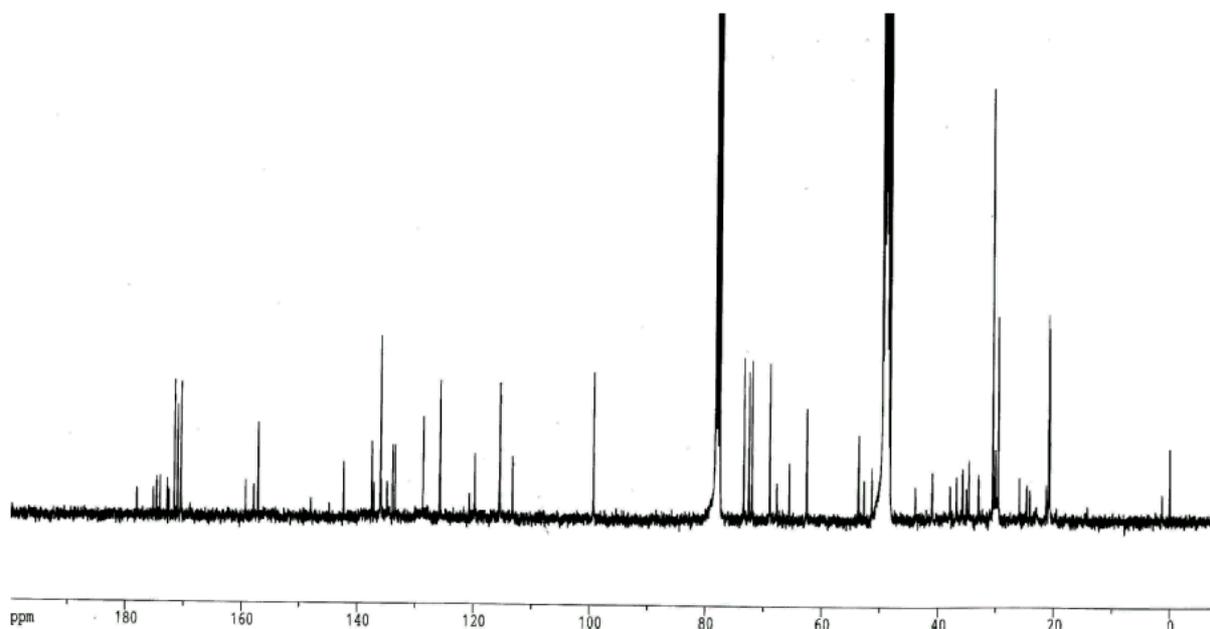


Figure III-36 : Spectre RMN ^{13}C du composé **18a**

Les spectres de RMN ^1H présentent des figures relativement déformées et élargies, phénomène couramment observé pour l'analyse de composés partiellement ou totalement déprotégés. Néanmoins, on distingue essentiellement quatre familles de signaux correspondant au macrocycle tétrapyrrolique, aux quatre groupements phényles, aux unités glucidiques et au substituant peptidique. Les protons de la double liaison interne du cycle peptidique résonnent tous deux à 5,38 ppm dans le cas du composé *para* **18a** et à 5,02 ppm

dans le cas du composé substitué en *ortho* **18b**. Malheureusement, la résolution de la figure n'est pas suffisante pour permettre de déterminer la stéréochimie de la double liaison. En revanche, le spectre du carbone 13 montre, comme pour l'étude du pentapeptide cyclique *allGRGDallG* exposée précédemment, qu'un isomère est très largement majoritaire. En effet, on observe pour les carbones en α de la double liaison seulement deux signaux suggérant, par analogie aux valeurs obtenues pour le peptide cyclique non lié au macrocycle, que seul l'isomère *trans* est obtenu.

On note par ailleurs que le passage d'une substitution *para* à *ortho* se traduit par un blindage des signaux de l'ordre de 0,2 à 1 ppm ce qui traduit le fait que le peptide, dans le cas du composé **18b** se positionne dans le cône d'anisotropie du macrocycle. La RMN du ^{13}C n'est quant à elle pas sensible à ce phénomène.

La connaissance des spectres RMN des porphyrines acétylées **18a,b**, du MALDI et de la masse exacte des composés déprotégés permet de donner sans ambiguïté les structures des porphyrines finales **19a** et **19b**.

2- Stratégie de synthèse

Les différentes étapes de synthèse sont présentées sur le schéma rétrosynthétique de la figure IV-2. La stratégie de synthèse que nous avons appliquée consiste à former dans un premier temps une triglucosylporphyrine portant un groupement allyle puis dans un second temps à la faire réagir par réaction de métathèse des alcènes sur le pentapeptide diallylique *allG-RGD-allG* fixé sur support solide.

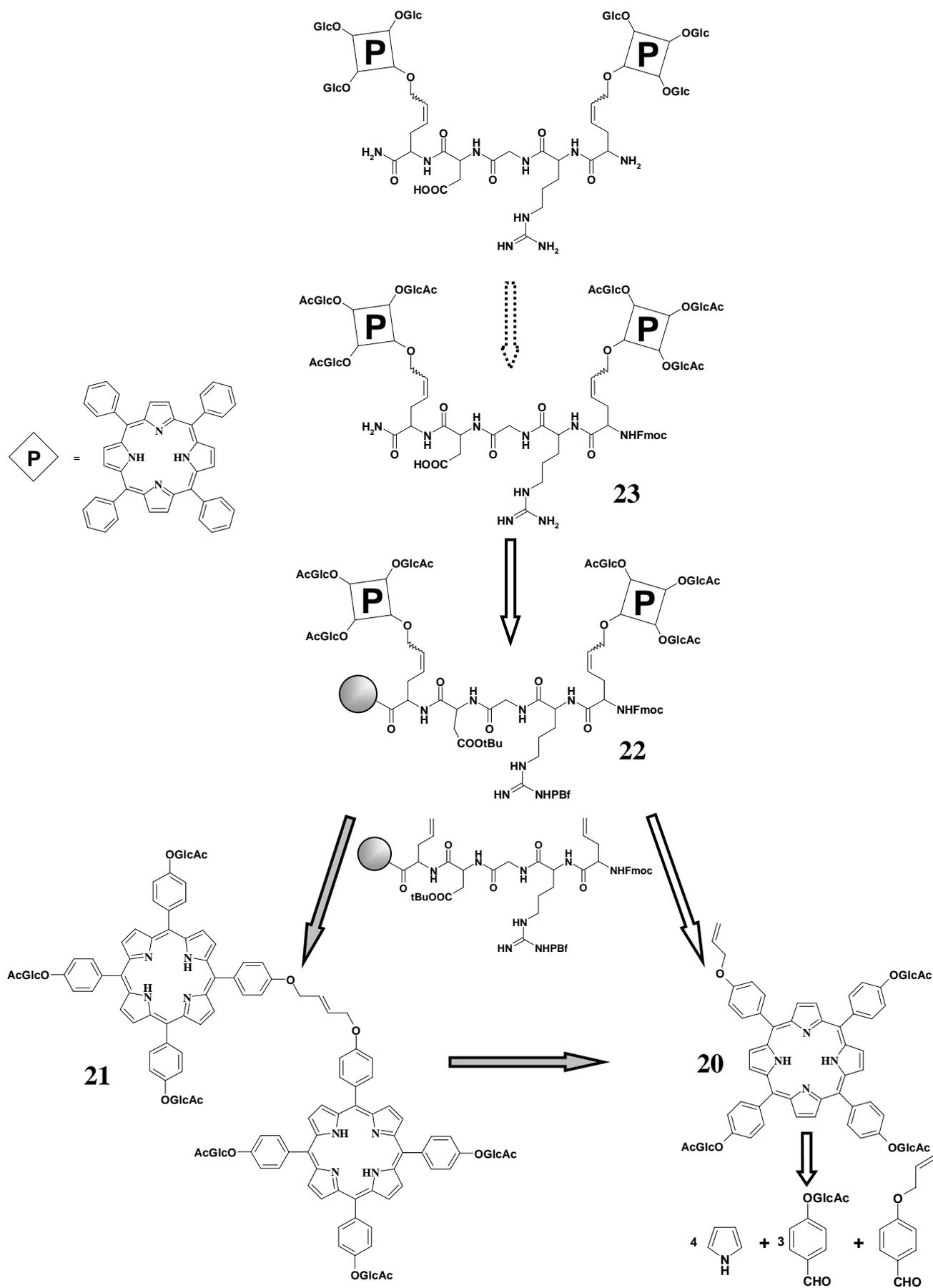


Figure IV-2 : Schéma rétrosynthétique du dimère 23.

3 – Synthèse du précurseur allylique.

Ce composé a été synthétisé selon deux méthodes : la méthode de Little et la méthode de Lindsey.

La méthode de Little, qui consiste dans ce cas à faire réagir un équivalent de *para*-allyloxybenzaldéhyde avec trois équivalents de glucosylaldéhyde **2** en présence de quatre équivalents de pyrrole dans l'acide propanoïque à reflux, permet d'obtenir après purification le composé **20** pur avec un rendement de 5%.

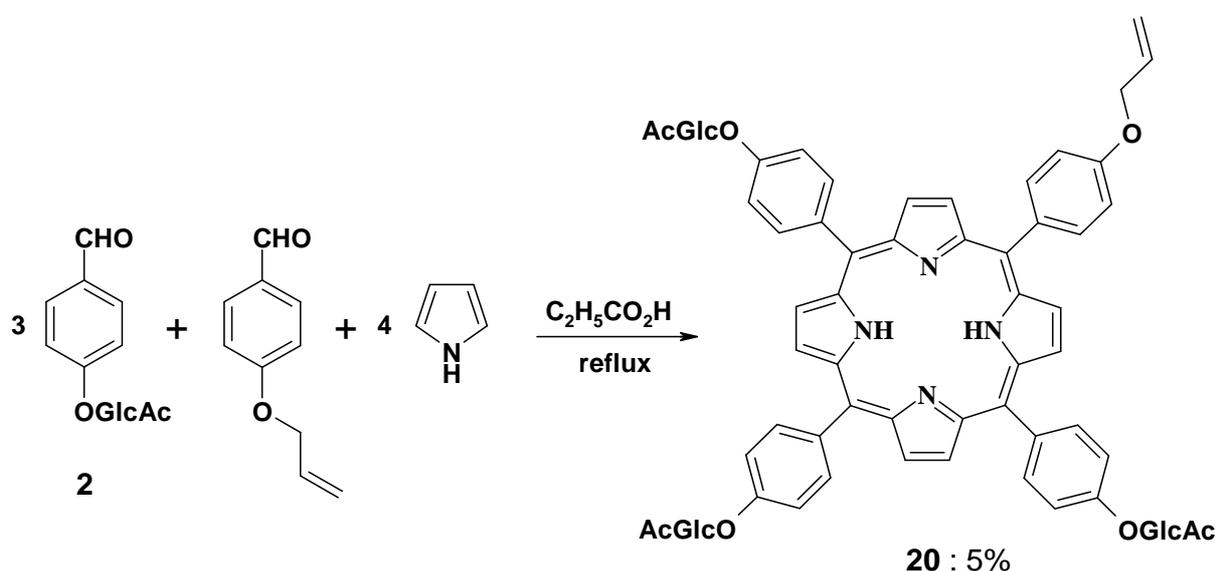


Figure IV-3 : Synthèse de la monoallyloxyphénylporphyrine **20** selon Little.

Comme dans le cas des monohydroxyphényltrigluosylporphyrines **5a** et **5b**, le composé **20** ne cristallise pas dans le milieu réactionnel ce qui complique considérablement la purification. Il est alors nécessaire de réaliser une pré-purification par chromatographie sur colonne de silice suivie d'une purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice.

L'utilisation du protocole de Lindsey nous a permis d'améliorer le rendement en composé **20**. Ce protocole, nous le rappelons, consiste à faire réagir quatre équivalents de pyrrole avec trois équivalents d'aldéhyde glucosylé **2** et un équivalent de *para*-allyloxybenzaldéhyde dans le

dichlorométhane en présence d'un acide de Lewis puis à oxyder le porphyrinogène formé par le *para*-chloranile.

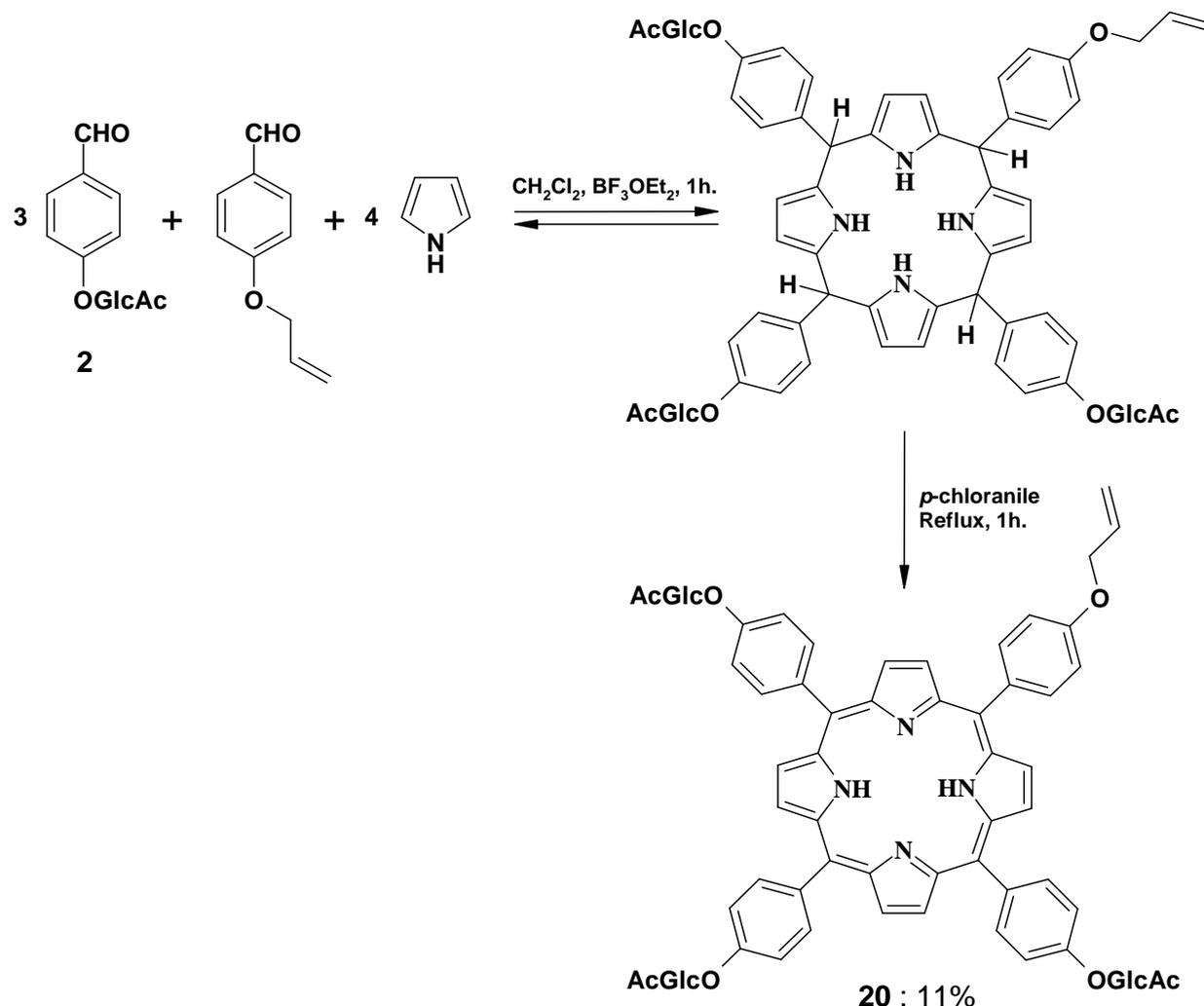


Figure IV-4 : Synthèse de la monoallyloxyphénylporphyrine **20** selon Lindsey.

Ainsi, la monoallyloxyphénylporphyrine **20** est obtenue, après purification, avec un rendement de 11%.

4- Essai de synthèse du dimère à motif RGD

En nous appuyant sur les résultats de la littérature, nous avons dans la suite de notre travail tenté de former le dimère **23** par réaction de métathèse croisée entre la monoallyloxyphénylporphyrine **20** et le pentapeptide *allG*-RGD-*allG*, en phase solide.

La résine décrite au chapitre précédent, dont la substitution en pentapeptide *allGRGDallG* représente $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$, a été utilisée pour cette étude. De plus, l'ensemble des réactions a été réalisé dans le dichlorométhane.

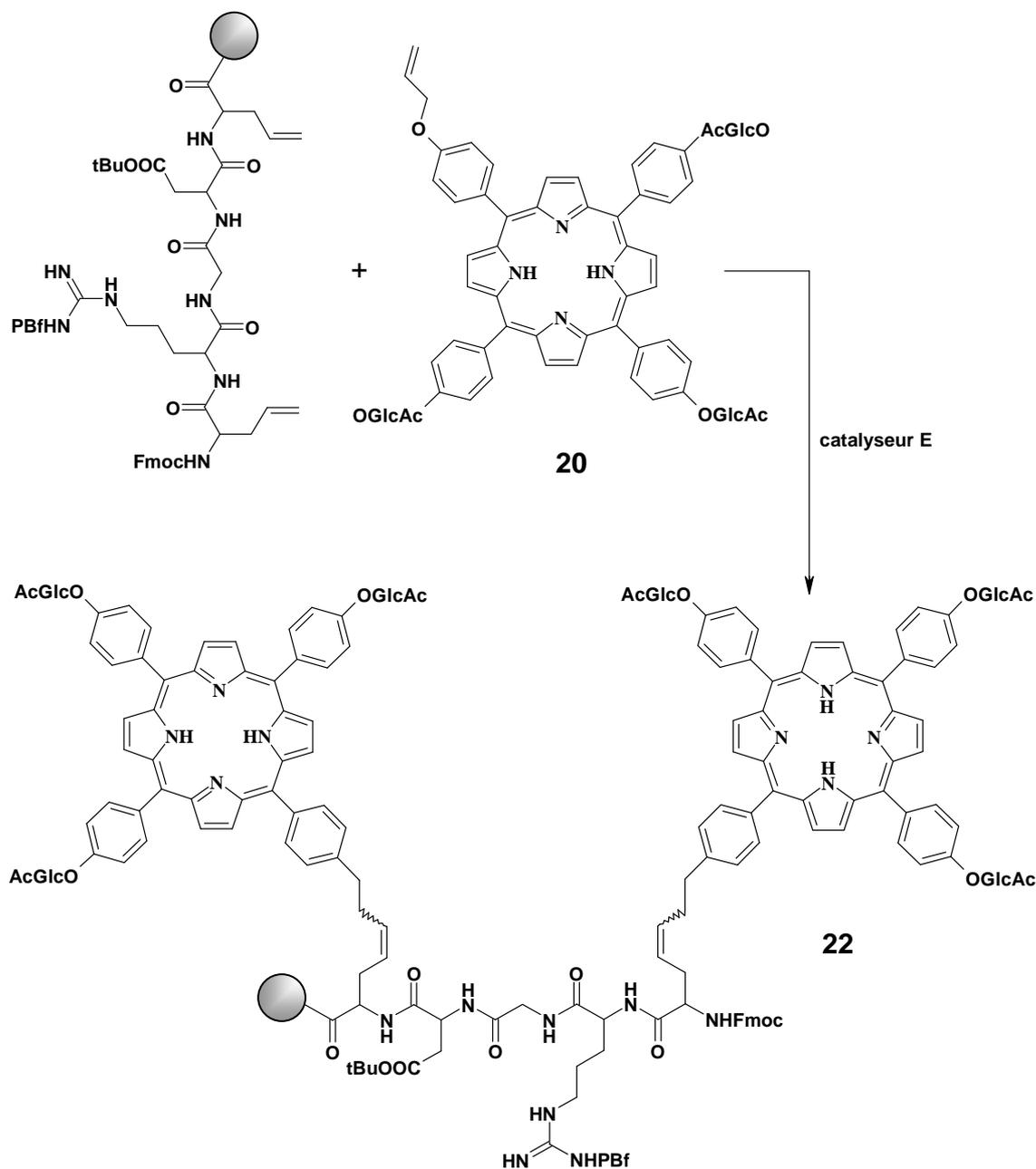


Figure IV-5 : Couplage du composé **20** et du peptide *allG-RGD-allG* par métathèse.

Sur la base des résultats obtenus au chapitre III, nous avons choisi d'employer le catalyseur de Grubbs noté **E** (figure III-11). En outre, les exemples de métathèse croisée en phase solide décrits dans la littérature indiquent que la réaction est favorisée par un excès de l'oléfine

présente en solution^[135]. Plusieurs essais de réaction ont été effectués en tenant compte de ces différents paramètres. Cependant, pour toutes les réactions réalisées, nous n'avons pas obtenu le produit souhaité. L'analyse du milieu réactionnel, après filtration de la résine, indique dans tous les cas la formation du dimère **21** (figure IV-6), par homodimérisation du monomère **20** par réaction de métathèse croisée en solution.

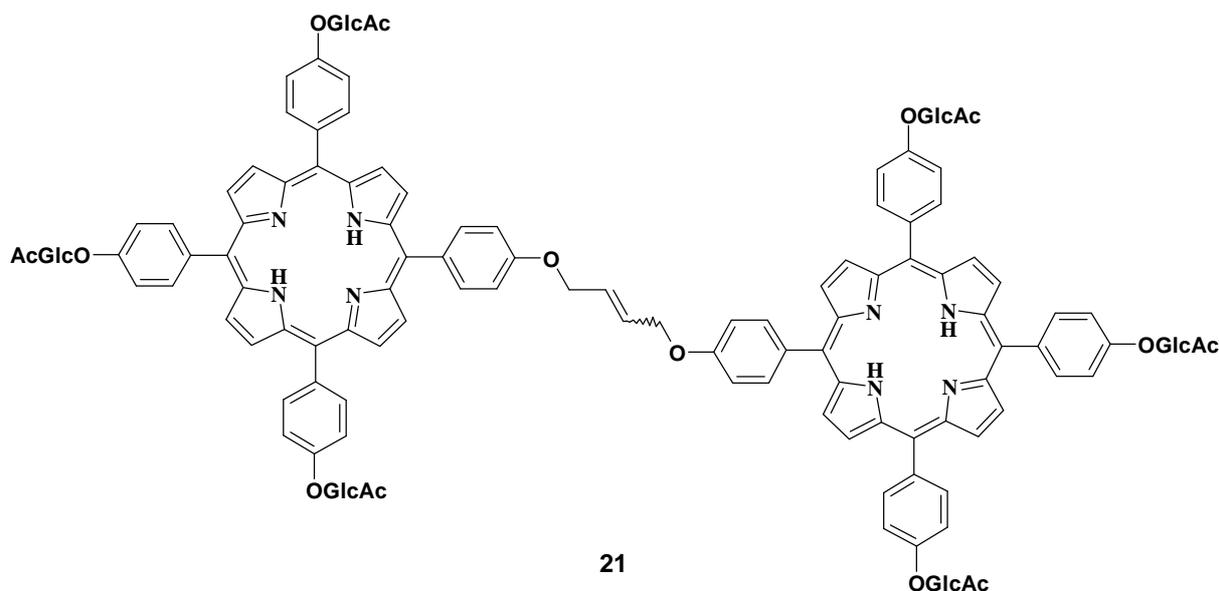


Figure IV-6 : Structure du composé obtenu par réaction de métathèse.

L'augmentation du nombre d'équivalent de composé **20** par fonction allyle portée par le pentapeptide (jusqu'à 6 équivalents) ou encore la dilution de ce même composé en solution n'ont pas permis d'obtenir le produit désiré.

Pour essayer de résoudre ce problème, nous avons synthétisé dans une première étape, le dimère **21** puis dans un second temps de le faire réagir par réaction de métathèse croisée sur le pentapeptide greffé sur résine.

5- Synthèse du dimère précurseur.

Le dimère **21** a été synthétisé selon deux méthodes : par métathèse des alcènes, et par réaction de Williamson.

5-1 Réaction de métathèse

La réaction d'homodimérisation (figure IV-7) est effectuée dans le dichlorométhane préalablement dégazé par barbotage d'argon, à température ambiante ou à reflux selon les cas. La monoallyloxyphénylporphyrine **20** est tout d'abord dissoute dans le solvant puis le catalyseur solubilisé dans un minimum de dichlorométhane est ajouté par l'intermédiaire d'une canne de transfert. L'évolution de la réaction est alors suivie par CCM. Pour cette étude, les catalyseurs de Grubbs notés **C** et **E** ont été utilisés. Dans tous les cas, 20% molaire de catalyseur ont été ajoutés au milieu réactionnel en deux fois. En outre, la concentration en porphyrine monomère **20** a été fixée pour chaque essai à 10^{-2} mol.L⁻¹.

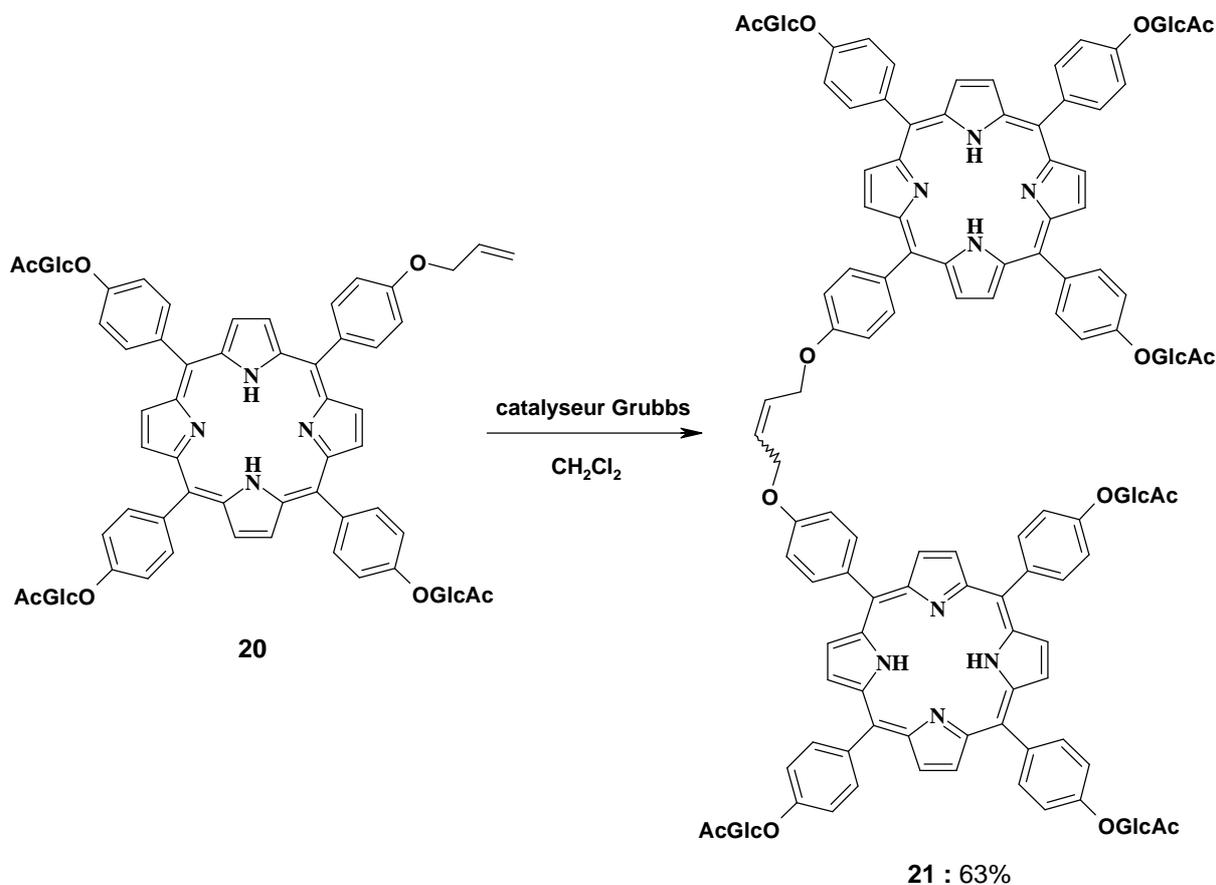


Figure IV-7 : Synthèse du dimère **21** par métathèse.

Tableau IV-1 : Résultats obtenus pour la réaction d'homodimérisation du composé **20**

Entrée	Catalyseur	Température	Rendements
1	C	20°C	57%
2	C	40°C	62%
3	E	20°C	59%
4	E	40°C	63%

Les résultats obtenus, rassemblés dans le tableau IV-1, semblent indiquer que la température de réaction et la nature du catalyseur n'ont que peu d'influence sur le rendement de la réaction. Toutefois, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le catalyseur **E**, pour une température de 40°C. (tableau IV-1, entrée 4). Dans ces conditions, le dimère **21** est isolé, après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice, avec un rendement de 63%.

