



UNIVERSITÉ DE LIMOGES
Faculté des Sciences et Techniques
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles



ÉCOLE DOCTORALE
Science – Technologie – Santé

ANNÉE : 2004

THÈSE N° 9500297

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Mention "Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles"

Présentée par
François LAMARCHE

**Synthèse et Évaluation Biologique
de Porphyrines-Polyamines en vue de leur Application
en Photothérapie Dynamique des Cancers**

Directeur de thèse : M. Pierre KRAUSZ, *Professeur*
Soutenue le 19 novembre 2004 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

Mme Nelly PLÉ

Professeur

Université de Rouen

M. Jean-Pierre CÉLÉRIER

Professeur

Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

Examineurs :

M. Jean-Claude BLAIS

Directeur de Recherche au CNRS

Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

M. Christophe BÉDANE

Professeur

Université et CHU de Limoges

M. Michel GUILLOTON

Professeur

Université de Limoges

M. Robert GRANET

Ingénieur de Recherche – HDR

Université de Limoges

M. Jean-François LAGORCE

Maître de Conférences – HDR

Université de Limoges

M. Vincent SOL

Maître de Conférences

Université de Limoges

M. Pierre KRAUSZ

Professeur

Université de Limoges

À mon grand père.

*C'était l'archétype de la belle ouvrage,
un pionnier qui n'a eu de cesse d'améliorer la condition humaine,*

*dans son métier de la terre,
utilisant à merveille ce formidable creuset de richesses.*

*Nous sommes liés indissociablement
par un profond atavisme terrien.*

Merci.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges. Je tiens donc tout d'abord à remercier son Directeur, Monsieur le Professeur Pierre KRAUSZ, pour avoir mis à ma disposition les moyens financiers et matériels afin de mener à bien ce travail. De plus, je souhaite le remercier pour ses conseils, son soutien et pour m'avoir permis de présenter les résultats de mes travaux lors de congrès.

Je souhaite rendre un hommage tout particulier au Docteur Vincent SOL, pour ses conseils, son encouragement et sa disponibilité durant toutes ces années.

J'adresse à l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) mes remerciements, pour m'avoir apporté une aide financière, me permettant de mener dans de bonnes conditions mon travail.

J'exprime ma gratitude au Professeur Michel GUILLOTON, à Monsieur Robert GRANET et au Docteur Jean-François LAGORCE pour leur dévouement, leurs conseils fructueux et leur aide précieuse.

Je remercie l'ensemble des membres du Jury : le Professeur Nelly PLE et le Professeur Jean-Pierre CELERIER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie le Professeur Christophe BEDANE pour l'honneur qu'il m'a fait d'examiner ce travail. Le Docteur Jean-Claude BLAIS, Directeur de Recherche au CNRS, pour sa participation à ce jury, pour avoir réalisé les spectres MALDI de l'ensemble des composés porphyriniques synthétisés et pour son aide dans l'interprétation des résultats.

Je remercie profondément l'ensemble des chercheurs et du personnel du Laboratoire, et en particulier le Docteur Yves CHAMPAVIER qui est en charge du Service Commun de RMN.

Enfin, je tiens à dédier ce travail à ma famille et à mes amis. Je les remercie pour leur soutien et leur encouragement durant toutes ces années.

Sommaire

Liste des abréviations	1
Introduction générale	5
Chapitre I : Etat de la question – Objectif du travail	7
1. Le cancer	7
2. Les porphyrines et leurs dérivés	11
2.1. Structures	11
2.2. Caractérisation des porphyrines et des chlorines	13
2.2.1. Spectroscopie UV-visible	13
2.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	15
a) Spectroscopie RMN du proton (RMN ¹ H)	15
b) Spectroscopie RMN du carbone 13 (RMN ¹³ C)	17
2.2.3. Spectrométrie de masse	18
2.3. Méthodes de synthèse des porphyrines	19
2.4. Obtention de porphyrines naturelles	23
2.5. Méthode de synthèse des chlorines	24
3. La photothérapie dynamique	25
3.1. Rappels historiques sur la Photothérapie dynamique (PDT)	25
3.2. Mécanisme de la photothérapie dynamique (PDT)	28
3.3. Les processus photochimiques	30
3.4. Les photosensibilisateurs utilisés en PDT	32
3.4.1. Les photosensibilisateurs de première génération	32
a) L'hématoporphyrine dérivée (HpD)	32
b) Le Photofrin II [®]	33
3.4.2. Les photosensibilisateurs de deuxième génération	34
a) L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) – Levulan [®]	34
b) La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC) – Foscan [®]	35
c) Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine (BPD-MA) – Visudyne [®]	37
d) L'étiopurpurine d'étain (SnET ₂) – Purlytin [®]	38
e) La texaphyrine de lutétium – Lutrin [®]	39

f) La mono-L-aspartylchlorine e6 – Npe6	39
g) Les phtalocyanines	40
4. Intérêt des polyamines en thérapie anticancéreuse	41
4.1. Généralités	42
4.2. Structure des polyamines	43
4.3. Chimie des polyamines	44
4.4. Fonctions des polyamines dans la cellule	46
4.5. Métabolisme des polyamines dans les cellules tumorales	47
4.6. Carence d'un organisme en polyamine	48
4.7. Intérêt des systèmes de transport des polyamines	50
5. But du travail	51
Chapitre II : Synthèse de tritolylporphyrines-polyamines	53
1. Introduction	53
2. Stratégie de synthèse	55
3. Synthèse des précurseurs polyaminés	57
3.1. Généralité	57
3.2. Synthèse de la spermidineBoc ₂ 1 et de la spermineBoc ₃ 2	58
3.3. Fixation du <i>N</i> -(4-bromobutyl)phtalimide	59
3.4. Déprotection du groupement phtalimide	61
4. Synthèse des mono <i>para</i> et <i>ortho</i>-hydroxyphényltritolylporphyrines 7a,b	62
5. Synthèse des mono carboxyporphyrines 9a,b	62
5.1. Alkylation des porphyrines 7a,b	62
5.2. Saponification des porphyrines 8a,b	63
6. Formation des porphyrines-polyamines	64
7. Déprotection des fonctions amines	65
8. Caractérisation spectroscopique	66
8.1 Spectroscopie UV-Visible	66
8.2. Spectrométrie de masse	68
8.3. RMN du proton	71
8.3.1. RMN du proton des précurseurs (7 à 9)	71
a) RMN ¹ H de la porphyrine ester 8a	74
b) Influence de l'orientation de la substitution	74
8.3.2. RMN du proton des porphyrine- polyamines (10 à 17)	78

Chapitre III : Synthèse de protoporphyrines IX-polyamines	85
1. Introduction	85
2. Stratégie de synthèse	87
3. Fixation des polyamines protégées sur la protoporphyrine IX	88
4. Déprotection des porphyrines polyamines	89
5. Caractérisations	90
5.1. Spectroscopie UV-Visible	90
5.2. Spectrométrie de masse	91
5.3. Spectroscopie RMN	93
Chapitre IV : Synthèse de chlorines e6-polyamines	97
1. Introduction	97
2. Stratégie de synthèse	99
3. Fixation des polyamines protégées sur la chlorine e6	100
4. Déprotection des chlorines e6 polyamines	101
5. Caractérisations	102
5.1. Spectroscopie UV-visible	102
5.2. Spectrométrie de masse	103
5.3. Spectroscopie RMN	105
Chapitre V : Evaluations biologiques	111
1. Introduction	111
1.1. Généralités	111
1.2. La mort cellulaire	111
1.2.1. La nécrose	112
1.2.2. L'apoptose	112
2. Résultats et discussion	117
2.1. Production d'oxygène singulet	117
2.2. Le Photofrin II [®]	117
2.3. Les tritolylporphyrines-polyamines – La mort cellulaire	118
2.3.1. Les tritolylporphyrines-polyamines protégées (10a,b et 11a,b)	118
2.3.2. Les tritolylporphyrines-polyamines (14a,b et 15a,b)	120
2.3.3. Les tritolylporphyrines-polyamines (16a,b et 17a,b)	121

2.3.4. Les protoporphyrines-polyamines (20 et 21)	123
a/ La mort cellulaire	123
b/ La chute du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	126
c/ L'activation de la caspase 9	127
d/ L'activation de la caspase 3	129
e/ L'Annexine V	131
2.3.5. Les chlorines e6-polyamines (24 et 25)	132
3. Conclusion	136
Conclusion générale et perspectives	139
Chapitre VI : Partie expérimentale	141
1. Réactifs et solvants	141
2. Chromatographie	142
2.1. Chromatographie sur couche mince	142
2.2. Chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice	143
2.3. Chromatographie sur colonne	143
2.4. Chromatographie sur colonne moyenne pression	143
3. Analyses	143
3.1. Température de fusion	143
3.2. Spectroscopie UV-visible	144
3.3. Spectroscopie Infra-Rouge	144
3.4. Spectroscopie RMN	144
3.5. Spectroscopie de masse MALDI	144
3.6. Spectrométrie de masse Haute Résolution	144
3.7. Production d'oxygène singulet	145
4. Synthèses	146
5. Culture cellulaire	184
5.1. Les cellules K562	184
5.2. Conditions de culture cellulaire	184
5.3. Conditions de photoirradiation des cellules	184
5.4. Les photosensibilisateurs	185
5.5. La cytométrie en flux	185

5.6. Les marqueurs fluorescents	186
5.6.1 Mesure de la perméabilité membranaire	186
5.6.2. Mesure du potentiel mitochondrial	188
5.6.3 Mesure de l'activation de la caspase 9	188
5.6.4 Mesure de l'activation de la caspase 3	190
5.6.5. Détection des phases précoces de l'apoptose	191

Liste des composés synthétisés **193**

Lexique **203**

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AIF : apoptosis-inducing factor
ALA : acide 5-aminolévulinique
AMM : autorisation de mise sur le marché
Apaf : apoptosis factor
Bcl-2 : B cell leukaemia/lymphoma 2
Boc : *tert*-butyloxycarbonyle
Boc-ON : 2-(*tert*- butyloxycarbonyloxyimino)-2-phénylacétonitrile
BPD-MA : benzoporphyrin derivative monoacid ring A
CCM : chromatographie sur couche mince
CIS : conversion intersystème
ClAlPcS : chloroaluminium phthalocyanine sulfonated
COSY : correlated spectroscopy
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEAD : diethylazodicarboxylate
DFMO : α -difluorométhylornithine
DHE : dihématoporphyrine éther ou ester
DIC : diisopropylcarbodiimide
DioC₆(3) : 3,3'-dihexyloxacarbocyanine
DISC : death-inducing signaling complex
DMA : diméthylacétamide
DMF : diméthylformamide
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO : diméthylsulfoxyde
FADD : fas-associated protein with death domain
FDA : food and drug administration
FISC : fluorescein isothiocyanate
H₂TPP : *méso*-tétraphénylporphyrine
H₂TTP : *méso*-tétratolylporphyrine

HCCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
Hp : hématorphyrine
HpD : hématorphyrine dérivée
HPLC : chromatographie liquide haute performance
HvD : hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine
IP : iodure de propidium
LDL : low density lipoproteins
MACE : mono-L-aspartylchlorine e6
MALDI : matrix-assisted laser desorption ionisation
m-THPBC : *méso*-tétraphénylbactéριοchlorine
m-THPC : *méso*-tétraphénylchlorine
m-THPP : *méso*-tétraphénylporphyrine
Npe6 : N-aspartylchlorine e6
ODC : ornithine décarboxylase
OMS : organisation mondiale de la santé
PAO : polyamine oxydase
PBS : phosphate buffered saline
PCT : photochimiothérapie
PDT : photothérapie dynamique (photodynamic therapy)
Pht : phtalimide
Pp : protoporphyrine
PT : putrescine
R_f : rapport frontal
RMN : résonance magnétique nucléaire
SAMDC : S-adénosyl-L-méthionine décarboxylase
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SM : spermine
SnET₂ : tin ethyletiopurpurin
SP : spermidine
SPDS : spermidine synthétase
SPES : spermine synthétase
SVF : sérum de veau foetal
T_f : température de fusion

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

THPBC : *méso*-tétraphénylbactéριοchlorine

THPC : *méso*-tétraphénylchlorine

THPP : *méso*-tétraphénylporphyrine

UV: ultraviolet

VADS : voies aérodigestives supérieures

Introduction générale

Les porphyrines et leurs dérivés, sont des macrocycles tétrapyrroliques qui constituent une classe très importante de composés biologiques en raison de leur implication dans de nombreux processus d'oxydoréduction. Elles sont responsables de la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine ou la myoglobine, et de la photosynthèse chez les plantes. En raison de leur vaste domaine d'applications, le développement de nouvelles stratégies de synthèse de ces composés n'a cessé de croître ces dernières années. Ils sont utilisés comme catalyseurs régiosélectifs d'hydroxylation, d'époxydation, ou encore en tant qu'agents de photodécomposition de l'eau. La photothérapie dynamique (PDT) ou photochimiothérapie qui est une technique en plein développement appliquée au traitement des cancers, est un autre domaine d'application de ces macrocycles tétrapyrroliques. Elle a été développée dans les années 1970 par Thomas Dougherty,¹ comme un éventuel traitement contre le cancer. De nos jours, cette technique est utilisée dans de nombreuses pathologies, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les myopies pathologiques. Des traitements fondés sur ce principe, destinés à lutter contre les maladies cardio-vasculaires, le SIDA, les rejets de greffes et les leucémies sont en cours d'études.² Parmi les porphyrines et leurs dérivés les plus couramment utilisés pour le traitement contre le cancer, deux grandes catégories de produits sont rencontrées. La première génération de ces molécules regroupe des dérivés de l'hémoglobine que l'on trouve sous deux formes : le dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) et le porfimer sodique connu sous le nom de Photofrin II[®] qui est un mélange complexe de porphyrines naturelles. Ce dernier a été commercialisé dans un premier temps aux Etats-Unis, puis il reçu l'autorisation de la mise sur le marché (AMM) en France en 1996. Depuis, des photosensibilisateurs, de deuxième génération, ont été développés et la photothérapie dynamique connaît un essor remarquable que se soit pour les applications oncologiques ou non oncologiques. La *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC ou Foscan[®]) est utilisée pour traiter les cancers de l'œsophage, du poumon et du larynx. Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine (BPD-MA) plus connu sous le nom de Vertéporfine (Visudyne[®]), agréé en avril 2000, est utilisé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la cause la plus fréquente de cécité dans les pays industrialisés en raison du vieillissement de

¹ T.J. Dougherty, G. Grindey ; *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1975, 115-121.

² D.W. Dixon, M.S. Kim, V. Kumar, G. Obara ; *Antiviral. Chem. Chemother.*, 3(5), 1992, 279-282.

la population. Devant le nombre restreint de photosensibilisateurs efficaces à structure bien définie présents sur le marché, la recherche de nouvelles molécules capables de reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses est un problème d'actualité. Elle tend à s'orienter vers la synthèse de molécules hybrides composées d'un macrocycle tétrapyrrolique (porphyrine, chlorine) associées à des agents de transport ou de reconnaissance telles que les polyamines (spermidine et spermine). La synthèse et l'évaluation *in vitro* de nouveaux photosensibilisateurs décrits dans ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche entrepris au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN). Nous avons dans un premier temps synthétisé des *méso*-arylporphyrines-polyamines. La spermidine et la spermine ont été fixées sur deux porphyrines non naturelles par le biais d'un bras espaceur. Nous avons également effectué ces mêmes greffages sur deux dérivés porphyriniques naturels, la protoporphyrine IX (molécule d'hème démétallée) et la chlorine e6 (macrocycle issue de la chlorophylle). De plus, une étude biologique de ces nouveaux photosensibilisateurs a été réalisée sur la lignée cellulaire K562 (lignée leucémique promyélocytaire humaine multipotente) afin d'évaluer *in vitro* leur activité anticancéreuse.

Chapitre I

Etat de la question – Objectif du travail

Comme indiqué dans l'introduction, le but de ce travail est la synthèse et l'étude *in vitro* de porphyrines-polyamines en vue d'une application en photothérapie dynamique des cancers. Nous nous proposons de présenter dans ce chapitre, l'état des lieux sur le cancer puis de décrire les synthèses et les caractérisations de porphyrines et de chlorines ainsi que leurs propriétés anticancéreuses. Enfin, nous détaillons les propriétés des polyamines qui constituent un des synthons de base de notre stratégie.

1. Le cancer

Le cancer est un mal ancien puisque les premiers écrits médicaux (papyrus égyptiens – 3500 ans avant Jésus-Christ, écrits mésopotamiens, indiens et persans) en relatent plusieurs cas. Mais, il faudra attendre le IV^e siècle avant notre ère pour qu'Hyppocrate, désigne pour la première fois ce mal, sous le nom de "carcinom", que le latin traduira en cancer (crabe).³ Au II^e siècle, Galien en attribue l'étiologie à un déséquilibre de la bile noire (atrabile), l'une des quatre humeurs du corps humain avec le sang, la bile jaune et le phlegme (lymphe). Ainsi se constitue l'idée, qui aura cours durant les quinze siècles suivants, que le cancer est une maladie générale dont seules les manifestations sont locales. A cette époque, afin de supprimer cette maladie, un régime alimentaire adéquat, des médicaments ou des saignées étaient plus appropriés qu'une intervention chirurgicale. Ce n'est qu'à partir du XVIII^e siècle que se structure peu à peu scientifiquement l'idée que le cancer est une maladie locale, grâce à la convergence des recherches, des pratiques et des savoirs.

De nos jours, nous savons de façon générale, que le cancer est caractérisé par une prolifération cellulaire anormale et anarchique, aboutissant à une néoformation tissulaire ayant tendance à persister et à s'accroître. On a défini le cancer comme le développement anormal d'un clone cellulaire, qui dans un organisme multicellulaire, échappe aux lois de l'homéostasie. On trouve des néoplasmes bénins caractérisés par l'absence d'invasion des

³ M.J. Imbault-Huart ; *Histoire du cancer, Ed. Histoire*, 1985, 74-77.

structures anatomiques voisines et par l'absence de métastases. Il existe également des tumeurs malignes qui possèdent des cellules pouvant migrer par les systèmes vasculaires et lymphatiques. Elles produisent des métastases, détruisent l'organe dont elles sont issues et les organes voisins.

Actuellement le cancer est un problème mondial majeur. En effet, l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.) estime qu'il y a 10 millions de nouveaux cas chaque année (figure I-1) et cette maladie est responsable du décès de 6 millions de personnes. Plus de 4,4 millions des cas proviennent d'Asie, dont 2,5 millions de l'Asie Orientale qui a le taux le plus élevé de cancers. L'Europe compte 2,8 millions de cas, l'Amérique du nord 1,4 millions de cas et l'Afrique 627 000 de cas.⁴

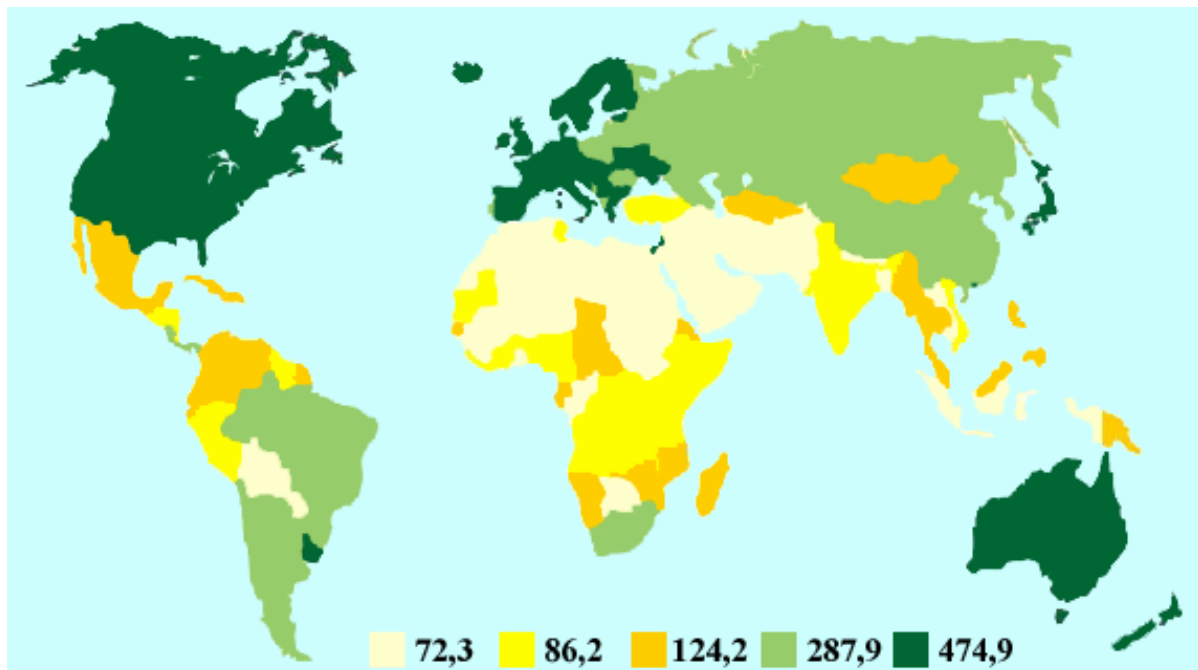


Figure I-1 : Fréquence des cancers dans les différents pays en 1999 (pour 100 000 habitants).⁴

En France, les études épidémiologiques révèlent que le cancer représente la deuxième cause de décès (150 000 décès par an) après les maladies cardio-vasculaires, soit plus d'un quart des décès (Tableau I-1).⁵

⁴ F. Scotté, P. Colonna, J.-M. Andrieu ; *Cancérologie*, Ed. Ellipses, 2002.

⁵ B. Hoerni ; *Cancérologie et Hématologie*, Ed. Masson, 2001.

Tableau I-1 : Principales causes de décès en France en 1999.

	Sexe masculin	Sexe féminin	Total
Maladies cardio-vasculaires	27,7	33,8	30,7
Cancers	32,4	22,6	27,6
Traumatismes, intoxications	9,4	6,8	8,1
Maladies de l'appareil respiratoire	8,2	8,2	8,2
Maladies de l'appareil digestif	4,9	4,5	4,7
Autres causes réunies	17,3	24,1	20,6
Nombre total des décès	274 764 (100 %)	262 695 (100 %)	537 459 (100 %)

L'incidence des cancers varie avec l'âge. Le cancer est une maladie du vieillissement, ainsi sa fréquence augmente fortement avec l'âge. C'est la raison pour laquelle la morbidité par cancer varie selon la population. L'incidence des cancers est donc plus importante dans les pays occidentaux qui ont une moyenne d'âge de la population plus élevée que les pays en voie de développement.

L'incidence des cancers est également sensible au sexe (figure I-2). Ainsi, elle est plus élevée chez l'homme que chez la femme d'un facteur 1,4 à 2,3, tant pour la morbidité que pour la mortalité. La raison principale vient d'une consommation tabagique importante des hommes durant les dernières décennies. En France, le cancer le plus souvent responsable du décès chez l'homme est le cancer du poumon (20 867 cas en 1999), viennent ensuite les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS), le cancer de la prostate et les cancers colorectaux. Par contre chez la femme, il y a prépondérance des cancers du sein (11 281 décès en 1999), du côlon et du col utérin alors que les cancers du poumon et des VADS sont rares (figures I-3 et I-4).

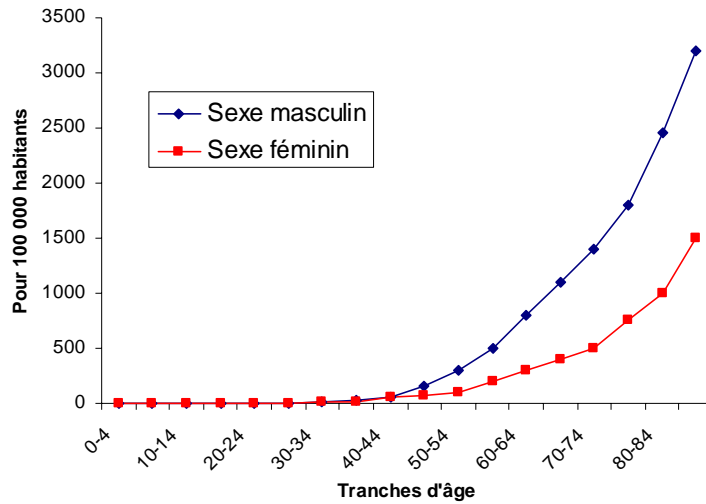


Figure I-2 : Evolution de la mortalité dues aux cancers en fonction de l'âge.

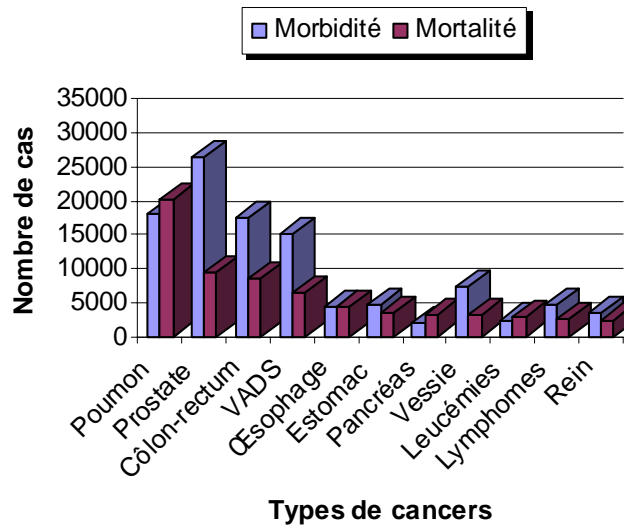


Figure I-3 : Distribution de la mortalité et de la morbidité cancéreuse chez les hommes en France en 1990.

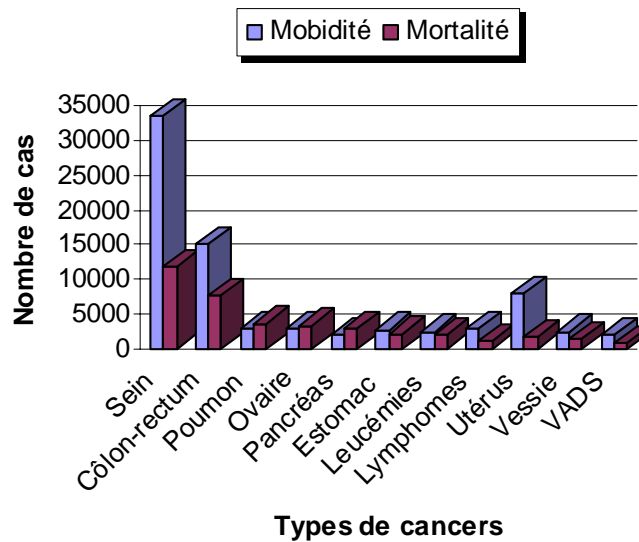


Figure I-4 : Distribution de la mortalité et de la morbidité cancéreuse chez les femmes en France en 1990.

La morbidité et la mortalité dues aux cancers ont varié au cours des époques. Les cancers ont la réputation d'être une maladie des temps modernes, pourtant des momies ont été découvertes avec la présence de tumeurs malignes. Au XVII^e siècle, l'entourage d'Anne d'Autriche chez les religieuses connaissait la fréquence des cancers du sein. Il est vrai toutefois que la mortalité due aux cancers est en augmentation constante à notre époque. Elle était en France de 350 pour 100 000 habitants en 1950 et de 420 pour 100 000 habitants en 1990. Cette augmentation provient d'une part du vieillissement de la population française et d'autre part de l'augmentation continue de la consommation de tabac. Au XXI^e siècle, les trois principales causes de décès seront cardio-vasculaire, cancéreuse et tabagique (cette dernière favorisant les deux premières).

2. Les porphyrines et leurs dérivés

2.1. Structures

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques à 18 électrons π constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthines (figure I-5). Cette forte conjugaison implique une coloration et une bonne stabilité de ces composés. Pour cette raison, ces macrocycles sont très stables et colorés. En outre, les porphyrines se comportent comme des diacides ou des dibases, et elles peuvent par conséquent être métallées par presque tous les métaux de la classification périodique. Dans le premier cas, la porphyrine est dite "base libre", dans le second cas, elle est dite "métallée". Elles peuvent être partiellement réduites (une double liaison) pour former des chlorines. Lorsque deux doubles liaisons sont hydrogénées, on parle alors de bactériochlorines ou d'isobactériochlorines.

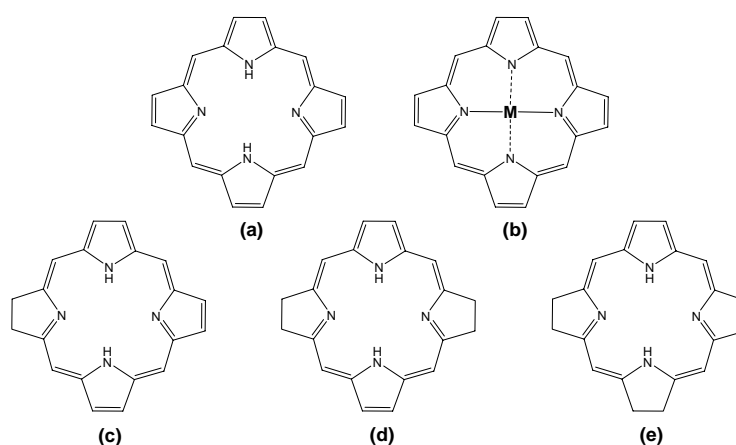


Figure I-5 : Les différentes classes de porphyrines. (a) porphyrine base libre ; (b) porphyrine métallée, (c) chlorine ; (d) bactériochlorine ; (e) isobactériochlorine.

Hans Fischer⁶ a présenté, dans les années trente, le premier système de nomenclature des porphyrines qui reste encore utilisé pour les porphyrines substituées en position β -pyrroliques. Mais la complexité des porphyrines synthétisées augmentant, une nouvelle nomenclature systématique a été introduite en 1979 (et finalisée en 1987) où tous les carbones ainsi que les azotes du macrocycle sont numérotés (figure I-6).⁷

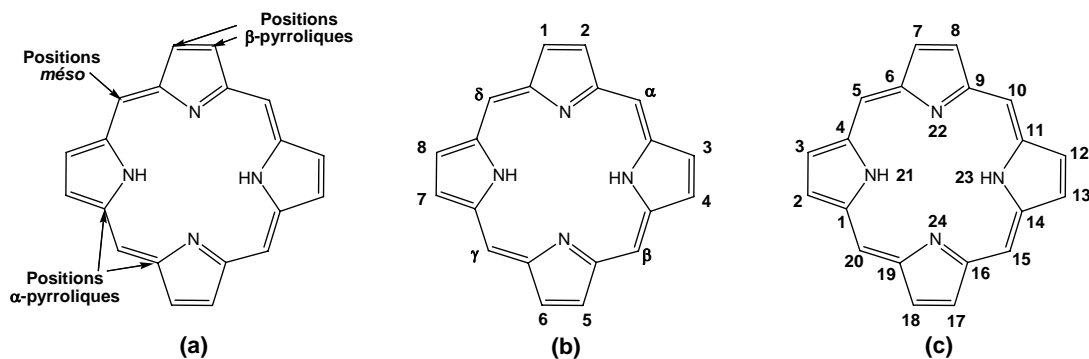


Figure I-6 : (a) Appellation générale ; (b) nomenclature de Fischer ; (c) nomenclature systématique.

Les positions des méthines sont appelées “*méso*” ; elles sont notées α , β , γ et δ dans la nomenclature de Fischer et portent les numéros 5, 10, 15 et 20 dans la nomenclature systématique. Avec cette dernière, les carbones α et β pyrroliques sont désignés respectivement par les numéros 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 ; les quatre atomes d’azote sont numérotés de 21 à 24. La nomenclature de Fischer, numérote les carbones β -pyrroliques de 1 à 8 alors que les carbones α -pyrroliques et les atomes d’azote n’ont n’en pas. En ce qui concerne les porphyrines β -pyrroliques, les substituants peuvent être disposés de différentes manières autour du macrocycle. Fischer a appelé ces structures des “isomères types” et les a nommées I, II, III, IV, etc. Lorsque par exemple la porphyrine possède 3 substituants différents, il y a 15 façons de les combiner menant ainsi à 15 isomères types (I – XV). L’un d’entre eux, l’isomère de type IX, représente le motif de substitution des porphyrines existant dans la nature (protoporphyrine IX).

Par ailleurs, les substituants portés par les carbones *méso*, comme par exemple les groupements phényle, 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 $\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\beta\alpha\alpha$, $\alpha\beta\alpha\beta$, $\alpha\beta\beta\alpha$ (figure I-7).

⁶ L.R. Milgrom ; *Oxford Univ. Press*, 1997, 249-260.

⁷ J.K.M. Sanders ; *The Porphyrins Handbook*, vol. III, 1999.

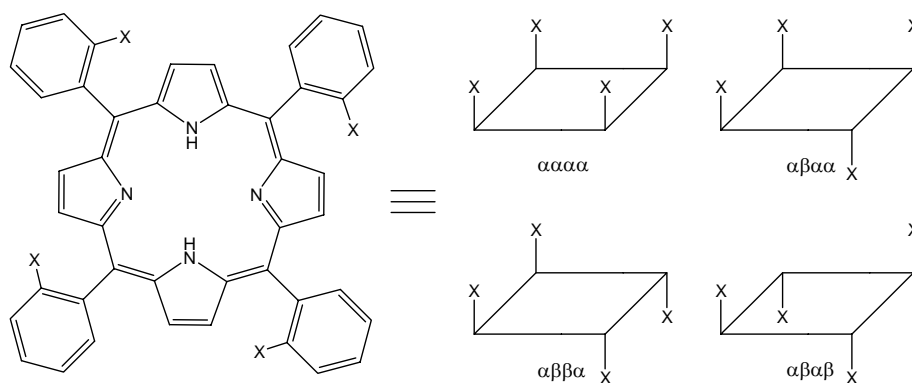


Figure I-7 : Représentation schématique des atropoisomères de *méso*-arylporphyrines.

2.2. Caractérisation des porphyrines et des chlorines

2.2.1. Spectroscopie UV-visible

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 (figure I-8). Ils se composent d'une bande intense ($\epsilon > 100000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre bandes de moindre intensité aux plus grandes longueurs d'ondes (entre 500 et 680 nm) nommées bandes Q.

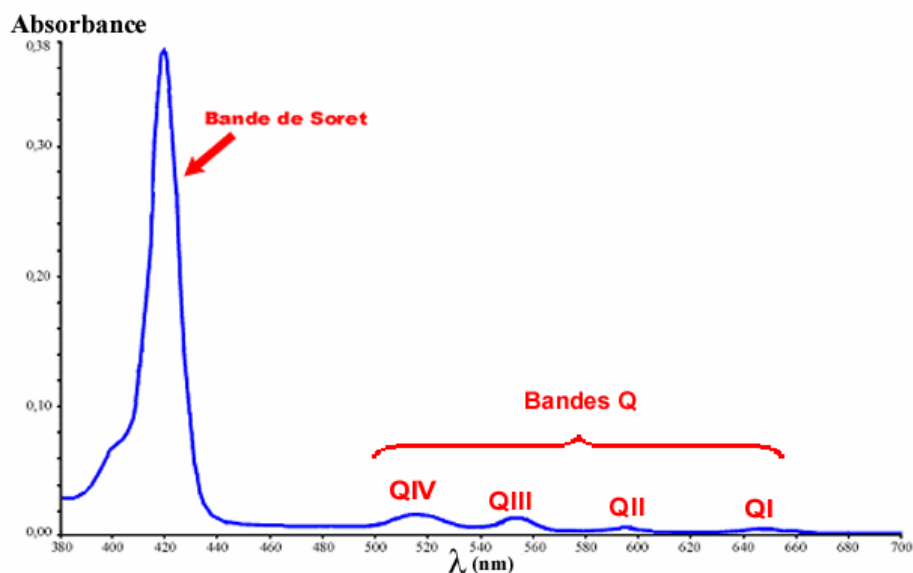


Figure I-8 : Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base libre.

La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible aux variations de structure, 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* (figure I-9).⁹ 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 *méso*-arylporphyrines. Ces dernières portant un substituant saturé (par exemple une chaîne alkyle) auront généralement un spectre de type *phyllo*. La présence de groupements riches en électrons π 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 pyrroles opposés conduit à un spectre de type *oxorhodo*.

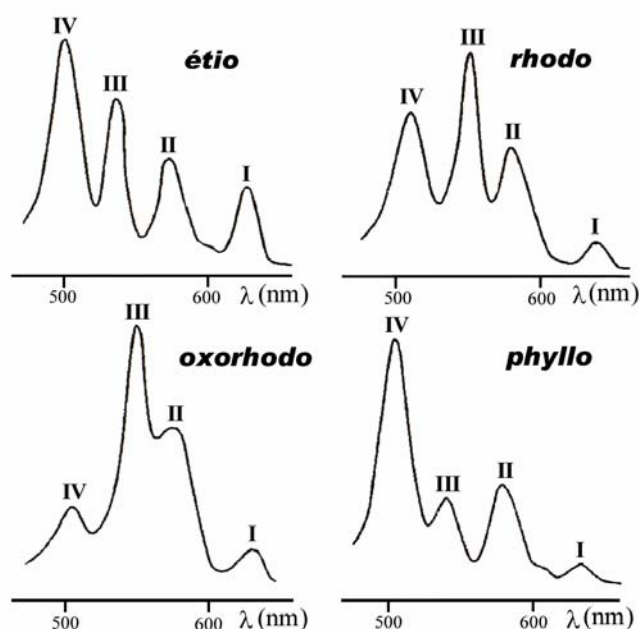


Figure I-9 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres.

Dans le cas des porphyrines métallées ou protonées, on observe toujours la présence de la bande de Soret, mais le nombre de bandes Q est réduit à deux ou trois. Ces dernières sont nommées α et β en partant des grandes longueurs d'onde (figure I-10). Dans ce cas, la substitution du macrocycle a très peu d'influence sur les intensités relatives des bandes α et β . En revanche, la nature de l'ion métallique fixé, 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 le complexe plan, stable avec la porphyrine (c'est le cas

⁸ H. Fischer, H. Orth ; *Die Chemie des Pyrrols*, vol. I-III, 1934-1940.

⁹ H.B.F. Dixon, A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K.L. Loening ; *Pure Appl. Chem.*, 59(6), 1987, 779-832.

par exemple du Ni(II) ou encore du Zn(II)). Par contre, lorsque le métal peut être facilement remplacé par deux protons, on observe un rapport $\alpha/\beta < 1$ (par exemple avec du Cd(II)).

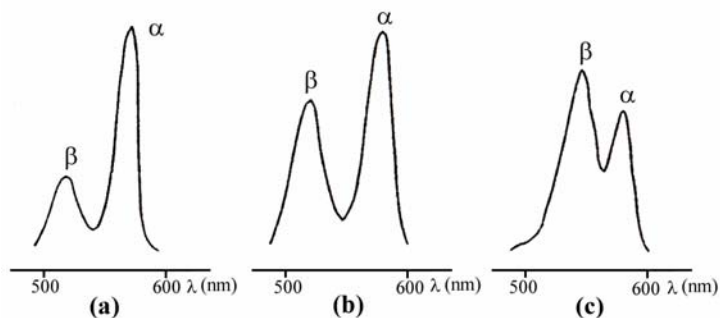


Figure I-10 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : (a) Ni(II) ; (b) Zn(II) ; (c) Cd(II).

Le spectre d'absorption des chlorines montre des bandes d'absorption différentes de celles des porphyrines. La bande QI est beaucoup plus intense chez la chlorine et la couleur change passant du pourpre au vert (figure I-11). L'intensité de la bande QI est encore plus importante dans le cas des bactériochlorines.