Ce composé a été caractérisé par spectrométrie de masse, spectroscopie UV-Visible et par RMN du proton et du carbone 13 (voir paragraphe 7). Il est bien connu qu'il est possible de distinguer les isomères *cis* et *trans* d'un alcène par l'étude de leur spectre RMN du proton et du carbone 13. L'analyse des spectres du composé **21** indique que la réaction de métathèse, dans ce cas, conduit exclusivement à la formation d'un seul isomère, celui de configuration *trans*, l'isomère *cis* étant très certainement trop encombré pour être formé.

Toutefois, dans le but de lever toute ambiguïté sur la détermination de la nature de l'isomère obtenu par réaction de métathèse, et avec l'objectif d'augmenter le rendement en composé **21**, nous avons synthétisé le dimère *trans* par réaction de Williamson.

5-2 Formation du dimère par la réaction de Williamson

La réaction consiste à faire réagir la monohydroxyphényltriglycosylporphyrine **5a** avec le *trans*-1,4-dibromobut-2-ène en présence de carbonate de potassium. Des dimères de porphyrines glucosylées ont déjà été synthétisés par cette méthode en deux étapes dans notre laboratoire^[145]. Dans ce cas, le monomère hydroxylé réagit avec un excès de composé dihalogéné puis le produit de réaction alkylé est purifié et mis à réagir avec un excès de monomère selon la même réaction. Nous avons cherché à améliorer ce procédé en formant le dimère en une seule étape de façon à limiter les purifications fastidieuses. Le protocole que nous avons appliqué consiste à faire réagir le monomère **5a** avec un équivalent de dérivé

dihalogéné en présence d'un large excès de carbonate de potassium dans le diméthylformamide à température ambiante. La réaction est suivie par CCM. Après 48 heures, on observe la disparition totale de la porphyrine de départ. On ajoute alors au milieu réactionnel trois équivalents supplémentaires de monomère **5a**. La réaction est poursuivie, toujours à température ambiante, jusqu'à ce que l'on n'observe plus d'évolution par CCM.

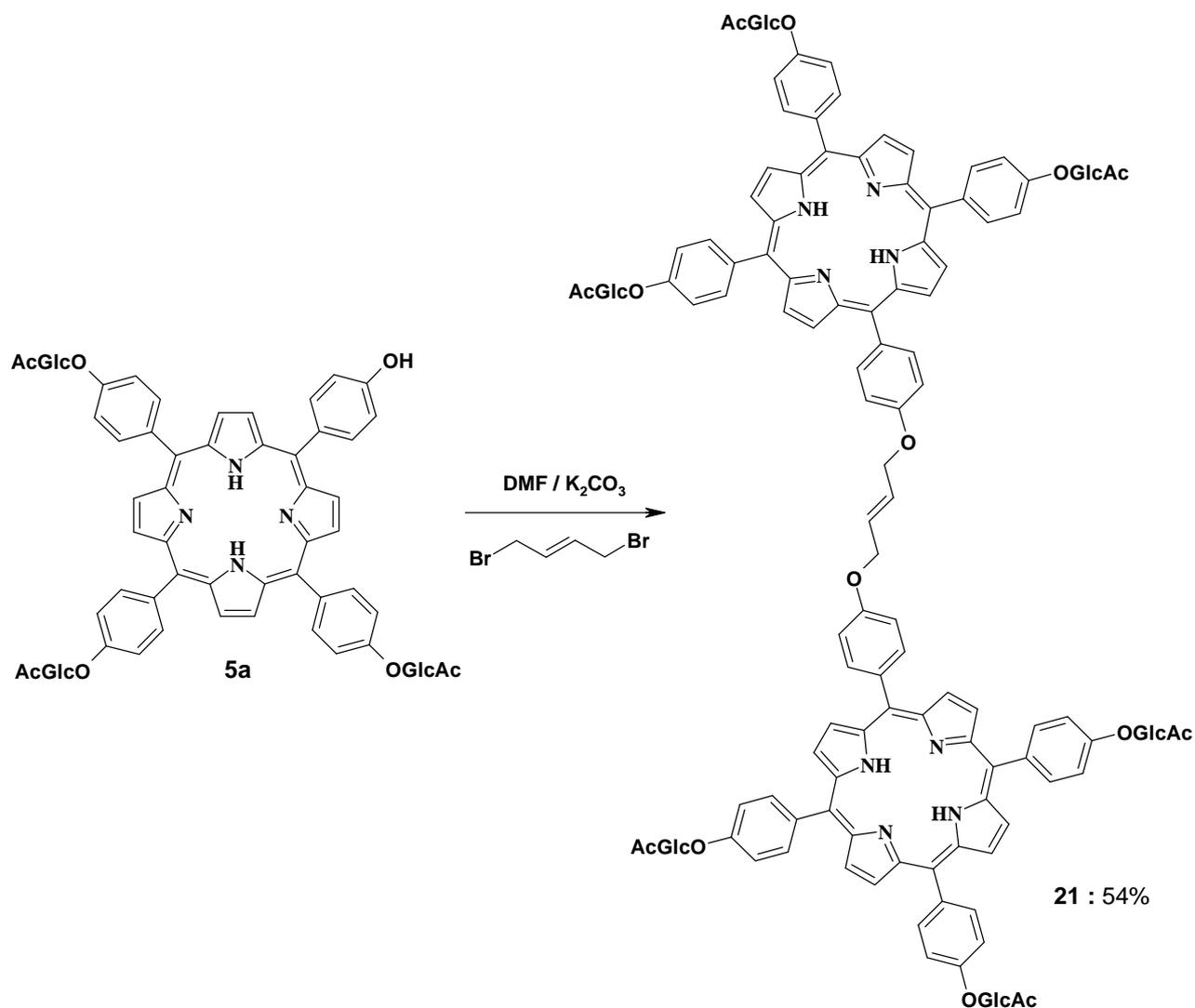


Figure IV-8 : Synthèse du dimère **21** par réaction de Williamson.

Au bout de 30 heures, la réaction est stoppée et nous avons obtenu dans le meilleur des cas après purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice le composé attendu avec un rendement de 54%.

Si le protocole de la réaction de Williamson appliqué à la dimérisation de porphyrine a pu être relativement simplifié, le rendement obtenu reste moyen et inférieur à celui de l'homodimérisation par métathèse croisée. Toutefois les spectres de RMN du proton et du carbone 13 du composé **21** obtenu par cette méthode sont identiques en tous points à ceux de

ce même composé obtenu par métathèse ce qui confirme la stéréochimie exclusivement *trans* de cette réaction pour le cas étudié.

6- Synthèse du dimère à motif RGD

Nous avons par la suite poursuivie l'étude menée sur la synthèse du dimère **23**. Nous avons pour cela utilisé le même support que celui décrit précédemment sur lequel nous avons fait réagir, par réaction de métathèse croisée, le dimère **21** selon des conditions opératoires variées. Pour tous les essais réalisés, le bon déroulement de la réaction est contrôlé d'une part par chromatographie CCM de la phase liquide du milieu réactionnel et d'autre part par chromatographie CCM du produit de réaction isolé par traitement classique d'une fraction de la résine à l'acide trifluoroacétique. Dans tous les cas, nous avons utilisé 40% molaire de catalyseur au ruthénium **E** et une quantité de dichlorométhane, anhydre et dégazé par barbotage d'argon, permettant un gonflement optimal de la résine et une solubilisation complète des autres réactifs. Nous avons fait varier le nombre d'équivalent de dimère **21** par groupement allyle présent sur le pentapeptide ainsi que la température. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant.

Tableau IV-2 : Résultats obtenus pour la synthèse du dimère **23**.

Entrée	Nombre d'équivalent de 21 /groupement allyle	Température	Rendement après purification
1	3	20°C	0
2	4	20°C	traces
3	4	40°C	11%
4	6	20°C	traces
5	6	40°C	9%

Par cette méthode, nous avons pu former le dimère recherché après 48 heures de réaction avec un rendement modeste de 11 %. Il est à noter que les rendements inscrits dans le tableau IV-2 sont calculés, après purification, pour les deux étapes métathèse/décrochage du support. Cette dernière étape est réalisée en appliquant les conditions classiques exposées au chapitre précédent par action d'un mélange d'acide trifluoroacétique et d'anisole dans les proportions 95/5.

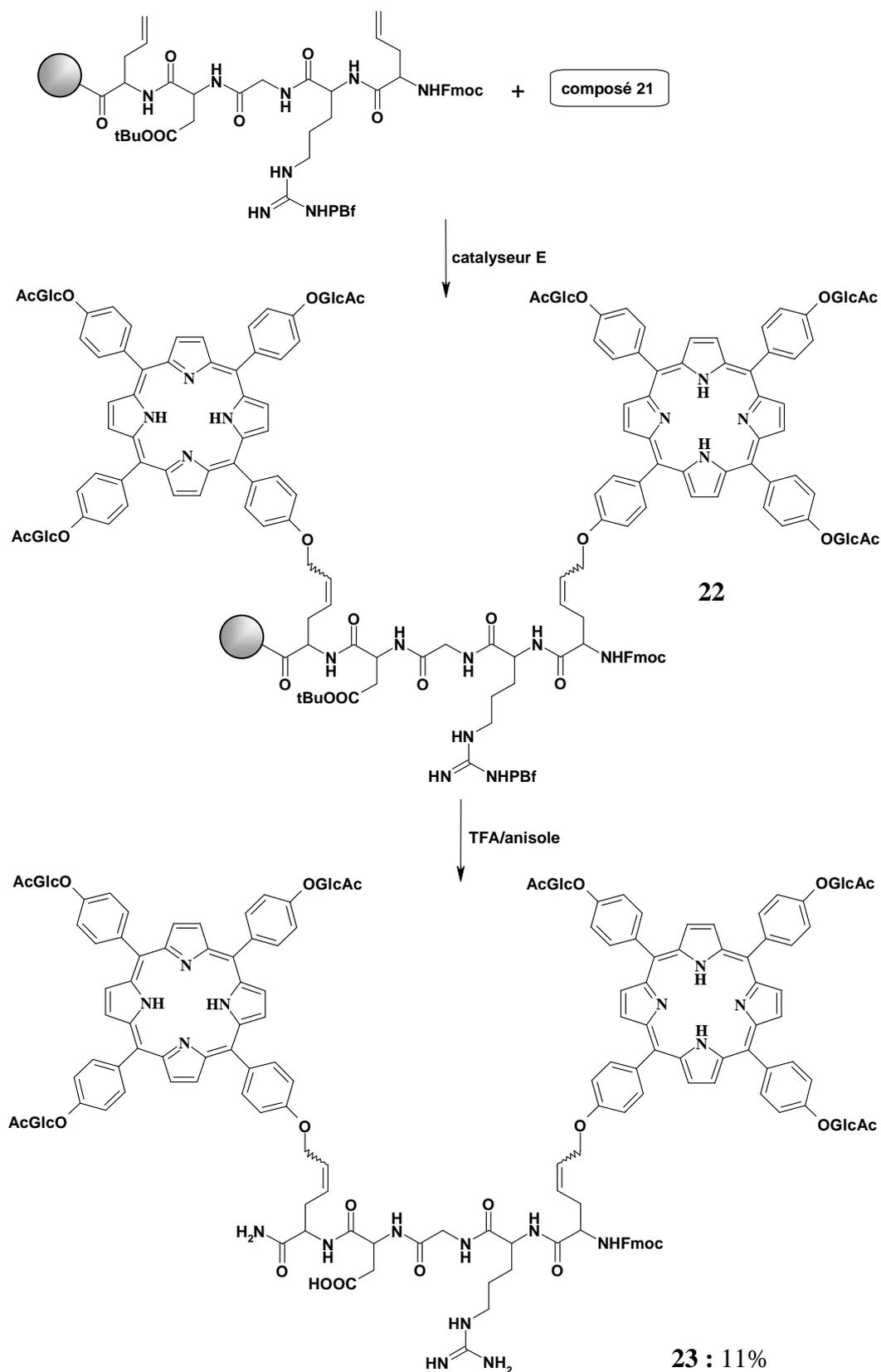


Figure IV-9 : Couplage du composé **21** et du pentapeptide allG-RGD-allG par métathèse.

Le composé **23** a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible, spectrométrie de masse MALDI et RMN du proton.

7- Caractérisation structurale

Les précurseurs glucosylés **20** et **21** ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI, par spectroscopie UV-Visible et par RMN du proton et du carbone 13. La structure du dimère **23** a quant à elle été caractérisée par spectrométrie de masse MALDI, spectroscopie UV-Visible et par RMN du proton. Cependant, la quantité de produit obtenu s'est révélée trop faible pour permettre une mesure fiable du spectre RMN du carbone 13.

7-1 Caractérisation des précurseurs

7-1-1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV-Visible des composés **20** et **21** ont été mesurés dans le chloroforme. Ils correspondent tous deux au type *étio* avec la bande de Soret proche de 420 nm et les quatre bandes Q situées vers 516, 552, 592 et 648 nm. Le spectre du dimère **21** est très similaire à celui du monomère **20** ce qui semble indiquer, conformément aux résultats de la littérature pour ce type de composés, qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux noyaux porphyriniques du composé **21**. Le spectre obtenu pour le dimère est présenté figure IV-10.

Tableau IV-3 : Bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des mésoporphyrines **20** et **21**.

Composé	Soret	Q _{IV}	Q _{III}	Q _{II}	Q _I
20	421 (341,5)	517 (13,8)	553 (8,6)	592 (4,4)	648 (4,2)
21	421 (718,2)	517 (28,1)	553 (17,4)	592 (9,3)	649 (9,2)

λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C

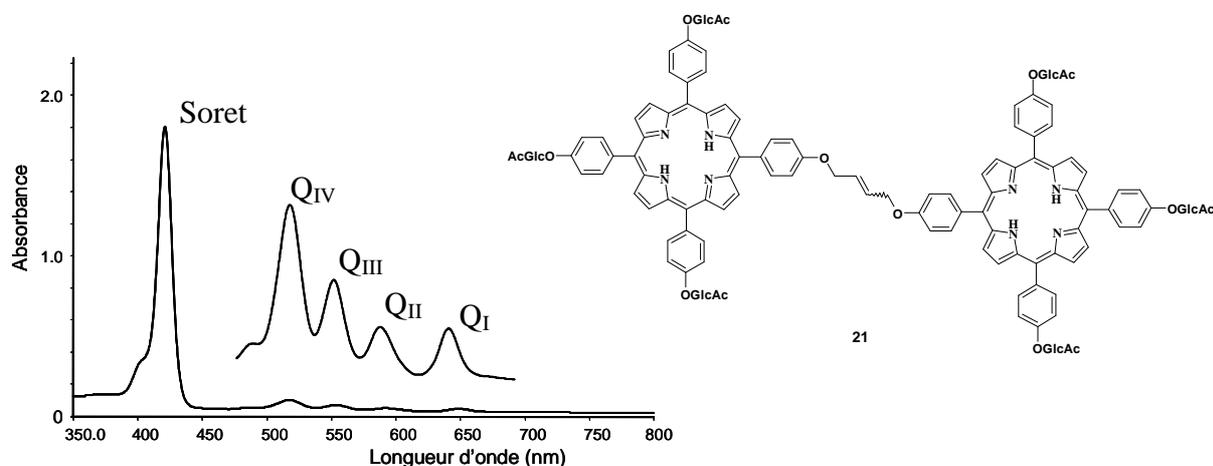


Figure IV-10 : Spectre UV-Visible du composé **21** (CHCl_3 , $C = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

7-1-2 Spectrométrie de masse MALDI

L'analyse structurale du monomère et du dimère de porphyrine triglucosylée a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse MALDI.

On observe pour les deux composés un seul pic correspondant à l'ion quasi-moléculaire attendu. Les résultats sont présentés dans le tableau IV-4 et le spectre du composé **21** est donné figure IV-11.

Tableau IV-4 : Spectrométrie de masse MALDI

<i>composés</i>	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
20	1708,53 (calculée pour C ₈₉ H ₈₈ O ₃₁ N ₄)	1709,61
21	3389,02 (calculée pour C ₈₉ H ₈₈ O ₃₁ N ₄)	3389,52

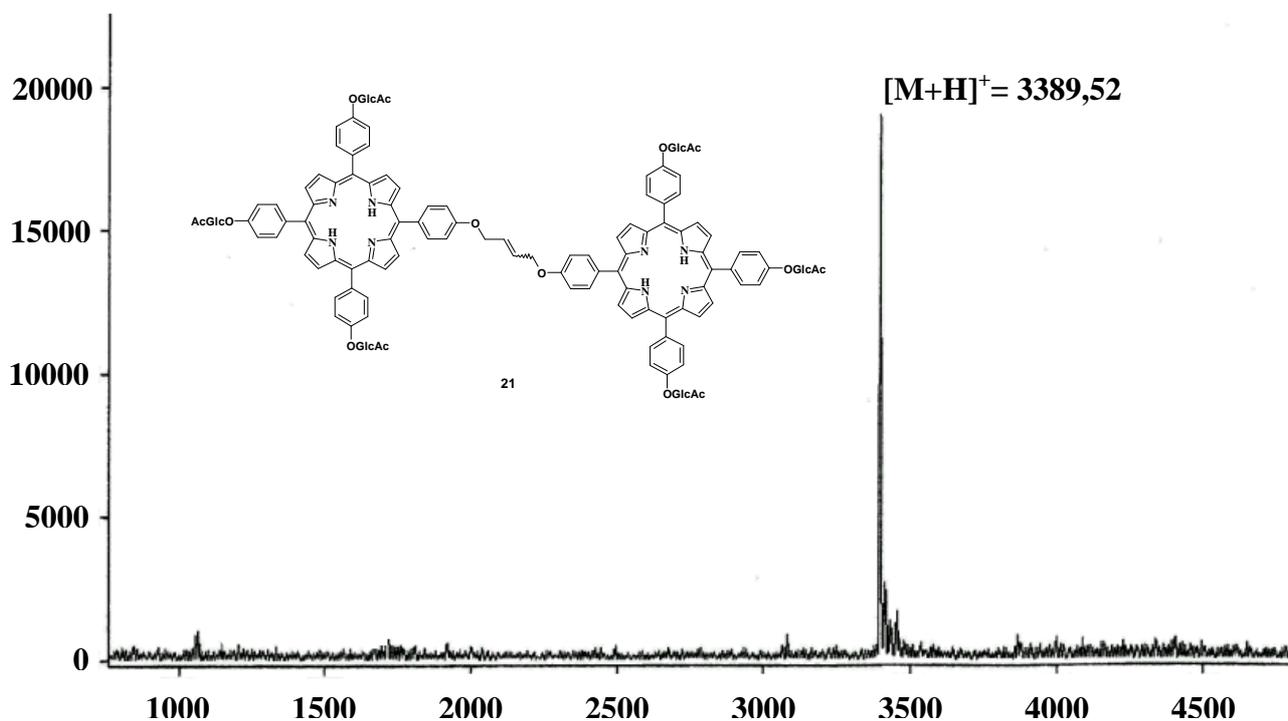


Figure IV-11 : Spectre de masse MALDI du composé **21**

7-1-3 Spectroscopie RMN

a- RMN du proton

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton du monomère **20** et du dimère **21** ont été réalisés dans le chloroforme deutérié. Les attributions des signaux, rassemblés dans le tableau IV-5 sont basées sur l'étude de la courbe d'intégration et sur les spectres 2D de corrélation homonucléaire $^1\text{H}-^1\text{H}$ (COSY).

D'une manière générale, le spectre du composé **20** (figure IV-13) présente une forte analogie avec celui de la *para*-hydroxyphényltrigluco-sylporphyrine **5a**. S'ajoutent aux signaux caractéristiques du macrocycle et des unités glucidiques les signaux correspondant au groupement allyle. En effet, le proton de la double liaison noté β sur la figure IV-12 résonne sous la forme d'un double-double-triplet à 6,27 ppm avec des constantes de couplage de 6,8 Hz, 10,2 Hz et 17, 2 Hz. Les deux protons notés α , équivalents, résonnent sous la forme d'un doublet élargi à 4,82 ppm. Enfin, les deux protons non équivalents du CH_2 terminal, noté γ_a et γ_b sur la figure IV-12 résonnent sous la forme d'un double doublet pour γ_b situé à 5,61 ppm et d'un multiplet pour γ_a , situé à 5,46 ppm. Ce dernier résonne à la même fréquence que les protons H_1 , H_2 et H_3 des unités glucidiques ce qui complique la figure.

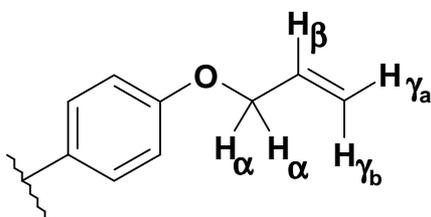


Figure IV-12 : Numérotation adoptée pour les protons du groupement allyle.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du dimère **21**, obtenu par réaction de métathèse, présente également de fortes similitudes avec celui du monomère **20**. Les protons β -pyrroliques résonnent sous la forme d'un singulet à 8,84 ppm et de deux doublets à 8,85 et 8,91 ppm. Toutefois, on note une perte d'équivalence des protons aromatiques $\text{H}_{2,6}$ et $\text{H}_{3,5}$ des groupements phényle portant les unités glucidiques. Ainsi, les protons $\text{H}_{2,6}$ résonnent sous la forme de deux doublets à 8,14 et 8,12 ppm intégrant chacun respectivement pour 4 protons et 8 protons et les protons $\text{H}_{3,5}$ résonnent quant à eux sous la forme de deux doublets à 7,39 et 7,37 ppm intégrant respectivement pour 4 et 8 protons. Le rapport des intégrations

des signaux confirme les attributions. En ce qui concerne les unités glucidiques, les signaux diffèrent peu de ceux du monomère **20** ; néanmoins, certains signaux sont dédoublés ce qui traduit une perte d'équivalence des protons osidiques. Ainsi, les protons H4' apparaissent cette fois ci sous la forme de deux triplets à 5,30 ppm et 5,33 ppm. Le massif correspondant aux protons H₁', H₂' et H₃' situé à 5,47 ppm est également plus complexe. Les protons des groupements acétyles donnent quant à eux six singulets à 2,22, 2,21, 2,12, 2,11, 2,10 et 2,09 ppm. La chaîne alkyle insaturée, symétrique, fournit seulement deux signaux, un triplet intégrant pour deux protons à 6,53 ppm et un singulet très élargi situé à 5,00 ppm intégrant pour quatre protons. Le fait de n'observer que deux signaux semble indiquer la présence d'un seul isomère. En outre, compte tenu de la symétrie de la molécule, les deux protons portés par la double liaison sont équivalents et donc non couplés entre eux. De ce fait il n'est pas possible, par l'examen du simple spectre proton de déterminer la nature de cet isomère.

Tableau IV-5 : RMN ^1H (CDCl_3) des porphyrines **20** et **21**, δ en ppm (J en Hertz).

H	20	21
<u>Pyrroles</u>		
2,8	8,88 d (4,5)	8,91 d (4,7)
3,7	8,83 d (4,5)	8,85 d (4,7)
12	8,86 s	8,84 s
13	8,86 s	8,84 s
17	8,86 s	8,84 s
18	8,86 s	8,84 s
NH	-2,78 s él.	-2,78 s él.
<u>Phényle</u>		
2,6	8,10 d (8,3)	8,16 d (8,5)
3,5	7,29 d (8,3)	7,37 d (8,5)
<u>Aryles-Oses</u>		
2,6	8,14 d (8,4)	8,14 d (8,4)-8,12 d (8,4)
3,5	7,38 d (8,4)	7,39 d (8,4)-7,37 d (8,4)
<u>O-allyl</u>		
α	4,82 d él (6,5)	-
β	6,27 ddd (17,2-10,2-6,8)	-
γ_a	5,46 m	-
γ_b	5,61 dd (17,2-1,3)	-
<u>Pont but-2-ène</u>		
<u>O-CH₂-CH=</u>	-	5,00 s él.
<u>-CH=CH-</u>	-	6,53 t (3,8)
<u>O-Glucosyles</u>		
1'	5,46 m	5,47 m
2'	5,46 m	5,47 m
3'	5,46 m	5,47 m
4'	5,31 t (9,4)	5,30 t (9,3)-5,32 t (9,4)
5'	4,06 ddd (9,6-5,1-2,3)	4,05 ddd (9,9-5,4-2,3)
6'a	4,42 dd (12,0-5,1)	4,42 m
6'b	4,30 d ap. (12,0)	4,30 dd (12,3-2,2)
<u>Acétyles</u>		
	2,10 s	2,09 s
	2,11 s	2,10 s
	2,12 s	2,11 s
	2,22 s	2,12 s
		2,21 s
		2,22 s

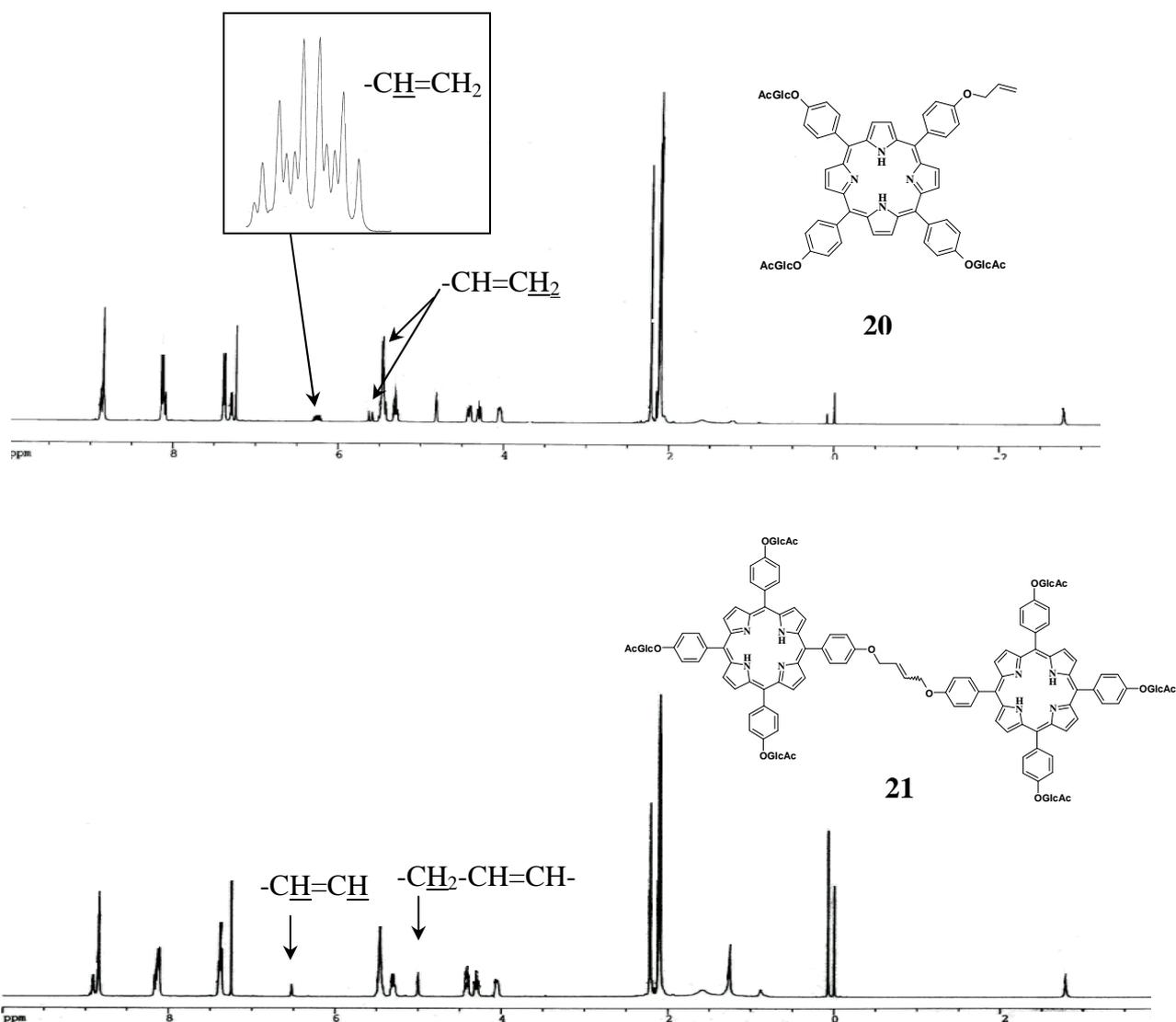


Figure IV-13: Spectres RMN ^1H des composés **20** et **21** (CDCl_3).

b- RMN du carbone 13

Nous avons poursuivi l'analyse structurale des précurseurs **20** et **21** par l'étude de leur spectres de RMN du carbone 13. Les résultats sont présentés dans le tableau IV-6. Pour interpréter ces spectres, nous nous sommes appuyés sur l'analyse du spectre de la monohydroxyphényltriglycosylporphyrine **5a**.

Le spectre obtenu pour le composé **20** est tout à fait semblable à celui de la porphyrine **5a**. Il comporte essentiellement dix groupes de signaux caractéristiques du macrocycle, des groupements phényle, des unités glucidiques ou encore du groupement allyle. Ce dernier se caractérise par trois signaux situés à 69,15 ppm, 118,03 ppm et 133,32 ppm attribués respectivement aux carbones notés α , β et γ sur la figure IV-14.