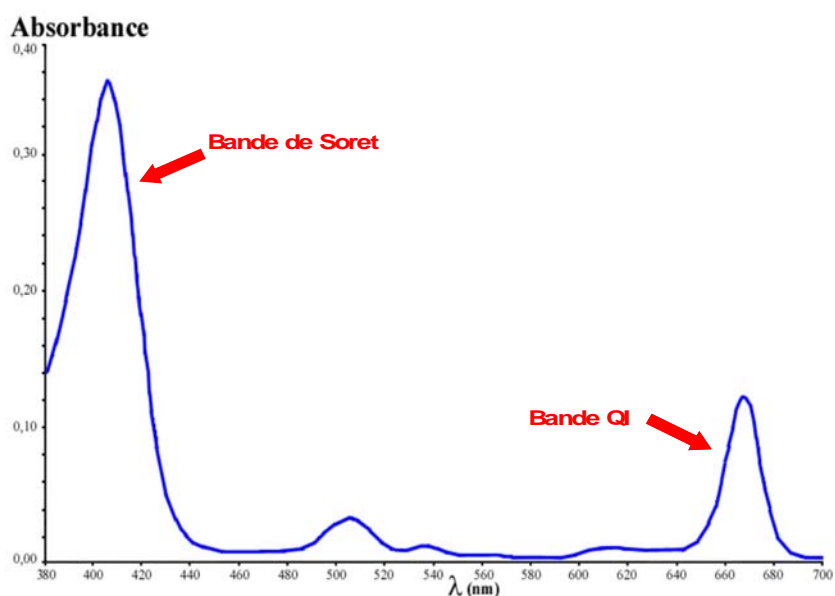


Figure I-11 : Spectre UV-visible caractéristique d'une chlorine.

2.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

a) Spectroscopie RMN du proton (RMN ¹H)

La résonance magnétique nucléaire du proton appliquée aux macrocycles porphyriniques fournit des spectres très caractéristiques. En effet, le courant de cycle généré par le champ magnétique (imposé par l'appareil) induit un important cône d'anisotropie magnétique dont

l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (figure I-12). Ainsi, les protons à l'intérieur de ce cône sont blindés vers 3 ppm alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont fortement déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm.¹⁰

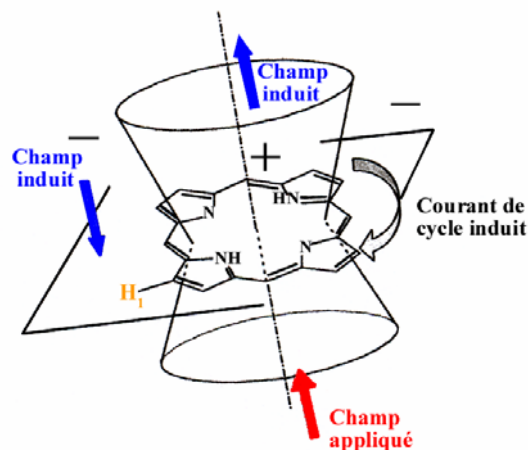


Figure I-12 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine.

Le spectre RMN ^1H de la porphyrine (porphyrine sans aucun substituant), est constitué de 3 singlets 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 méthines (position *méso*). Puisque ces derniers sont liés à des carbones essentiellement déficients en électrons, ils sont plus déblindés que les protons β -pyrroliques. De plus l'unicité des signaux des protons β -pyrroliques s'explique par la tautomérisation des protons NH internes (figure I-13).

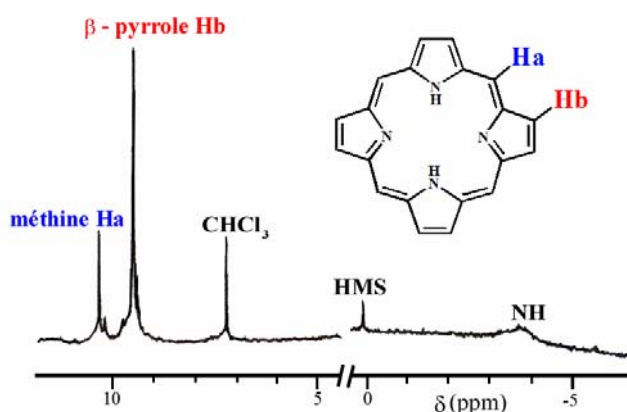


Figure I-13 : Spectre RMN ^1H de la porphyrine dans CDCl_3 .

¹⁰ J.M. Craig ; *The Porphyrins Handbook*, vol. V , K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guilard (Ed.), 1999.

Dans le cas de porphyrines *méso*-substituées, les substituants affectent davantage les déplacements chimiques des protons du macrocycle que dans le cas de porphyrines β -substituées. Il y a un blindage des protons périphériques et un déblindage des protons internes dus à une diminution du courant de cycle. L'introduction d'un métal modifie également sensiblement le spectre. On observe ainsi des variations de déplacements chimiques des protons périphériques (β -pyrroliques ou *méso*) selon la nature, le degré d'oxydation ou le paramagnétisme du métal.

Dans le cas des chlorines, on observe une modification de l'allure du spectre. En effet, l'absence d'une double liaison conduit à l'apparition de signaux plus blindés ($\delta < 5$ ppm) correspondant aux protons du noyau pyrrolique réduit.

b) Spectroscopie RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C)

En RMN du carbone 13, la résonance des noyaux est relativement peu affectée par les courants de cycle mais demeure très sensible aux effets électroniques. Le spectre RMN ^{13}C d'une porphyrine est divisée en trois régions principales : les carbones α -pyrroliques vers 145 ppm, les carbones β -pyrroliques vers 130 ppm et les carbones *méso* entre 120 et 95 ppm. Les carbones α -pyrroliques apparaissent le plus souvent sous la forme de figures élargies et sont donc sensibles à la tautomérie des protons NH internes. Un abaissement à -60 °C ralentit la tautomérie sur l'échelle de temps de la RMN. On observe alors deux signaux très nets correspondant chacun à quatre carbones α -pyrroliques.¹¹

En ce qui concerne le spectre RMN ^{13}C d'une chlorine, on retrouve comme chez les porphyrines, trois régions principales : les carbones α -pyrroliques vers 145 ppm, les carbones β -pyrroliques vers 130 ppm et les carbones *méso* entre 110 et 120 ppm. Cependant, en raison de la réduction d'une double liaison du macrocycle, des signaux supplémentaires sont observés. Ils correspondent aux carbones α -pyrrolines vers 167 ppm et aux carbones β -pyrrolines vers 45 ppm.¹²

¹¹ R.J. Abraham, G.E. Hawkes, M.F. Hudson, K.M. Smith ; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 3, 1975, 204-211.

¹² A.M. Stolzenberg, M.S. Stershic ; *Magnetic Resonance in Chemistry*, 25, 1987, 256-559.

2.2.3. Spectrométrie de masse

Les porphyrines se caractérisent par leur très faible volatilité. Ainsi, les techniques classiques d'ionisation ne sont généralement pas adaptées à leur étude par spectrométrie de masse. Néanmoins, en appliquant une méthode d'ionisation plus douce, comme la technique MALDI, la spectrométrie de masse se révèle être une méthode d'investigation précieuse dans le but de confirmer la structure d'une porphyrine (figure I-14).

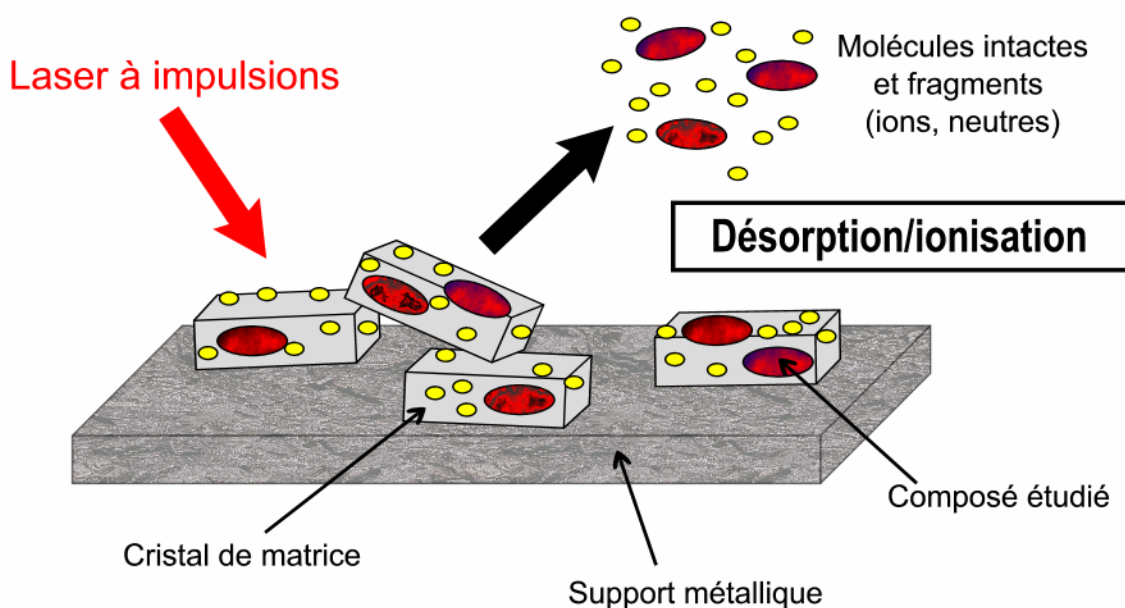


Figure I-14 : Principe de la technique MALDI.

La technique MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization : désorption-ionisation laser assistées par matrice) permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes à hauts poids moléculaires. Le produit 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 lasers 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 conduisant 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 $[M+H]^+$, $[M-H]^+$ ou peuvent être issus de processus de cationisation $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. 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. Même si l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) est une matrice couramment employée pour l'étude des porphyrines, il existe cependant une gamme assez étendue de composés pouvant être utilisée comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées.¹³

2.3. Méthodes de synthèse des porphyrines

Plusieurs méthodes sont accessibles pour la synthèse de porphyrines et peuvent être classées en quatre catégories.

i – Les premières *méso*-tétraarylporphyrines ont été synthétisées par Rothemund¹⁴ dès 1935 en faisant réagir le benzaldéhyde et le pyrrole dans le méthanol. La *méso*-tétraméthylporphyrine a ainsi été obtenue avec de très faibles rendements. Dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant un nombre varié d'aldéhydes, il a synthétisé diverses porphyrines portant comme substituants des groupes propyls, butyls ou phényles. En 1941, le même auteur améliore ces très faibles rendements en faisant réagir dans une ampoule scellée les mêmes réactifs à 220°C.¹⁵ Il a obtenu la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement voisin de 5% (figure I-15).

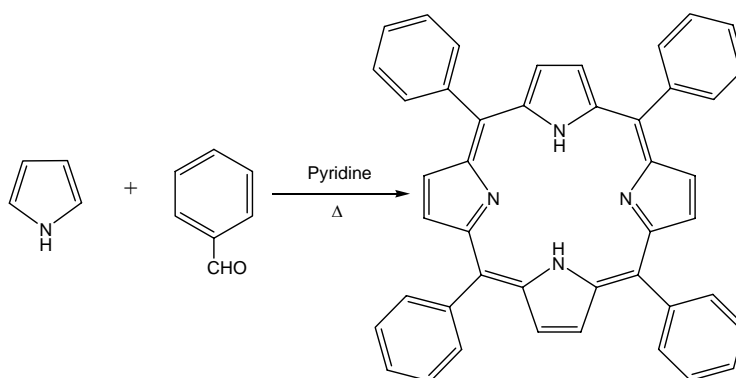


Figure I-15 : Méthode de Rothemund appliquée à la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine.

¹³ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp ; *Int. J. Mass. Spect. Ion. Proc.*, 78, 1987, 53-68.

¹⁴ P. Rothemund ; *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1935, 2010-2011.

¹⁵ P. Rothemund, A.R. Menotti ; *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1941, 267-270.

Calvin et coll.¹⁶ ont montré qu'il était possible de doubler le rendement dans les mêmes conditions en ajoutant au milieu réactionnel de l'acétate de zinc et ils sont parvenus à synthétiser la *méso*-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc avec un rendement proche de 11%. En 1967, Alder et Longo¹⁷ ont amélioré de manière significative la synthèse des porphyrines par condensation d'aldéhyde et de pyrrole dans l'acide propanoïque à reflux dans un réacteur ouvert à l'air libre. Ils ont ainsi formé la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20%. En 1975, Little et coll.¹⁸ ont adapté cette méthode à la synthèse de *méso*-arylporphyrines non symétriques. Cette méthode dite des "aldéhydes mixtes" consiste à condenser dans l'acide propanoïque à reflux du pyrrole et deux aldéhydes différents (figure I-16).

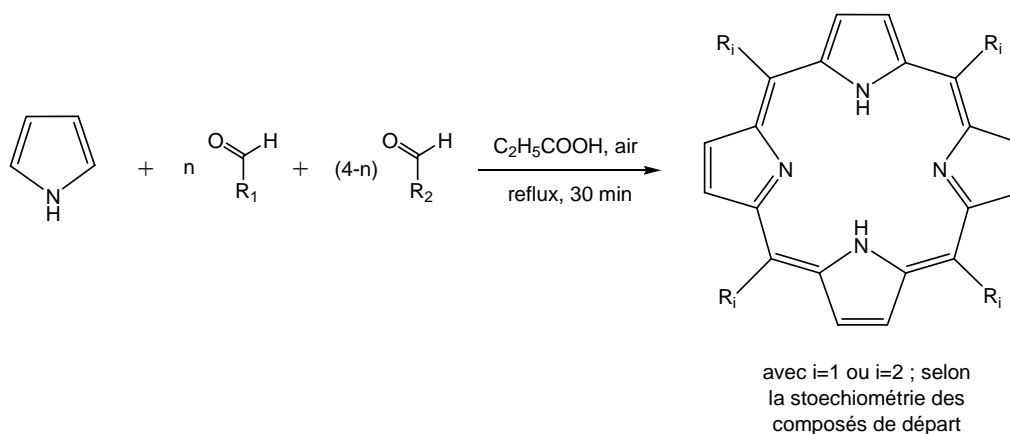


Figure I-16 : Méthode dite des aldéhydes mixtes.

En fonction des proportions de réactifs employées, la réaction conduit à la formation de porphyrines substituées par un, deux, trois ou quatre groupements identiques. En pratique, le rendement en porphyrine n'excède jamais 7% et l'existence de réactions de polymérisation du pyrrole au cours des synthèses implique dans bien des cas de fastidieuses étapes de purification chromatographique. Néanmoins, la méthode de Little reste couramment employée pour la synthèse de porphyrines et celles-ci peuvent être facilement isolées par cristallisation.

Par la suite, Rocha-Gonsalvès¹⁹ et Lindsey²⁰ ont développé une méthode permettant de préparer des porphyrines dans des conditions de réactions douces et à température ambiante.

¹⁶ R.H. Ball, G.D. Dorough, M. Calvin ; *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1946, 2278-2281.

¹⁷ A.D. Alder, F.R. Longo, J.D. Finarelli ; *J. Org. Chem.*, 32(2), 1967, 476-481.

¹⁸ R.G. Little, J.A. Anton, P.A. Loach, J. Ibers ; *J. Heterocycl. Chem.*, 12(2), 1975, 343-349.

¹⁹ A.M. Rocha-Gonsalvès, M.M. Pereira ; *J. Heterocycl. Chem.*, 22, 1985, 931-937.

²⁰ J.S. Lindsey, H.C. Hsu, I.C. Shreiman ; *Tetrahedron Lett.*, 27(41), 1986, 4969-4970.

Elle consiste à condenser du pyrrole et de l'aldéhyde par catalyse acide (acide trifluoroacétique ou BF_3OEt_2), en l'absence d'oxygène. Il se forme d'abord du porphyrinogène, et ce dernier est ensuite converti *in-situ* en porphyrine, par traitement avec un oxydant comme la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) ou le *p*-chloranil (figure I-17). Le rendement obtenu pour la formation de la H_2TPP est de 46%. Il est dans ce cas significativement augmenté par rapport aux méthodes précédentes. Cependant cette méthode s'est avérée extrêmement dépendante des conditions opératoires (solvant, catalyseur de condensation et d'oxydation, structure des substrats) et elle nécessite une concentration faible en réactifs ($<10^{-2}\text{M}$).

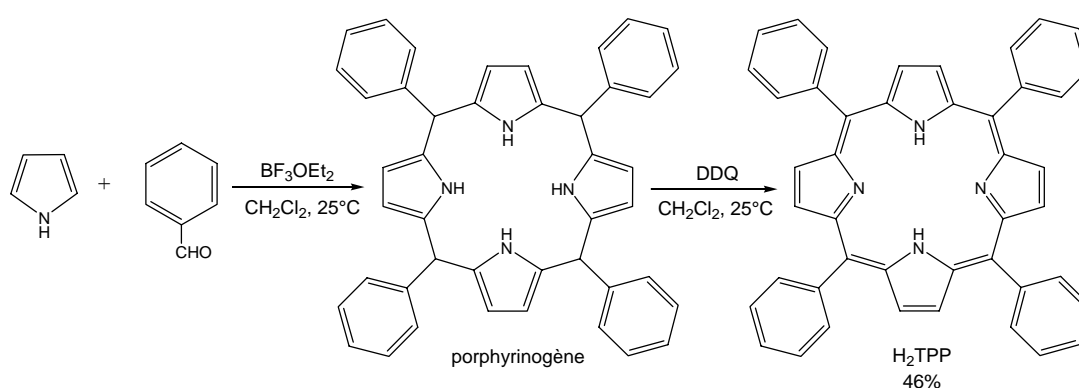


Figure I-17 : Méthode de Lindsey.

ii – La seconde stratégie de synthèse des porphyrines correspond au couplage de deux intermédiaires dipyrroliques. Cette méthode est communément appelée la “synthèse 2+2” (figure I-18).

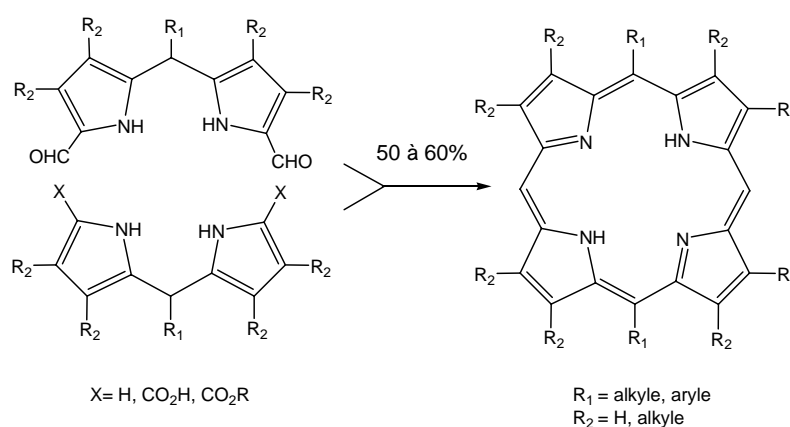


Figure I-18 : Synthèse 2+2.

Fisher²¹ a été le premier à mettre en œuvre cette stratégie. Sa méthode de synthèse consiste à utiliser des dipyrrométhanés qui, après condensation dans l'acide succinique pendant plusieurs heures à l'air, donnent la porphyrine attendue. En adaptant la méthode de Fischer, Smith²² a préparé l'étioporphyrine et la coproporphyrine I avec des rendements de l'ordre de 60%. En 1960, MacDonald et coll.²³ ont montré que la condensation de 5,5'-diformyldipyrrométhanés avec des dipyrrométhanés 5,5' non substitués, conduit à une seule porphyrine avec 50 à 60% de rendement. Cette méthode n'est valable que lorsque l'un des dipyrrométhanés est symétrique afin d'éviter les problèmes d'isomérisation. Les limites de la synthèse des porphyrines par ce type de réaction 2+2 ont conduit à chercher une autre voie de synthèse.

iii – La troisième méthode est la condensation d'un tripyranne, dont les positions 1 et 14 sont non substituées, avec un 2,5-diformylpyrrole. Cette nouvelle approche a été nommée “synthèse 3+1”. Grâce à cette stratégie, il est possible de former des porphyrines β -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole avec des rendements voisins de 35% (figure I-19).²⁴

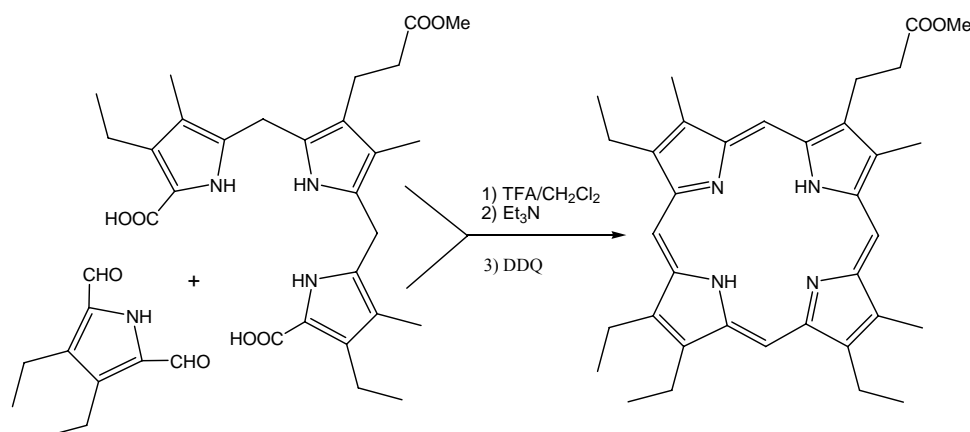


Figure I-19 : Synthèse 3+1.

iv – Enfin, la quatrième méthode consiste à modifier les macrocycles naturels. Ainsi, à partir de la protohème ou de la chlorophylle a et b, de nombreux dérivés porphyriniques ont été élaborés.