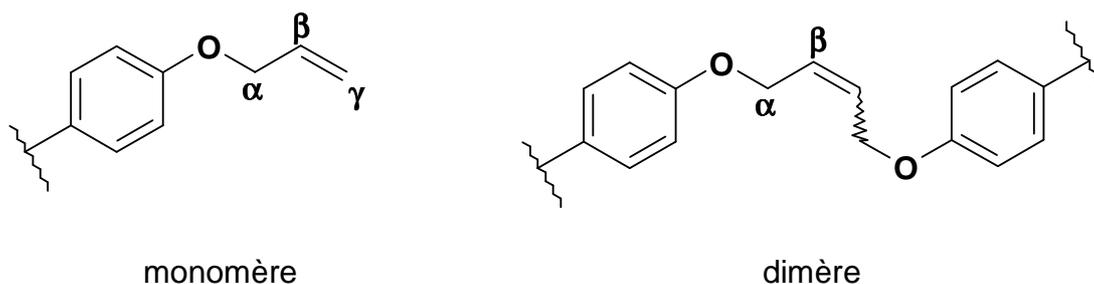


Figure IV-14 : Numérotation adoptée pour les carbones du groupement allyle du composé **20** et du pont but-2-ène du dimère **21**

En ce qui concerne le dimère **21**, très peu de changements sont observés. Le groupement but-2-ène situé entre les deux unités porphyriniques se caractérise par seulement deux pics ce qui est la conséquence d'une part de la symétrie de la molécule et d'autre part de la présence d'un seul isomère. Le carbone noté α résonne à 68,2 ppm et le carbone hybridé sp_2 β apparaît à 128,8 ppm. Il est connu qu'il est possible de distinguer les deux isomères *cis* et *trans* dans un mélange par l'examen des signaux des carbones situés en α de la double liaison. Cette analyse est bien sûr possible lorsque les deux isomères sont présents dans l'échantillon étudié. Dans notre cas le spectre de RMN du carbone 13 ne suffit pas pour conclure sans aucune ambiguïté sur la nature de l'isomère formé par réaction de métathèse. Néanmoins, on peut penser que l'absence de dédoublement des signaux relatifs aux protons des phényle ou encore des unités glucidiques suggère que les deux macrocycles tétrapyrroliques n'interagissent pas entre eux ce qui semble favorisé *a priori* par une configuration *trans* de la double liaison.

Nous avons confirmé cette hypothèse en réalisant l'étude des spectres de RMN du proton et du carbone 13 de l'isomère *trans* du dimère **21** obtenu par réaction de Williamson. Ces deux spectres sont en tous points parfaitement superposables aux spectres décrits précédemment. On observe par exemple un pic à 128,8 ppm pour le carbone en α de la double liaison, valeur identique à celle donnée pour le composé issu de la réaction de métathèse.

Cette comparaison confirme la nature exclusivement *trans* du dimère **21** obtenu par homodimérisation par métathèse croisée.

Tableau IV-5 : RMN ^{13}C (CDCl_3) des porphyrines **20** et **21**, δ en ppm.

^{13}C	20	21
Pyrroles		
α	146,0	146,5
β	131,1	131,0
Méso		
5	120,2	120,1
10	119,2	119,3
15	119,1	119,3
20	119,2	119,3
Phényle		
1	134,5	134,7
2,6	135,5	135,5
3,5	113,0	113,0
4	158,5	158,6
Aryles-oses		
1	137,2	137,2
2,6	135,5	135,7
3,5	115,1	115,1
4	156,6	156,6
O-allyl		
α	69,15	-
β	133,3	-
γ	115,0	-
Pont but-2-ène		
α	-	68,2
β	-	128,8
O-Glucosides		
1'	99,1	99,2
2'	71,4*	71,3*
3'	72,9	72,8
4'	68,4	68,4
5'	72,3*	72,3*
6'	62,1	62,1
Acétyles		
	20,8	20,82
	20,7	20,78
	170,6	20,68
	170,3	20,64
	169,5	170,6
		170,3
		169,5

* : valeurs interchangeables dans une même colonne

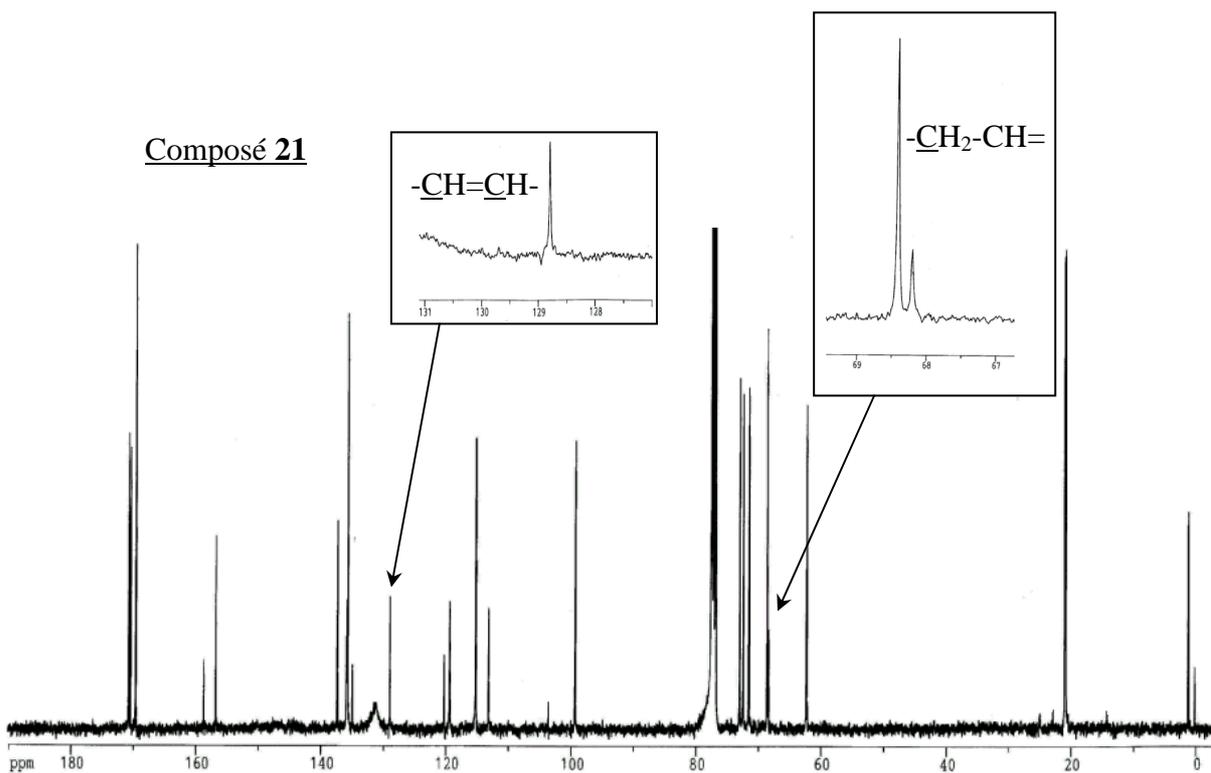
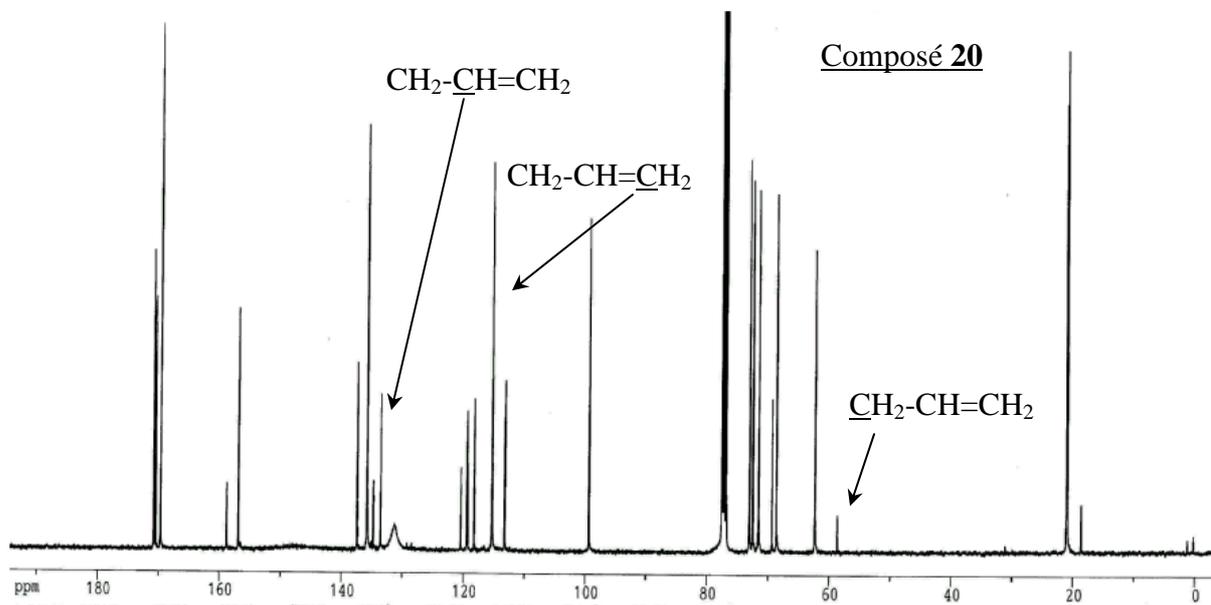


Figure IV-15 : Spectres RMN ¹³C des composés 20 et 21 (CDCl₃).

7-2 Caractérisation du dimère à motif RGD.

La structure du dimère **23** a été caractérisée par spectrométrie de masse MALDI, spectroscopie UV-Visible et par RMN du proton.

7-2-1 Spectroscopie UV-Visible.

Le spectre UV-Visible du composé **23** présenté figure IV-16, a été mesuré dans un mélange de chloroforme et de méthanol (90/10). Son profil est de type *étio*. Les coefficients d'absorption ϵ calculés sont donnés dans le tableau IV-6.

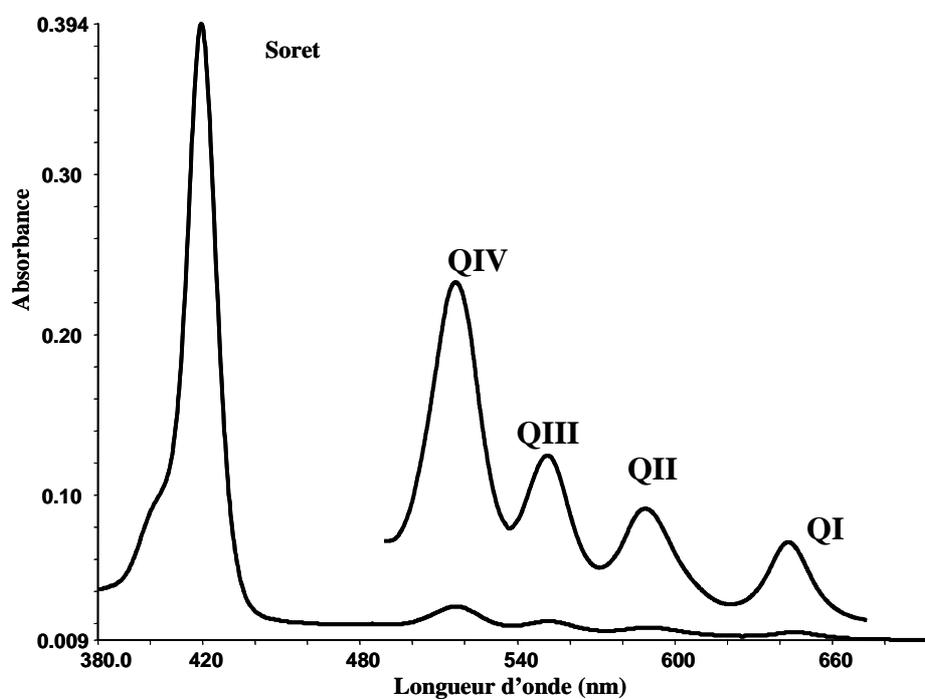


Figure IV-16 : Spectre UV-Visible du composé **23** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1, $C = 0,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

Tableau IV-6 : Bandes caractéristiques du spectre UV-Visible du composé **23**.

Composé	Soret	QIV	QIII	QII	QI
21	420 (686,2)	516 (27,2)	553 (15,1)	592 (10,4)	649 (8,7)

Les valeurs obtenues pour les coefficients d'absorption, environ deux fois supérieures à la valeur classiquement attendue pour un monomère de porphyrine, confirment la présence de deux macrocycles porphyriniques sur la molécule **23**. En outre, l'allure de la bande de Soret, fine et dont le maximum d'absorption est situé à 420 nm, semble indiquer que les deux macrocycles n'interagissent pas entre eux et donc qu'ils occupent des régions de l'espace bien différentes^[146].

7-2-2 Spectrométrie de masse MALDI.

L'analyse structurale du dimère **23** a été poursuivie par la mesure de son spectre de masse MALDI. Celui-ci met en évidence le pic quasi moléculaire $[M+H]^+$ situé à $m/z = 4126,99$ (valeur calculée pour $C_{210}H_{231}N_{17}O_{71}$: $m/z = 4126,49$).

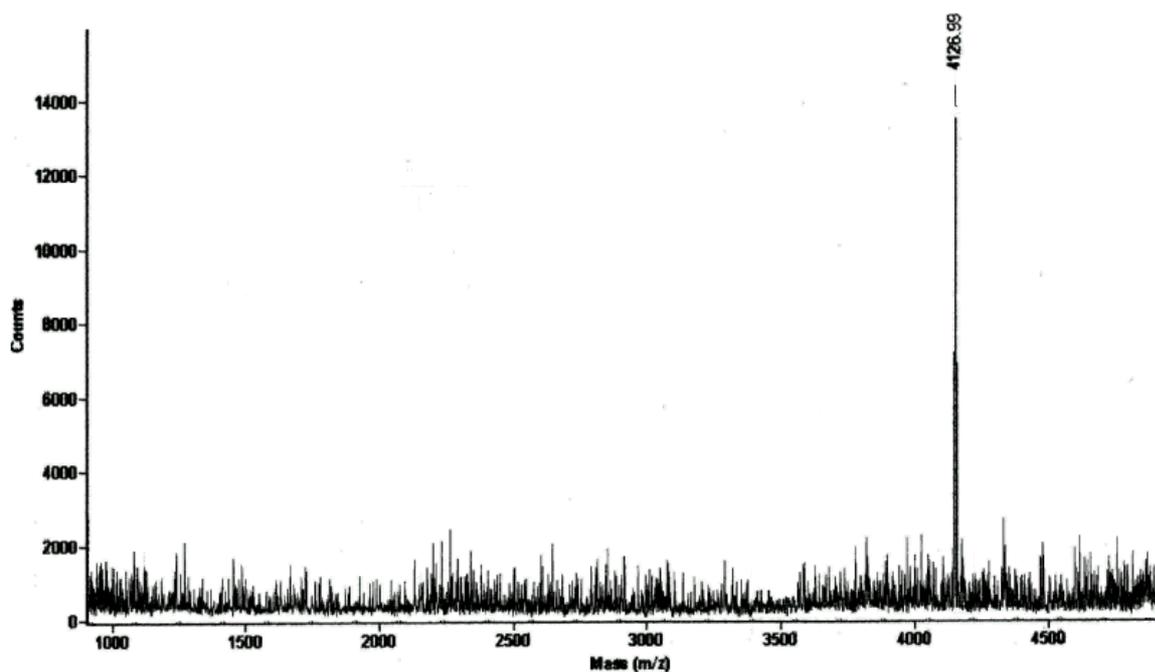


Figure IV-17: Spectre de masse MALDI du composé **23**

7-2-3 Spectroscopie RMN 1H

Le spectre RMN 1H du dimère **23**, présenté figure IV-19 a été enregistré dans un mélange de chloroforme et de méthanol deutériés (9/1). Compte tenu de la faible quantité de produit disponible, il nous a fallu augmenter le temps d'acquisition (environ deux heures) ce qui engendre une légère déformation des pics qui s'ajoute à l'élargissement des signaux

couramment observés pour les porphyrines portant des substituants déprotégés (totalement ou partiellement). Dans ces conditions, l'attribution des signaux, basée sur l'étude de la courbe d'intégration et sur le spectre de corrélation 2D proton-proton, est délicate. Ainsi, certaines valeurs reportées dans le tableau IV-7 et identifiées par une étoile sont interchangeables. Toutefois, la courbe d'intégration est en accord avec le nombre de protons du composé **23** et de plus, l'intégration des protons aromatiques du groupement Fmoc comparée à l'intégration des protons aromatiques des phényle portés par les macrocycles confirme bien la présence de deux groupements porphyrinyles sur la molécule. La numérotation adoptée pour la description du spectre est présentée figure IV-18 (les macrocycles porphyriniques ont été décrits avec la même numérotation que précédemment).

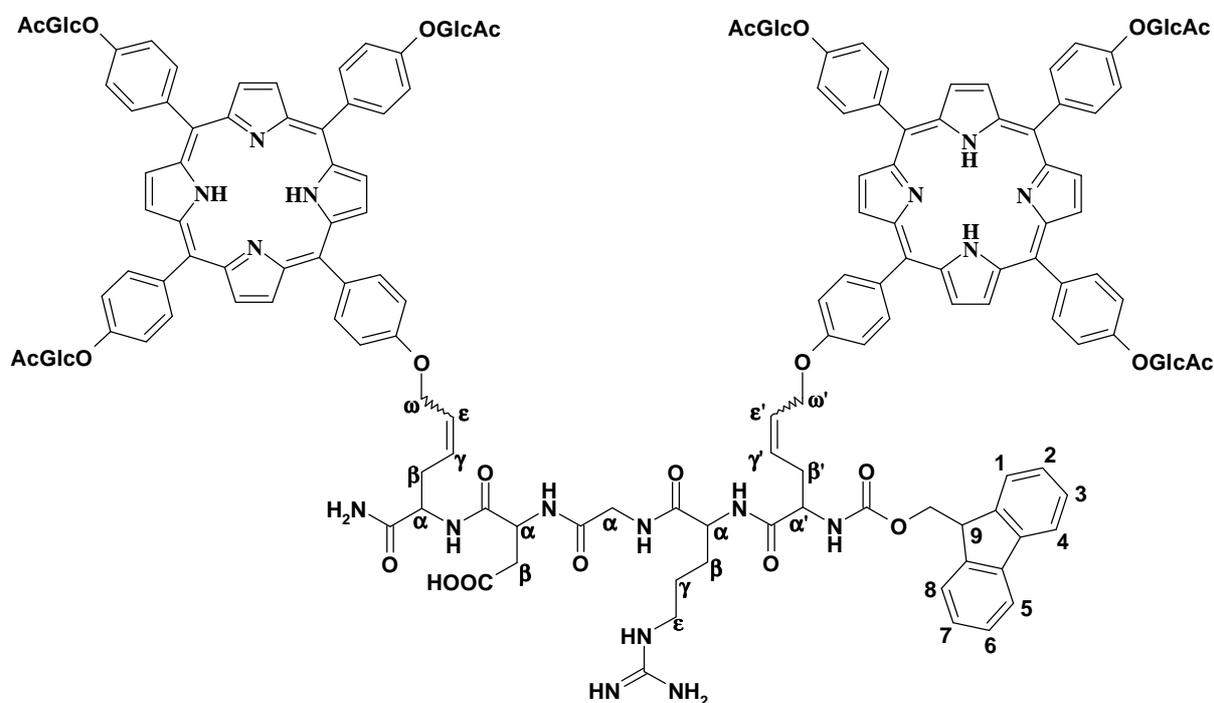


Figure IV-18: Numérotation adoptée pour le composé **23**.

Tableau IV-7 : Spectre RMN ¹H du composé 23 (CDCl₃/CD₃OD 9/1)

H	Composé 23	H(suite)	Composé 23
Pyrroles		Arginine	
2,8	8,96 m	α	4,15 m
3,7	8,87 m	β	1,80 m
12, 13, 17, 18	8,83 s él.	γ	1,55 m
NH	-	ε	3,55 m
Phényle		Glycine	
2,6	8,06 d él. (8,0)	α	4,22 d él. (5,0)
3,5	7,24 d él. (8,0)	A. Aspartique	
Aryles-Oses		α	4,45 m
2,6	8,12 d (8,0) - 8,12 d (8,0)	β	2,57 m
3,5	7,38 d (8,0) - 7,39 d (8,0)	allGlycine (carboxamide)	
O-Glucosyles		α	4,41 m
1'	5,47 d (7,0)	β	2,48 m**
2'	5,48 t (7,0)*	γ	6,09 m***
3'	5,48 t (7,0)*	ε	5,71 m****
4'	5,30 m	ω	4,73 m*****
5'	4,02 m		
6'a	4,40 dd (12,1-5,6)		
6'b	4,29 dd (12,1-2,0)		
acétyles	2,01-2,03-2,4-2,05- 2,06-2,09-2,10-2,11		
allGlycine(NHFmoc)			
α'	4,30 m*		
β'	2,48 m**		
γ'	6,10 m***		
ε'	5,70 m****		
ω'	4,73 m*****		
CH ₂ (Fmoc)	4,30 m*		
9	4,21 t él. (5,80)		
1, 8	7,71 d (7,6)		
2, 7	7,05 m		
3, 6	7,05 m		
4, 5	7,55 d (7,2)		

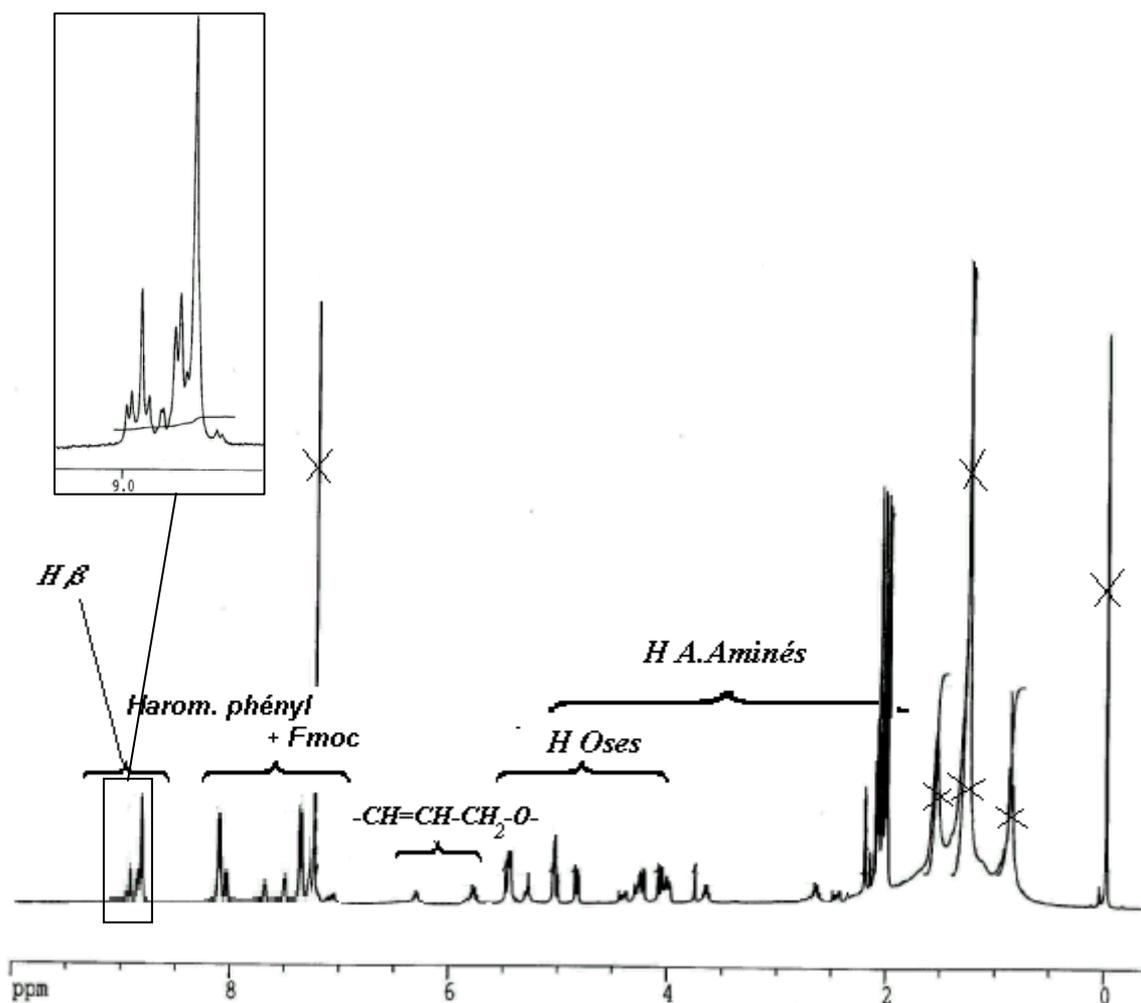
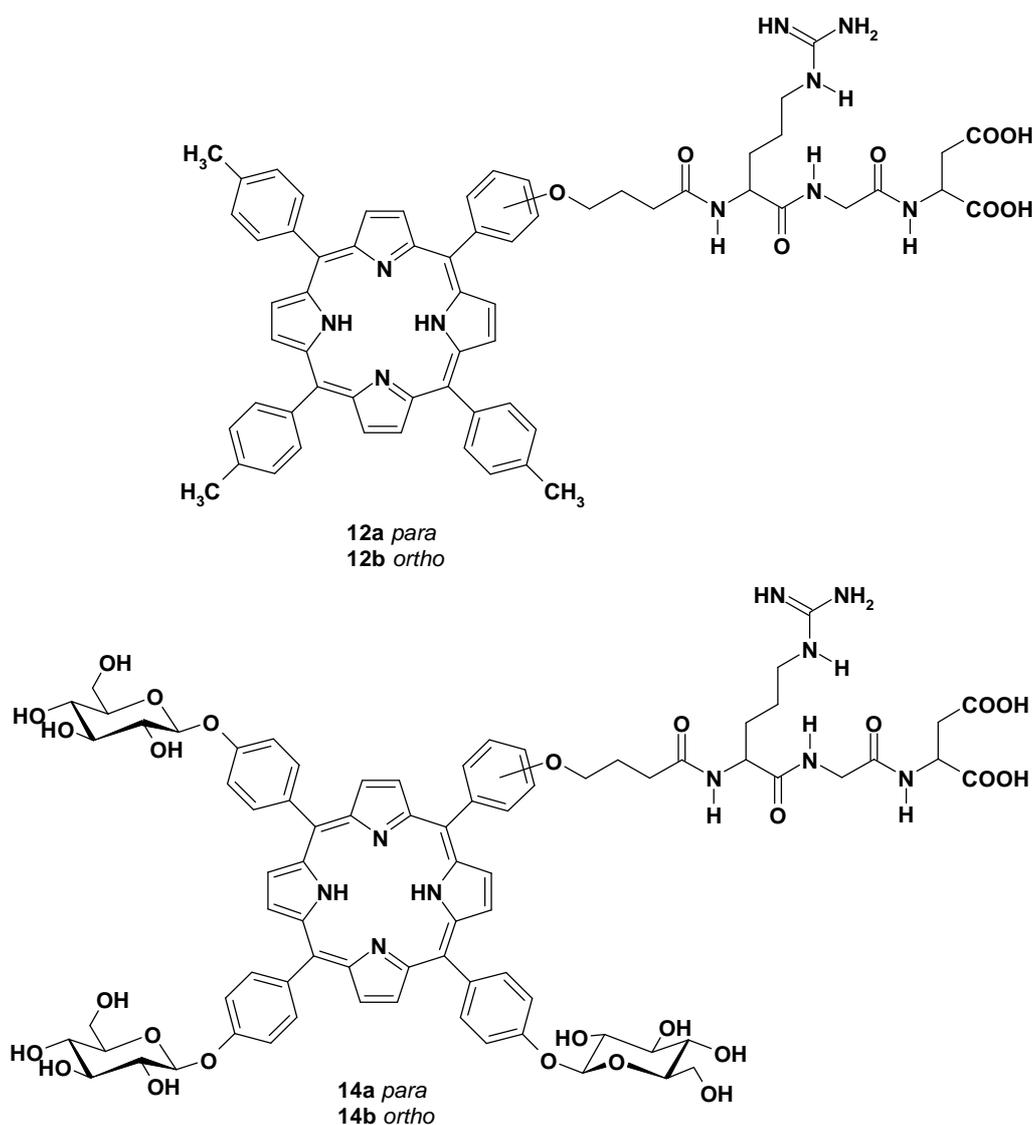


Figure IV-19: Spectre RMN ^1H du composé 23 ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 9/1).

On observe également un dédoublement des signaux correspondant aux protons aromatiques des phényle liés aux deux macrocycles. La figure correspondant aux protons β -pyrroliques est également plus complexe que celles rencontrées jusqu'alors. Ce comportement est vraisemblablement la conséquence d'une perte d'équivalence des deux macrocycles. En outre, on constate que les protons aromatiques du Fmoc sont légèrement blindés par rapport aux valeurs classiquement rencontrées ce qui indique que ce groupement subit l'influence magnétique d'une des porphyrines située dans son environnement.

EVALUATION BIOLOGIQUE

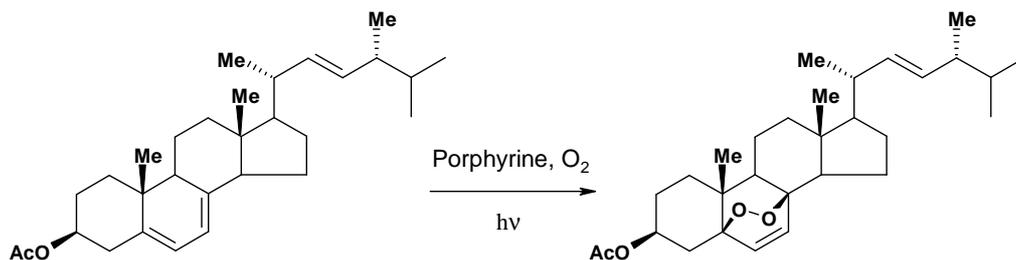
Nous avons effectué une étude préliminaire d'activité biologique pour les composés **12a,b** et **14a,b** dont les structures sont rappelées sur la figure suivante.



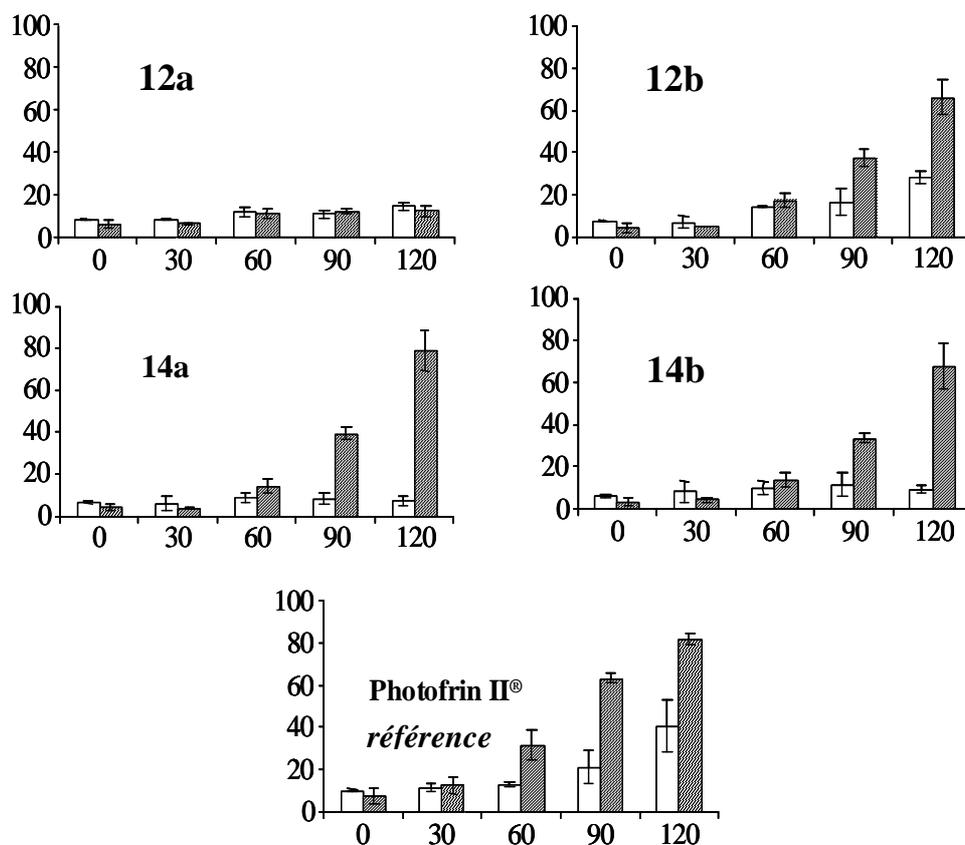
Structures des composés dont l'activité biologique a été étudiée.

Nous avons tout d'abord évalué l'aptitude de ces composés à produire de l'oxygène singulet selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Ce test consiste à contrôler par CCM la formation d'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol à partir d'acétate d'ergostérol en présence de porphyrine, sous bullage d'air comprimé et sous irradiation lumineuse^[147]. Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'hématoporphyrine (Hp) qui est un inducteur

d'oxygène singlet connu. Ces tests mettent en évidence qualitativement, pour tous les composés étudiés, la production d'oxygène singlet.



Nous avons par la suite cherché à déterminer la phototoxicité de ces mêmes composés sur la lignée cellulaire leucémique promyélocytaire K562 selon la procédure décrite dans la partie expérimentale. La figure suivante présente, pour les quatre porphyrines testées, la quantité de cellules mortes, déterminée par cytométrie en flux, juste après irradiation (rectangles vides) et après de 24 heures d'incubation à l'obscurité à 37°C après irradiation (rectangles hachurés). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec le Photofrin® à la même concentration pondérale.



Pourcentage d'incorporation de l'iodure de propidium en fonction du temps d'irradiation (rectangles vides : cellules mortes juste après irradiation ; rectangles hachurés : après 24 heures d'incubation dans le noir après irradiation).

Le composé **12a**, tritolylporphyrine portant le motif RGD en position *para* du groupement phényle, ne présente aucune phototoxicité. Cette absence d'activité dans les conditions de l'expérience peut-être attribuée à la trop faible solubilité de ce composé. Pour les trois autres porphyrines testées, on observe qu'elle induisent une mortalité cellulaire significative. Les résultats obtenus pour le composé **12b** sont qualitativement similaires à ceux du Photofrin II[®]. En effet, dans les deux cas, la mortalité cellulaire résulte d'une part d'une mort immédiate, observée juste après irradiation et qui peut être attribuée à un processus de nécrose et d'autre part d'une mort retardée, observée au bout de 24 heures d'incubation à l'obscurité après irradiation et qui peut être attribuée à un processus d'apoptose associé à de la nécrose.

Le taux de mortalité induit par les deux porphyrines glucosylées **14a** et **14b** après 120 minutes d'irradiation est comparable à celui induit par le Photofrin II[®] ; néanmoins ces deux photosensibilisateurs semblent avoir un mode d'action différent de celui du témoin. En effet, nous n'avons pas observé de mortalité immédiatement après irradiation mais seulement après 24 heures d'incubation à l'obscurité ce qui semble indiquer que les deux composés **14a** et **14b** induisent une mort cellulaire suivant un processus essentiellement apoptotique. Dans le but de vérifier cette hypothèse, une étude complémentaire est actuellement en cours au sein de notre laboratoire. Ainsi, nous avons entrepris une série de tests permettant la détection des phases précoces de l'apoptose par technique de cytométrie de flux utilisant l'annexine V, marqueur de choix pour mesurer la perte d'asymétrie de la membrane plasmique ; cette perte d'asymétrie fait partie des étapes précoces de l'apoptose^[148]. Nous cherchons également à mettre en évidence l'apoptose par mesure du potentiel membranaire mitochondrial en utilisant la technique du marquage au DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxycarbocyanine). Nous envisageons enfin d'observer par microscopie confocale la localisation des porphyrines dans les cellules cancéreuses traitées afin d'identifier les sites d'action spécifiques de ces photosensibilisateurs^[149]. En outre, l'ensemble de ces tests biologiques sera appliqué à toutes les molécules finales synthétisées au cours de ce travail.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé pour la première fois une série de *méso*arylporphyrines glucosylées peptidiques pour lesquelles les unités peptidiques à motif RGD sont reliées au macrocycle par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Ces composés ont été obtenus par condensation en phase solide de carboxyporphyrines sur, d'une part, la séquence d'acide aminé arginine-glycine-acide aspartique greffée sur résine Wang, et d'autre part, sur un pentapeptide à motif RGD préalablement cyclisé par réaction de métathèse des alcènes sur résine rink-amide-MBHA. Nous avons en outre fait varier la position des unités peptidiques sur le macrocycle afin d'obtenir un éventail plus large de photosensibilisateurs. La réaction de métathèse des alcènes a également été appliquée à la synthèse d'un dimère de glucosylporphyrines liées par la séquence RGD. Ces nouvelles structures ont été caractérisées par spectrométrie de masse, spectroscopie UV-Visible et RMN. Les spectres UV des composés solubles dans l'eau ont révélé l'aptitude de ces molécules à former des agrégats en solution.

Les premiers essais d'activité biologique d'une partie de ces porphyrines réalisés sur une lignée cellulaire K562 ont montré leur activité anticancéreuse *in vitro*, qui est pour les composés glucosylés comparable à celle du Photofrin[®].

Nous envisageons par la suite tout d'abord de réaliser l'étude de l'activité biologique des autres porphyrines glucosylées peptidiques synthétisées, puis de compléter cette série de tests par l'étude des interactions intégrine $\alpha_v\beta_3$ / porphyrines à motif RGD complétée d'une évaluation *in vivo*. Le dimère **23**, synthétisé en plus grande quantité, sera également désacétylé de façon à étudier ses propriétés en tant que photosensibilisateur pour la PDT. Enfin, la synthèse de chlorines, bactériochlorines et phthalocyanines à motif RGD est également envisagée.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés au cours de ce travail et leur traitements éventuels sont présentés dans le tableau V-1. Toutes les puretés ont été testées avec les procédures classiques (point de fusion, traces d'eau mesurées par IR...).

Tableau V-1 : réactifs et solvants utilisés

Réactifs et solvants	Origines
Acétate d'éthyle	SDS
Acétone	FISHER
Acétonitrile	ACROS
Acide acétique	LABOSI
Acide 4-bromobutanoïque 98%	ACROS
Acide bromhydrique à 33% (conservé à 4°C)	ALDRICH
Acide chlorhydrique à 35%	LABOSI
Acide orthophosphorique 85%	VWR
Acide propanoïque 99%	ACROS
Acide sulfurique concentré 98%	FISHER
Acide trifluoroacétique 99%	ACROS
4-Allyloxybenzaldéhyde (conservé à 4°C, sous argon) 97%	LANCASTER
Anisole 99%	ACROS
BF ₃ -éthérate (conservé à 4°C)	ALDRICH
4-bromobutanoate d'éthyle 95%	ALDRICH
Carbonate de potassium (séché 24 heures à l'étuve à 100°C)	ALDRICH
Chlorure d'acide 4-bromobutanoïque 95%	ALDRICH
Chloroforme 99,9%	SDS
1,4-dibromobutène 97%	ACROS
Dichlorométhane 99,8% (distillé sur P ₂ O ₅ et CaH ₂)	SDS
Diisopropylcarbodiimide 99%	ACROS
Diméthylformamide	SDS
Diméthylsulfoxyde	Riedel-deHaën
Ethanol	FISHER
Ethanol absolu	FISHER
Ether de pétrole	SDS
Ether diisopropylique 99%	ACROS

2-hydroxybenzaldéhyde (distillé sous vide sur CaH ₂)	ALDRICH
4-hydroxybenzaldéhyde 99%	ACROS
1-hydroxybenzotriazole (H ₂ O<5%)	ALDRICH
Hydroxyde de sodium	ACROS
Méthanol	FISHER
Méthanolate de sodium 0,5M (conservé à 4°C)	ACROS
<i>Para</i> -chloranile	ACROS
<i>Para</i> -tolualdéhyde (distillé sous vide sur CaH ₂) 97%	ALDRICH
Pyrrrole (distillé sous vide sur CaH ₂)	ALDRICH
Tertiobutanol 99,5%	ALDRICH
Tétrahydrofurane 99,9	ACROS
Toluène	SDS
Triéthylamine	ALDRICH
Catalyseur de Grubbs A (conservé sous argon à 4°C)	STREM CHEMICALS
Catalyseur de Grubbs D (conservé sous argon à 4°C)	STREM CHEMICALS
1,2,3,4,6-pentaacétyl- α -D-Glucopyranose 98%	ALDRICH

2 - Chromatographie

2-1 Chromatographie Analytique

2-1-1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des plaques de silice Kieselgel 60F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur (provenance : Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale. Pour les CCM phase inverse, les plaques RP-18 F_{254s} (Merck) ont été utilisées. La révélation des plaques se fait :

- ✓ Par observation directe dans le cas des composés colorés,
- ✓ Par vaporisation d'une solution à 1% d'orcinol sulfurique dans l'acide sulfurique à 20% suivie d'un chauffage à 100°C dans le cas des glucides,
- ✓ Par vaporisation d'une solution de fluorescéine dans le méthanol/eau (1/1) puis d'une solution aqueuse d'eau oxygénée à 30% dans l'acide acétique suivie d'un chauffage à 100°C dans le cas de produits bromés,
- ✓ Par observation sous une lampe UV pour les produits aromatiques.

2-1-2 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les analyses par chromatographie liquide haute performance ont été réalisées à l'aide d'une chaîne HPLC constituée d'une pompe isocratique LDC/Milton Roy constametric III,

d'une colonne SUPELCOSIL™ LC-18 (L = 25 mm ; D.int.= 4,6 mm), d'un détecteur spectrophotométrique UV-Visible Shimadzu SPD-6A et d'un système d'acquisition Shimadzu C-R4A. Chaque échantillon est injecté par l'intermédiaire d'une boucle de 10 µL. Pour chaque analyse, le solvant est préalablement dégazé sous vide et par ultrasons.

2-2 Chromatographie Préparative.

2-2-1 Chromatographie préparative sur plaques de silice

Les plaques de silice sont préparées par dépôt d'une couche uniforme de silice de 2 mm d'épaisseur (Kieselgel 60F254 Merck) sur des plaques de verre (20 cm x 20 cm) que l'on active, après séchage, à 100°C durant 2 heures.

2-2-2 Chromatographie sur colonne

Pour les séparations par chromatographie phase normale, nous avons utilisé de la silice 60 ACC, 20-40 µm provenant de SDS. Dans tous les cas, les colonnes sont équilibrées dans le système d'élution. La quantité de support utilisée est calculée afin que le produit à chromatographier n'excède pas 1 à 2% en masse du système. Tous les composés à purifier sont dissous dans un minimum d'éluant puis ils sont introduits en tête de colonne. L'élution est accélérée par une légère surpression d'air comprimé. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur désiré.

2-2-3 Chromatographie sur colonne moyenne pression

L'ensemble des purifications par chromatographie en phase inverse a été réalisé sur colonne moyenne pression. Pour cela, nous avons utilisé un système de chromatographie BUCHİ comprenant une pompe B688 moyenne pression pilotée par un formeur de gradient binaire B687 et associée à une colonne BUCHİ de dimension (H 23 cm x φ1,5 cm) ou (H 23 cm x φ1,5 cm) selon les quantités à purifier. La sortie de la colonne est connectée à un collecteur de fractions. La phase stationnaire utilisée est du Lichroprep® RP18 (5-20 µm) (Merck). Dans tous les cas, les solvants sont préalablement dégazés sous vide.

2-2-4 Chromatographie d'exclusion stérique

Tous les composés finals décrits dans ce travail ont été également purifiés par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique avec comme support le séphadex LH20 (Pharmacia).

1- Analyses

Température de fusion

Les températures de fusion T_f sont mesurées en tube capillaire sur un appareil de Thomas Hoover et ne sont pas corrigées.

Pouvoirs rotatoires

Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D$ sont mesurés au polarimètre Jasco (DIP-370) pour la raie D du sodium et dans une cuve de 10 cm de longueur. Ces mesures sont effectuées à 22°C en solution dans le chloroforme.

Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été effectuées au service de microanalyse de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Spectroscopie infra-rouge

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 1310 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

Spectroscopie UltraViolet-Visible

Les spectres sont réalisés sur un spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25 piloté par le logiciel UVWinlab. Ils sont effectués dans des cellules en quartz de 0,1 ou 1 cm de trajet optique à des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-6} mol.L^{-1} . Pour des concentrations inférieures, nous avons utilisé une cuve de 5 cm de trajet optique. Les longueurs d'onde correspondant aux absorbances maximales λ_{max} sont exprimées en nanomètre (nm) et les coefficients d'absorption en $\text{mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$.

Spectroscopie RMN

Les spectres sont réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont quant à elles données en Hertz (Hz). Les abréviations retenues sont : s (singulet), s él. (singulet élargi), d (doublet), d él. (doublet élargi), dd (double doublet), t

(triplet), t él. (triplet élargi), dt (double triplet), ddd (double double doublet), ddt (double double triplet), quad (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet).

Spectrométrie de masse MALDI

Les spectres de masse MALDI ont été effectués au laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'Université de Paris VI par les docteurs Jean-Claude Blais et Gérard Bolbach avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite.

Spectrométrie de masse Haute Résolution.

Les spectres de masse Haute Résolution ont été réalisés sur un appareil ZABSpec. TOF de Micromass possédant une géométrie EBE TOF au Centre Régional de Mesure Physique de l'Ouest (CRMPO) de l'Université de Rennes.

Spectrométrie de masse par impact électronique (IE)

Les spectres de masse par impact électronique sont réalisés sur un appareil Shimadzu QP1000 au Laboratoire Départemental D'Analyse de la Haute Vienne.

Réacteur utilisé pour les synthèses sur support solide.

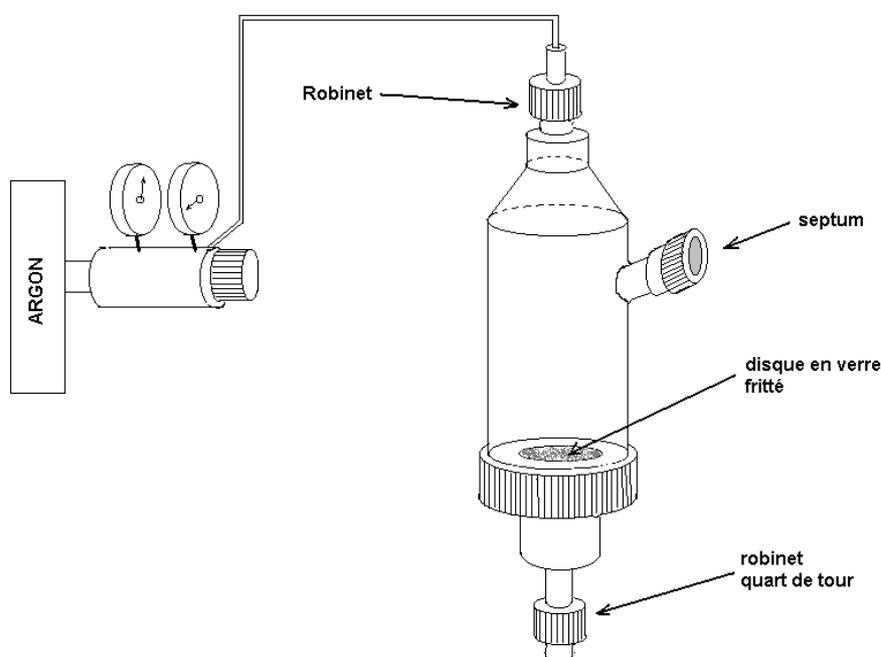


Figure V-1 : Schéma du réacteur Système 45[®] utilisé pour les synthèses sur support solide

Le réacteur utilisé pour les synthèses sur support solide est constitué d'une enceinte en verre passivé de 20 mL munie à sa base d'un disque en verre fritté associé à un robinet quart de tour. Le réacteur comporte également une ouverture latérale équipée d'un septum permettant l'introduction de réactifs. En outre, une troisième ouverture située à l'extrémité supérieure permet de contrôler l'atmosphère régnant à l'intérieur du dispositif. Il est à noter que les réactions nécessitant de chauffer à reflux du solvant sont réalisées avec un montage classique.

Appareillage pour la production d'oxygène singulet

Le système est constitué d'un bain thermostaté à 20°C dans lequel est inséré un tube à hémolyse contenant l'échantillon étudié à une concentration d'environ 10^{-5} M. L'ensemble est maintenu sous bullage d'air comprimé et sous un éclairage fourni par 2 lampes de 100W.

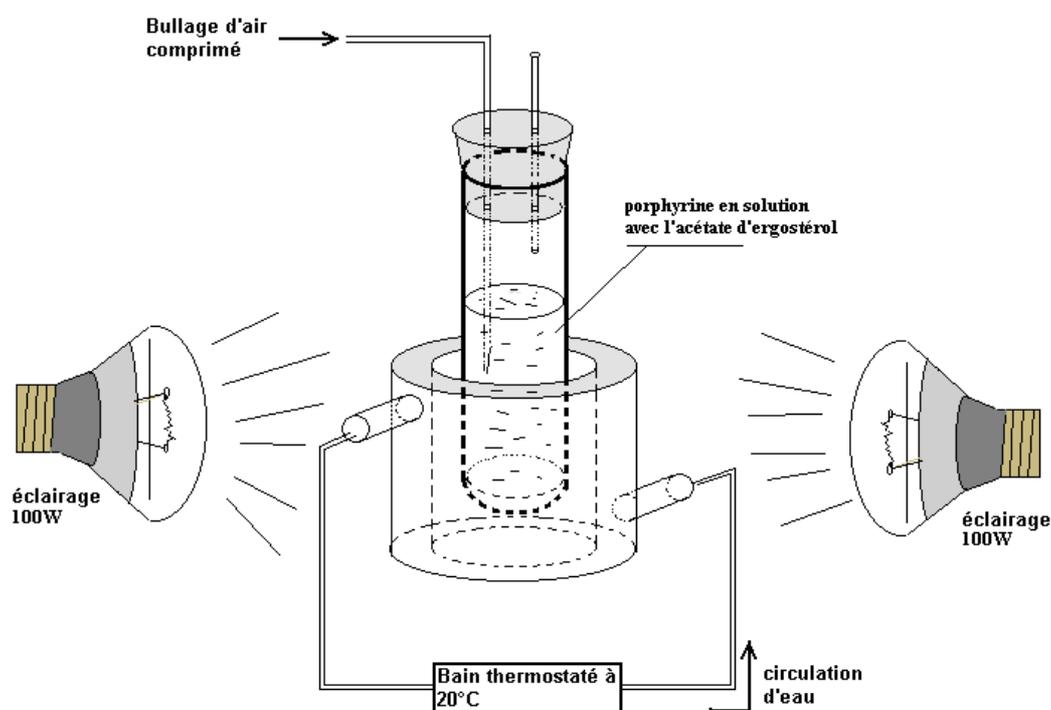


Figure V-2 : Schéma du montage mis au point pour la production d'oxygène singulet

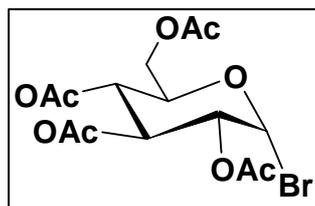
Les résultats des tests de production d'oxygène singulet réalisés sur certaines de nos porphyrines sont qualitativement comparés par CCM à ceux obtenus pour l'hématoporphyrine qui est un inducteur connu d'oxygène singulet. Au cours de ces essais, l'acétate d'ergostérol est utilisé comme accepteur d'oxygène singulet afin de former l'endoperoxide d'acétate d'ergostérol. L'analyse des produits formés met en évidence, après quinze minutes d'irradiation, la présence de l'endoperoxide et donc la formation d'oxygène singulet pour toutes les porphyrines testées.

Protocole établi pour l'étude de la phototoxicité des composés **12a,b** **14a,b**.

Les cellules K562 en phase de croissance exponentielle sont mises en suspension ($5 \cdot 10^5$ cellules/mL⁻¹) dans un milieu de culture RPMI 1640 à 37°C. Les porphyrines **12a,b** (solubilisées dans le DMSO) et **14a,b** (solubilisées dans l'eau) sont ajoutées de façon à obtenir une concentration en photosensibilisateur de $2 \cdot 10^{-6}$ M. Le Photofrin[®] est utilisé comme témoin à la concentration pondérale de 1,25 mg.mL⁻¹ ce qui correspond à une concentration de $2 \cdot 10^{-6}$ M si on considère la masse molaire de l'hématoporphyrine (M= 600 g.mol⁻¹). Les cellules en suspension sont ensuite irradiées avec une source de lumière fluorescente (flux 10mW.cm⁻²) pendant 30, 60, 90 et 120 minutes. Les cellules mortes sont perméables à l'iodure de propidium et il est alors possible de mesurer leur taux de mortalité par cytométrie en flux.

4- Synthèses

1-bromo-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucofuranose (1)



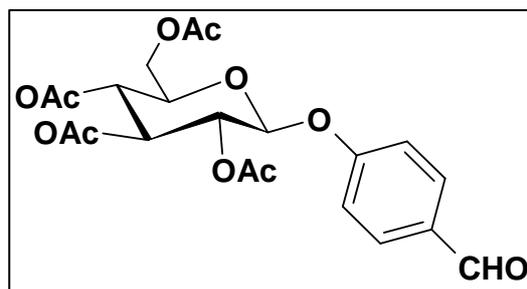
Le glucose *peracétylé* (15g, 38,4 mmol) est dissous dans 20 mL d'une solution à 33% d'HBr dans l'acide acétique à 4°C. La réaction est laissée sous agitation pendant 4 heures puis le mélange réactionnel est mis au réfrigérateur pendant 12 heures. L'excès d'acide bromhydrique est chassé à 0°C par barbotage d'argon suivi d'une extraction par le dichlorométhane (50 mL) et l'eau bidistillée (100 mL), puis une neutralisation rapide avec une solution saturée de NaHCO₃ glacée (2x10 mL). Après lavage de la phase organique à l'eau distillée (2x100 mL), séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation du solvant, le produit brut est recristallisé deux fois dans 25 mL d'éther diisopropylique. On isole alors 12,9 g (Rdt 82%) de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucofuranose.

Rf : 0,6 (acétate d'éthyle / éther de pétrole 2/1)

T_F = 88°C (litt.^[98] T_F = 88-89°C)

[α]_D = +196° (C=2, CHCl₃)

4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyloxy)benzaldéhyde (2)



Par réaction de 15 g de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-O-acétyl- α -D-glucopyranose (36,4 mmol, 1 équ.) avec 13,2 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (108,7 mmol, 3 équ.), en présence de 30 mL d'acétone et de 20 mL de NaOH à 7%, on obtient après 24 heures une solution à laquelle on ajoute 400 mL d'eau glacée. Après une heure d'agitation, le précipité formé est récupéré par filtration. Il est alors recristallisé dans le mélange méthanol/eau (1/1). On obtient ainsi 6,6 g (rdt 40%) du composé **2**.

R_f : 0,31 (acétate d'éthyle/éther de pétrole 1/1)

T_F = 144°C (litt.^[97] T_F=144-145°C)

[α]_D = -33,5° (C=0,5, CHCl₃)

Analyse élémentaire pour C₂₁H₂₄O₁₁ (452,40 g.mol⁻¹)

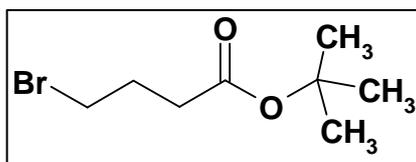
Calculée C = 55,75 H = 5,31

Trouvée C = 55,61 H = 5,38

SM (IE) m/z = 452 (M)⁺, 121(M-GlcAc)⁺

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm, 9,90 (s, 1H, CHO), 7,85 (d, J=8,5, 2H, H3-5 Ar), 7,10 (d, J=8,5, 2H, H2-6 Ar), 5,20-5,40 (m, 4H, H1', H2', H3' et H4' ose), 3,90 (ddd, J=10,0-5,6-2,6, 1H, H5' ose), 4,15 (dd, J=12,0-5,6, 1H, H6'a ose), 4,27 (dd, J=12,0-2,6, 1H, H6'b ose), 2,06 (s, 3H, CH₃CO), 2,05 (s, 6H, CH₃CO), 2,03 (s, 3H, CH₃CO).

4-bromobutanoate de tertiobutyle (**3**)



Dans un ballon de 100 mL, on ajoute 0,55 mL (10 mmol, 1 éq.) d'acide sulfurique concentré à une suspension, agitée vigoureusement, de sulfate de magnésium anhydre (4,81 g, 10 mmol, 1 éq.) dans 40 mL de dichlorométhane fraîchement distillé. Après 15 minutes d'agitation, l'acide 4-bromobutanoïque (1,66 g, 10 mmol, 1 éq.) et le tertiobutanol (4,78 mL, 50 mmol, 5 éq.) sont ajoutés. Le ballon est alors fermé hermétiquement puis le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante et sous argon. Après 48 heures de réaction, le contenu du ballon est versé dans 75 mL d'une solution saturée glacée de bicarbonate de sodium puis agité jusqu'à dissolution complète du sulfate de magnésium. La phase organique est alors séparée puis lavée successivement avec 25 mL de solution saturée de bicarbonate de sodium puis avec de l'eau (3x50 mL). Elle est ensuite séchée sur sulfate de magnésium puis le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite. Après purification par chromatographie sur colonne de silice (15x2,5 cm) en éluant avec du chloroforme, le composé **3**, liquide de couleur jaune très pâle, est obtenu avec un rendement de 60% (1,33 g).