²¹ H. Fisher, A. Stern ; *Die Chemie des pyrrols*, vol. 2 Part 2, Akad Verlag, Leipzig, 1940.

²² K.M. Smith, F. Eivazi ; *Journal of organic Chemistry*, 44, 1979, 2591-2597.

²³ G.P. Arsenault, E. Bullock, S.F. MacDonald ; *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1960, 4384-4389.

²⁴ J.L. Sessler, J.W. Gende, A. Urbach, P. Sanson ; *Synlett*, 2, 1996, 187-188.

2.4. Obtention de porphyrines naturelles

La protohème, nommée également chloroporphyrine de fer(III), est le dérivé porphyrinique le plus abondant chez les animaux. Elle dérive de l'hémoglobine et de la myoglobine. La méthode classique de Fischer²⁵ est généralement utilisée afin d'isoler la protohème à partir du sang.

La protoporphyrine IX, l'hématoporphyrine IX ou encore la *méso*-porphyrine IX sont quelques exemples de porphyrines préparées par modification de la protohème (figure I-20).

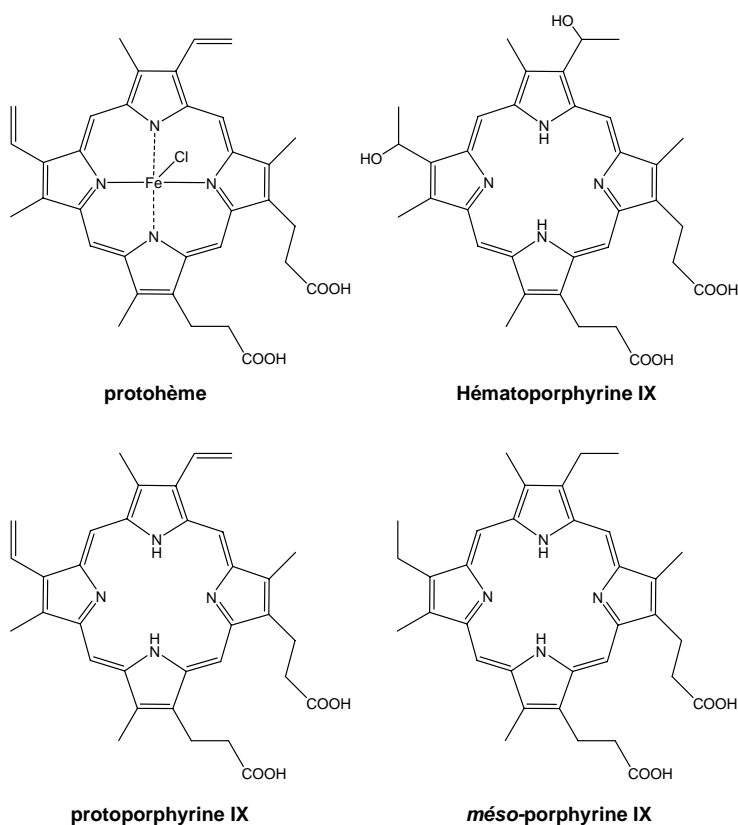


Figure I-20 : Structure de la protohémine et ses dérivés.

Les chlorophylles a et b, qui peuvent être extraites des feuilles des végétaux, sont également à la base de la synthèse d'un très grand nombre de dérivés porphyriniques (figure I-21). Ainsi la méthanolyse de la chlorophylle fournit la chlorine-e6 triméthyle ester. De même, le traitement de la chlorophylle a, suivant diverses conditions opératoires, suivi d'une

²⁵ H. Fischer ; *Org. Synth.*, 3, 1955, 442-443.

méthanolyse, a permis d'obtenir la phylloporphyrine XV diméthyle ester et la pyrroporphyrine XV diméthyle ester.

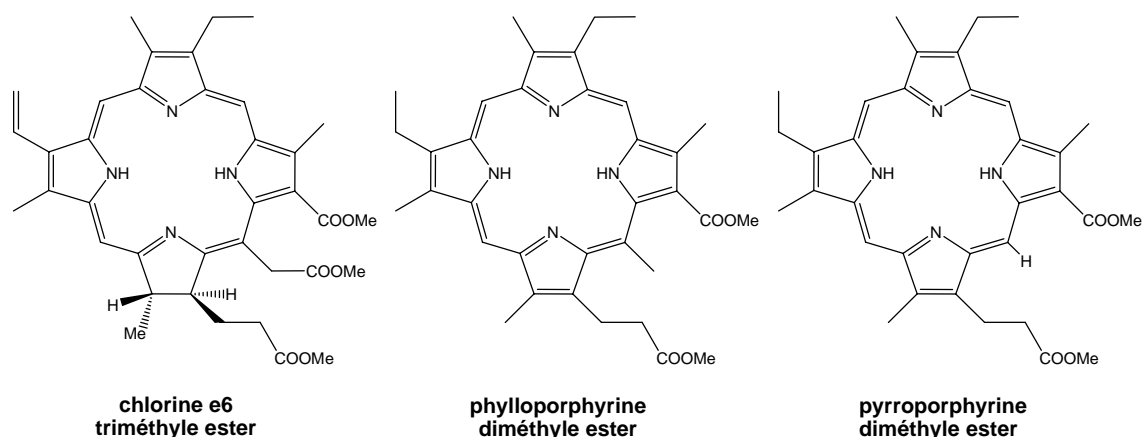


Figure I-21 : Macrocyces tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a.

2.5. Méthode de synthèse des chlorines

Devant la faible stabilité de la chlorophylle a, de nombreux groupes de recherches se sont penchés sur la synthèse de chlorines synthétiques. Dans les années 40, Fischer²⁶ a décrit l'oxydation des octa-alkylporphyrines par OsO_4 afin d'obtenir la dihydrochlorine correspondante. Cette méthode permis à Brückner et Dolphin²⁷ de synthétiser la *méso*-2,3-dihydroxytétraphénylchlorine (figure I-22).

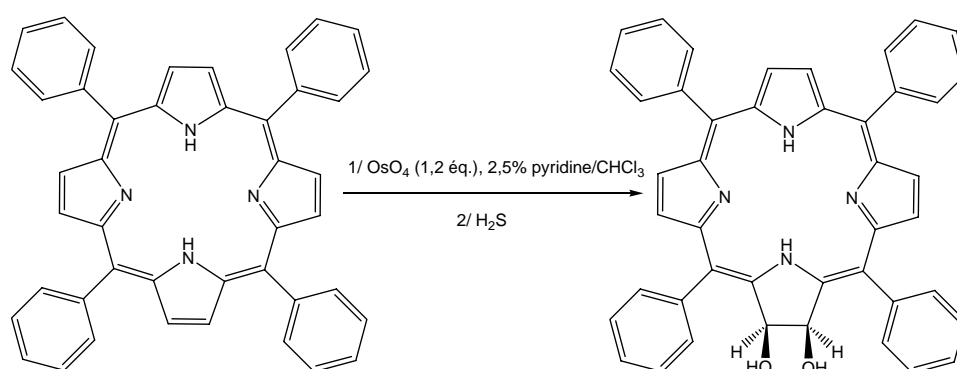


Figure I-22 : Synthèse de la *méso*-2,3-dihydroxytétraphénylchlorine.

²⁶ H. Fisher, H. Pfeiffer ; *Liebigs Ann. Chem.*, 556, 1944, 131-153.

²⁷ C. Brückner, D. Dolphin ; *Tetrahedron Lett.*, 36(19), 1995, 3925-3928.

Une autre voie de synthèse des chlorines a été réalisée par Whitlock et coll.²⁸ avec la méthode de réduction des porphyrines par les diimides. Ils ont ainsi réduit l'octaéthylporphyrine en octaéthylchlorine, avec le *p*-toluenesulfonylhydrazine. Ce procédé a permis à Bonnett et coll.²⁹ de synthétiser la *méso*-tétrahydrophénylchlorine (figure I-23).

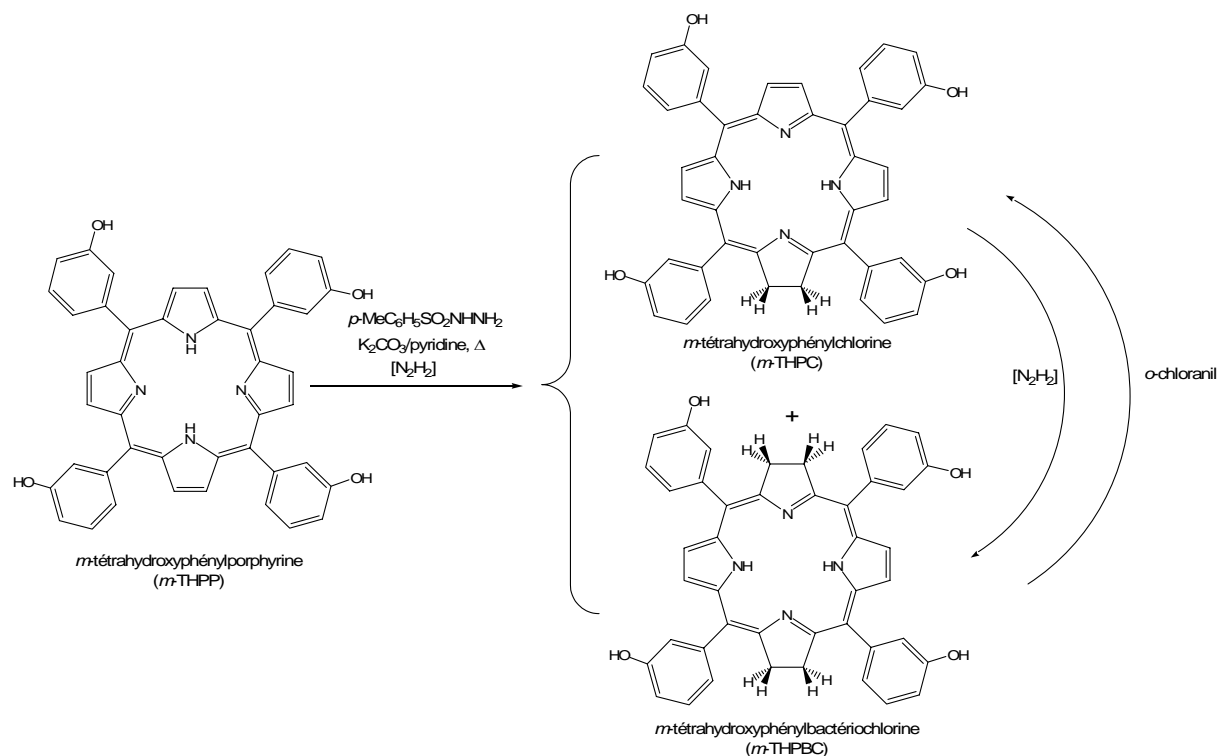


Figure 1-23 : Synthèse de la *méso*-tétrahydrophénylchlorine (*m*-THPC).

3. La photothérapie dynamique

Classiquement, les cancers sont traités par la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, ou bien encore par la biothérapie. Une nouvelle méthode développée depuis quelques années, la photothérapie dynamique, présente des résultats prometteurs et pourrait devenir un traitement efficace de certains cancers dans les années à venir.

3.1. Rappels historiques sur la Photothérapie dynamique (PDT)

L'utilisation de la lumière et d'un photosensibilisateur à but thérapeutique remonte aux temps les plus anciens. En effet, le peuple égyptien, il y a 3000 ans, traitait déjà des

²⁸ H.W. Whitlock, R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower ; *J. Org. Chem.*, 33(5), 1968, 2169-2171.

²⁹ R. Bonnet, M.J. Dimsdale, G.F. Stephenson ; *J. Chem. Soc.*, 1969, 564-570.

personnes atteintes du Vitiligo (maladie de la peau caractérisée par une disparition focale des mélanocytes de l'épiderme) grâce à la photothérapie. Les égyptiens appliquaient des feuilles écrasées de persil (plante contenant des psoralènes) sur la zone à traiter, et après l'exposition solaire, il en résultait une photosensibilisation des zones cutanées concernées. Ce traitement aboutissait ensuite à une repigmentation des tâches blanches.

Historiquement, c'est en 1900 qu'a été décrit pour la première fois par Raab³⁰ une utilisation de la photothérapie dynamique (PDT). Il a constaté que le temps de lyse des paramécies par l'acridine orange variait selon l'intensité lumineuse régnant dans le laboratoire. Il a donc découvert que cette molécule était toxique pour ces protozoaires seulement en présence de lumière. Mais le premier essai d'élimination d'une tumeur grâce à photochimiothérapie a été effectué en 1903. Deux médecins Tappenier et Jesionek³¹ utilisèrent de l'éosine et une lumière blanche chez un patient ayant une tumeur maligne cutanée. Haussmann en 1908 et Meyer-Betz en 1913 ont décrit le pouvoir de photosensibilisation d'une porphyrine naturelle, l'hématoporphyrine (provient de l'hème ; Hp). En 1924, Policard,³² en éclairant une tumeur maligne avec une lampe à ultraviolets découvre l'émission d'une fluorescence rouge par la tumeur, caractéristique des porphyrines endogènes. Il s'agit ainsi de la première observation de l'accumulation sélective de porphyrines dans les tumeurs. Puis en 1942, Auler et Banzer³³ notèrent que l'injection d'hématoporphyrine conduisait à son accumulation sélective dans les tumeurs transplantées à des rats. De plus, ils observèrent que l'exposition de ces tumeurs concentrées en porphyrine à une lumière générée par une lampe à quartz provoquait leur nécrose. En 1948, Figge et Weiland,³⁴ ont montré l'affinité de l'hématoporphyrine pour les tissus néoplasiques en mettant en évidence une fluorescence émise au niveau des tumeurs après excitation par une lampe à ultraviolets. Ensuite, Rasmussen-Taxdal³⁵ en 1954, a confirmé chez l'homme l'accumulation de l'hématoporphyrine dans les tumeurs malignes et les tissus lymphatiques. Afin d'améliorer la détection des cancers par fluorescence Lipson et coll.³⁶ ont cherché à optimiser la sélectivité des porphyrines dans les tumeurs. Ils ont proposé un dérivé de l'hématoporphyrine appelé "hématoporphyrine dérivée" (ou HpD), préparé en traitant

³⁰ O. Raab ; *Z. Biol.*, 39, 1900, 524-546.

³¹ H. Tappenier, A. Jesionek ; *Muench. Med. Wochenscher*, 1, 1903, 2042-2050.

³² A. Policard ; *Soc. Biol.*, 91, 1924, 1422-1423.

³³ H. Auler, G. Banzer ; *Z. Krebsforschung*, 53, 1942, 65-68.

³⁴ F.H.J. Figge, G.S. Weiland ; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68, 1948, 640-641.

³⁵ D. Rasmussen-Taxdal, G. Ward, F.H.J. Figge ; *Cancer*, 8, 1955, 78-81.

³⁶ R.L. Lipson, J. Ednard, D. Baldes, A.M. Olsen ; *J. Natl. Cancer Inst.*, 26, 1961, 1-11.

l'hématoporphyrine commerciale par un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique, suivi d'une hydrolyse alcaline. Ce n'est que dans les années soixante-dix, que la photothérapie dynamique prend son essor à la fois expérimentalement et cliniquement grâce aux travaux de Dougherty et coll.³⁷. Cette équipe décrit l'éradication totale de tumeurs mammaires transplantées chez la souris, sans effets secondaires cutanés après action de l'hématoporphyrine dérivée et d'une lumière rouge (une lampe à arc à Xénon). Utilisées seules, les deux composantes se sont avérées inactives. Les travaux de cette équipe ont donc été essentiels dans la progression de cette technique thérapeutique. Après des études de recherche fondamentale, les premiers essais cliniques ont débuté en 1976 et ont été publiés par Dougherty³⁸ en 1978. Il rapporta le traitement de lésions tumorales cutanées et sous-cutanées chez 25 patients par photochimiothérapie à l'HpD, avec des résultats très encourageants. Il utilisa dans un premier temps une lampe à Xénon de 500 Watts comme source lumineuse (émission dans l'Ultra-Violet). Cette technique d'irradiation ne permettait pas une pénétration tissulaire suffisante. Dougherty utilisa pour la première fois le laser afin d'irradier la zone tumorale. En 1983, la fraction active de l'HpD responsable des propriétés photosensibilisantes de ce mélange complexe initial a été identifiée par Dougherty.³⁹ Il montra qu'il s'agissait de l'éther ou l'ester de dihématoporphyrine (DHE ; figure I-24).

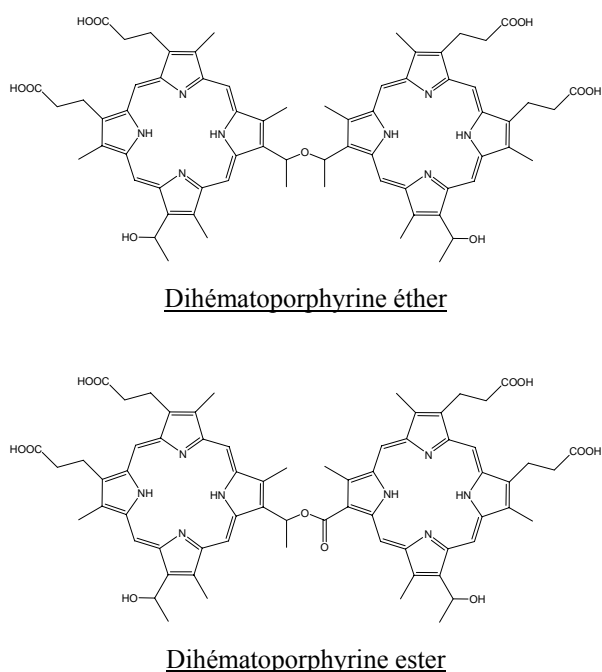


Figure I-24 : Structures de la dihématoporphyrine éther et de la dihématoporphyrine ester.

³⁷ T.J. Dougherty, G. Grindey ; *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 1975, 115-121.

³⁸ T.J. Dougherty, J. Kaufman ; *Cancer Res.*, 38(8),1978, 2628-2655.

³⁹ T.J. Dougherty ; *Plenum Press New York*, 1983, 3.

La fraction purifiée de “l’hématoporphyrine dérivée” est commercialisée sous le nom de Photofrin II[®]. Ce dernier a obtenu l’autorisation de mise sur le marché pour la première fois au Canada, en 1993, dans le but de traiter les cancers papillaires de la vessie. A la fin de l’année 1993, il reçut l’AMM au Japon afin de traiter les cancers précoces du poumon, de l’estomac, de l’œsophage et du col de l’utérus. En 1994, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé l’utilisation du Photofrin II[®] pour le traitement des cancers de l’œsophage et également en Hollande pour les cancers du poumon. En France, ce photosensibilisateur a obtenu l’autorisation de mise sur le marché en 1996, pour le traitement des rechutes des cancers bronchiques et des cancers de l’œsophage. Depuis la fin des années 70, aux Etats-Unis, au Japon et Europe, plusieurs milliers de patients ont été traités par la photothérapie dynamique. Les résultats obtenus sont très encourageants sur une large variété de tumeurs tels que le cancer de la peau, du poumon, de l’œsophage, de la vessie, de l’estomac. Les expériences cliniques montrent que le traitement est peu traumatisant et peu agressif.

Durant ces dernières années, le nombre d’équipes scientifiques ou cliniques travaillant dans le domaine de la photothérapie dynamique ne cesse de croître. De nouvelles sources de lumières se sont développées et des photosensibilisateurs de deuxième génération plus efficaces que l’hématoporphyrine ont été testés. Les études cliniques humaines qui se multiplient actuellement se réalisent en phase I, II et III. La photothérapie a donc un avenir certain et elle n’en est qu’à ses débuts.