Rf : 0,65 (CHCl₃)

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2973, 2927, 1727 (C=O), 1364, 1156, 842

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 1.45 (s, 9H, CH₃), 2.13 (quint, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, H _{β} -CH₂-), 2.40 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, H _{γ} -CH₂-C=O), 3.45 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, H _{α} -Br-CH₂-).

RMN ¹³C : (100 MHz, CDCl₃, 25°C) : 29,0, 29,3, 31,3, 33,6, 80,1, 172,4

Procédure générale de synthèse des *méso*-monohydroxyphénylporphyrines

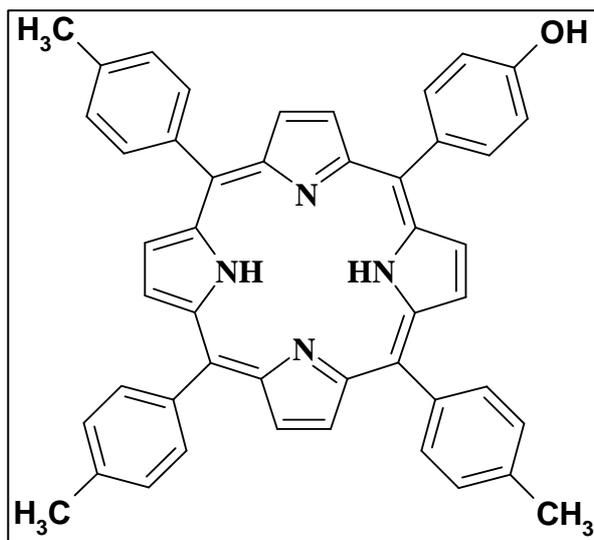
Méthode A :

Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on dissout, selon les conditions stœchiométriques retenues, dans de l'acide propanoïque, le 2 ou 4-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.) et le *para*-tolualdéhyde (3 éq.) dans le cas des tritolylporphyrines, ou l'aldéhyde glucosylé **2** (3 éq.) pour les porphyrines glucosylées. Le mélange est alors porté à 140°C puis maintenu sous agitation à cette température pendant 45 minutes. Le pyrrole (4 éq.) fraîchement distillé est ensuite introduit goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant 90 minutes à l'abri de la lumière. Les tritolylporphyrines précipitent dans le milieu réactionnel après 18 heures à 4°C. Après filtration et lavage à l'éthanol, ces composés sont purifiés par chromatographie sur colonne de silice. Dans le cas des glucosylporphyrines, le mélange est refroidi, puis le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice et sur plaques préparatives de silice.

Méthode B :

Dans un tricol muni d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium on dissout le pyrrole (4 éq.), le 2 ou 4-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.) et l'aldéhyde glucosylé **2** (3 éq.) dans du dichlorométhane sous courant d'argon. Ce mélange est ainsi agité pendant une heure à température ambiante puis 0,01 éq de BF₃OEt₂ est ajouté au milieu. La réaction est poursuivie pendant 18 heures sous agitation. Le *para*-chloranile (0,75 éq. par pyrrole) est alors ajouté au mélange et l'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice puis sur plaques préparatives de silice.

5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)porphyrine (4a)



Méthode A :

La réaction de 3,4 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (28 mmol, 1 éq.) avec 10,1 mL de para-tolualdéhyde (85 mmol, 3 éq.) et 8,0 mL de pyrrole (114 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl_3 /éther de pétrole 8/2 à 10/0), le composé **4a** avec un rendement de 6% (1,12 g).

Rf : 0,33 (CH_2Cl_2).

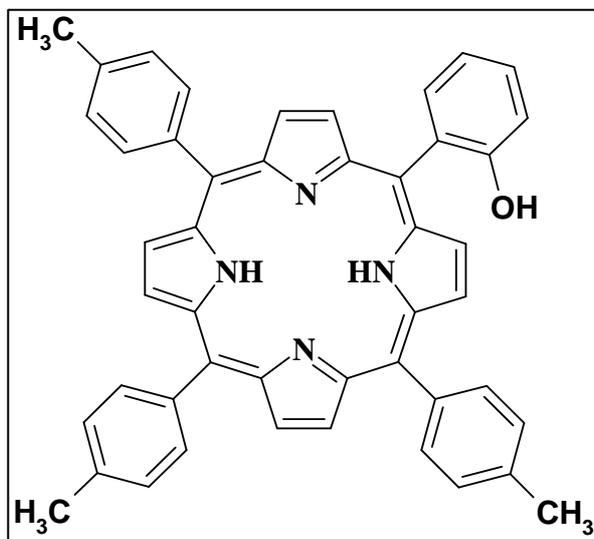
UV-Visible (tableau II-2).

RMN ^1H (tableau II-4).

SM (MALDI) (tableau II-3).

Les données physiques de ce composé sont conformes à celles de la littérature ^[150].

5-(2-hydroxyphényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)porphyrine (4b)



Méthode A :

La réaction de 3 mL de 2-hydroxybenzaldéhyde (28 mmol, 1 éq.) avec 10,1 mL de *para*-tolualdéhyde (85 mmol, 3 éq.) et 8,0 mL de pyrrole (114 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éther de pétrole 7/3 à 10/0), le composé **4b** avec un rendement de 4% (752 mg).

R_f : 0,70 (CH₂Cl₂)

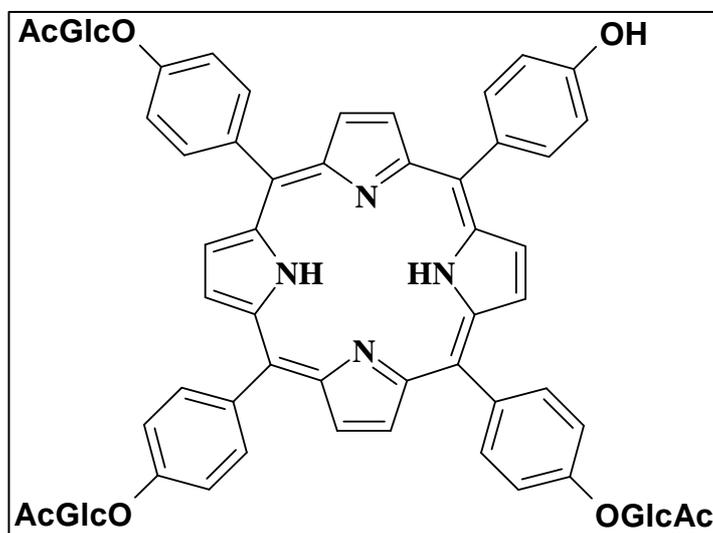
UV-Visible (tableau II-2)

RMN 1H (tableau II-5)

SM (MALDI) (tableau II-3)

Les données physiques de ce composé sont conformes à celles de la littérature ^[150].

5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)-phényl]porphyrine (5a)



Méthode A :

La réaction de 200 mg de 4-hydroxybenzaldéhyde (1,64 mmol, 1 éq.) avec 2,2 g de glucosylbenzaldéhyde **2** (4,92 mmol, 3 éq.) et 0,454 mL de pyrrole (6,56 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol 100/0 à 98/2) puis purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol 95/5), le composé **5a** avec un rendement de 6,5% (176 mg).

Méthode B :

En suivant la procédure générale et en utilisant les mêmes quantités de réactifs que dans la méthode A, on isole 325 mg du composé **5a** (rdt 12%).

Rf : 0,43 (CHCl₃/EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-2)

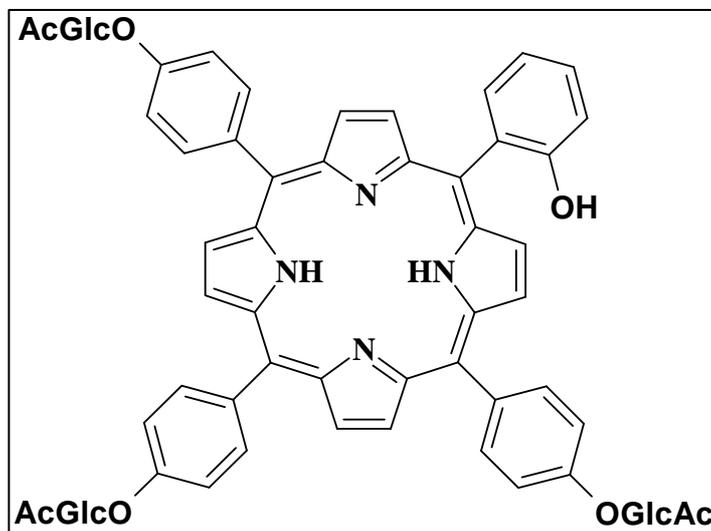
RMN ¹H (tableau II-6)

RMN ¹³C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

Les données physiques de ce composé sont conformes à celles de la littérature ^[97b].

5-(2-hydroxyphényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)-phényl]porphyrine (5b)



Méthode A :

La réaction de 214 μl de 2-hydroxybenzaldéhyde (2 mmol, 1 éq.) avec 2,8 g de glucosylbenzaldéhyde **2** (6 mmol, 3 éq.) et 0,58 mL de pyrrole (8 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl_3 /éthanol 100/0 à 99/1) et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl_3 /éthanol 95/5), le composé **5b** avec un rendement de 4% (133 mg).

Méthode B :

En suivant la procédure générale et en utilisant les mêmes quantités de réactifs que dans la méthode A, on isole 266 mg du composé **5b** (rdt 8%).

Rf : 0,49 (CHCl_3 /EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-2)

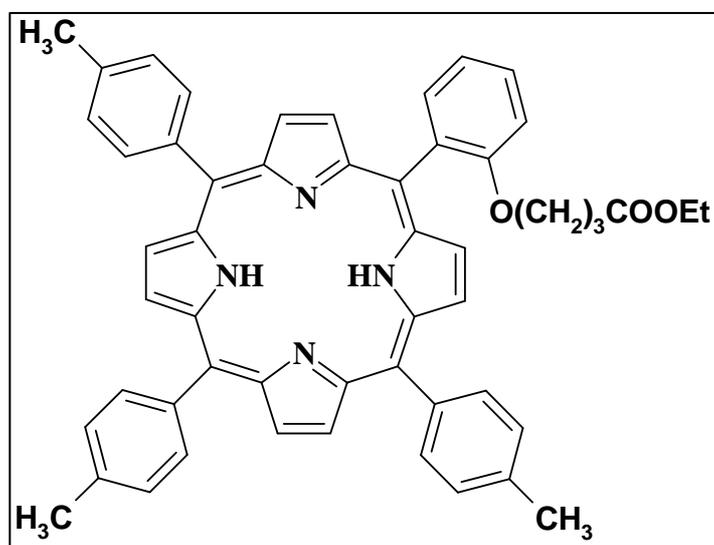
RMN ^1H (tableau II-7)

RMN ^{13}C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

Les données physiques de ce composé sont conformes à celles de la littérature ^[97b].

5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)porphyrine (6b)



La réaction de 150 mg d'*ortho*-hydroxyphényltritolyldiporphyrine **4b** (0,22 mmol, 1 éq.) avec 0,16 mL de 4-bromobutanoate d'éthyle (1,1 mmol, 5 éq.) dans 8 mL de DMF anhydre en présence de 615 mg de carbonate de potassium (4,4 mmol, 20 éq.) comme décrit précédemment mène, après traitement et purification par chromatographie sur plaques préparatives (éluant CHCl₃), à 85% de composé **6b** (158 mg).

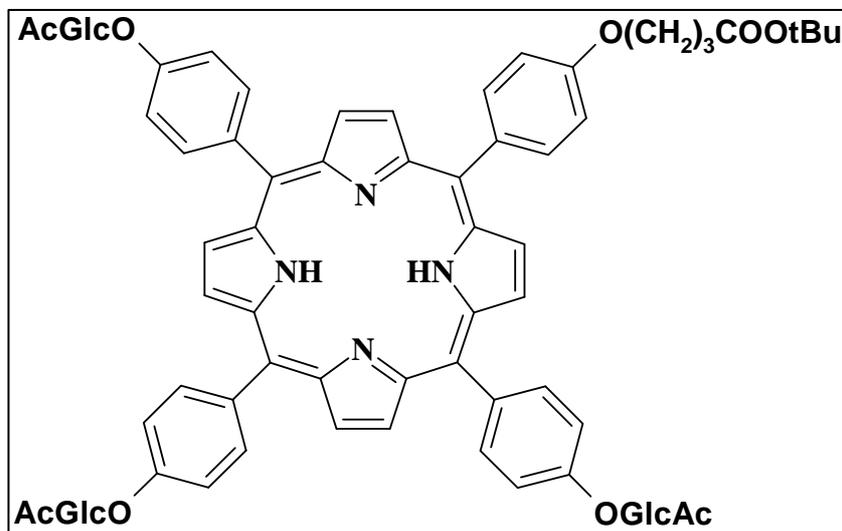
R_f : 0,66 (CHCl₃)

UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-5)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(4-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (7a)



La réaction de 100 mg d'*ortho*-hydroxyphényltrigluco-sylporphyrine **5b** (0,06 mmol, 1 éq.) avec 66 mg de composé **3** (0,3 mmol, 5 éq.) dans 6 mL de DMF anhydre en présence de 165 mg de carbonate de potassium (1,2 mmol, 20 éq.) comme décrit précédemment mène, après traitement et purification par chromatographie sur plaques préparatives (éluant CHCl₃/EtOH 95/5), à 85% de composé **7a** (92 mg).

Rf : 0,48 (CHCl₃/EtOH 95/5)

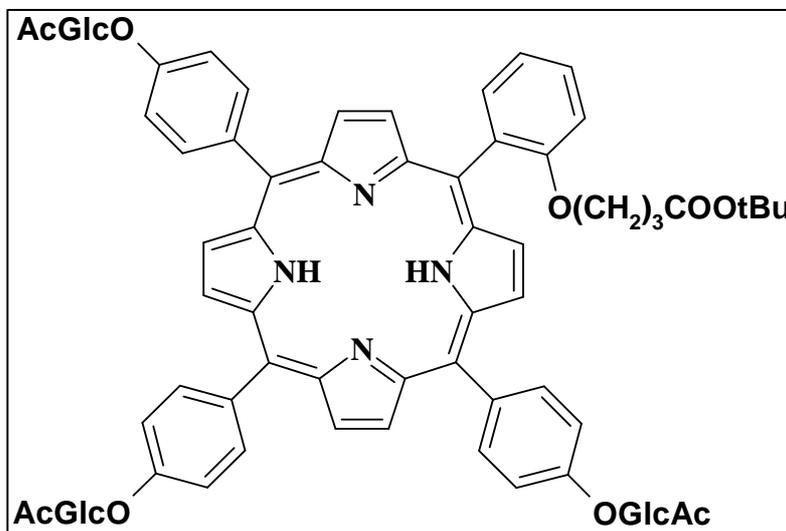
UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-6)

RMN ¹³C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(2-[3-terbutoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (7b)



La réaction de 100 mg d'*ortho*-hydroxyphényltriglucosylporphyrine **5b** (0,06 mmol, 1 éq.) avec 66 mg de composé **3** (0,3 mmol, 5 éq.) dans 6 mL de DMF anhydre en présence de 165 mg de carbonate de potassium (1,2 mmol, 20 éq.) comme décrit précédemment mène, après traitement et purification par chromatographie sur plaques préparatives (éluant CHCl₃/EtOH 95/5), à 82% de composé **7b** (88 mg).

Rf : 0,52 (CHCl₃/EtOH 95/5)

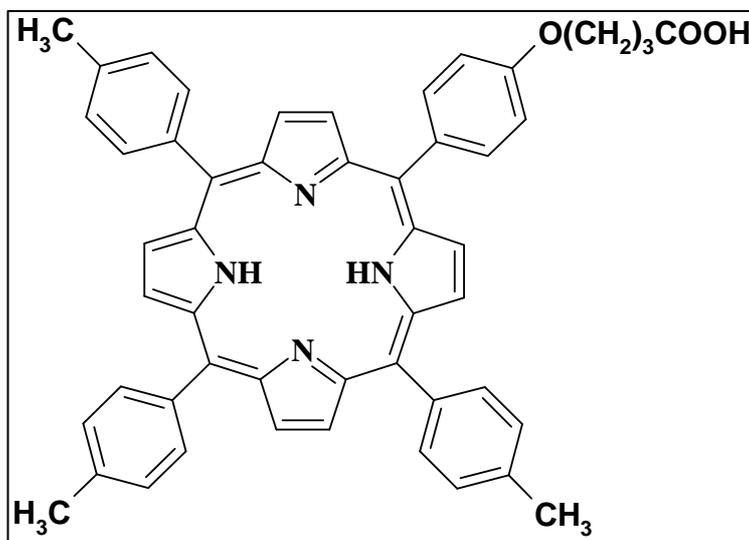
UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-7)

RMN ¹³C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(4-[3-carboxypropyloxy]phényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)porphyrine (8a)



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, 150 mg de composé **6a** sont dissous dans 8 mL de DMF puis 2 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Le mélange est agité pendant deux heures à reflux. Après refroidissement, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est neutralisée par addition d'une solution aqueuse de HCl à 1 mol.L⁻¹ et lavée avec de l'eau (2 x 50 mL). Après séchage sur MgSO₄, et purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 90/10), le composé **8a** est isolé avec un rendement de 98% (141 mg).

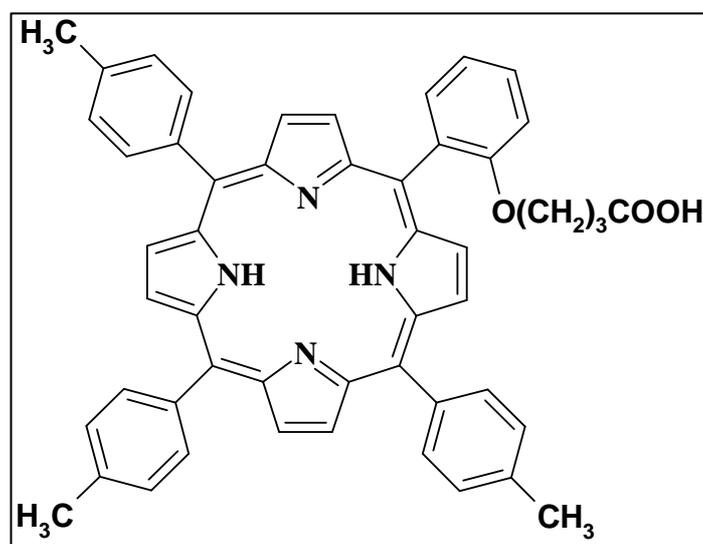
Rf : 0,53 (CHCl₃/EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-4)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(2-[3-carboxypropyloxy]phényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)porphyrine (8b)



La réaction de 150 mg de composé **6b**, dissous dans 8 mL de DMF, avec 2 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹ dans les conditions décrites précédemment, fournit après purification, 139 mg de composé **8b** (rdt 97%).

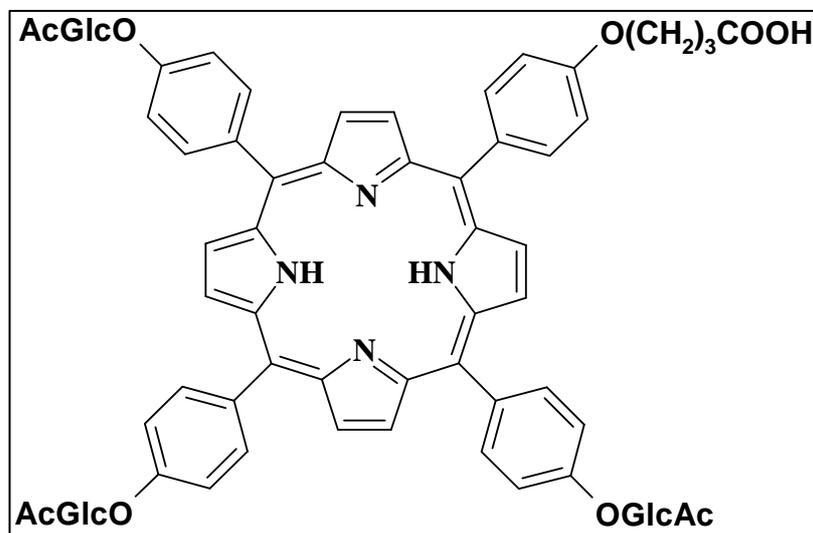
Rf : 0,49 (CHCl₃/EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-5)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(4-[3-carboxypropyloxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (9a)



Dans un bicol, 120 mg de porphyrine ester **7a** (0,06 mmol 1 éq.) sont dissous dans 8mL de dichlorométhane puis 2 mL d'acide trifluoroacétiques sont ajoutés. Après 2 heures de réaction à température ambiante et sous agitation, on ajoute 30 mL de dichlorométhane puis la phase organique est neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Après un lavage à l'eau (50mL) puis séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est alors purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol 100/0 à 90/10). Le composé **9a** est obtenu avec un rendement de 95% (110 mg).

Rf : 0,54 (CHCl₃/EtOH 90/10)

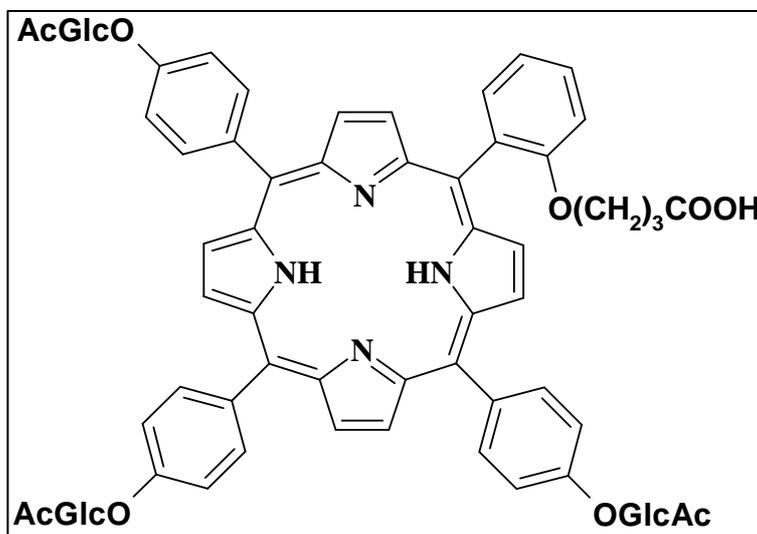
UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-6)

RMN ¹³C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

5-(2-[3-carboxypropyloxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (9b)



La réaction de 130 mg de composé **7b** (0,07 mmol 1 éq.), dissous dans 8 mL de dichlorométhane, avec 2 mL d'acide trifluoroacétique dans les conditions décrites précédemment, fournit après purification, 119 mg de composé **9b** (rdt 95%).

R_f : 0,57 (CHCl₃/EtOH 90/10)

UV-Visible (tableau II-2)

RMN ¹H (tableau II-7)

RMN ¹³C (tableau II-8)

SM (MALDI) (tableau II-3)

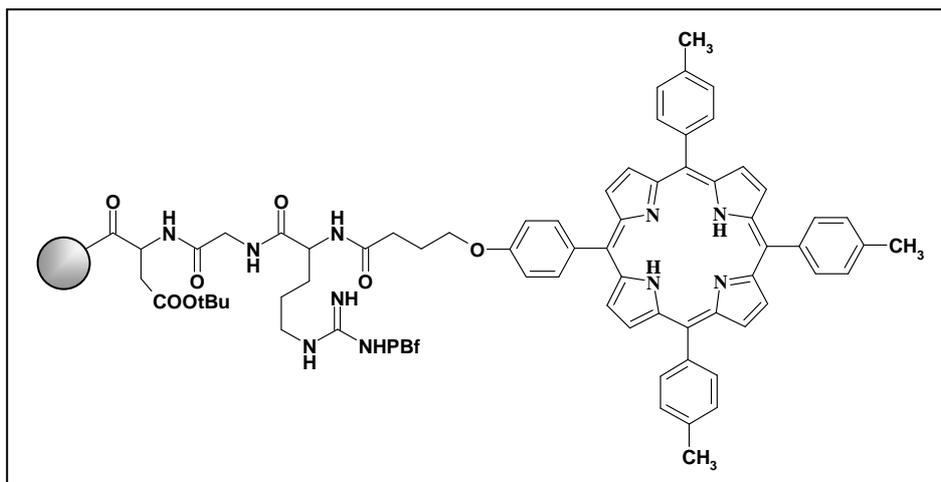
Procédure générale de condensation des carboxyporphyrines sur le peptide RGD en phase solide

La résine portant le motif RGD est placée dans un réacteur *ystème 45*[®] puis l'ensemble est placé sous courant d'argon. Après 30 minutes, la résine est gonflée dans un volume approprié de solvant, un mélange de dichlorométhane et de diméthylformamide 1/1. Les carboxyporphyrines **8a**, **8b**, **9a** ou **9b** (2 éq. par rapport au peptide), préalablement solubilisées dans un minimum de solvant sont alors introduites dans le réacteur par l'intermédiaire d'une seringue. Après ajout de 2 éq. de diisopropylcarbodiimide et de 2 éq. de 1-hydroxybenzotriazole, le mélange réactionnel est maintenu sous argon pendant 24 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Après réaction, le solvant et les réactifs en excès sont éliminés par filtration. La résine est alors rincée avec du DMF (2x15 mL) et du dichlorométhane (3x15 mL) puis elle est séchée au dessiccateur.

Procédure générale de décrochage des porphyrines peptidiques du support.

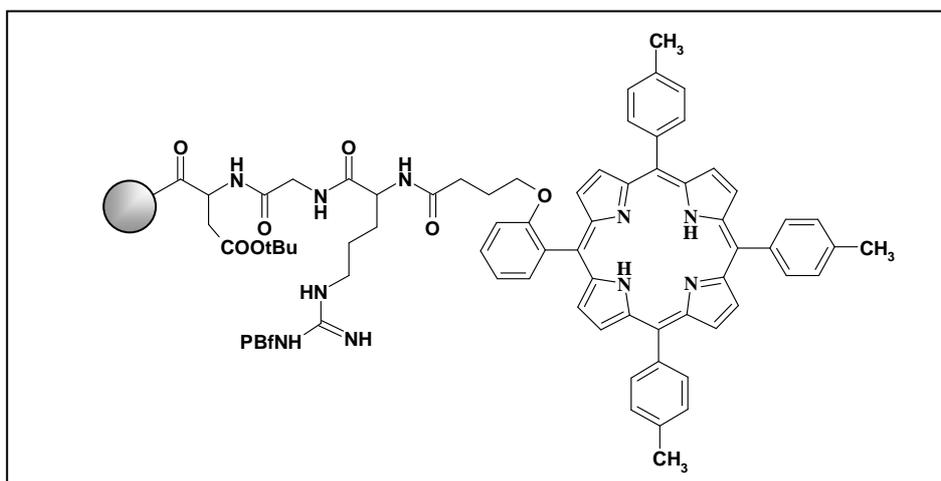
Les produits fixés sur résines **10a,b** et **11a,b** sont traités avec une solution d'acide trifluoroacétique (9,5 mL) et d'anisole (0,5 mL) dans un réacteur *ystème 45*[®]. Après deux heures de réaction, le mélange réactionnel est filtré, les billes de résine sont rincées avec de l'acide trifluoroacétique (2 mL) et du dichlorométhane (2x5 mL). Après évaporation des solvants sous pression réduite, le résidu est dissous dans du chloroforme et lavé avec de l'eau jusqu'à obtention d'un pH neutre. Les produits bruts ainsi obtenus sont purifiés par chromatographie sur plaques préparatives de silice avec des éluants de nature variable selon les porphyrines considérées.

Résine 10a



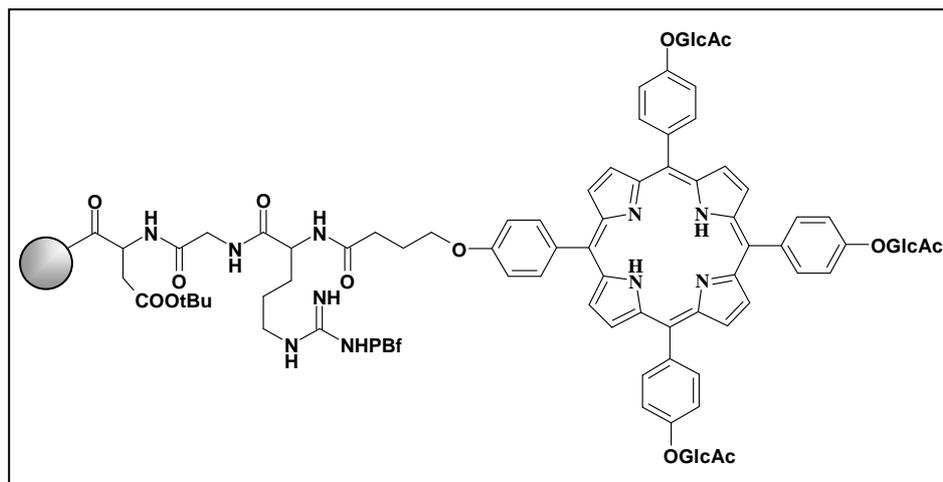
La réaction de 100 mg de résine (0,058 mmol de peptide RGD, 1 éq.) avec 88 mg de porphyrine **8a** (0,11 mmol, 2 éq.) en présence de DIC (18 μ l, 0,11 mmol, 2 éq.) et de HOBt (8 mg, 0,11 mmol, 2 éq.) fournit la résine **10a** avec un rendement, déterminé par augmentation de masse après séchage sous vide, de 85% (136,5 mg).