3.2. Mécanisme de la photothérapie dynamique (PDT)

La photothérapie dynamique (PDT) ou photochimiothérapie (PCT) à visée anticancéreuse est une innovation thérapeutique originale et relativement récente. Elle repose sur un principe séduisant, la destruction des cellules tumorales au sein d’un individu tout en respectant les tissus sains avoisinants. Elle utilise une substance appelée photosensibilisateur ayant la propriété de se fixer sélectivement sur les cellules néoplasiques, ou d’être retenue par elles. La photothérapie dynamique comprend deux aspects distincts :

- la thérapeutique : une fois introduit dans les tissus néoplasiques, le photosensibilisateur va réagir avec la lumière en induisant des réactions chimiques oxydatives entraînant des altérations cellulaires irréversibles, aboutissant à la nécrose du tissu.

- le photodiagnostic : lorsque le photosensibilisateur est excité par une lumière de longueur d'onde appropriée, il émet une fluorescence. L'analyse de cette fluorescence permet ainsi de détecter avec précision des lésions néoplasiques avec une sensibilité supérieure à celle des moyens d'investigation actuellement disponibles.

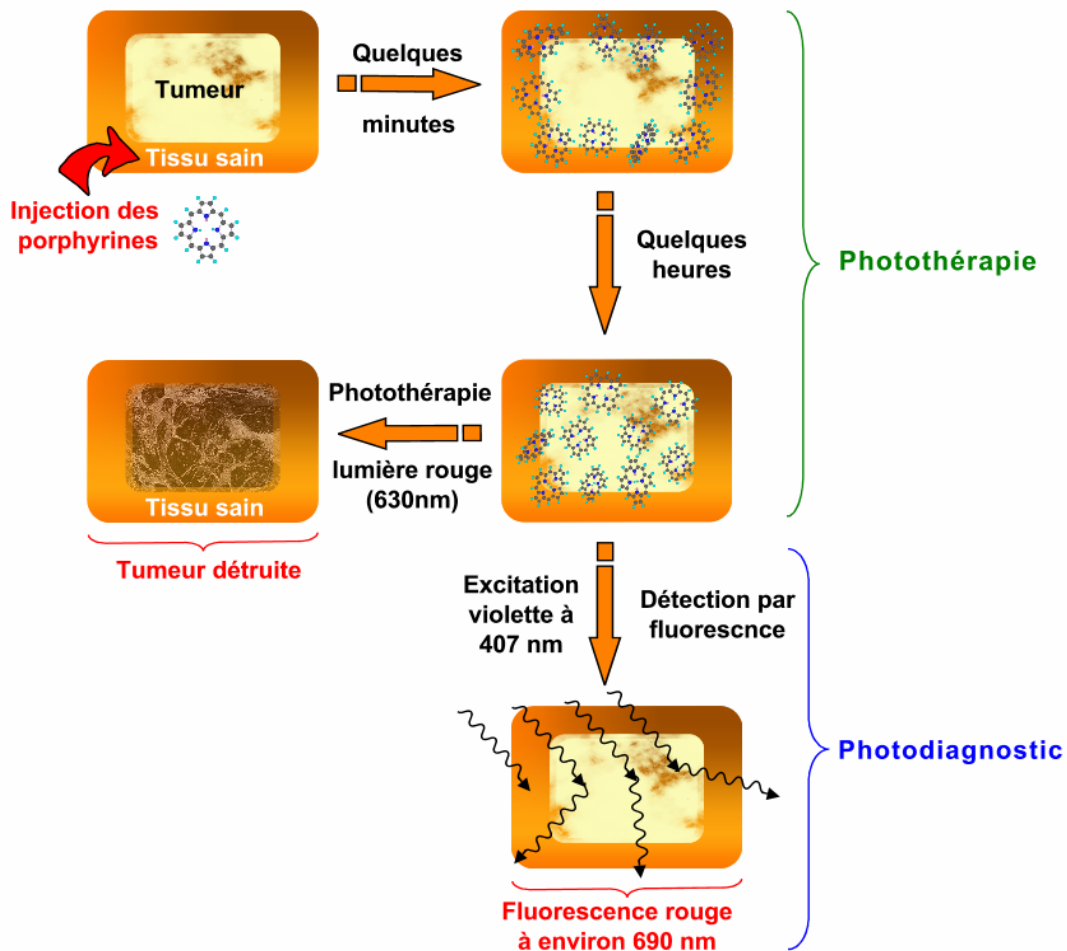


Figure I-25 : Principe de la photothérapie dynamique avec ses deux composantes : la thérapeutique et la photodétection.

La figure I-25 schématise le principe général de la thérapie photodynamique avec ses deux composantes ; la thérapeutique et la photodétection. Dans un premier temps, le photosensibilisateur est injecté par voie intraveineuse chez le patient, puis après quelques heures il se répartit dans l'organisme. Après deux à trois jours, il est retenu préférentiellement dans les tissus tumoraux. Une exposition à la lumière rouge (630 nm) aboutit après une succession de processus photochimiques à la nécrose ou à l'apoptose des cellules tumorales. Par contre, l'irradiation à la lumière violette à 407 nm, induit l'émission d'une fluorescence rouge (à 690 nm environ) permettant un diagnostic topographique.

Si le principe de la photothérapie dynamique est réellement séduisant, son application pratique se heurte à de nombreuses difficultés. En effet, les différentes réactions responsables de la destruction tumorale sont encore mal connues. Les paramètres de ces réactions (concentration et répartition du photosensibilisateur, température, pH, oxygénation du tissu néoplasique) sont difficiles à apprécier alors que leur détermination est essentielle pour une optimisation du traitement thérapeutique. Par ailleurs, le photosensibilisateur idéal doit répondre à plusieurs critères :

- être totalement inerte et atoxique en absence de lumière,
- avoir un rendement quantique en oxygène singulet élevé afin d'induire des réactions photochimiques importantes,
- avoir une grande sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales afin de respecter les tissus sains avoisinants,
- être de préférence amphiphile. Cette caractéristique va lui permettre de s'incorporer dans les organites cellulaires, hydrophiles comme les lysosomes et hydrophobes comme les mitochondries,
- posséder une absorption optimale dans le rouge entre 650 et 800 nm, là où les tissus sont les plus "transparents" à la lumière,
- avoir une durée de vie plasmatique suffisante.

3.3. Les processus photochimiques

L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ par un photosensibilisateur entraîne son passage du niveau d'énergie fondamental S_0 à un état singulet excité S^* . Il subira alors en un temps très court un processus de conversion interne pour revenir à l'état singulet S_1 . A partir de cet état la molécule rejoint son niveau énergétique fondamental S_0 par différents processus : émission de fluorescence ou conversion intersystème.

Le photosensibilisateur à l'état singulet excité $^1P^*$ peut conduire à l'état triplet $^3P^*$ par conversion intersystème. Cet état à une durée de vie plus longue que celle de l'état singulet (10^{-3} secondes à quelques secondes). Cette durée de vie plus importante permet ainsi au photosensibilisateur de réagir avec d'autres molécules environnantes suivant deux types de réactions dites de type I et de type II. Le photosensibilisateur perd ainsi son excédant d'énergie et revient finalement à son état fondamental (figure I-26).

L'émission de fluorescence est utilisée dans un but diagnostique afin de repérer la tumeur de façon précise et dans le but de délimiter la zone de traitement. Par contre, la conversion intersystème est utilisée dans un but thérapeutique suivant les réactions de type I et II :

- Au cours de la réaction de type I, le sensibilisateur à l'état triplet excité peut réagir avec l'oxygène moléculaire ou des substrats tels que les lipides par transfert d'hydrogènes ou d'électrons afin de produire des radicaux. *In vivo*, les processus secondaires sont complexes et peuvent impliquer de nombreuses espèces réactives.

- la réaction de type II, implique le transfert de l'énergie d'excitation vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour produire une forme réactive d'oxygène excité qui est l'oxygène singulet. Ce dernier peut alors diffuser sur une courte distance avant sa désactivation vers l'état fondamental, et réagir avec le substrat en attaquant, par exemple, directement certains acides aminés conduisant à l'altération structurale et fonctionnelle de nombreuses protéines membranaires, mais également à la peroxydation des lipides insaturés. Des effets directs ou indirects sur d'autres fonctions cellulaires sont observés comme sur l'ADN.⁴⁰ Il est maintenant couramment admis que l'oxygène singulet est l'agent toxique principal en photothérapie dynamique bien que sa production soit extrêmement difficile à quantifier dans les milieux biologiques.

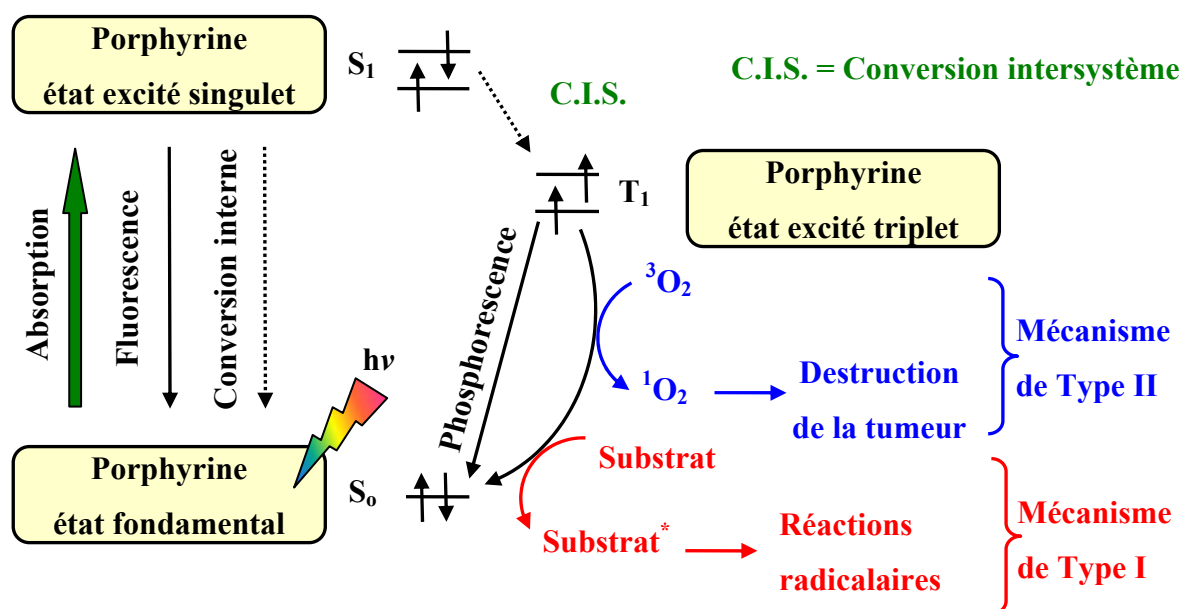


Figure I-26 : Mécanisme photochimique de la PDT.⁴¹

⁴⁰ M.S. Mai, R.P. Allison ; *Arch. Biochem. Biophys.*, 221, 1983, 467-476.

⁴¹ R. Bonnett ; *J. Heterocycl. Chem.*, 39(3), 2002, 455-470.

3.4. Les photosensibilisateurs utilisés en PDT

3.4.1. Les photosensibilisateurs de première génération

a) *L'hématoporphyrine dérivée (HpD)*

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'hématoporphyrine dérivée (HpD) est le mélange de porphyrine qui a été le plus étudié. Son obtention se fait par acétylation du dihydrochlorhydrate d'hématoporphyrine avec un mélange acide sulfurique à 5%/acide acétique, suivie de la neutralisation du produit de la réaction par de la soude (figure I-27).⁴²

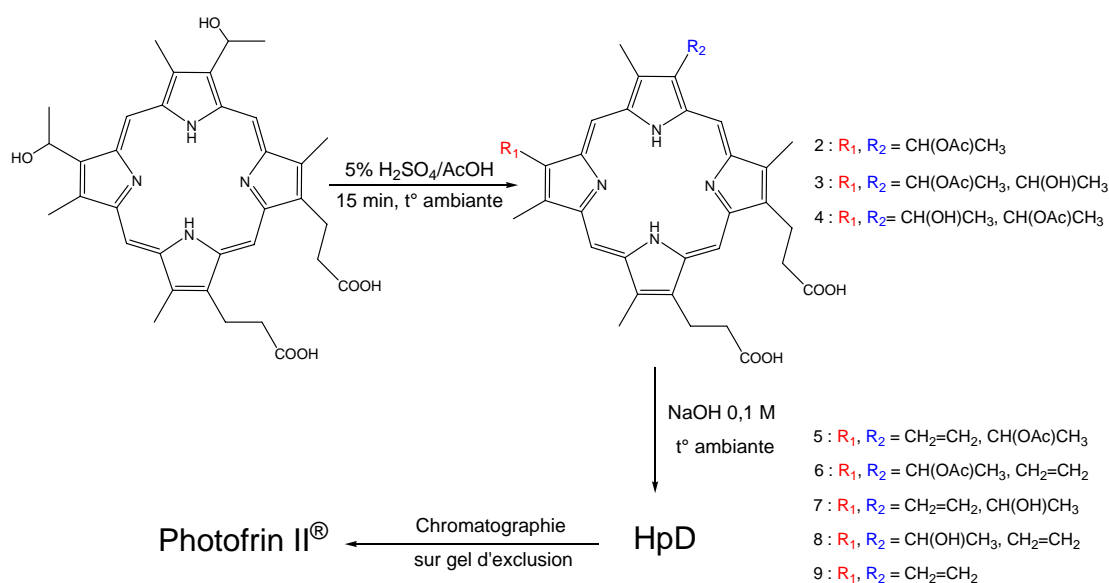


Figure I-27 : Schéma représentant la préparation de l'HpD.

L'étude par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de l'HpD réalisée par Dougherty a montré qu'il s'agissait d'un mélange complexe de diverses porphyrines (figure I-28)⁴³ :

- 20% d'hématoporphyrine (Hp),
- 20 à 30% d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine sous deux formes isomériques (HvD1 et HvD2),
- 3 à 5% de protoporphyrine IX (Pp IX),
- 50% des molécules restantes constituent un mélange d'oligomères sous formes d'éthers et/ou d'esters d'hématoporphyrine (cf. figure I-24).

⁴² R. Bonnett ; Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

⁴³ T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(12), 1998, 889-905.

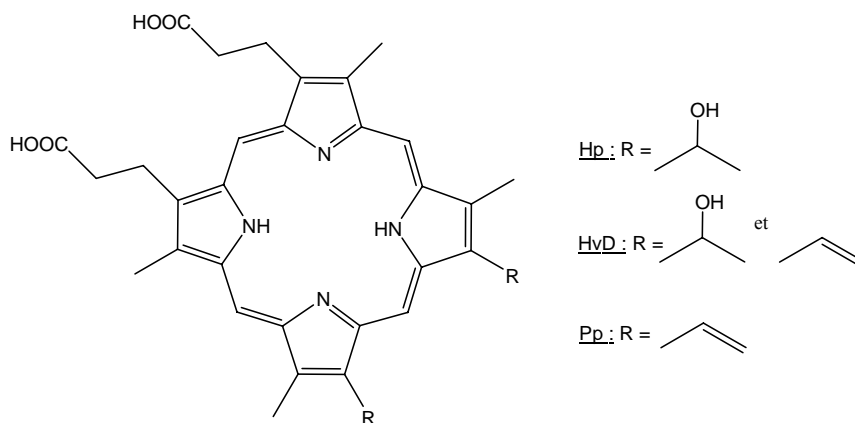


Figure I-28 : Structure de quelques porphyrines contenue dans l'HpD. Hp : hématorporphyrine ; HvD : hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine ; Pp : protoporphyrine IX.

b) Le Photofrin II[®]

Il est élaboré à partir de l'hématorporphyrine. C'est une fraction enrichie à 80-90% en DHE qui est actuellement disponible pour les études cliniques sous le nom commercial de Photofrin II[®] (figure I-11).⁴⁴ Il est cependant important de noter que ce produit est souvent assimilé à la DHE. Il s'agit en fait, comme l'HpD, d'un mélange de très nombreuses porphyrines. Le Photofrin II[®] a une photocytotoxicité efficace, mais il présente certaines limites :

- ses propriétés pharmaceutiques sont difficiles à étudier, comme ce n'est pas un composé chimiquement pur,⁴⁵
- il ne présente qu'une faible absorption à 630 nm. Son utilisation se limite à des traitements de tumeurs superficielles.
- Après injection, il s'accumule dans l'épiderme et s'élimine lentement de l'organisme. Cette propriété est à l'origine de la photosensibilité cutanée des patients. Les photoréactions telles que les brûlures solaires, peuvent être évitées par le port de vêtements de protection et de lunettes. Ces précautions doivent être respectées durant quatre à huit semaines après le traitement.⁴⁶

⁴⁴ T.J. Dougherty ; *Semin. Surg. Oncol.*, 2(1), 1986, 24-37.

⁴⁵ R.K.Pandey, D.F. Majchzycki, K.M. Smith, T.J. Dougherty ; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 19(7), 1990, 405-414.

⁴⁶ M.M. Ressler, R.K. Pandey ; *Chemtech.*, 28(3), 1998, 39-45.

3.4.2. Les photosensibilisateurs de deuxième génération

Les photosensibilisateurs de deuxième génération, présentent par rapport aux porphyrines de première génération plusieurs avantages. Ils sont activés avec une lumière de longueurs d'onde comprise entre 600 et 800 nm, permettant une augmentation de la profondeur de pénétration de la lumière dans le tissu. Par ailleurs, ce sont des composés purs. Ils sont rapidement éliminés par les tissus, limitant ainsi la période de photosensibilisation cutanée.

a) L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) – Levulan[®]

L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est commercialisé par la société DUSA Pharamaceuticals sous le nom de Levulan[®]. (figure I-29).

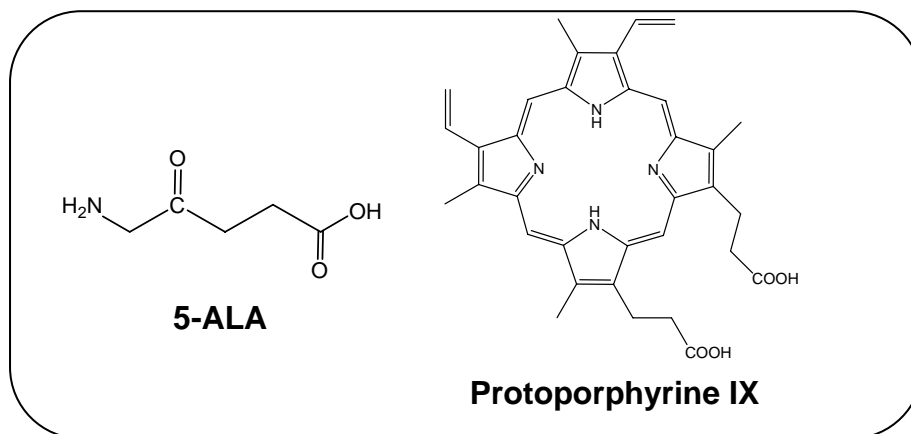


Figure I-29 : Structures de la protoporphyrine IX et de la 5-ALA.

Le 5-ALA est naturellement présent dans l'organisme et il est le précurseur de la biosynthèse de l'hème (figure I-30). Dans la cellule, la biosynthèse de l'hème est régulée très finement, de sorte que les concentrations en Protoporphyrine IX (PpIX) requises pour la photosensibilisation ne soient jamais atteintes physiologiquement. Il existe un système de rétrocontrôle agissant sur le taux de formation du 5-ALA à partir du succinyl-coA et de la glycine, et il peut être aisément contourné en administrant du 5-ALA exogène. Si l'on en introduit des quantités importantes, le 5-ALA est rapidement transformé en Protoporphyrine IX. En revanche, la ferrochélatase ne pourra pas convertir aussi rapidement la protoporphyrine IX en hème, induisant alors des concentrations transitoires de PpIX élevées.