Résine 10b



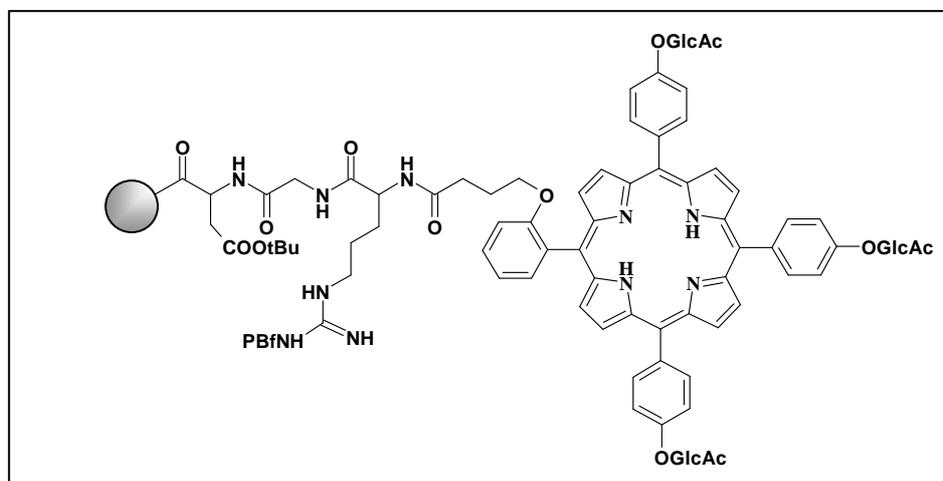
La réaction de 100 mg de résine (0,058 mmol de peptide RGD, 1 éq.) avec 88 mg de porphyrine **8b** (0,11 mmol, 2 éq.) en présence de DIC (18 μ l, 0,11 mmol, 2 éq.) et de HOBt (8 mg, 0,11 mmol, 2 éq.) fournit la résine **10b** avec un rendement, déterminé par augmentation de masse après séchage sous vide, de 84% (136 mg).

Résine 11a



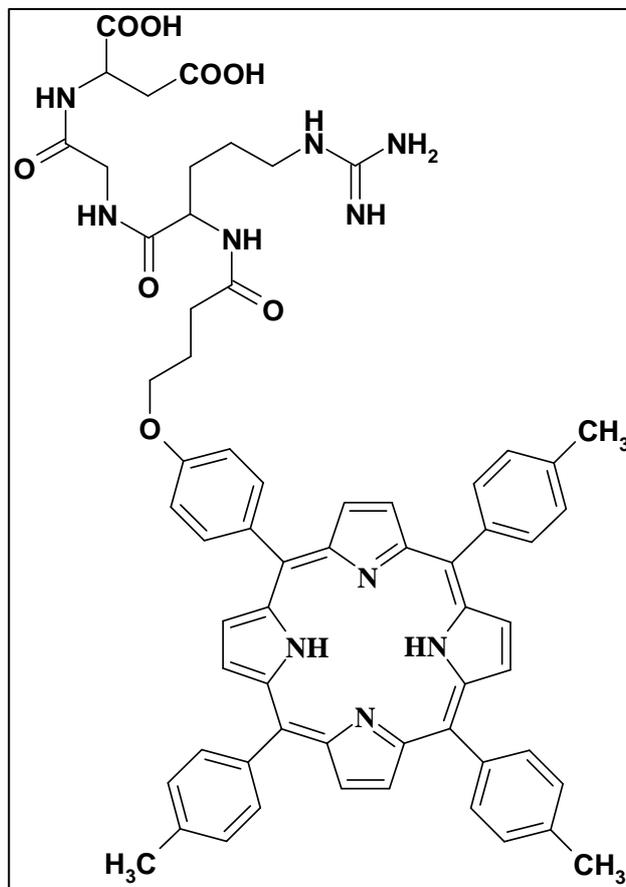
La réaction de 100 mg de résine (0,058 mmol de peptide RGD, 1 éq.) avec 203 mg de porphyrine **9a** (0,11 mmol, 2 éq.) en présence de DIC (18 μ l, 0,11 mmol, 2 éq.) et de HOBt (8 mg, 0,11 mmol, 2 éq.) fournit la résine **11a** avec un rendement, déterminé par augmentation de masse après séchage sous vide, de 81% (181 mg).

Résine 11b



La réaction de 100 mg de résine (0,058 mmol de peptide RGD, 1 éq.) avec 88 mg de porphyrine **9b** (0,11 mmol, 2 éq.) en présence de DIC (18 μ l, 0,11 mmol, 2 éq.) et de HOBt (8 mg, 0,11 mmol, 2 éq.) fournit la résine **11b** avec un rendement, déterminé par augmentation de masse après séchage sous vide, de 80% (180 mg).

5-(4-[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)-porphyrine (12a)



La réaction de 100 mg de résine **10a** (0,049 mmol de porphyrine peptidique) avec 10 mL d'une solution d'acide trifluoroacétique (9,5 mL) et d'anisole (0,5 mL) conduit après traitement et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/EtOH/TFA 60/40/1) au composé **12a** avec un rendement de 70% (37 mg). Ce composé, après neutralisation n'est pas soluble dans les solvants usuels mais seulement partiellement soluble dans le DMSO.

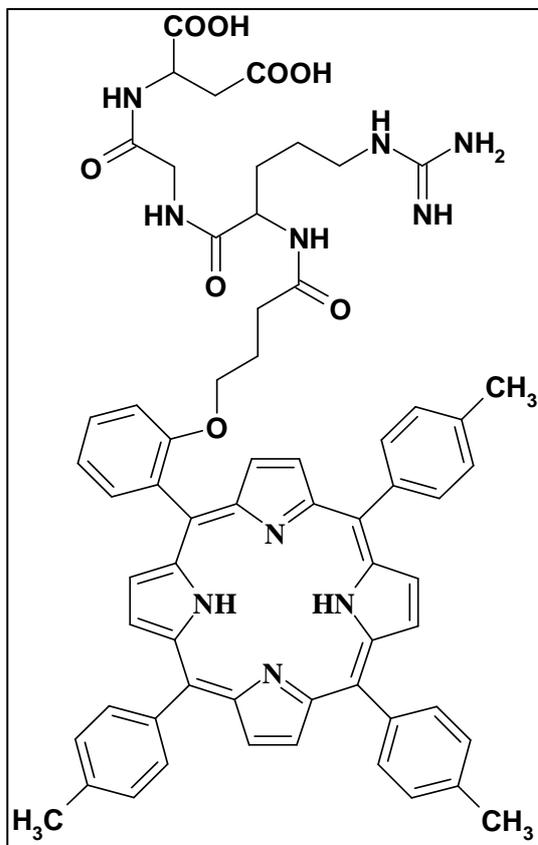
Rf : 0,42 (CHCl₃/EtOH/TFA 60/40/1)

UV-Visible (tableau II-9)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

5-(2-[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri(4-méthylphényl)-porphyrine (12b)



La réaction de 100 mg de résine **10b** (0,049 mmol de porphyrine peptidique) avec 10 mL d'une solution d'acide trifluoroacétique (9,5 mL) et d'anisole (0,5 mL) conduit après traitement et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/EtOH/TFA 60/40/1) au composé **12b** avec un rendement de 64% (34 mg).

Rf : 0,44 (CHCl₃/EtOH/TFA 60/40/1)

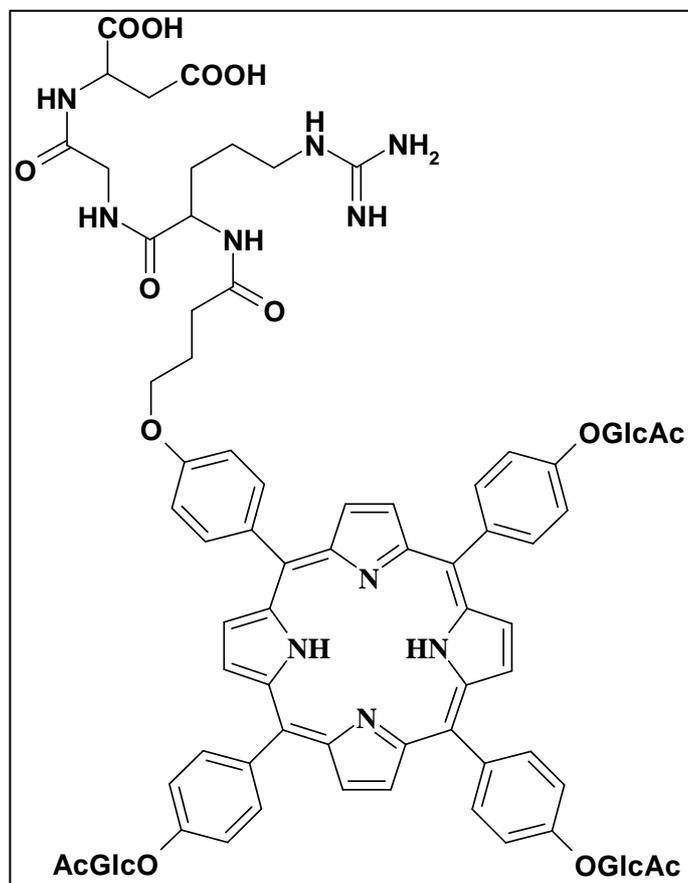
UV-Visible (tableau II-9)

RMN ¹H (tableau II-12)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

5-(4-[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (13a)



La réaction de 100 mg de résine **11a** (0,049 mmol de porphyrine peptidique) avec 10 mL d'une solution d'acide trifluoroacétique (9,5 mL) et d'anisole (0,5 mL) conduit après traitement et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1) au composé **13a** avec un rendement de 67% (68 mg).

Rf 0,48 (CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1)

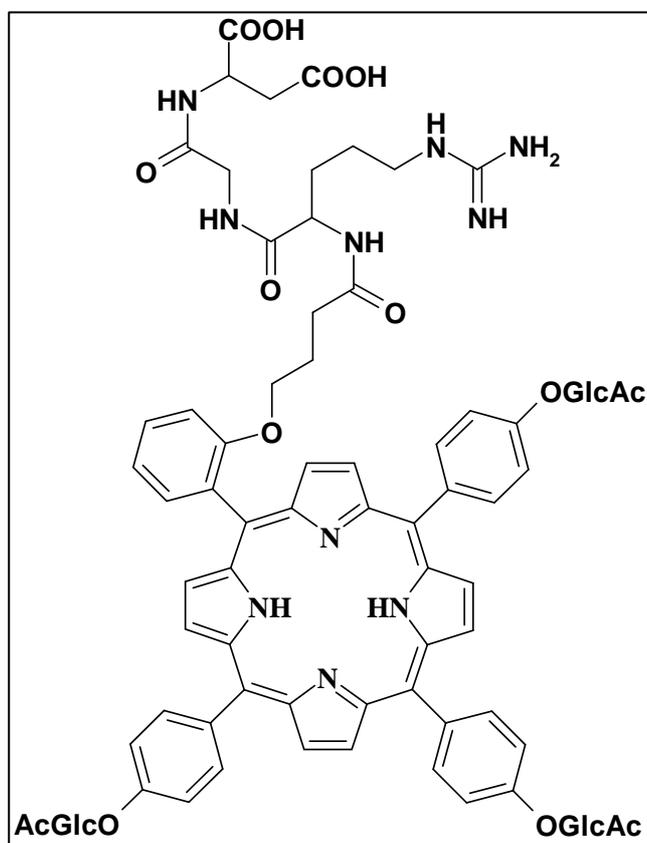
UV-Visible (tableau II-9)

RMN ¹H (tableau II-12)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

5-(2-[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (13b)



La réaction de 100 mg de résine **11b** (0,049 mmol de porphyrine peptidique) avec 10 mL d'une solution d'acide trifluoroacétique (9,5 mL) et d'anisole (0,5 mL) conduit après traitement et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1) au composé **13b** avec un rendement de 65% (66 mg).

Rf : 0,48 (CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1)

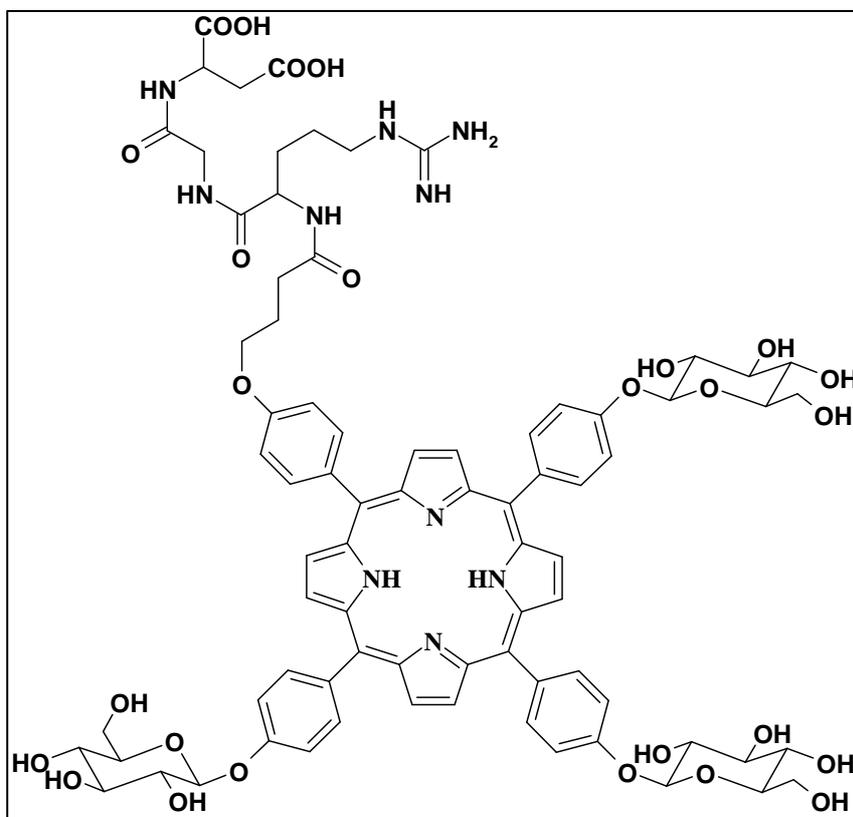
UV-Visible (tableau II-9)

RMN ¹H (tableau II-12)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

5-(4-[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(β -D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (14a**)**



40 mg de porphyrine peptidique glucosylée *peracétylée* **13a** (0,020 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 4 mL d'une solution de dichlorométhane et de méthanol (80/20) à laquelle on ajoute 0,69 mL (0,34 mmol, 1,5 éq. par groupement acétyle) de solution méthanolique 0,5 M de méthylate de sodium. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant une heure puis la porphyrine est précipitée complètement par addition d'éther diisopropylique froid. Après filtration, lavage à l'éther diisopropylique (4x10 mL), la porphyrine **14a** est redissoute dans de l'eau puis neutralisée à l'aide d'une résine basique. Après purification par chromatographie moyenne pression en phase inverse (éluant eau/méthanol 70/30 à 90/10) puis par chromatographie d'exclusion stérique sur séphadex LH20 le composé **14a** est obtenu avec un rendement de 95% (28 mg). Cette porphyrine est conservée à 0°C après lyophilisation.

Rf : 0,64 (eau/méthanol 90/10)

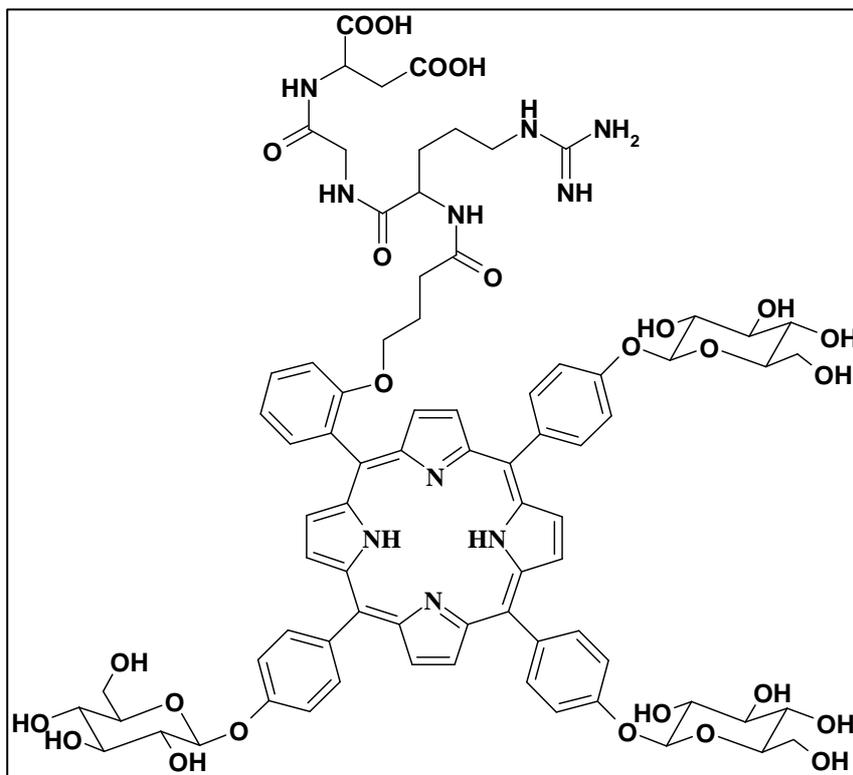
UV-Visible (tableau II-9)

RMN ^1H (tableau II-12)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

5-(2[3-((L)-Arg-(L)-Gly-(L)-Asp)amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tri[4-(β -D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (14b**)**



40 mg de porphyrine peptidique glucosylée *peracétylée* **13b** (0,020 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 4 mL d'une solution de dichlorométhane et de méthanol (80/20) à laquelle on ajoute 690 μ l (0,34 mmol, 1,5 éq. par groupement acétyle) de méthylate de sodium en solution (à 0,5 M) dans le méthanol. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant une heure puis la porphyrine est précipitée complètement par addition d'éther diisopropylique froid. Après filtration, lavage à l'éther diisopropylique (4x10 mL), la porphyrine **14b** est redissoute dans de l'eau puis neutralisée à l'aide d'une résine basique. Après purification par chromatographie moyenne pression en phase inverse (éluant eau/méthanol 70/30 à 90/10) puis par chromatographie d'exclusion stérique sur séphadex LH20 le composé **14b** est obtenu avec un rendement de 93% (27 mg). La porphyrine **14b** est conservée à 0°C après lyophilisation.

Rf : 0,70 (eau/méthanol 90/10)

UV-Visible (tableau II-9)

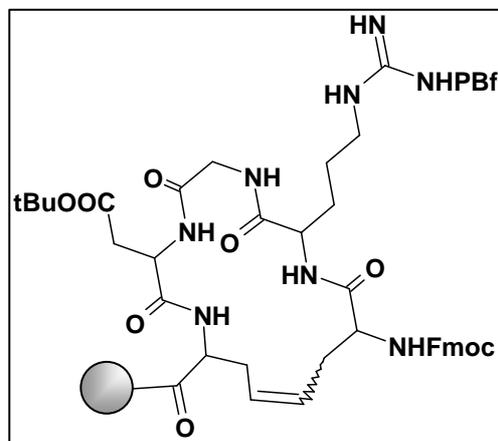
RMN ^1H (tableau II-12)

SM (MALDI) (tableau II-10)

SM Haute Résolution (tableau II-11)

Cyclisation du pentapeptide *all*Glycine-Arginine-Glycine-A.Aspartique-*All*Glycine

3*S*-9*S*-12*S*-14*E*-17*S*-12-((9-fluorénylméthoxycarbonyl)amino)-9-(3-guanidinopropyl)-3-(*tert*iobutyloxycarbonylméthyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétraazacycloheptadec-14-ène-17-carbonyl greffé sur résine Rink-Amide-MBHA (**15**)



Dans un ballon de 25 mL, on place 200 mg de résine portant le pentapeptide *all*GRGD*all*G (0,02 mmol, 1 éq.). L'ensemble est maintenu sous courant d'argon pendant 30 minutes. On introduit alors 5 mL de dichlorométhane distillé et rigoureusement dégazé par barbotage d'argon. On ajoute par l'intermédiaire d'une canne de transfert 1 mL d'une solution à $2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de (4,5-dihydro-1,3-dimésityl-imidazolin-2-ylidène)-(tricyclohexylphosphine)dichlororuthénium (IV) benzyldène (catalyseur **E**) dans le dichlorométhane distillé et dégazé (0,002 mmol, 0,1 éq.). Le mélange réactionnel est agité très légèrement à température ambiante. Après 16 heures de réaction, 1 mL supplémentaire de solution de catalyseur **E** est introduit. On effectue la même opération après 32 heures de réaction. La quantité totale de catalyseur de Grubbs mise à réagir est alors de 0,3 éq. par unité peptidique. Au bout de 48 heures de réaction, la résine est filtrée puis rincée au dichlorométhane (4x10 mL), au méthanol (2x10 mL) et à nouveau au dichlorométhane (2x5 mL). Après séchage au dessiccateur, une fraction du support est traité avec un mélange de TFA et d'anisole (95/5) selon le protocole classique. Le produit brut obtenu est analysé par chromatographie HPLC de manière à évaluer le rendement de la réaction. Dans ces conditions, la résine **15** est obtenue avec un rendement de 71%.

HPLC : temps de rétention = 11,87 min. (éluant CH₃CN / H₂O (H₃PO₄/TEA 1/1 0,1%) :6/4)

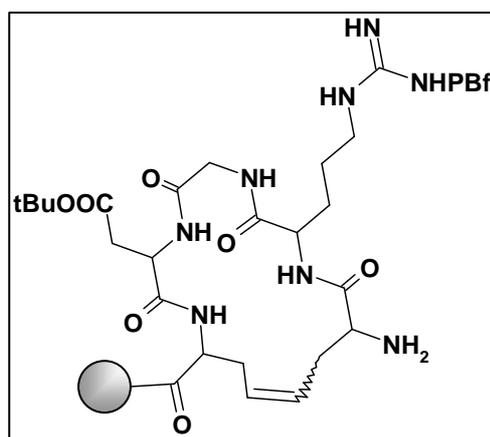
SM MALDI : m/z calculé pour C₃₅H₄₃N₉O₉ : 733,31 ; m/z trouvé : 734,71 [M+H]⁺

RMN ¹H : (tableau III-3)

RMN ¹³C : (tableau III-4)

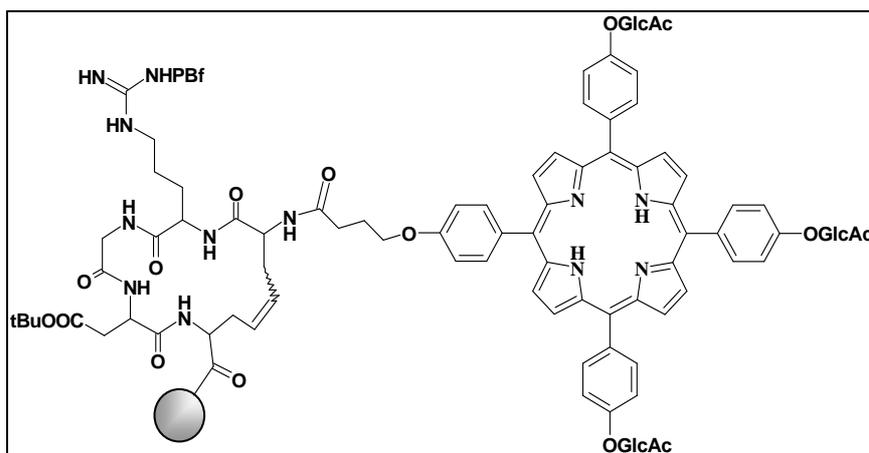
Procédure de déprotection du N-Fmoc-pentapeptide

3*S*-9*S*-12*S*-14*E*-17*S*-12-(amino)-9-(3-guanidinopropyl)-3-(*tert*butyloxycarbonylméthyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétraazacycloheptadec-14-ène-17-carbonyl greffé sur résine Rink-Amide-MBHA (**16**)



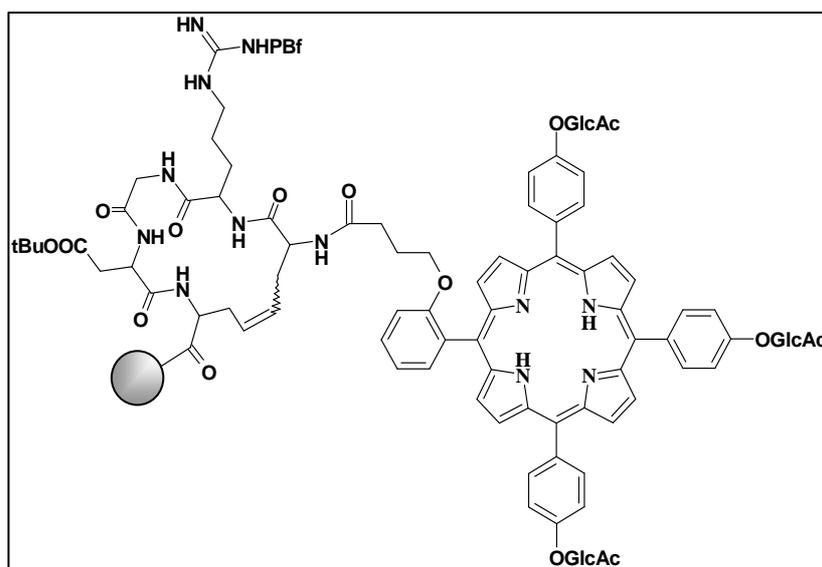
Un échantillon de résine **15** (400 mg, 0,04 mmol de peptide 1éq.) préalablement séché au dessiccateur est introduit dans un réacteur de type *system 45*[®]. On ajoute 12 mL d'une solution de pipéridine à 20% dans le diméthylformamide. Le mélange réactionnel est maintenu à température ambiante sous agitation douce. La réaction est suivie par spectroscopie UV-Visible (mesure effectuée entre 300 et 320 nm). Au bout de 5 minutes, la résine est filtrée puis on ajoute à nouveau 12 mL de solution de pipéridine à 20%. Après 5 minutes supplémentaires de réaction, on répète cette opération. Le chromophore résultant de la réaction de la pipéridine avec le dibenzofulvène libéré n'est plus détecté par spectroscopie UV-Visible pour un temps de réaction de 15 minutes. La résine est alors filtrée puis rincée avec 15 mL de diméthylformamide et avec du dichlorométhane (5x 15 mL) de façon à éliminer toutes traces de diméthylformamide. On obtient ainsi la résine **16** après séchage sous pression réduite avec un rendement, estimé par la mesure de variation de masse, supérieur à 95% (391,5 mg)

Résine 17a



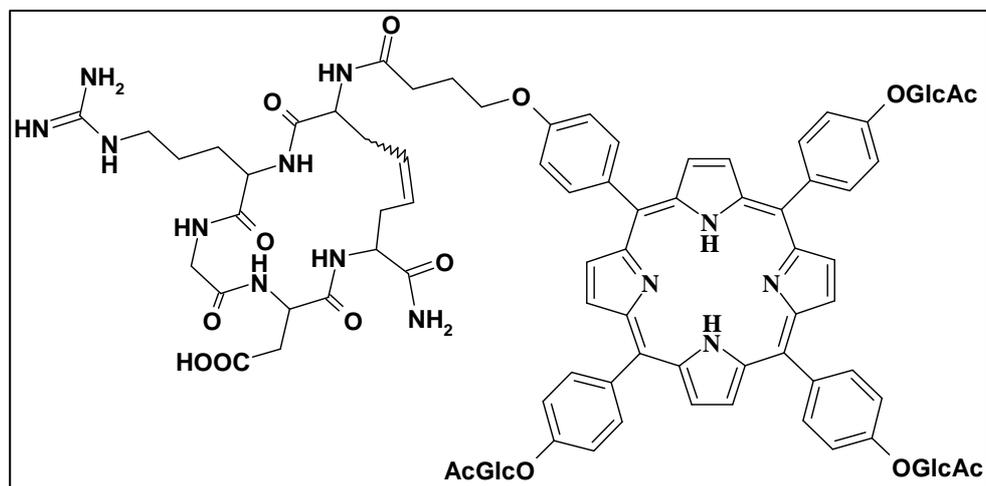
La réaction de condensation est effectuée selon le protocole décrit précédemment pour les supports **10a,b** et **11a,b**. La réaction de 160 mg (0,016 mmol, 1 éq.) de résine **16** avec 53 mg (0,032 mmol, 2 éq.) de porphyrine **9a** auxquels on ajoute 0,5 mL d'une solution à 0,06 mol.L⁻¹ de DIC (0,032 mmol, 2 éq.) et 2,3 mg de HOBt (0,032 mmol, 2 éq.) préalablement solubilisé dans 0,5 mL dans le DMF, fournit la résine souhaitée avec un rendement brut, déterminé par augmentation de masse du support après séchage au dessiccateur, de 82% (182,9 mg).

Résine 17b



La réaction de 160 mg (0,016 mmol, 1 éq.) de résine **16** avec 53 mg de porphyrine **9b** en présence de 2 équivalents de DIC et de 2 équivalents de HOBt fournit la résine souhaitée avec un rendement brut, déterminé par augmentation de masse du support, de 79% (182,1 mg).

Acide [3S,9S,12S,14E,17S-17-carbamoyl-12-{4-(10,15,20-tris(4-[2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy]phényl)porphyrin-5-yl)phényloxybutanamido}-9-(3-guanidino-propyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétraazacycloheptadec-14-ényl]-3-acétique (18a)



La résine **17a** (150 mg, 0,0087 mmol de porphyrine à motif peptidique cyclisé) est introduite dans un réacteur *system 45*[®]. On ajoute 10 mL d'une solution à 10% (en volume) d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Après un laps de temps de 5 minutes permettant le gonflement du polymère, le robinet quart de tour du réacteur est ouvert légèrement pour permettre un écoulement lent du réactif. L'ouverture inférieure du réacteur étant maintenue entrouverte, on introduit alors 60 mL supplémentaire de réactif, par fractions de 10 mL. Ainsi, la réaction se déroule en flux quasi continu pendant 30 minutes. Les fractions collectées sont alors regroupées puis on évapore le dichlorométhane sous pression réduite. On obtient ainsi 5 mL de solution auxquels on rajoute 4,5 mL d'acide trifluoroacétique et 0,5 mL d'anisole de façon à poursuivre la réaction de déprotection des chaînes latérales des unités peptidiques. Après une heure de réaction supplémentaire, le solvant est évaporé, le résidu est solubilisé dans du chloroforme (30 mL) et neutralisé avec 25 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium puis lavé avec de l'eau (3x50 mL) jusqu'à obtention d'un pH neutre. Après purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol/TFA 80/20/1) et chromatographie sur colonne séphadex LH20, le composé **18a** est obtenu avec un

rendement de 70% (13,7 mg). Ce rendement est calculé par rapport au nombre de moles réel de porphyrines à motif peptidique cyclisé greffées sur la résine **17a**.

Rf : 0,32 (CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1)

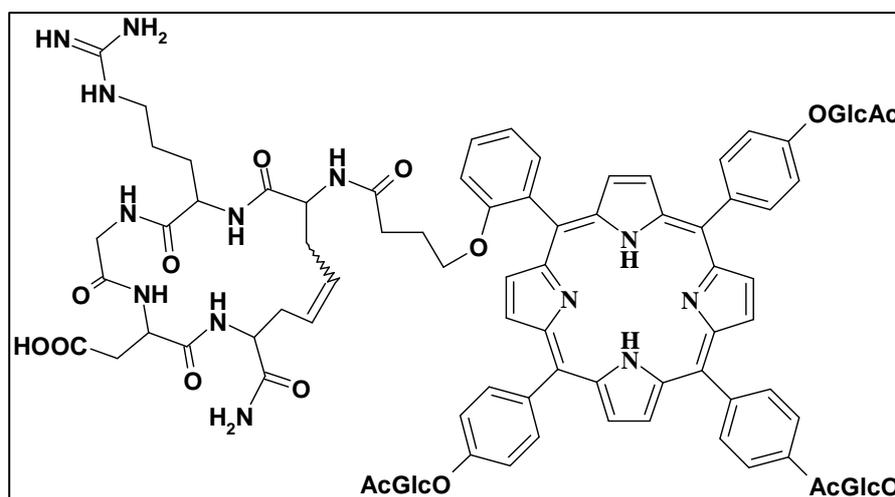
UV-Visible (tableau III-5)

RMN ¹H (tableau III-7)

RMN ¹³C (tableau III-8)

SM (MALDI) (tableau III-6)

Acide [3S,9S,12S,14E,17S-17-carbamoyl-12-{2-(10,15,20-tris(4-[2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy]phényl)porphyrin-5-yl)phényloxybutanamido}-9-(3-guanidino-propyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétrazacycloheptadec-14-ényl]-3-acétique (18b)



Selon le même protocole que celui décrit pour le composé **18a**, la réaction de 150 mg (0,0084 mmol de porphyrine à motif peptidique cyclisé) de résine **17b** fournit la porphyrine **18b** avec un rendement de 71% (13,4 mg)

Rf : 0,37 (CHCl₃/EtOH/TFA 80/20/1)

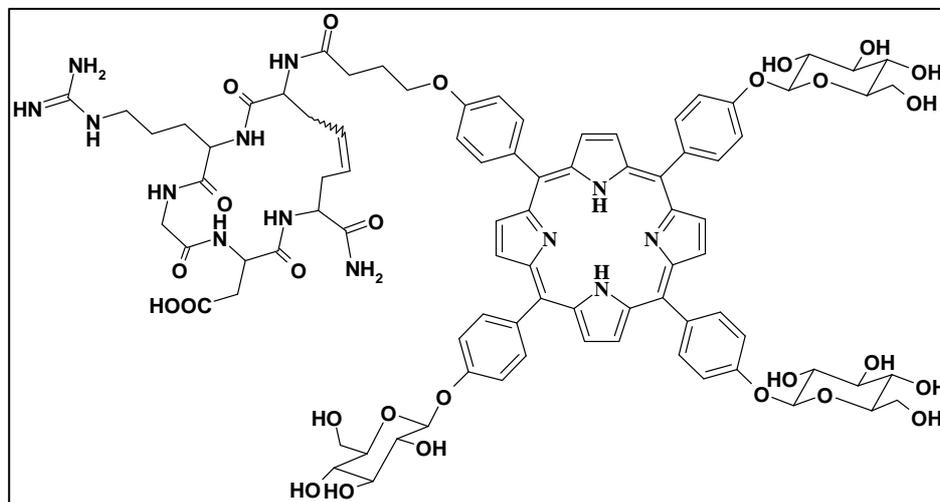
UV-Visible (tableau III-5)

RMN ¹H (tableau III-7)

RMN ¹³C (tableau III-8)

SM (MALDI) (tableau III-6)

Acide [3S,9S,12S,14E,17S-17-carbamoyl-12-{4-(10,15,20-tris(4-[β-D-glucopyranosyloxy]-phényl)porphyrin-5-yl)phényloxybutanamido}-9-(3-guanidinopropyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétrazacycloheptadec-14-ènyl]-3-acétique (19a)



La réaction de 14 mg (0,0062 mmol, 1 éq.) de porphyrine glucosylée *peracétylée* **18a** solubilisée dans 2 mL d' un mélange de dichlorométhane et de méthanol (80/20) avec 0,30 mL (0,148 mmol, 24 éq.) de solution de méthylate de sodium (0,5 M dans le méthanol) fournit le composé **19a**, après purification par chromatographie moyenne pression phase inverse, avec un rendement de 80% (8,6 mg)

Rf : 0,37 (éluant méthanol/eau 70/30)

UV-VISIBLE (tableau III-5)

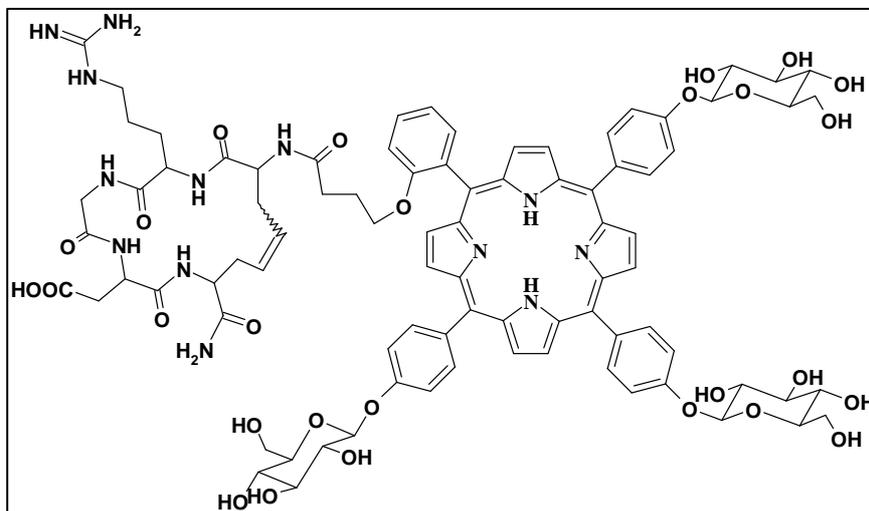
SM MALDI (tableau III-6)

SM Haute Résolution :

Calculée pour C₈₆H₉₇N₁₃O₂₇ : m/z = 1743,6615

Trouvée : m/z = 1744,6710 [M+H]⁺

Acide [3S,9S,12S,14E,17S-17-carbamoyl-12-{2-(10,15,20-tris(4-[β-D-glucopyranosyloxy]-phényl)porphyrin-5-yl)phényloxybutanal-amido}-9-(3-guanidinopropyl)-2,5,8,11-tétraoxo-1,4,7,10-tétrazacycloheptadec-14-ényl]-3-acétique (19b)



Le protocole décrit pour le composé **19a** appliqué à 12 mg de composé **18b** permet d'obtenir la porphyrine glucosylée désacétylée **19b** avec un rendement après purification de 80% (7,3 mg).

Rf : 0,41 (éluant méthanol/eau 70/30)

UV-VISIBLE (tableau III-5)

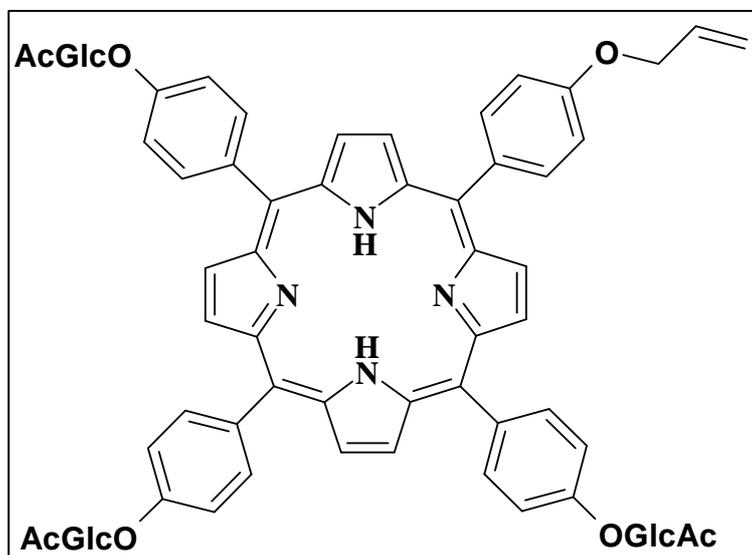
SM MALDI (tableau III-6)

SM Haute Résolution :

Calculée pour $C_{86}H_{97}N_{13}O_{27}$: $m/z = 1743,6615$

Trouvée : $m/z = 1767,6496 [M+H+Na]^+$

5-(4-allyloxyphényl)-10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrine (20)



Ce composé a été synthétisé selon les deux méthodes décrites pour la synthèse des monohydroxyphényltriglycosylporphyrines **5a** et **5b** (méthode **A** et méthode **B**).

Méthode A :

La réaction de 362 mg de 4-allyloxybenzaldéhyde (2,23 mmol, 1 éq.) avec 3 g de glucosylbenzaldéhyde **2** (6,7 mmol, 3 éq.) et 0,618 mL de pyrrole (8,94 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol 100/0 à 98/2) et purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol 98/2), le composé **20** avec un rendement de 5% (190 mg).

Méthode B :

En suivant la procédure générale et en utilisant les mêmes quantités de réactifs que dans la méthode A, on isole 418 mg du composé **20** (rdt 11%).

Rf : 0,52 (CHCl₃/EtOH 98/2)

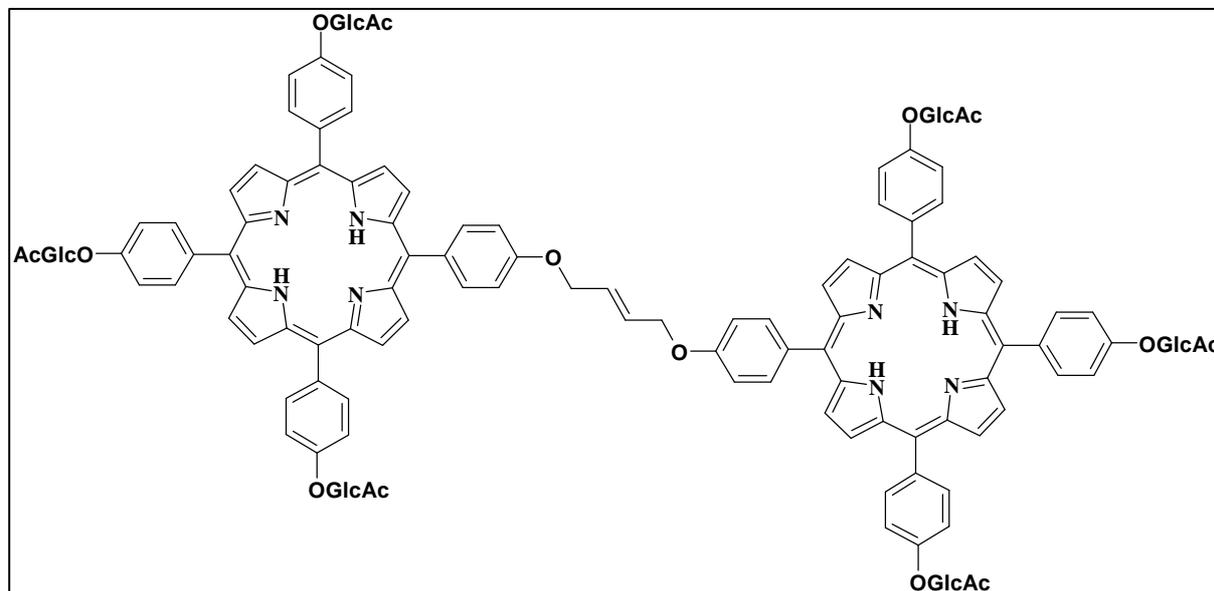
UV-Visible (tableau IV-3)

RMN ¹H (tableau IV-5)

RMN ¹³C (tableau IV-6)

SM (MALDI) (tableau IV-4)

2,4-Bis-(4-(10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)phényl]-porphyrin-5-yl)phényloxy)-but-2-ène (21)



Ce composé est synthétisé selon deux méthodes :

Méthode 1 :

Dans un bicol de 25 mL surmonté d'un réfrigérant, on introduit sous atmosphère d'argon 100 mg de monomère **20** solubilisé dans 5 mL de dichlorométhane préalablement distillé et dégazé par barbotage d'argon. On ajoute par l'intermédiaire d'une canne de transfert 4,8 mg (0,0058 mmol, 10% molaire) de (4,5-dihydro-1,3-dimésityl-imidazolin-2-ylidène)-(tricyclohexyl-phosphine)dichlororuthénium (IV) benzyldène (catalyseur **E**) solubilisé dans 0,5 mL de dichlorométhane distillé et dégazé. La réaction, à reflux du solvant et sous argon, est suivie par CCM. Après 5 heures, on ajoute 4,8 mg supplémentaires de catalyseur **E** soit 10% molaire. Au bout de 18 heures, on évapore le solvant et le résidu est chromatographié sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol 98/2). On obtient le dimère **21** avec un rendement de 63% (125 mg).

Méthode 2 :

Dans un ballon de 25 mL, on introduit 50 mg (0,03 mmol, 1 éq.) de porphyrine **5a** solubilisée dans 5 mL de diméthylformamide anhydre. On ajoute alors 80 mg de carbonate de potassium

(0,60 mmol, 20 éq.) puis 7 mg (0,03 mmol, 1 éq.) de *trans*-1,4-dibromobut-2-ène. Après 48 heures de réaction à température ambiante, on ajoute 3 équivalents de composé **5a** (150 mg, 0,09 mmol). La réaction est suivie par CCM. Au bout de 30 heures de réaction supplémentaires, le solvant est évaporé sous pression réduite puis le résidu est dissous dans du chloroforme (50 mL) et lavé à l'eau (3x75 mL). Le dimère **21** est obtenu après purification sur plaques préparatives de silice avec un rendement de 54% (55 mg)

Rf : 0,47 (CHCl₃/EtOH 98/2)

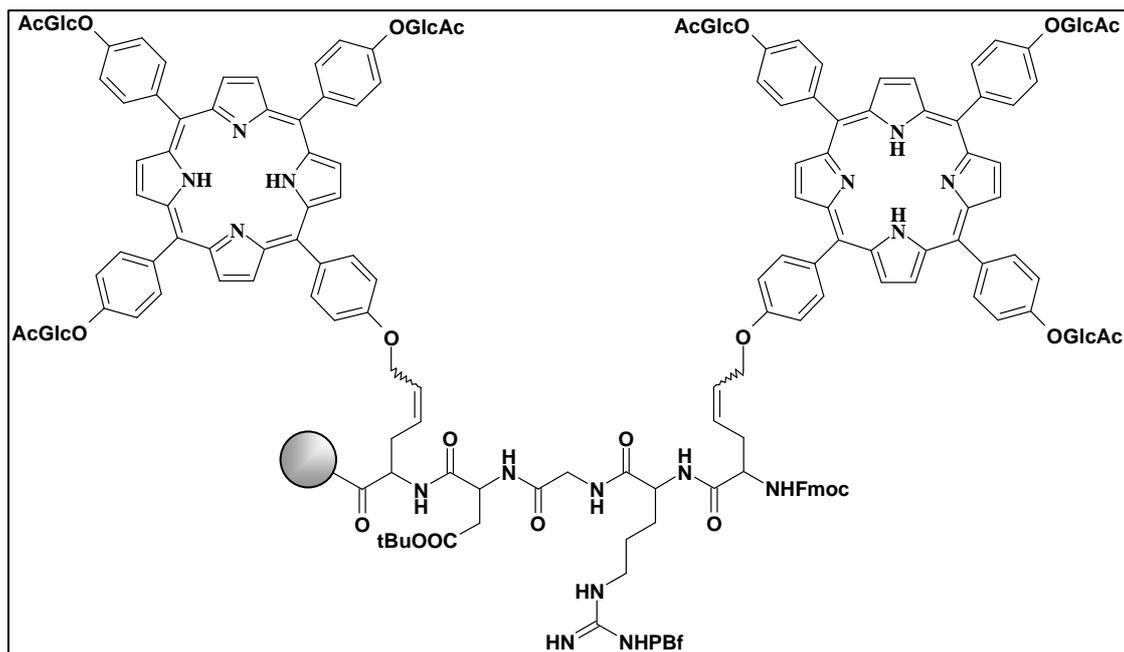
UV-Visible (tableau IV-3)

RMN ¹H (tableau IV-5)

RMN ¹³C (tableau IV-6)

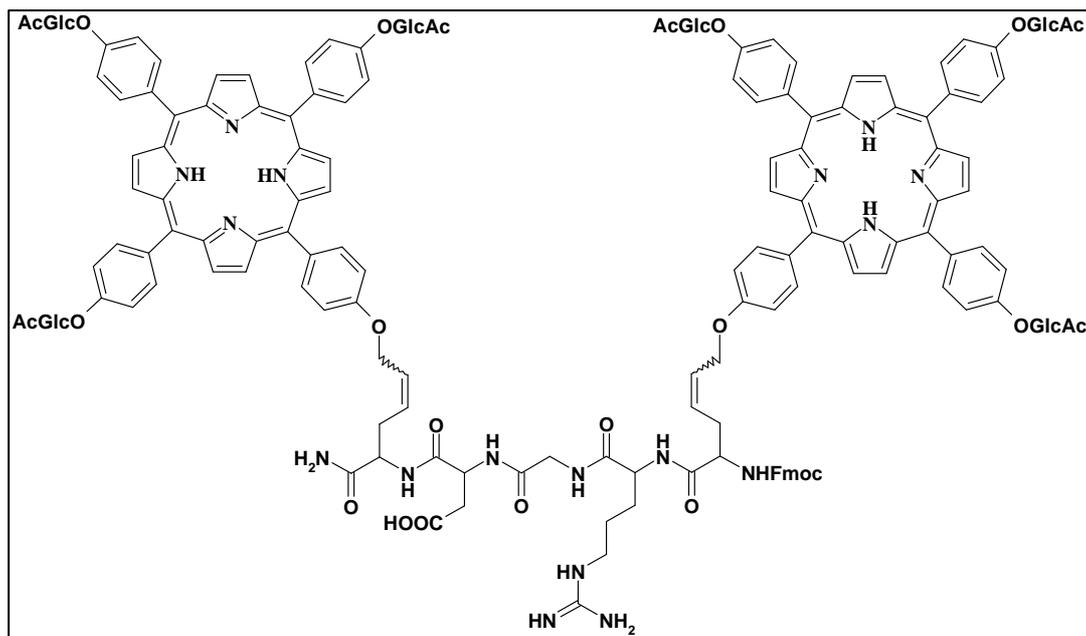
SM (MALDI) (tableau IV-4)

Résine (22)



80 mg de résine MBHA Rink amide portant le pentapeptide *allG*-RGD-*allG* (0,008 mmol de peptide, 1 éq.) sont introduits dans un bicol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est placé sous courant d'argon pendant 30 minutes. On ajoute alors 216 mg (0,064 mmol, 8 éq.) de composé **21** solubilisé dans 5 mL de dichlorométhane anhydre et dégazé par barbotage d'argon puis 1 mL d'une solution à 1,6 mmol.L⁻¹ de catalyseur de Grubbs noté **E** dans le dichlorométhane anhydre et dégazé , par l'intermédiaire d'une canne de transfert. Après 24 heures de réaction, on ajoute à nouveau 1 mL de cette solution. Au bout de 48 heures, la résine est filtrée, rincée au dichlorométhane (1x10 mL), au méthanol (2x20 mL) puis à nouveau au dichlorométhane (2x10 mL). Le rendement, estimé par mesure de l'augmentation de masse, est de 19% (masse de résine récupérée après séchage sous pression réduite : 85,1 mg)

N-[*N*-[*N*-[*N*-[*N*-(*Fmoc*)-5-(10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -*D*-glucopyranosyloxy)]phényl)porphyrin-5-ylphényloxyéthyl)-4,5-didéhydro-*L*-Norvalyl]-*L*-Arginyl]-*L*-Glycyl]-*L*-Aspartyl]-5-(10,15,20-tri[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -*D*-glucopyranosyloxy)]phényl)porphyrin-5-ylphényloxyéthyl)-4,5-didéhydro-*L*-Norvaline-carbamoyle (**23**)



La résine **22** (85,1 mg, 0,00152 mmol de porphyrine peptidique, 1 éq.) est introduite dans un réacteur *system 45*[®]. On ajoute 10 mL d'une solution à 10% (en volume) d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Après un laps de temps de 5 minutes permettant le gonflement du polymère, le robinet quart de tour du réacteur est ouvert légèrement pour permettre un écoulement lent du réactif. L'ouverture inférieure du réacteur étant maintenue entrouverte, on introduit alors 60 mL supplémentaires de réactif, par fractions de 10 mL. Ainsi, la réaction se déroule en flux quasi continu pendant 30 minutes. Les fractions collectées sont alors regroupées puis on évapore le dichlorométhane sous pression réduite. On obtient ainsi 5 mL de solution auxquels on rajoute 4,5 mL d'acide trifluoroacétique et 0,5 mL d'anisole de façon à poursuivre la réaction de déprotection des chaînes latérales de l'unité peptidique. Après une heure de réaction supplémentaire, le solvant est évaporé, le résidu est

solubilisé dans du chloroforme (20 mL) et neutralisé avec 15 mL d'une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium puis lavé avec de l'eau (3x40 mL) jusqu'à obtention d'un pH neutre. Après purification sur plaques préparatives de silice (éluant CHCl₃/éthanol 80/20) et chromatographie sur colonne séphadex LH20, le composé **23** est obtenu avec un rendement de 11% (4 mg). Le rendement est calculé pour les deux étapes couplage par métathèse / décrochage du support.

Rf : 0,41 (CHCl₃/éthanol 80/20)

SM MALDI : calculé pour C₂₁₀H₂₃₁N₁₇O₇₁ m/z = 4126,49 ; trouvée m/z = 4126,99

RMN ¹H (tableau IV-7).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Sanders J.K.M.
The Porphyrins Handbook, vol. III (Inorganic, organometallic and coordination chemistry), Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**
Axial coordination chemistry of metalloporphyrins.
- [2] Fischer H., Orth H.,
Die Chemie des Pyrrols, 1934-1940, vol. I-III, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig
Die Chemie des Pyrrols.
- [3] Dixon H. B. F., Cornish-Bowden A., Liebecq C., Loening K. L., Moss G. P., Reedijk J., Velick S. F., Venetianer P., Vliegthart J. F. G. et al.
Pure Appl. Chem., **1987**, 59(6), 779-832
Nomenclature of tetrapyrroles.
- [4] Scheidt W. R., Lee Y.
Structure and Bonding (Berlin, Germany), **1987**, 64, 1-70
Recent advances in the stereochemistry of metalotetrapyrroles.
- [5] Meyer E.F.
Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., **1972**, B28, 2162-2167
The crystal and molecular structure of nickel(II)octaethylporphyrin.
- [6] Perutz M.
Pour la science, 1979, 16, 71-85
La structure de lhémoglobine et le transport respiratoire.
- [7] Milgrom L. R.
The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds.
Publisher: Oxford Univ Press, Oxford, UK, **1997**, 249 p.
The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds.
- [8] Gouterman M.
J. Mol. Spectrosc., **1961**, 6, 138-163.
Spectra of porphyrins.
- [9] Smith K.M.
Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam, **1975**, 910 p.
Porphyrins and Metalloporphyrins.
- [10] Craig J. M.
The Porphyrins Handbook, Vol.5 (NMR and EPR), Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**
NMR Spectroscopy of Diamagnetic Porphyrins.
- [11] Ponomarev G. V., Borovkov V. V., Sugiura K., Sakata Y., Shul'ga A. M.
Tetrahedron Lett., **1993**, 34(13), 2153-2156
Synthesis and properties of cis-1,2-bis(octaethylporphyrinyl)ethylene.

-
- [12] Abraham R. J.
Mol. Phys., **1961**, 4, 145-152
Proton magnetic resonance spectra of porphyrins. II. Ring current effects in the porphyrins.
- [13] Abraham R. J., Hawkes G. E., Hudson M. F., Smith K. M.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, **1975**, 3, 204-211
Nuclear magnetic resonance spectra of porphyrins. X. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of meso-tetraarylporphyrins and their metal chelates.
- [14] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F.
Int. J. Mass. Spect. Ion. Proc., **1987**, 78, 53-68
Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds.
- [15] Rothemund P. J.
J. Am. Chem. Soc., **1939**, 61, 2912-2915
Porphyrin studies. III. The structure of the porphine ring system.
- [16] Rothemund P., Menotti A. R.
J. Am. Chem. Soc., **1941**, 63, 267-270
Porphyrin studies. IV. The synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetraphenylporphine.
- [17] Ball R. H., Dorough G. D., Calvin M.
J. Am. Chem. Soc., **1946**, 68, 2278-2281
Further study of the porphine-like products of the reaction of benzaldehyde and pyrrole.
- [18] Adler A. D., Longo F. R., Finarelli J. D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L.
J. Org. Chem., **1967**, 32(2), 476
A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine.
- [19] Little R. G., Anton J. A., Loach P. A., Ibers J., A.
J. Heterocycl. Chem., **1975**, 12(2), 343-349
Synthesis of some substituted tetraarylporphyrins.
- [20] Lindsey J.S.
The Porphyrins Handbook, vol. I (Synthesis and organic chemistry), Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**.
Synthesis of meso-substituted porphyrins.
- [21] Leznoff C. C., Svirskaya P. I.
Angew. Chem., **1978**, 90(12), 1001-1002
Solid-phase synthesis of unsymmetrical tetraarylporphyrins.
- [22] Montierth J. M., Duran A. G., Leung S. H., Smith K. M., Schore N. E.
Tetrahedron Lett., **2000**, 41(39), 7423-7426
The polymer-supported MacDonald-type porphyrin synthesis: coupling of two dissimilar dipyrromethanes.
- [23] Gonsalves A. M. A. R., Pereira M. M.
J. Heterocycl. Chem., **1985**, 22(3), 931-933
A new look into the Rothemund meso-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis.