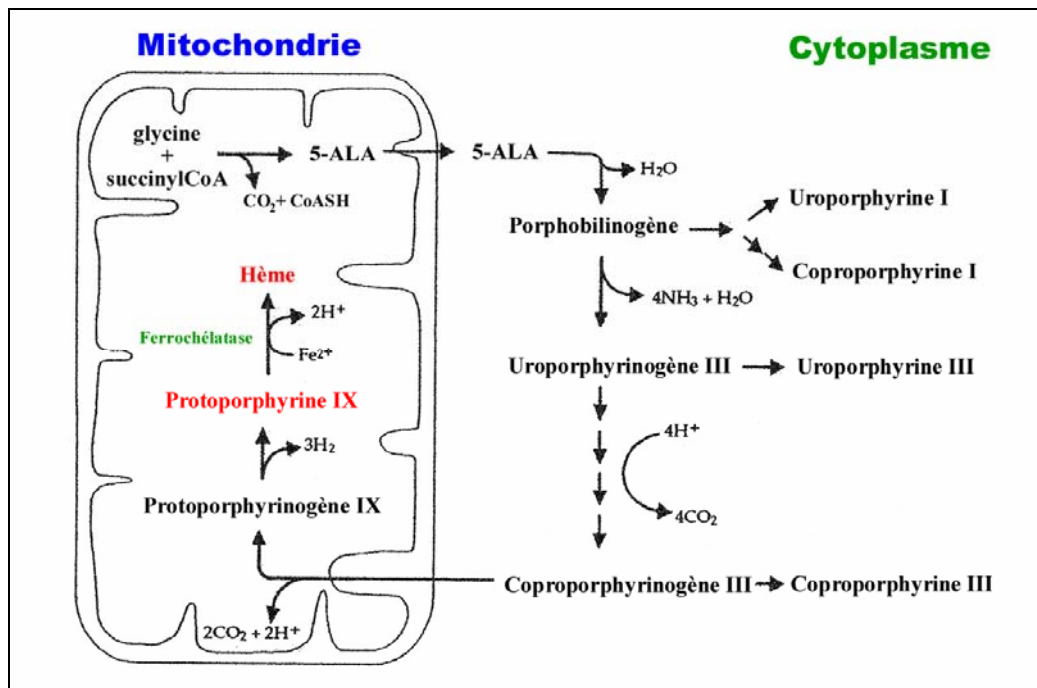


Figure I-30 : Schéma représentant la biosynthèse de l'hème.

Le principal avantage de l'utilisation du 5-ALA est la possibilité de l'administrer par voie topique chez les patients porteurs de lésions superficielles. Appliqué sur ces lésions, le 5-ALA est converti en quelques heures en PpIX et il peut être activé en surface par la lumière. Pour des tumeurs profondes, l'administration de 5-ALA par voie intraveineuse semble être indiquée car la distribution de la PpIX est plus homogène. L'administration de 5-ALA n'engendre pas de photosensibilisation cutanée prolongée au-delà de 24 heures et l'excédent de PpIX est métabolisé rapidement en hème et en bilirudine. Des dérivés du 5-ALA comme l'hexyl et le pentyl ester présentent une meilleure sélectivité tumorale tout en diffusant moins dans la peau saine périphérique. Le méthyl ester de l'ALA a été développé par la société PhotoCure sous le nom de Metvix[®]. Il a fait l'objet d'études cliniques dans le traitement des carcinomes basocellulaires.

b) La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC) – Foscan[®]

La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC) est un photosensibilisateur de seconde génération (figure I-31). Ce composé est un dérivé de porphyrine avec une double liaison réduite. Cette chlorine, également appelée témoporphyne, a été développée par la société Scotia Pharmaceuticals sous le nom de Foscan[®].

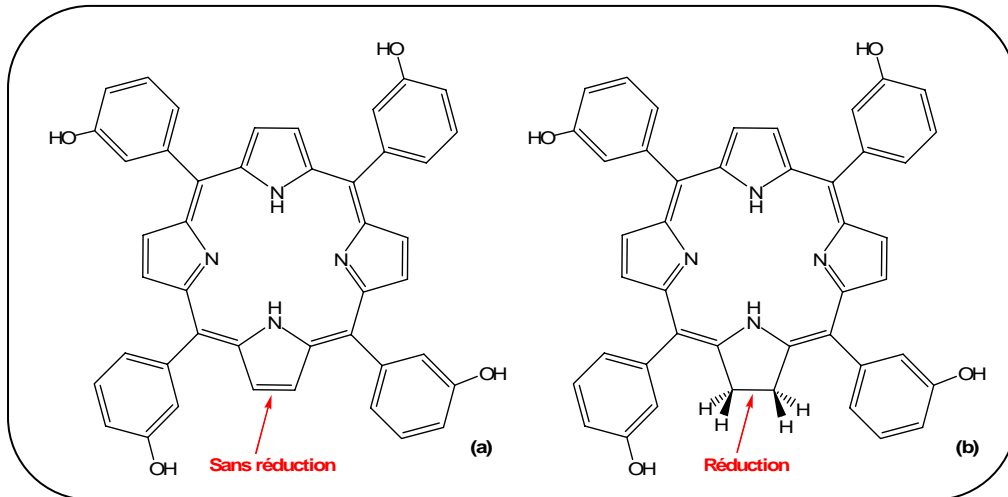


Figure I-31 : (a) Structure de la *m*-THPP ; (b) sa chlorine correspondante (la *m*-THPC).⁴⁷

La *m*-THPC présente deux bandes principales d'absorption. L'une se situe vers 415 nm et l'autre à 650 nm vers le rouge. L'excitation de ce photosensibilisateur aux différentes longueurs d'onde de son spectre d'absorption lui confère la possibilité d'être utilisé en photodiagnostic grâce à son émission de fluorescence dans le rouge (652 nm). L'existence de bandes intermédiaires et notamment d'une bande à 514 nm n'est pas dénuée d'importance. En effet, ce pic peut être utilisé en clinique dans le cas des cancers de l'œsophage. L'utilisation d'une irradiation vers 514 nm, ne pénétrant pas profondément dans les tissus, permet l'activation de la *m*-THPC tout en préservant l'organe à traiter. Par contre ce n'est pas le cas pour un traitement avec une lumière d'excitation à 650 nm. La *m*-THPC fait actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement des tumeurs des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage, des bronches et de l'estomac. Elle présente de nombreux avantages :

- une grande pureté,
- un fort coefficient d'absorption dans le rouge,
- une photocytoxicité élevée,
- un rendement quantique important.

Elle induit une nécrose tumorale à des doses pour lesquelles les porphyrines seraient inefficaces. Cela permet d'utiliser des doses faibles en photosensibilisateur et donc de réduire les risques de photosensibilisation suite à son administration.

⁴⁷ R. Bonnett ; *Biochem. J.*, 1, 1989, 277-280.

c) Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine (BPD-MA) – Visudyne[®]

Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine (BPD-MA) est également un photosensibilisateur de seconde génération qui est dénommé Visudyne[®] et il est développé au Canada par la société QLT (figure I-32). Les benzoporphyrines dérivées (BPD) ont été synthétisées à partir de la protoporphyrine IX.⁴⁸ Les études sur plusieurs analogues de BPD ont montré que le dérivé monoacide avec un cycle benzénique attaché (BPD-MA) est le plus photoactif.

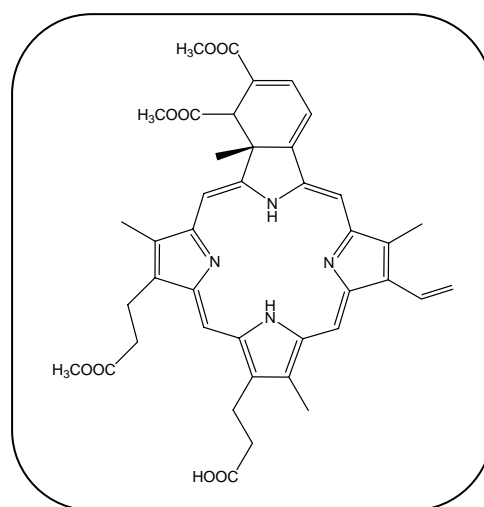


Figure I-32 : Structure de la benzoporphyrine (BPD-MA).

La Visudyne est une chlorure hydrophobe chimiquement stable, présentant une bande d'absorption à 690 nm, et elle possède un bon rendement de formation d'états triplet. Elle montre une accumulation rapide dans les tissus tumoraux permettant une irradiation au bout de 30 à 150 minutes. Elle est rapidement éliminée (par voie hépatique en 24 heures) et la photosensibilité de la peau ne dure que quelques jours. Sa principale utilisation reste la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DLMA) qui est une maladie de la rétine pouvant entraîner la cécité.^{49,50} Cette maladie atteint 1 à 2% des 50-60 ans, et jusqu'à 20% des personnes âgées de plus de 80 ans. Dans la forme la plus grave, des vaisseaux sanguins anormaux prolifèrent sous la rétine. Ces néovaisseaux altèrent la vision centrale et le patient finit par ne plus reconnaître les visages. La BPD-MA va agir en détruisant sélectivement les

⁴⁸ A.M. Richter, E. Waterfield, A.K. Jain ; *Photochem. Photobiol.*, 52, 1990, 495-500.

⁴⁹ S.C. Lin, C.P. Lin, J.R. Feld ; *Curr. Eye Res.*, 13(7), 1994, 513-522.

⁵⁰ U. Schmidt-Erfurth, J. Miller, M. Sickenberg ; *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2365(5), 1998, 365-374.

cellules endothéliales des néocapillaires choroïdiens. Pour les patients atteints de la forme la plus grave de DLMA, la Visudyne diminue de moitié le risque de perte de la vision sur une période de deux ans. L'effet est notable pendant au moins trois ou quatre ans. Le traitement fonctionne également dans des formes moins graves de DMLA et dans le cas de la myopie pathologique, avec des résultats moins significatifs cependant. Seule une petite partie des patients souffre de coups de soleil ou de réactions secondaires.

La Visudyne est administrée sous forme de liposomes. Ce type d'incorporation confère à ces derniers un rôle de vecteur pharmacologique permettant une certaine protection du photosensibilisateur contre les mécanismes enzymatiques de dégradation. Ce vecteur permet également de créer des complexes avec d'autres structures lipophiles telles que le LDL (low density lipoproteins) présents dans le sérum. La présence de nombreux récepteurs aux LDL au niveau des néovaisseaux pourrait expliquer la sélectivité de la Visudyne pour les vaisseaux choroïdiens.

d) L'étiopurpurine d'étain (SnET₂) – Purlytin[®]

L'étiopurpurine d'étain, portant le nom commercial Purlytin[®], est un photosensibilisateur de la famille des chlorines (figure I-33).⁵¹ C'est une molécule conjuguée possédant un atome d'étain au centre de la structure et ayant une longueur d'onde d'absorption aux alentours de 650 nm.

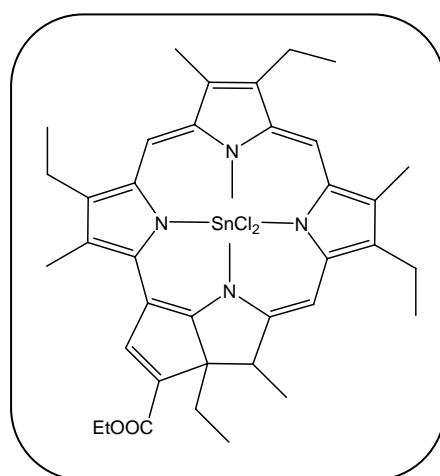


Figure I-33 : Structure de l'étiopurpurine d'étain.

⁵¹ T.S. Mang, R. Allison, G. Hewson, W. Snider ; *Cancer J. Sci. Am.*, 4(6), 1998, 378-384.

Après injection, l'étiopurpurine d'étain se localise dans la peau et peut provoquer une photoréaction pendant 7 à 14 jours.⁵² Il a été évalué pour le traitement du cancer métastatique du sein et il est en cours d'évaluation pour la photothérapie de la néovascularisation cornéenne. La PDT induite par cette molécule affecte les mitochondries et provoque rapidement une réponse apoptotique. La fragmentation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques sont observées soixante minutes après le traitement photodynamique.⁵³

e) La texaphyrine de lutétium – Lutrin[®]

Connue sous le nom de Lutrin[®], la texaphyrine de lutétium est un photosensibilisateur non porphyrinique qui est à présent en phase II d'essais cliniques pour le traitement de cancers du sein et des mélanomes (figure I-34).⁵⁴ Il possède une spécificité très forte vis-à-vis des tissus tumoraux et une longueur d'onde d'excitation maximale située vers 730 nm. Cette dernière propriété autorise une forte pénétration de la lumière dans les lésions ce qui différencie cette molécule des autres photosensibilisateurs.

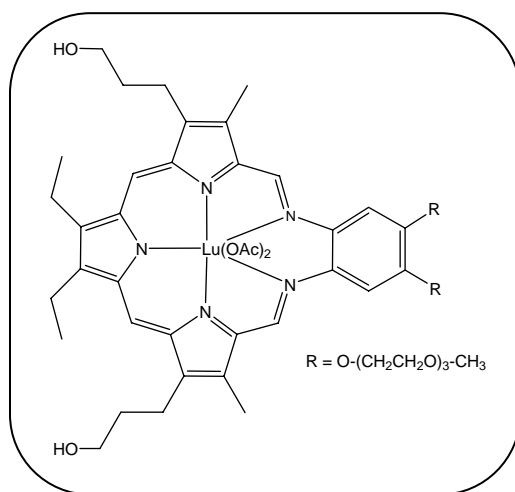


Figure I-34 : Structure de la Texaphyrine de lutétium.

f) La mono-L-aspartylchlorine e6 – Npe6

La mono-L-aspartylchlorine e6 (figure I-35) est une chlorine désignée sous le nom de Npe6 (ou MACE) qui est sous la propriété d'une société japonaise (Nippon Petrochemicals).

⁵² G.B. Primbs, R. Casey, K. Warmser, W.J. Snyder ; *Ophthalmic Surg. Laser*, 29(10), 1998, 832-838.

⁵³ D. Kessel, Y. Luo, C.K. Chang ; *Photochem. Photobiol.*, 65(3), 1997, 422-426.

⁵⁴ S.W. Young, K.W. Woodburn, M. Wright, T.D. Mody ; *Photochem. Photobiol.*, 63(6), 1996, 892-897.

Elle est étudiée pour le traitement de l'adénocarcinome du sein, les carcinomes basocellulaires et squameux. Elle est éliminée rapidement des tissus, par conséquent l'irradiation est réalisée dans les quatre heures suivant l'injection.⁵⁵ Utilisée à faible dose, la Npe6 peut induire la régression provisoire des tumeurs. A forte dose, la régression est prolongée mais la sélectivité vis-à-vis des tissus néoplasiques est diminuée.⁵⁶ Ce composé entraîne une faible photosensibilité de la peau. Il est en cours d'essais afin de détruire les néovascularisations de la rétine. Les résultats préliminaires révèlent que la Npe6 détruit efficacement les vaisseaux choroïdiens en produisant le minimum de dommage à la rétine.

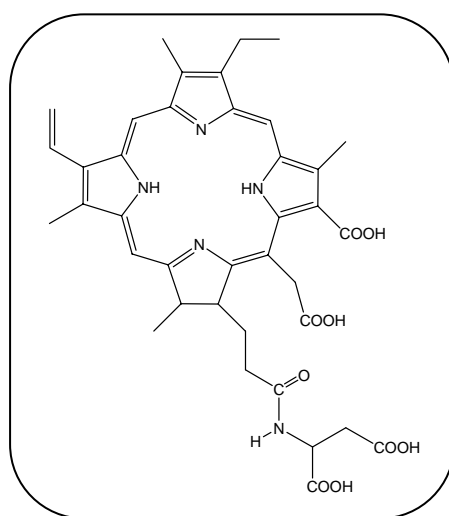


Figure I-35 : Structure de la mono-L-aspartylchlorine e6.

g) Les phtalocyanines

Les phtalocyanines présentent une forte absorption entre 600 et 700 nm avec maximum d'absorption à 765 nm.⁵⁷ Elles ont de multiples avantages :

- elles présentent une faible toxicité à l'obscurité,
- une photosensibilisation cutanée diminuée d'une clairance rapide de ces composés,
- une rétention tumorale sélective,
- enfin, une photocytotoxicité très intéressante.

⁵⁵ R.W. Boyle, D. Dolphin ; *Photochem. Photobiol.*, 64(3), 1996, 469-485.

⁵⁶ S.W. Taber, V.H. Fingar, C.T. Coats ; *Clin. Cancer Res.*, 4(11), 1998, 2741-2746.

⁵⁷ A. Waszkowiak, D. Frackowiak, K. Wiktorowicz, J. Miyake ; *Acta Biochimica Polonica*, 49, 2002, 633-641.

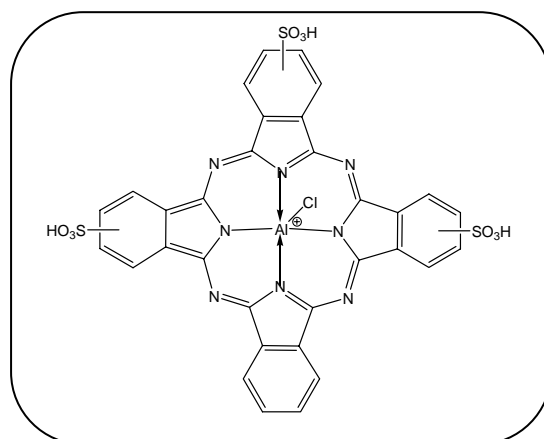


Figure I-36 : Structure de la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée.

L'activité des phthalocyanines dépend de leur localisation cellulaire en fonction de leur caractère hydrophile ou lipophile.⁵⁸ Elles peuvent être chélatées par de nombreux ions métalliques comme l'aluminium ou le zinc qui augmentent leur photocytotoxicité. La plus connue et la plus utilisée des phthalocyanines est la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée (CIAIPcS ; figure I-36). Elle est soluble dans l'eau et sa durée de rétention dans le tissu tumoral est élevée. Les études avec cette molécule ont été uniquement menées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal.⁵⁹ Les conséquences majeures d'un traitement PDT avec cette substance sont des dommages vasculaires au niveau de la tumeur.

4. Intérêt des polyamines en thérapie anticancéreuse

Un des paramètres important pour l'élaboration de nouveaux photosensibilisateurs en PDT est la sélectivité de ces molécules vis-à-vis des cellules tumorales. Au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, de nombreux travaux ont porté sur l'utilisation de sucres ou de petits peptides pour améliorer le ciblage.^{60,61,62} De récentes recherches ont montré que les polyamines complexées à des molécules actives (chlorambucil-polyamine,⁶³ anthracène-polyamine)⁶⁴ peuvent améliorer le ciblage et l'activité de ces molécules. L'utilisation de ces composés nous a semblé particulièrement pertinente afin

⁵⁸ R. Bachor, T. Flotte, M. Scholz, S. Dretler, T. Hasan ; *J. Urology*, 147(5), 1992, 1404-1410.

⁵⁹ Q. Peng, J. Moan, M. Kongshaug, J.F. E vensen, H. Anholt, C. Rimington ; *Int. J. Cancer*, 48, 1991, 258-264.

⁶⁰ I. Sylvain ; *Thèse de l'Université de Limoges*, 59-1999, 1999.

⁶¹ V. Chaleix ; *Thèse de l'Université de Limoges*, 26-2003, 2004.

⁶² V. Chaleix, V. Sol, Y.M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J.C. Blais, P. Krausz ; *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 1486-1493.

⁶³ J.L. Holley, A. Mather, R.T. Wheelhouse, P.M. Cullis, J.A. Hartley ; *Cancer Research*, 52, 1992, 4190-4195.

⁶⁴ C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel ; *J. Med Chem.*, 46, 2003, 5129-5138.

d'augmenter la reconnaissance et l'accumulation des photosensibilisateurs dans les cellules tumorales

4.1. Généralités

Les polyamines sont des constituants naturels présents dans toutes les cellules eucaryotes et procaryotes.⁶⁵ C'est au XVIII^e siècle que Vauquelin suspecta pour la première fois la présence de polyamines dans le liquide séminal humain. Cependant, leurs structures chimiques n'ont été établies qu'en 1924 et il fallu attendre les années 1960 pour que la putrescine (PT), la spermidine (SP) et la spermine (SM) ne soient plus considérées comme des catabolites terminaux dénués de tout rôle physiologique.⁶⁶ Ces molécules naturelles ont des fonctions étroitement associées aux mécanismes impliqués dans les processus prolifératifs malins et leur concentration dans les cellules eucaryotes est dans une large mesure en relation avec l'importance de la prolifération et de la différenciation cellulaire.⁶⁷ Par conséquent, ces substances sont devenues l'une des cibles privilégiées de la recherche en oncologie.^{68,69} Les polyamines sont très intéressantes du point de vue médical à titre diagnostique et à titre thérapeutique parce qu'elles sont liées au cycle cellulaire :

- A titre diagnostique : les polyamines peuvent servir de marqueurs de l'état cancéreux en dosant leur concentration dans les divers liquides biologiques (sérum, plasma, urines...).
- A titre thérapeutique : des molécules interférant avec les enzymes impliquées dans le métabolisme des polyamines sont des médicaments anticancéreux potentiels.⁷⁰ Mais l'inhibition des voies de synthèse intracellulaire des polyamines (DFMO, MDL 72527 ; figure I-37) doit être accompagnée par la réduction des sources exogènes de polyamines dans l'organisme. Ces ressources extérieures à la cellule peuvent provenir de l'alimentation et de la flore microbienne gastro-intestinale. Ainsi, le traitement thérapeutique doit être complété par un régime alimentaire carencé en polyamines et par l'administration d'antibiotiques comme la néomycine et le métronidazole. Une autre stratégie consiste à exploiter les systèmes de transport des polyamines afin d'acheminer et de cibler sélectivement des agents cytotoxiques vers les cellules à prolifération rapide ("approche du cheval de Troie").

⁶⁵ V. Castros-Quemener, L. Chamaillard, F. Bouet ; *Médecine/Science*, 15, 1999, 1078-1085.

⁶⁶ A.E. Pegg ; *Cancer Res.*, 48, 1988, 759-773.

⁶⁷ J. Jänne, H. Poso, A. Raina ; *Biochim. Biophys. Acta*, 473, 1978, 241-293.

⁶⁸ N. Seiler, J.P. Moulinoux ; *Médecine/Sciences*, 12, 1996, 745-755.

⁶⁹ V. Quemener, N.A. Khan, J.P. Moulinoux ; *Cancer J.*, 3, 1990, 45-52.

⁷⁰ H.M. Wallace, A.V. Fraser, A. Hughes ; *Biochem. J.*, 376, 2003, 1-14.

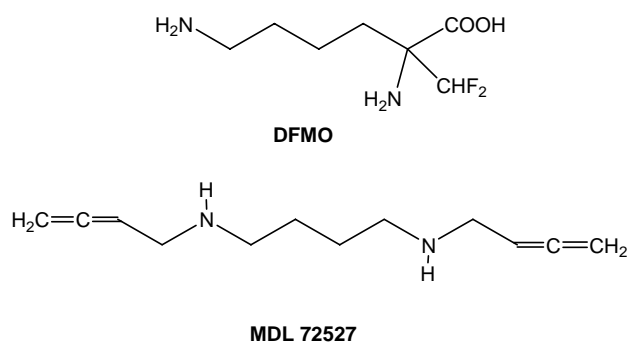


Figure I-37 : Structure de deux inhibiteurs de la synthèse des polyamines, le DFMO et le MDL 72527.

4.2. Structure des polyamines

Les polyamines sont des molécules flexibles qui peuvent facilement se cationiser. Sur la figure I-38, nous en présentons quelques exemples en précisant leurs pKa.

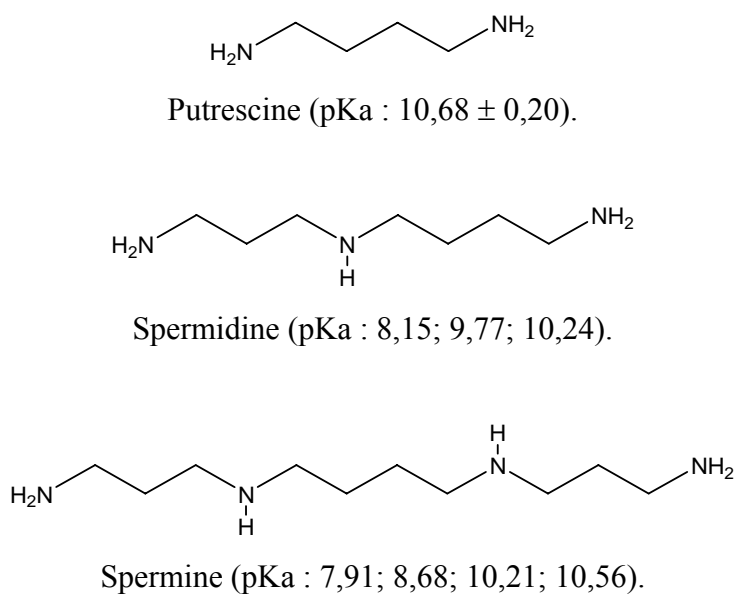


Figure I-38 : Structure et pKa de quelques polyamines usuelles.⁷¹

⁷¹ O. Rosenheim ; *Biochem. J.*, 18, 1924, 1265-1272.

4.3. Chimie des polyamines

La synthèse de polyamines, se heurte à certaines difficultés comme le contrôle de la régiosélectivité, sur des composés possédant une ou plusieurs fonctions amines de natures différentes. Les méthodes nécessitent donc l'utilisation de groupements protecteurs.

Une première voie décrite par B. Ganem⁷² consiste à former les deux composés représentés dans la figure I-39. Ils sont obtenus par réaction de la spermidine ou de la spermine avec le formaldéhyde. Avec le dérivé de la spermidine, la nature des trois fonctions amines est devenue différente. Ainsi la réalisation de transformations régiosélectives devient efficace. Grâce à cette approche, de nombreuses polyamines ont pu être synthétisées.

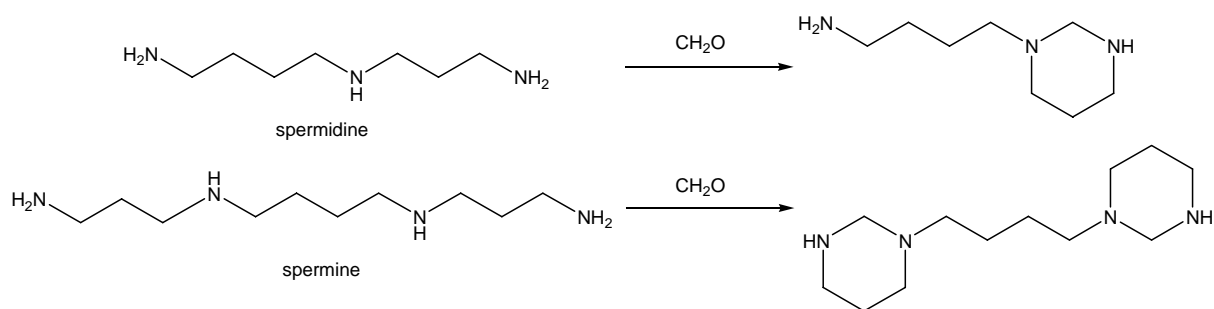


Figure I-39 : Polyamines obtenues par B. Ganem et coll.⁷²

Une seconde voie, a été proposée par R.J. Bergeron et coll.⁷³ (figure I-40). Les polyamines benzylées ont été obtenues à partir de la benzylamine soit par une addition de Michael sur l'acrylonitrile suivie d'une réduction, soit par alkylation à l'aide d'un nitrile halogéné et réduction.

⁷² B. Ganem ; *Acc. Chem. Res.*, 15, 1982, 290-298.

⁷³ R.J. Bergeron ; *Acc. Chem. Res.*, 19, 1986, 105-112.

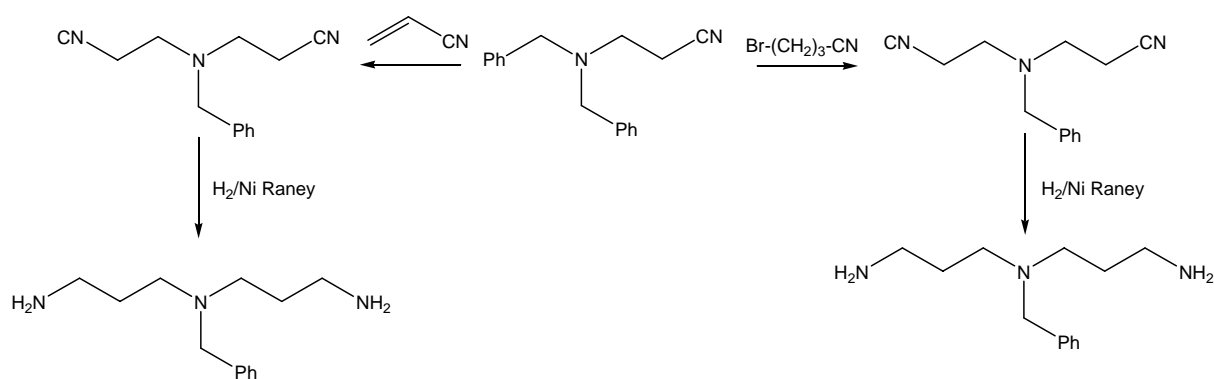


Figure I-40 : Synthèse d'une polyamine benzylée.⁷³

La même équipe a préparé des triamines avec trois protections différentes permettant de libérer sélectivement, les différentes fonctions amines (figure I-41).

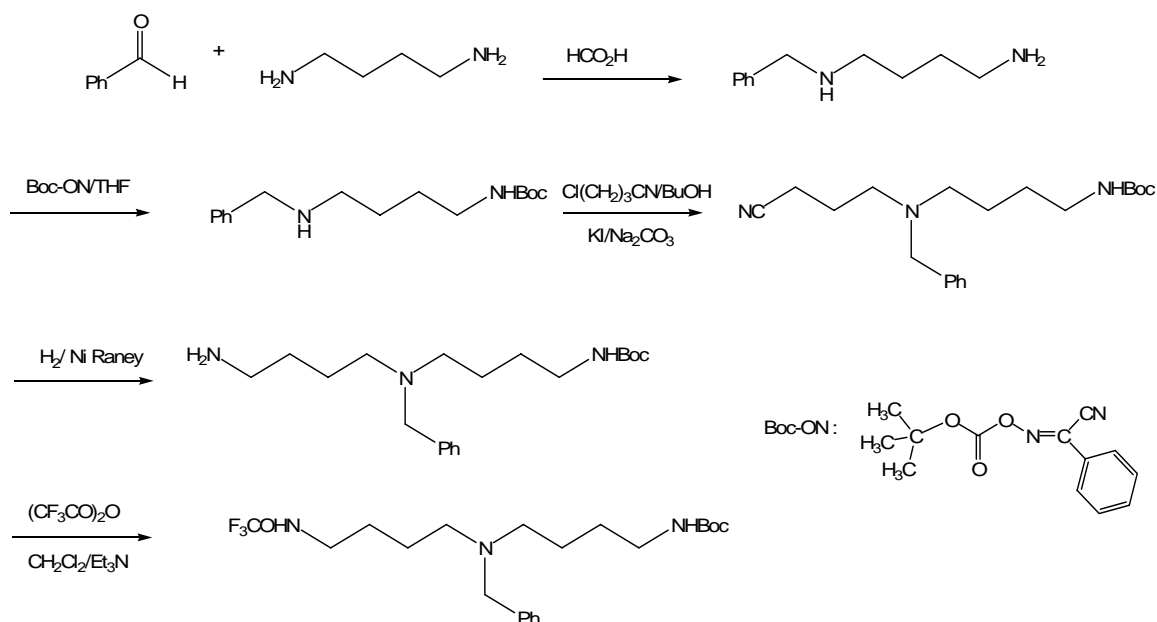


Figure I-41 : Synthèse de Bergeron et coll. d'une polyamine avec trois protections différentes.⁷⁴

Plus récemment, de nouvelles synthèses pour la préparation des polyamines ont été décrites :

- La réduction des bases de Schiff permet de préparer de tels composés (figure I-42). Par exemple, le traitement d'un excès de diamine avec l'azidopropanal donne l'iminoazide. Puis, après réduction avec le borocyanohydrure de sodium et LiAlH_4 , on obtient le triaminoalcène.

⁷⁴ R.J. Bergeron, J.R. Garlich, N.J. Stollowich ; *J. Org. Chem.*, 49, 1984, 2997-3001.

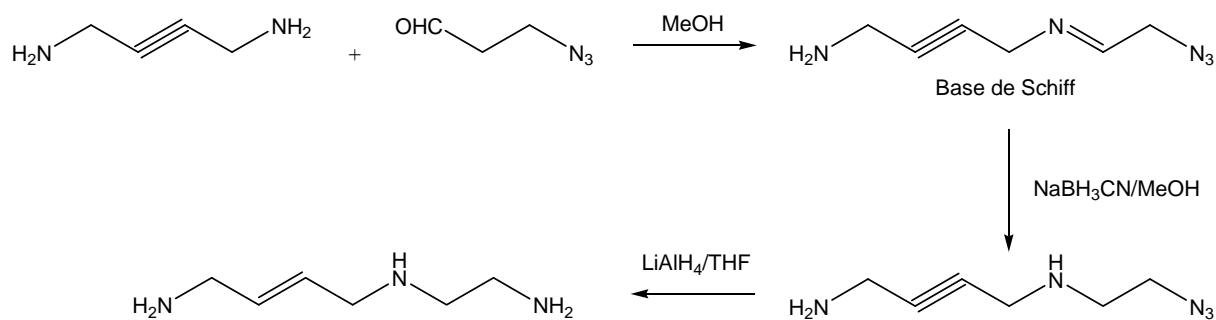


Figure I-42 : Synthèse de polyamines grâce à la réduction de bases de Schiff.

- L'utilisation par Edwards et coll.⁷⁵, de la réaction de Mitsunobu, a également permis d'obtenir des polyamines (figure I-43). Ainsi, la réaction du *N*-trifluorométhanesulfonyl(Tf)-*N*-méthylaminobutanol avec le *N*^{1,7}-bis-trifluorométhanesulfonylaminoheptane, en présence de diéthylazodicarboxylate (DEAD) et de triphénylphosphine donne une tétraamine optiquement active.

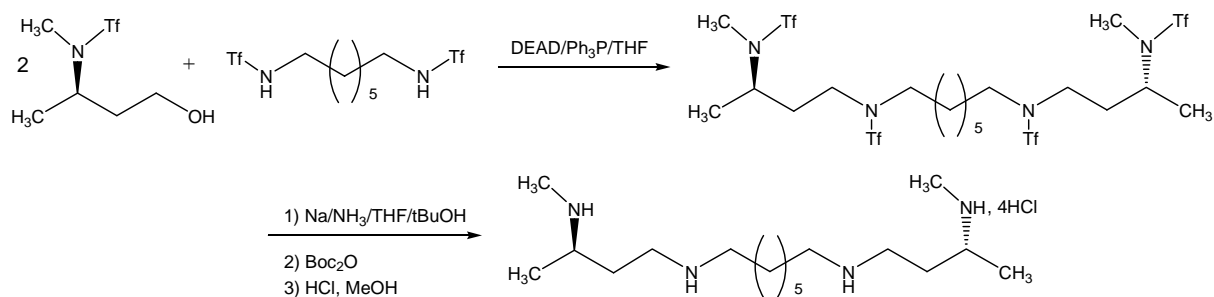


Figure I-43 : Synthèse de polyamines grâce à la réduction de Mitsunobu.

4.4. Fonctions des polyamines dans la cellule

Les polyamines sont essentielles pour la vie et la division cellulaire.⁷⁶ Les fonctions amines primaires et secondaires des polyamines sont protonées au pH physiologique. Ces polycations peuvent donc se lier avec divers sites anioniques de la cellule comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides membranaires. Ainsi, les sites d'interaction électrostatique des polyamines sont nombreux et leurs fonctions biologiques sont très souvent liées à une modification de la conformation de leur cible.

⁷⁵ M.L. Edwards, D.M. Stemerick, J.R. Mc Carthy ; *Tetrahedron Lett.*, 31, 1990, 3417-3421.

⁷⁶ C.W. Tabor, H. Tabor ; *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 1976, 285-306.

Les polyamines stabilisent les acides nucléiques contre la dénaturation thermique. Ce sont des composés susceptibles de condenser et d'agréger l'ADN *in vitro* à de faibles concentrations et il a été démontré que la structure de la chromatine était modifiée par une déplétion en polyamines. La spermine protège l'ADN de l'action des endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN (enzymes induites lors de la phase d'exécution de l'apoptose). Elles peuvent se fixer sur des protéines très différentes du point de vue de leur rôle physiologique :

- sur des kinases telle que la caséine kinase II,⁷⁷
- sur des récepteurs membranaires tel que le récepteur au N-méthyl-D-aspartate,⁷⁸

L'interaction spermine-protéine se traduit par une stimulation des activités enzymatiques (caséine kinase II, topoisomérase...) ou par modulation de l'activité de certains récepteurs et canaux membranaires.

Au niveau membranaire, les polyamines agissent sur le mouvement des ions tels que les chlorures et le calcium, mais elles peuvent interagir également avec des phospholipides membranaires⁷⁹ et ainsi stabiliser les membranes biologiques par création de pontages entre deux structures voisines. De même, elles inhibent la peroxydation des membranes biologiques et modulent de nombreuses fonctions des membranes cellulaires.⁸⁰

4.5. Métabolisme des polyamines dans les cellules tumorales

Une caractéristique majeure de la cellule tumorale est l'importance de la mobilisation des voies de synthèse des polyamines dans la régulation de la prolifération cellulaire. Dans les cellules saines, les concentrations intracellulaires en polyamines sont régulées très finement aussi bien au niveau des enzymes contrôlant leur synthèse (ornithine décarboxylase (ODC), S-adénosyl-L-méthionine décarboxylase (SAMDC))⁸¹ et leur dégradation (polyamine oxydase (PAO)) qu'à leur captation. Les mécanismes régulant les concentrations endogènes en polyamines sont profondément perturbés dans la cellule tumorale. Ainsi, la cellule cancéreuse est capable de détourner les voies métaboliques des polyamines, en activant d'une part les

⁷⁷ O. Filhol, C. Cochet, T. Delagoutte, E.M. Chambas ; *Bioch. and Biophysical Res. Com.*, 180, 1991, 945-952.

⁷⁸ I.J. Reynolds ; *Life Sciences*, 47, 1990, 1785-1792.

⁷⁹ K. Igarashi, I. Sakamoto, N. Goto, K. Kashiwagi, R. Honma ; *Arch. Bioch. Biophys.*, 219, 1982, 438-443.

⁸⁰ R.W. Ransom, N.L. Deschenes ; *Synapse*, 5, 1990, 294-298.

⁸¹ P.S. Mamont, C. Danzin, J. Wagner, M. Siat ; *Eur. J. Biochem.*, 123, 1982, 499-504.

enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines, et d'autre part en inhibant les enzymes impliquées dans le catabolisme. En effet, l'activité de l'ODC et le contenu en polyamines sont plus élevés dans les tumeurs par rapport au tissu normal. Par contre l'activité de la PAO, enzyme permettant la synthèse de spermidine et de putrescine par la voie d'interconversion diminue nettement dans les tumeurs.

Aux dysfonctionnements observés au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des polyamines, des différences sont observées au niveau de leur captation. En effet, les cellules tumorales captent d'une façon plus importante les polyamines extracellulaires d'origine alimentaire et celles synthétisées par les cellules normales ou les bactéries.

4.6. Carence d'un organisme en polyamine

Le métabolisme des polyamines étant accru dans les cellules cancéreuses⁸² et son inhibition s'accompagnant systématiquement *in vitro* d'un arrêt de croissance de ces dernières, ce métabolisme a été considéré comme une cible privilégiée pour la conception de médicaments à visée anti-tumorale.⁸³ Il est maintenant parfaitement établi que l'inhibition du métabolisme des polyamines par des molécules comme le difluorométhylornithine (DFMO ; inhibiteur spécifique de l'ornithine décarboxylase) ne provoque *in vivo* qu'un effet anticancéreux modéré.⁸⁴ Le foyer cancéreux n'étant pas un système fermé dans l'organisme, la cellule tumorale peut restaurer son taux intracellulaire en putrescine et en spermidine en captant les polyamines extracellulaires. En effet, les cellules tumorales incorporent mieux les polyamines présentes dans le milieu extracellulaire que les cellules saines. De plus, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, le traitement effectué par le DFMO, induit un accroissement de la captation des polyamines.⁸⁵ Le mélange DFMO et MDL 72527 (inhibiteur de la polyamine oxydase) provoque *in vivo* une réduction importante des taux de putrescine et de spermidine.⁸⁶ Cependant, cette carence en polyamine s'accompagne d'une diminution modeste de la croissance tumorale.⁸⁷

⁸² J. Jänne, H. Poso, A. Raina ; *Biochem. Biophys. Acta.*, 473, 1978, 241-293.