-
- [24] Lindsey J. S., Hsu H. C., Schreiman I. C.
Tetrahedron Lett., **1986**, 27(41), 4969-4970
Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions.
- [25] Geier G. R. III, Riggs J. A., Lindsey J. S.
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5(9), 681-690
Investigation of acid cocatalysis in syntheses of tetraphenylporphyrin.
- [26] a) - Lindsey J. S., Prathapan S., Johnson T. E., Wagner R. W.
Tetrahedron, **1994**, 50(30), 8941-8968
Porphyrin building blocks for modular construction of bioorganic model systems.
- b) - Oulmi D., Maillard P., Guerquin-Kern J.L., Huel C., Momenteau M.
J. Org. Chem., **1995**, 60(6), 1554-1564
Glycoconjugated Porphyrins. 3. Synthesis of Flat Amphiphilic Mixed meso-(Glycosylated aryl)arylporphyrins and Mixed meso-(Glycosylated aryl)alkylporphyrins Bearing Some Mono- and Disaccharide Groups.
- [27] a) - Woodward, R. B.
Angew. Chem., **1960**, 72, 651-662
Total synthesis of chlorophylls.
- b) - Woodward, R. B.
Pure Appl. Chem., **1961**, 2, 383-404
The total synthesis of chlorophyll.
- c) - Arsenault G.P., Bullock E., MacDonald S.F.
J. Am. Chem. Soc., **1960**, 82, 4384-4389
Pyromethanes and porphyrins therefrom.
- [28] Littler B. J., Ciringh Y., Lindsey J. S.
J. Org. Chem., **1999**, 64(8), 2864-2872
Investigation of Conditions Giving Minimal Scrambling in the Synthesis of trans-Porphyrins from Dipyrromethanes and Aldehydes.
- [29] Shi D.F., Wheelhouse R. T.
Tetrahedron Lett., **2002**, 43(51), 9341-9342
A novel, high-yielding synthesis of meso-substituted porphyrins via the direct arylation of porphine.
- [30] Treibs A., Haberle N.
Justus Liebigs annalen der Chemie, **1968**, 718, 183-207
Concerning the synthesis and the electron spectrum of meso-substituted porphine.
- [31] Siedel W., Winkler F.
Justus Liebigs annalen der Chemie, **1943**, 54, 162-201
Oxidation of pyrrole derivatives with Pb tetraacetate. A new kind of porphyrin synthesis.
- [32] Nguyen L. T., Senge M. O., Smith K. M.
J. Org. Chem., **1996**, 61(3), 998-1003
Simple Methodology for Syntheses of Porphyrins Possessing Multiple Peripheral Substituents with an Element of Symmetry.

-
- [33] Fischer H., Friedrich H., Lamatsch W., Morgenroth K.
Techn. Hochschule, Munchen. Ann., **1928**, 466, 147-178
Porphyrin syntheses XVIII (XIX). Syntheses of coproporphyrin I and II and also mesoporphyrin II, V and XII.
- [34] Sessler J. L., Genge J. W., Urbach A. Sanson P.
Synlett, **1996**, 2, 187-188
A 3+1 approach to monofunctionalized alkyl porphyrins.
- [35] Fischer H.
Org. Synth., **1955**, 3, 442-443
Preparation of hemin.
- [36] Porter T.D., Coon M.J.
J. Biol. Chem., **1991**, 266(21), 13469-13472
Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms.
- [37] Groves J. T., Nemo T. E., Myers R. S.
J. Am. Chem. Soc., **1979**, 101(4), 1032-1033
Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene.
- [38] Chang C.K., Kuo Ming-Shang.
J. Am. Chem. Soc., **1979**, 101(12), 3413-3415
Reaction of iron(III) porphyrins and iodosoxylene. The active oxene complex of cytochrome P-450.
- [39] Groves J. T., Myers R. S.
J. Am. Chem. Soc., **1983**, 105(18), 5791-5796
Catalytic asymmetric epoxidations with chiral iron porphyrins.
- [40] Collman J. P., Wang Z., Straumanis A., Quelquejeu M., Rose E.
J. Am. Chem. Soc., **1999**, 121(2), 460-461
An Efficient Catalyst for Asymmetric Epoxidation of Terminal Olefins.
- [41] Maillard P., Guerquin-Kern J. L., Momenteau, M.
Tetrahedron Lett., **1991**, 32(37), 4901-4904
Catalytic properties of iron and manganese glycoconjugated porphyrins.
- [42] Breslow R., Huang Y., Zhang X., Yang J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **1997**, 94(21), 11156-11158
An artificial cytochrome P450 that hydroxylates unactivated carbons with regio- and stereoselectivity and useful catalytic turnovers.
- [43] Groves J. T., Viski P.
J. Am. Chem. Soc., **1989**, 111(22), 8537-8538
Asymmetric hydroxylation by a chiral iron porphyrin.
- [44] Stuk T. L., Grieco P. A., Marsh M. M.
J. Org. Chem., **1991**, 56(9), 2957-2959
Site-selective hydroxylation of steroids via oxometalloporphyrates covalently linked to ring D: introduction of hydroxyl groups into the C(9) and C(12) position of 5 α -androstanes.

-
- [45] Breslow R., Zhang X., Xu R., Maletic M., Merger R.
J. Am. Chem. Soc., **1996**, 118(46), 11678-11679
Selective Catalytic Oxidation of Substrates That Bind to Metalloporphyrin Enzyme Mimics Carrying Two or Four Cyclodextrin Groups and Related Metallosalens.
- [46] Breslow R., Fang Z.
Tetrahedron Lett., **2002**, 43(29), 5197-5200
Hydroxylation of steroids with an artificial P-450 catalyst bearing synthetic cyclophanes as binding groups.
- [47] Liu C.Y., Pan H.L., Tang H., Fox M. A., Bard A. J.
J. Phys. Chem., **1995**, 99(19), 7632-7636
Effect of Structural Order on the Dark Current and Photocurrent in Zinc Octakis(β -decoxyethyl)porphyrin Thin-Layer Cells.
- [48] Goodby J. W., Robinson P. S., Teo B.K., Cladis P. E.
Mol. Cryst. Liq. Cryst., **1980**, 56(10), 303-309
The discotic phase of uro-porphyrin I octa-n-dodecyl ester.
- [49] Gregg B. A., Fox M. A., Bard A. J.
Chem. Commun., **1987**, 15, 1134-1135
Porphyrin octaesters: new discotic liquid crystals.
- [50] Shimizu Y., Miya M., Nagata A., Ohta K., Matsumura A., Yamamoto I., Kusabayashi S.
Chem. Lett., **1991**, 1, 25-28
Mesomorphic phase transitions of 5,10,15,20-tetrakis(4-n-dodecylphenyl)porphyrin.
- [51] Wang Q. M., Bruce D. W.
Angew. Chem., International Edition in English, **1997**, 36(1/2), 150-152
Low-melting, liquid-crystalline metalloporphyrins.
- [52] Hayes R. T., Wasielewski M. R., Gosztola D.
J. Am. Chem. Soc., **2000**, 122(23), 5563-5567
Ultrafast Photoswitched Charge Transmission through the Bridge Molecule in a Donor-Bridge-Acceptor System.
- [53] Crossley, M.J., Burn, P.L.
Chem. Commun., **1991**, 21, 1569-1571
An approach to porphyrin-based molecular wires: synthesis of a bis(porphyrin)tetraone and its conversion to a linearly conjugated tetrakisporphyrin system.
- [54] Wagner R. W., Lindsey J. S.
J. Am. Chem. Soc., **1994**, 116(21), 9759-9760
A molecular photonic wire.
- [55] Raab O.
Z. Biol., **1900**, 39, 524-526
Über die wirkung fluorescirender stoffe auf infosurien.
- [56] Tappeiner V.H., Jesionek A.
Muench. Med. Wochschr., **1903**, 50, 2042-2044
Therapeutische Versuche mit fluorescierenden Stoffen.

-
- [57] Hausmann W.
Biochem. Z., **1910**, 30, 276-316
Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins.
- [58] Meyer-Betz F.
Dtsch. Arch. Klin Med., **1913**, 112, 476-503
Wirkung des hämatoporphyrins und anderer derivative des blut und gallenfarbestoffs.
- [59] Policard A., Leulier A.
Compt. rend. soc. biol., **1924**, 91, 1422-1433
Characterization of hematoporphyrin and urobilin in urine by means of Wood's light.
- [60] Figge F. H. J., Weiland G. S., Manganiello L. O. J.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **1948**, 68, 640-641
Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins.
- [61] Lipson R. L., Baldes E. J., Olsen, A. M.
J. Natl. Cancer. I., **1961**, 26, 1-12
Use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection.
- [62] a) - Dougherty T. J.
J. Natl. Cancer. I., **1974**, 52(4), 1333-1336
Activated dyes as antitumor agents.
- b) - Diamond I., Granelli S. G. McDonagh A. F., Nielsen S., Wilson C.B., Jaenicke R.
Lancet, **1972**, 2(7788), 1175-1177
Photodynamic therapy of malignant tumours.
- c) - Kelly J. F., Snell M. E.
J. urology, **1976**, 115(2), 150-151
Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder.
- [63] Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J.
Cancer Res., **1976**, 36, 2326-2329
Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor.
- [64] Dougherty T.J., Potter W.R., Weishaupt K.R.
Progress in Clinical and Biological Research, **1984**, 170, 301-314
The structure of the active component of hematoporphyrin derivative.
- [65] Moan J.
J. Photochem. Photobiol., B, 6(3), **1990**, 343-344
On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues.
- [66] Bonnett R.
J. Heterocycl. Chem., **2002**, 39(3), 455-470
Progress with heterocyclic photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of tumors.

-
- [67] Cramers P., Ruevekamp M., Oppelaar H., Dalesio O., Baas P., Stewart F.A.
Brit. J. Cancer, **2003**, 88(2), 283-290
Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy.
- [68] a) - Bilgin M.D., Al-Akhras M-A., Khalili M., Hemmati, H., Grossweiner L. I.
Photochem. Photobiol., **2000**, 72(1), 121-127
Photosensitization of red blood cell hemolysis by lutetium texaphyrin.
- b) – Young S.W., Woodburn K.W., Wright M., Mody T.D., Fan Q., Sessler J.L., Dow W.C.
Miller R.A.
Photochem. Photobiol., **1996**, 63(6), 892-7
Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizing.
- [69] a) - Takeuchi Y., Kurohane K., Ichikawa K., Yonezawa S., Nango M., Oku N.
Cancer, **2003**, 97(8), 2027-2034
Induction of intensive tumor suppression by antiangiogenic photodynamic therapy using polycation-modified liposomal photosensitizer.
- b) - Schmidt S.
Photomedicine in Gynecology and Reproduction, **2000**, 316-321
Photodynamic therapy in breast cancer patients: Application of SnET2 for skin metastases.
- [70] Perlin M., Mao J. C. H., Otis E. R., Shipkowitz N. L., Duff R. G.
Antiviral Res. , **1987**, 7(1), 43-51
Photodynamic inactivation of influenza and herpes viruses by hematoporphyrin.
- [71] Dixon D. W., Kim M. S., Kumar V., Obara G., Marzilli L. G., Schinazi R. F.
Antiviral Chem. Chemother., **1992**, 3(5), 279-282
Amino- and hydroxytetraphenylporphyrins with activity against the human immunodeficiency virus.
- [72] Sol V., Branland P., Granet R., Kaldapa C., Verneuil B., Krausz P
Bioorg. Med. Chem. Lett., **1998**, 8(21), 3007-3010
Nitroglycosylated meso-arylporphyrins as photoinhibitors of gram positive bacteria.
- [73] Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B.
Photochem. Photobiol., **1992**, 55(1), 89-96
Inactivation of Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins.
- [74] Hunt D.W.C., Margaron P.
Idrugs, **2003**, 6(5), 464-469
Status of therapies in development for the treatment of age-related macular degeneration.
- [75] Bressler N.M.
Arch. Ophthalmol. (Chicago), **2001**, 119(2), 198-207
Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: Two-year results of 2 randomized clinical trials-TAP report 2.
- [76] Monsigny M., Roche A.C., Midoux P., Kieda C., Mayer R.
Lectins Glycoconjugates Oncology, **1988**, 25-47
Endogenous lectins of myeloid and tumor cells: characterization and biological implications.

[77] a) - Sylvain I., Benhaddou R., Carre V., Cottaz S., Driguez H., Granet R., Guilloton M., Krausz P.,

J. Porphyrins Phthalocyanines, **1999**, 3(1), 1-4

Synthesis and biological evaluation of thio-glycosylated meso-aryl-porphyrins.

b) - Sol V., Blais J.C., Carre V., Granet R., Guilloton M., Spiro M., Krausz P.

J. Org. Chem., **1999**, 64(12), 4431-4444

Synthesis, Spectroscopy, and Photocytotoxicity of Glycosylated Amino Acid Porphyrin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Phototherapy.

[78] Berg K., Bommer J. C., Moan J.

Cancer Lett., **1989**, 44(1), 7-15

Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies.

[79] Muthukkaruppan V., Auerbach R.

Science, **1979**, 205(4413), 1416-1418

Angiogenesis in the mouse cornea.

[80] Haubner R., Wester Hans-Jurgen, Weber W.A., Mang C., Ziegler S.I., Goodman, S.L., Senekowitsch-Schmidtke R., Kessler H., Schwaiger M.

Cancer Res., **2001**, 61(5), 1781-1785

Noninvasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using ^{18}F -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography.

[81] a) - Pasqualini R., Koivunen E., Ruoslahti E.

Nat. Biotechnol., **1997**, 15(6), 542-546

Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands.

b) - Brooks P.C.

Eur. J. Cancer, **1996**, 32A(14), 2423-2429

Role of integrins in angiogenesis.

[82] Koivunen E., Wang B., Ruoslahti E.

Bio/Technology, **1995**, 13(3), 265-270

Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins.

[83] Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.

Science, **1998**, 279(5349), 377-380

Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model.

[84] a) - Haubner R., Wester H.-J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stocklin G., Schwaiger M.

J. Nucl. Med., **1999**, 40(6), 1061-1071

Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting.

b) - Miller W. H., Keenan R. M., Willette R. N., Lark M. W.

Drug Discov. Today, **2000**, 5(9), 397-408

Identification and in vivo efficacy of small-molecule antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$ (the vitronectin receptor).

-
- [85] a)** - Smith J. W., Cheresch D. A.
J. Biol. Chem., **1990**, 265(4), 2168-2172
Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.
- b)** - Pelletier A J., Kunicki T., Quaranta V.
J. Biol. Chem., **1996**, 271(3), 1364-1370
Activation of the integrin $\alpha_v\beta_3$ involves a discrete cation-binding site that regulates conformation
- [86]** Lanza P., Felding-Habermann B., Ruggeri Z.M., Zanetti M., Billetta R.
Blood Cell. Mol. Dis., 1997, 23(2), 230-241
Selective interaction of a conformationally-constrained Arg-Gly-Asp (RGD) motif with the integrin receptor $\alpha_v\beta_3$ expressed on human tumor cells.
- [87]** Wang Y., Goh S.-Y., Kuczera K.
J. Pept. Res., **1999**, 53(2), 188-200
Molecular dynamics study of disulfide bond influence on properties of an RGD peptide.
- [88]** Lichtenthaler F.W.
Eur. J. Org. Chem., **2002**, (24), 4095-4122
Emil Fischer, his personality, his achievements, and his scientific progeny.
- [89]** Knud J.J.
Eur. J. Org. Chem., **2002**, (20), 2219 – 2233
O-Glycosylations under neutral or basic conditions.
- [90]** Fischer E., Raske K.
Ber., **1909**, 42, 1465-1476
Synthesis of Certain Glucosides.
- [91]** Mauthner F.
J. Prakt. Chem., **1915**, 91, 174-179
Synthesis of gluco-m-hydroxycoumarin and glucoprotocatechuic acid.
- [92]** Voznyi Y. V., Kalicheva I. S., Galoyan A. A.
Bioorganicheskaya Khimiya, **1982**, 8(10), 1388-1392
Synthesis of aromatic glycosides using glycosyl fluorides.
- [93]** Brewster K., Harrison J. M., Inch T. D.
Tetrahedron Lett., **1979**, 52, 5051-5054
Synthesis of aryl β -D-glucopyranosides and aryl β -D-glucopyranosiduronic acids.
- [94]** Halazy S., Berges V., Ehrhard A., Danzin, C.
Bioorg. Chem., **1990**, 18(3), 330-344
Ortho- and para-(difluoromethyl)aryl- β -D-glucosides: a new class of enzyme-activated irreversible inhibitors of β -glucosidases.
- [95]** Roy R., Tropper F. D., Romanowska A., Letellier M., Cousineau L., Meunier S. J., Boratynski J.
Glycoconjugate J., **1991**, 8(2), 75-81
Expedient syntheses of neoglycoproteins using phase transfer catalysis and reductive amination as key reactions.

-
- [96]** Maillard P., Guerquin-Kern J.-L., Huel C., Momenteau M.
J. Org. Chem., **1993**, 58(10), 2774-2780
Glycoconjugated porphyrins. 2. Synthesis of sterically constrained polyglycosylated compounds derived from tetraphenylporphyrins
- [97] a)** -Toshima K., Tatsuta K.
Chem. Rev., **1993**, 93(4), 1503-1531
Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural products synthesis
- b)** – Kaldapa.C. Blais J C.Carre V. Granet R. Sol V. Guilloton M. Spiro M. Krausz P.
Tetrahedron Lett., **2000**, 41(3), 331-335
Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrin dimers.
- [98]** Schuster B., Winter M., Herrmann K.
Z. Naturforsch., C: J. Biosci., **1986**, 41(5-6), 511-520
4-O-β-D-Glucosides of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids – their synthesis and determination in berry fruit and vegetable.
- [99]** Altschul R.
J. Am. Chem. Soc., **1948**, 70, 2569-2572
The Reversible Dissociation of t-Butyl Esters. Structural Effects and Reactions Mechanism.
- [100]** Wang S.S., Gisin B. F., Winter D. P., Makofske R., Kulesha I. D., Tzougraki C., Meienhofer J.
J. Org. Chem., **1977**, 42(8), 1286-1290
Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts.
- [101]** Kim S., Lee, J. I.
J. Org. Chem., **1984**, 49(10), 1712-1716
Copper ion promoted esterification of (S)-2-pyridyl thioates and 2-pyridyl esters. Efficient methods for the preparation of hindered esters.
- [102]** Wiener H., Gilon C.
J. Mol. Catal., **1986**, 37(1), 45-52
An improved method for the catalytic preparation of tert-butyl esters of carboxylic and fatty acids.
- [103]** Shrader W. D., Marlowe C. K.
Bioorg. Med. Chem. Lett., **1995**, 5(19), 2207-2210
A short asymmetric synthesis of N-α-Fmoc-N-δ-Boc-α-methyl-D-ornithine.
- [104]** Wright S. W., Hageman D. L., Wright A. S., McClure L. D.
Tetrahedron Lett., **1997**, 38(42), 7345-7348
Convenient preparations of t-butyl esters and ethers from t-butanol.
- [105]** Satge C., Verneuil B., Branland P., Granet R., Krausz P., Rozier J., Petit C.
Carbohydr. Polym., **2002**, 49(3), 373-376
Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation.

-
- [106] Perreux L., Loupy A.
Tetrahedron, **2001**, 57(45), 9199-9223
A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations.
- [107] Wang S. S.
J. Am. Chem. Soc., **1973**, 95(4), 1328-1333
p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments.
- [108] Carpino L. A., Shroff H., Triolo S. A., Mansour E.-S. M. E.; Wenschuh H., Albericio F.
Tetrahedron Lett., **1993**, 34(49), 7829-7832
The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant.
- [109] NEOSYSTEM groupe SNPE
7 rue de Boulogne, 67100 Strasbourg, France
- [110] Merrifield R. B.
J. Am. Chem. Soc., **1963**, 85(14), 2149-2154
Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide.
- [111] Kisfaludy L., Schon I.
Synthesis, **1983**, 4, 325-327
Preparation and applications of pentafluorophenyl esters of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino acids for peptide synthesis.
- [112] Castro B., Dormoy J. R., Evin G., Selve C.
Tetrahedron Lett., **1975**, 14, 1219-1222
Peptide coupling reagents. IV. N-[Oxytris(dimethylamino)phosphonium]benzotriazole hexafluorophosphate.
- [113] Coste J., Le-Nguyen D., Castro B.
Tetrahedron Lett., **1990**, 31(2), 205-208
PyBOP: a new peptide coupling reagent devoid of toxic byproduct.
- [114] Reid G. E., Simpson R. J.
Anal. Biochem., **1992**, 200(2), 301-309
Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids.
- [115] Atherton E., Sheppard R. C.
Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Publisher: IRL Press, Oxford, UK, **1989**, 203 p.
Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach.
- [116] Rose E., Lecas A., Quelquejeu M., Kossanyi A., Boitrel B.
Coord. Chem. Rev., **1998**, 178-180, 1407-1431
Synthesis of biomimetic heme precursors.
- [117] De Luca S., Bruno G., Fattorusso R., Isernia C., Pedone C, Morelli G.
Lett. Pept. Sci., 1998, 5(4), 269-276
New synthetic tools for peptide-tetraphenylporphyrin derivatives.

[118] De Napoli L., De Luca S., Di Fabio G., Messere A., Montesarchio D., Morelli G., Piccialli G., Tesauro D.

Eur. J. Org. Chem., **2000**, (6), 1013-1018

A facile solid-phase strategy for the synthesis of oligonucleotide-tetraphenylporphyrin conjugates.

[119] Mourtas S., Katakalous C., Nicolettou A., Tzavara C., Gatos D., Barlos K.

Tetrahedron Lett., **2002**, 44(1), 179-182

Resin-bound aminothiols: synthesis and application.

[120] a) - Kasha M., Rawls H. R., Ashraf El-Bayoumi M.

Pure Appl. Chem., **1965**, 11(3-4), 371-392

Exciton model in molecular spectroscopy.

b) - Fuhrhop J. H., Demoulin C., Boettcher C., Koenig J., Siggel U.

J. Am. Chem. Soc., **1992**, 114(11), 4159-4165

Chiral micellar porphyrin fibers with 2-aminoglycosamide head groups.

[121] Arunachalam B., Phan U. T., Geuze H. J., Cresswell P.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **2000**, 97(2), 745-750

Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT).

[122] Schuster M., Blechert S.

Angew. Chem., **1997**, 36(19), 2037-2056

Olefin metathesis in organic chemistry.

[123] Herisson J. L., Chauvin Y.

Makromolekulare Chemie, **1971**, 141, 161-176

Catalysis of olefin transformations by tungsten complexes. II. Telomerization of cyclic olefins in the presence of acyclic olefins

[124] a) -Trnka T. M., Grubbs R. H.

Acc. Chem. Res., **2001**, 34(1), 18-29

The Development of L2X2Ru:CHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story.

b) -Krausz P. Garnier F. Dubois J E.

J. Am. Chem. Soc., **1975**, 97(2), 437-438

Photochemically induced olefin metathesis by transition metal complex. I. Intermediacy of pentacarbonylchlorotungsten.

[125] Schrock R. R., DePue R. T., Feldman J., Schaverien C. J., Dewan J. C., Liu, A. H.

J. Am. Chem. Soc., **1988**, 110(5), 1423-1435

Preparation and reactivity of several alkylidene complexes of the type W(CHR')(N-2,6-C6H3-iso-Pr2)(OR)2 and related tungstacyclobutane complexes. Controlling metathesis activity through the choice of alkoxide ligand.

[126] Fujimura O., Fu G. C., Grubbs R. H.

J. Org. Chem., **1994**, 59(15), 4029-4031

The Synthesis of Cyclic Enol Ethers via Molybdenum Alkylidene-Catalyzed Ring-Closing Metathesis.

-
- [127] a)** - Nguyen S. T., Johnson L. K., Grubbs R. H., Ziller J. W.
J. Am. Chem. Soc., **1992**, 114(10), 3974-3975
Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media.
- b)** - Wu Z., Nguyen S. T., Grubbs R. H., Ziller J. W.
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117(20), 5503-5511
Reactions of Ruthenium Carbenes of the Type (PPh₃)₂(X)₂Ru:CH-CH:CPh₂ (X = Cl and CF₃COO) with Strained Acyclic Olefins and Functionalized Olefins.
- [128]** Nguyen S. T., Grubbs R. H., Ziller J. W.
J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(21), 9858-9859
Syntheses and activities of new single-component, ruthenium-based olefin metathesis catalysts.
- [129] a)** - Miller S. J., Kim S.-H., Chen Z.-R., Grubbs R. H.
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117(7), 2108-2109
Catalytic Ring-Closing Metathesis of Dienes: Application to the Synthesis of Eight-Membered Rings.
- b)** - Huwe C. M., Blechert S.
Tetrahedron Lett., **1995**, 36(10), 1621-1624
A novel approach to aza sugars from vinyl glycine methyl ester via olefin metathesis.
- [130]** Schwab P., Grubbs R. H., Ziller J. W.
J. Am. Chem. Soc., **1996**, 118(1), 100-110
Synthesis and Applications of RuCl₂(:CHR')(PR₃)₂: The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity.
- [131] a)** - Roy R., Das S. K.
Chem. Commun., **2000**, 7, 519-529
Recent applications of olefin metathesis and related reactions in carbohydrate chemistry.
- b)** - Jorgensen M., Hadwiger P., Madsen R., Stutz A. E., Wrodnigg T. M.
Curr. Org. Chem., **2000**, 4(6), 565-588
Olefin metathesis in carbohydrate chemistry.
- c)** - Furstner A.
Angew. Chem., **2000**, 39(17), 3012-3043
Olefin metathesis and beyond.
- [132]** Dias E. L., Nguyen S. T., Grubbs R. H.
J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119(17), 3887-3897
Well-Defined Ruthenium Olefin Metathesis Catalysts: Mechanism and Activity.
- [133]** Ulman M., Grubbs R. H.
Organometallics, **1998**, 17(12), 2484-2489
Relative Reaction Rates of Olefin Substrates with Ruthenium(II) Carbene Metathesis Initiators.
- [134]** Schuster M., Pernerstorfer J., Blechert S.
Angew. Chem., **1996**, 35(17), 1979-1980
Ruthenium-catalyzed metathesis of polymer-bound olefins.

-
- [135] Pernerstorfer J., Schuster M., Blechert S.
Chem. Commun., **1997**, (20), 1949-1950
Cyclization/cleavage of macrocycles by ring-closing metathesis on solid support-conformational studies.
- [136] Piscopio A. D., Miller J. F., Koch K.
Tetrahedron Lett., **1997**, 38(41), 7143-7146
Solid phase heterocyclic synthesis via ring closing metathesis: traceless linking and cyclative cleavage through a carbon-carbon double bond.
- [137] Connon S. J., Blechert S.
Angew. Chem., **2003**, 42(17), 1900-1923
Recent developments in olefin cross-metathesis.
- [138] Tang Q., Wareing J. R.
Tetrahedron Lett., **2001**, 42(8), 1399-1401
Ring-closing metathesis versus cross metathesis of resin-bound olefins.
- [139] Miller S., Blackwell H.E., Grubbs R.H.
J. Am. Chem. Soc., **1996**, 118(40), 9606-9614
Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides.
- [140] Rink H.
Tetrahedron Lett., **1987**, 28(33), 3787-3790
Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methyl ester resin.
- [141] Breitmaier E., Voelter W.
Carbon 13 NMR Spectroscopy, **1987**, Wiley VCH New York, p116
Carbon 13 NMR Spectroscopy
- [142] Vuljanic T., Bergquist K.-E., Clausen H., Roy S., Kihlberg J.
Tetrahedron, **1996**, 52(23), 7983-8000
Piperidine is preferred to morpholine for Fmoc cleavage in solid phase glycopeptide synthesis as exemplified by preparation of glycopeptides related to HIV gp120 and mucins.
- [143] Jacquemotte F.
Chimie Nouvelle, **1992**, 10(37), 1081-1085
La chimie des Fmoc-polyamides au service de la nouvelle synthèse des peptides.
- [144] Dorner B., Ostresh J. M., Houghten R. A., Frank R., Tiepold A., Fox J. E., et coll.
Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Chan W. C., White P. D. (Eds). Publisher: Oxford University Press, Oxford, UK, **2000**, 303-327
Manual multiple synthesis methods.
- [145] Kaldapa C.
thèse de l'Université de Limoges, n° d'ordre:19-1999
Les porphyrines dimères glucosylées : de nouveaux photosensibilisateurs pour la photothérapie des cancers.
- [146] Terekhov S. N., Meleshchenko L. A., Shulga A. M., Chirvonyi V. S.
J. Appl. Spectrosc., **1997**, 64(6), 726-733
Analysis of the conformation composition of ethane-bisporphyrin solutions from absorption spectra in the region of the Soret band.

[147] Ohloff G.

Pure Appl. Chem., **1975**, 43(3-4), 481-502

Singlet oxygen: a reagent in organic synthesis.

[148] Godard T., Deslandes E., Lebailly P., Vigreux C., Sichel F., Poul J-M., Gauduchon P.

Histochem. Cell Biol., **1999**, 112(2), 155-161

Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays.

[149] Winum J-Y., Baghdiguian S., Commes T., Leydet A., Montero J-L.

Bioorg. Med. Chem. Lett., **2002**, 12(24), 3529-3532

Synthesis of new Targretin analogues that induce apoptosis in leukemia HL-60 cells.

[150] Bourhim A., Gaud O., Granet R., Krausz P., Spiro M.

Synlett, **1993**, 8, 563-564

Synthesis of new glycosylated porphyrin derivatives with a hydrocarbon spacer arm.