⁸³ A.E. Pegg ; *Cancer Res.*, 48, 1988, 759-773.

⁸⁴ B.W. Metcalf, P. Bey, C. Danzin, M.J. Jung, P. Casara ; *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 1978, 2551-2553.

⁸⁵ J.E. Chaney, K. Kobayashi, R. Goto, G.A. Digenis ; *Life Science*, 32, 1983, 1237-1241.

⁸⁶ F.N. Bolknus, P. Bey, N. Seiler ; *Biochem. Biophys. Acta*, 838, 1985, 69-76.

⁸⁷ N. Claverie, J. Wagner, B. Knödgen, N. Seiler ; *Anticancer Res.*, 7, 1987, 765-772.

Les polyamines présentes dans le milieu extracellulaire sont aussi bien d'origine endogène que d'origine exogène. Ainsi, il a été montré que l'effet anti-tumoral pouvait être potentialisé en associant aux inhibiteurs du métabolisme des polyamines, une antibiothérapie. Cette dernière a pour effet de s'attaquer à la flore intestinale, qui est une source importante en polyamine.⁸⁸ S. Sarhan et N. Seiler⁸⁹ ont ainsi confirmé l'importance certaine des polyamines d'origine intestinale dans le maintien du processus prolifératif. Il s'est révélé également nécessaire de réduire l'apport intestinal de polyamines, en associant aux différents traitements une alimentation pauvre en polyamines (figure I-44).

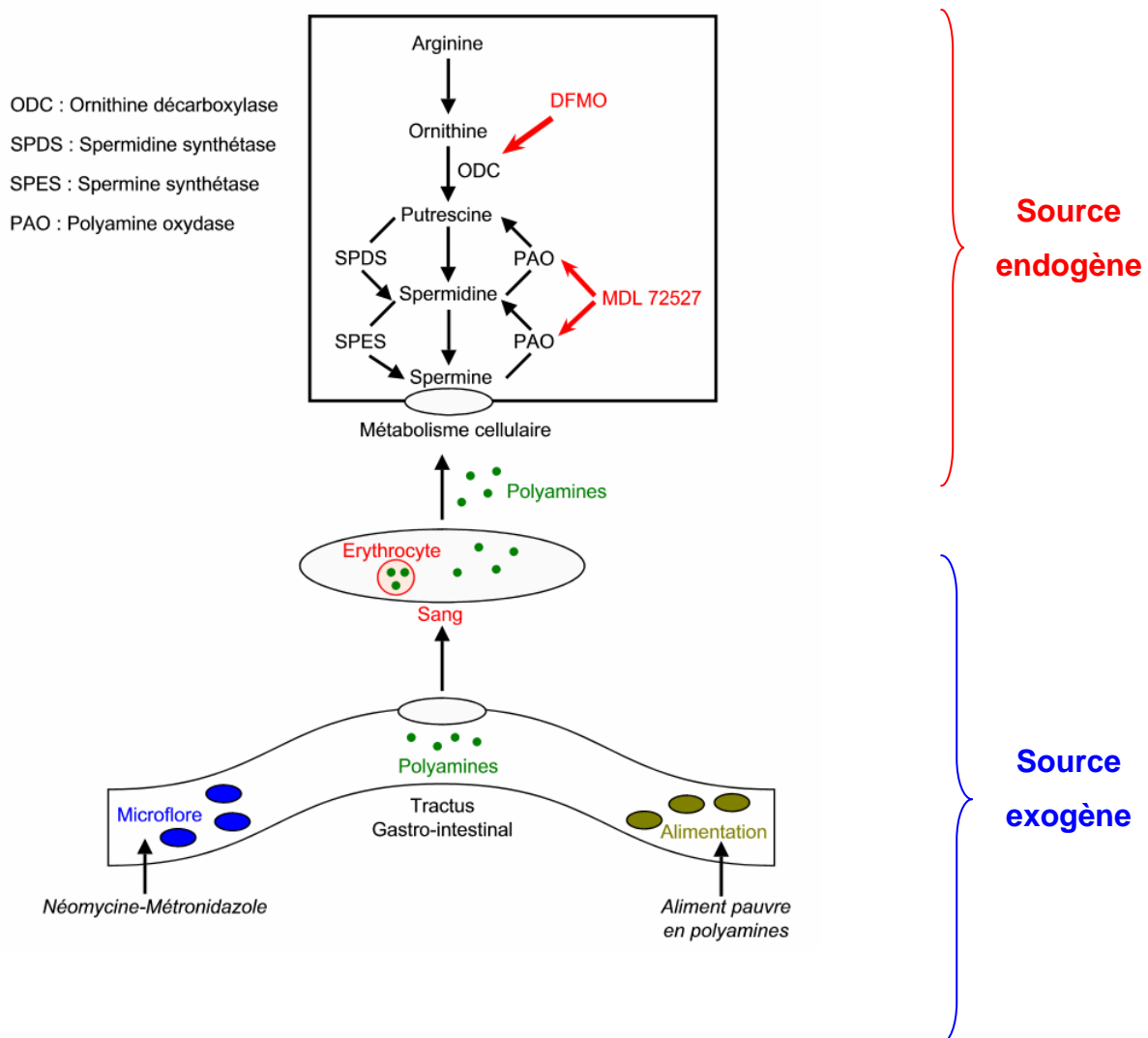


Figure I-44 : Carences en polyamines. Les principales sources de polyamines (sources endogènes et exogènes), peuvent être partiellement bloquées par l'action combinée d'inhibiteurs du métabolisme des polyamines (DFMO, MDL 72527), d'une antibiothérapie et d'une alimentation pauvre en polyamines.

⁸⁸ J. Hessels, A.W. Kingma, H. Fewerda, J. Keij, F.A.J. Muskiet ; *Int. J. Cancer*, 43, 1989, 1155-1164.

⁸⁹ S. Sahan, B. Knödgen, N. Seiler ; *Anticancer Res.*, 9, 1989, 215-223.

4.7. Intérêt des systèmes de transport des polyamines

Les systèmes de transport des polyamines ont un intérêt réel en recherche oncologique puisqu'ils peuvent permettre l'acheminement des polyamines naturelles mais également des analogues ou des dérivés de ces polyamines. Cette capacité peut être exaltée sous l'effet d'une diminution de la concentration en polyamines intracellulaires (utilisation du DFMO par exemple). Il est donc intéressant de lier des groupes réactifs ou des drogues cytotoxiques à une polyamine, afin d'augmenter la sélectivité de ces composés pour les cellules cancéreuses. De nombreuses molécules actives ont été fixées à des polyamines comme les conjugués chlorambucil-polyamine,⁹⁰ anthracène-polyamine,⁹¹ acridine-polyamine,⁹² et nitroimidazole-polyamine (figure I-45).⁹³ La réussite de cette approche dépend de deux composantes clés, la capacité des transporteurs des polyamines à reconnaître et à transporter les polyamines modifiées et l'aptitude des dérivés polyaminés à cibler l'ADN une fois internalisés dans la cellule cancéreuse.

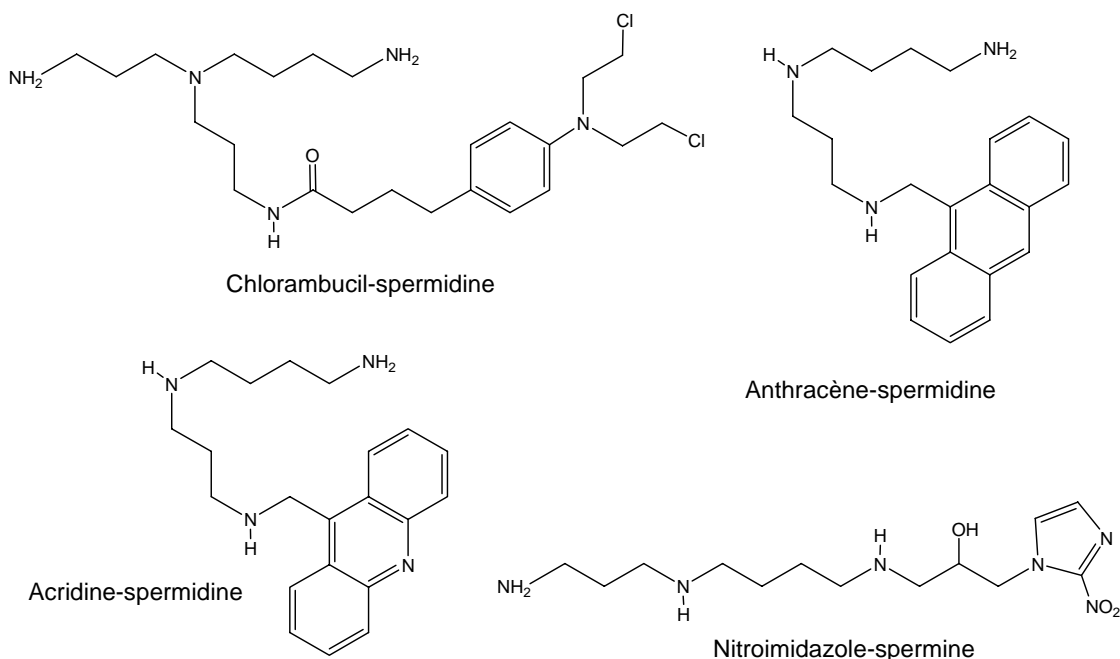


Figure I-45 : Analogues de polyamines.

⁹⁰ J.L. Holley, A. Mather, R.T. Wheelhouse, P.M. Cullis, J.A. Hartley ; *Cancer Research*, 52, 1992, 4190-4195.

⁹¹ C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel ; *J. Med. Chem.*, 46, 2003, 5129-5138.

⁹² J.-G. Delcros, S. Tomasi, S. Carrington, B. Martin, J. Renault ; *J. med. Chem.*, 45, 2002, 5098-5111.

⁹³ A.Q. Siddiqui, L. Merson-Davies, P.M. Cullis ; *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 22, 1999, 3243-3252.

5. But du travail

Compte tenu du rôle important des polyamines pour le transport *in vivo* et le ciblage des cellules cancéreuses, nous avons pensé que la fixation de telles structures sur des photosensibilisateurs devrait assurer la reconnaissance des tumeurs, réduisant ainsi les problèmes liés au manque relatif de sélectivité qui caractérise la plupart des porphyrines actuellement développées. Sur la base de ces résultats, nous nous sommes attachés à développer la synthèse de porphyrines et de chlorines portant une ou plusieurs polyamines.

Dans la première partie de notre travail, nous avons synthétisé deux tritolypporphyrines portant une molécule de spermidine ou de spermine séparées par un bras espaceur. Dans un second temps, afin d'éloigner les polyamines du macrocycle, une chaîne aliphatique supplémentaire a été introduite. Pour compléter ce travail, les deux dérivés polyaminés alkylés précédents ont été greffés sur deux composés d'origine naturelle, la protoporphyrine IX et la chlorine e6. (figure I-46). Enfin, nous présentons les résultats d'une étude préliminaire d'activité biologique sur la lignée cellulaire K562.

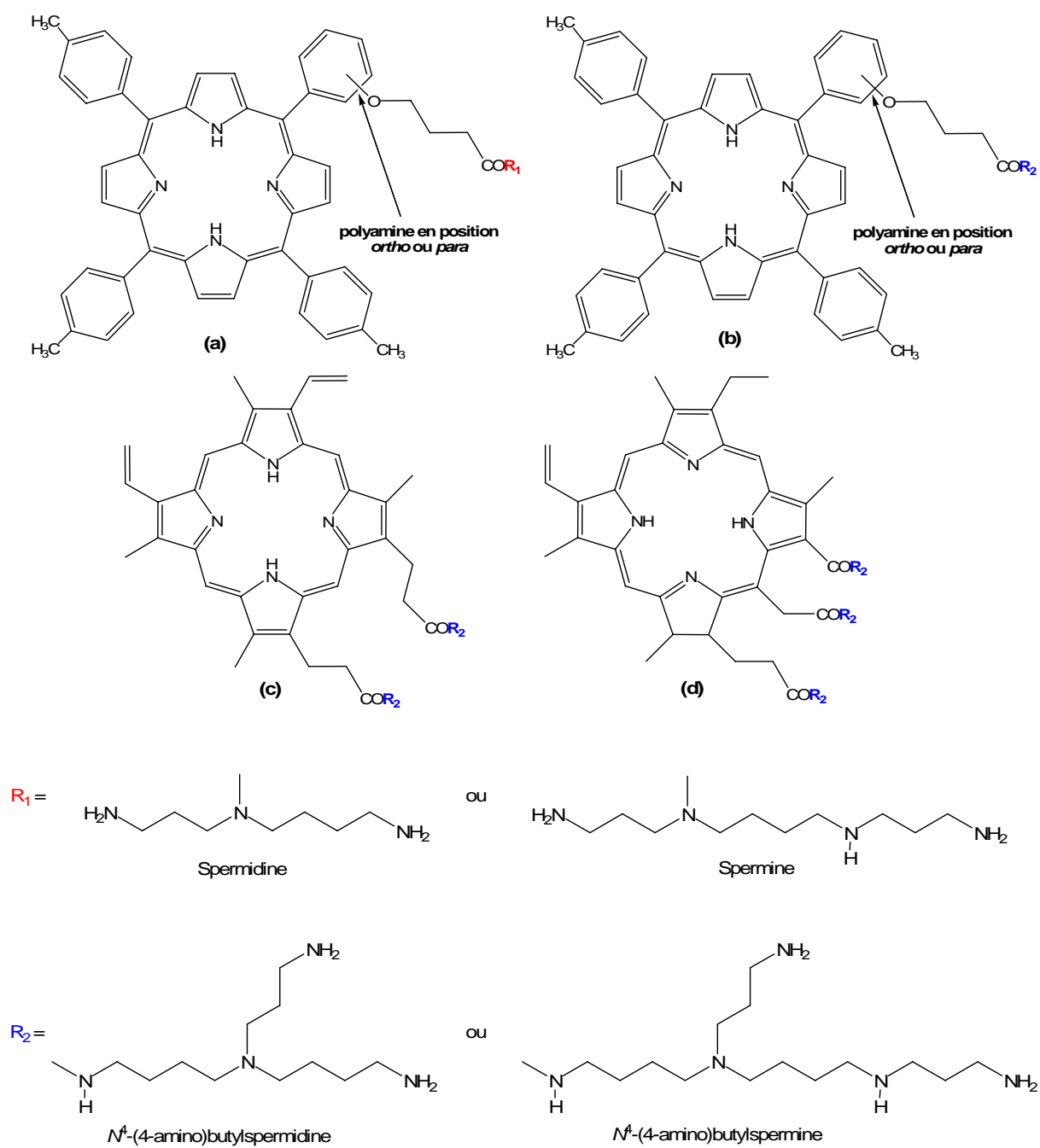


Figure I-46 : Structure des composés finaux synthétisés au cours de ce travail. (a) et (b) tritolylporphyrines-polyamines ; (c) protoporphyrines IX-polyamines ; (d) chlorines e6-polyamines.

Chapitre II

Synthèse de tritolylporphyrines-polyamines

1. Introduction

Dans le cadre du programme présenté au chapitre I, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'élaboration et à la caractérisation de tritolylporphyrines substituées en *ortho* ou en *para* par une molécule de spermidine ou de spermine (**14** à **15** ; figure II-1). Afin d'optimiser le système de transport des polyamines et d'augmenter l'affinité pour l'ADN de ces complexes photosensibilisateur-polyamine,⁹⁴ plusieurs caractéristiques semblent être nécessaires : (i) une distance appropriée entre les deux amines primaires pour que le transport soit efficace, (ii) un minimum de trois charges positives sur le ligand afin d'assurer l'affinité pour l'ADN, (iii) l'attachement du médicament *via* une amide stable à une chaîne flexible liée de la polyamine.⁹⁵ En tenant compte de ces critères, nous avons dans un second temps, réalisé la synthèse de deux précurseurs polyaminés **5** et **6** portant une chaîne alkyle. Après la fixation de ces molécules sur les tritolylporphyrines **9a,b** quatre nouveaux photosensibilisateurs ont été synthétisés et caractérisés (**16** à **17**).

⁹⁴ Otto Phanstiel, H.L. Price, L. Wang, J. Juusola, M. Kline, S.M. Shah ; *J. Org. Chem.*, 65, 2000, 5590-5599.

⁹⁵ J. Holley, A. Mather, P. Cullis ; *Biochemical Pharmacology*, 43(3), 1992, 763-769.

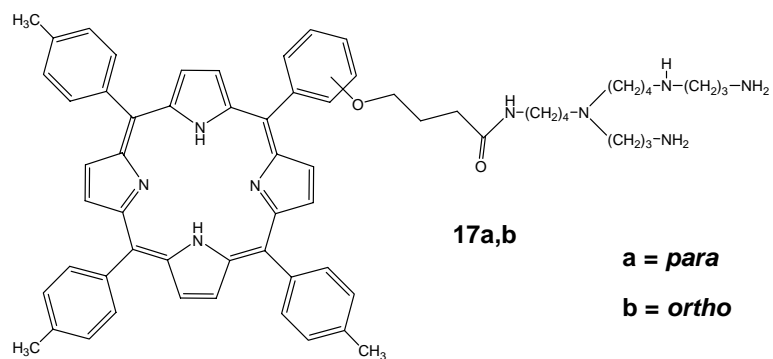
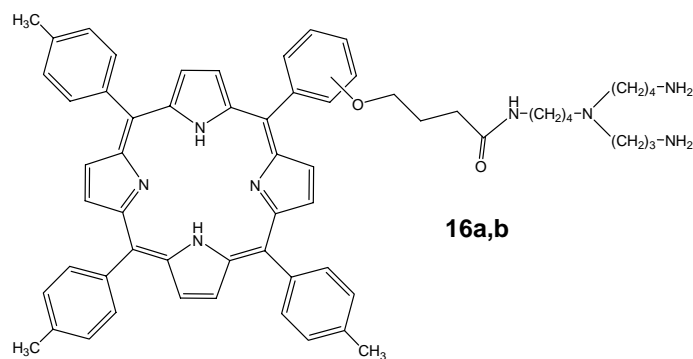
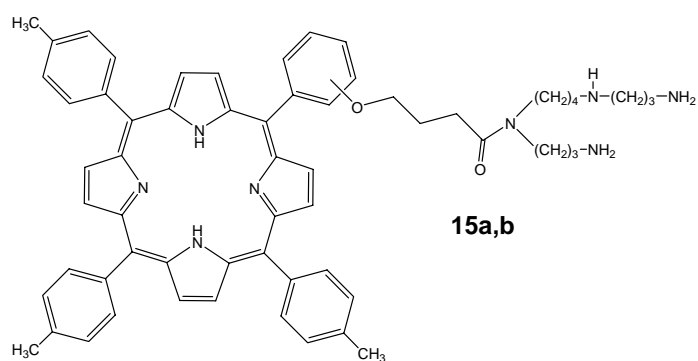
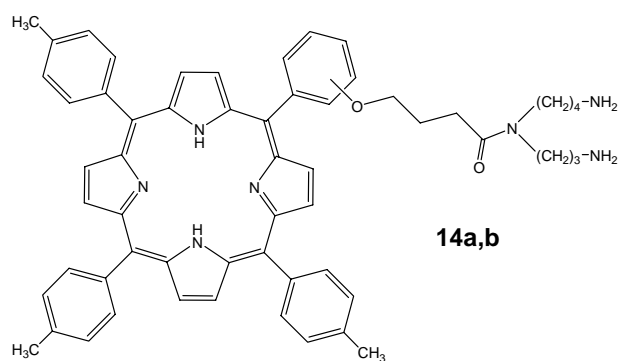


Figure II-1 : Tritolyloxy-porphyrines-polyamines synthétisées.

2. Stratégie de synthèse

Les étapes de la synthèse des tritolylporphyrines sont représentées sur la figure II-2. Les synthons **7a,b** sont formés selon la méthode de Little et coll. (cf. chapitre I), par condensation du pyrrole sur l'*ortho* ou le *para*-hydroxybenzaldéhyde. Après fixation d'un bras espaceur portant une fonction ester, les porphyrines sont dans un premier temps saponifiées, puis couplées à une polyamine protégée par le groupement protecteur *tert*-butyloxycarbonyle (Boc). Enfin, une simple déprotection mène aux composés **14** à **17** attendus (figure II-3).

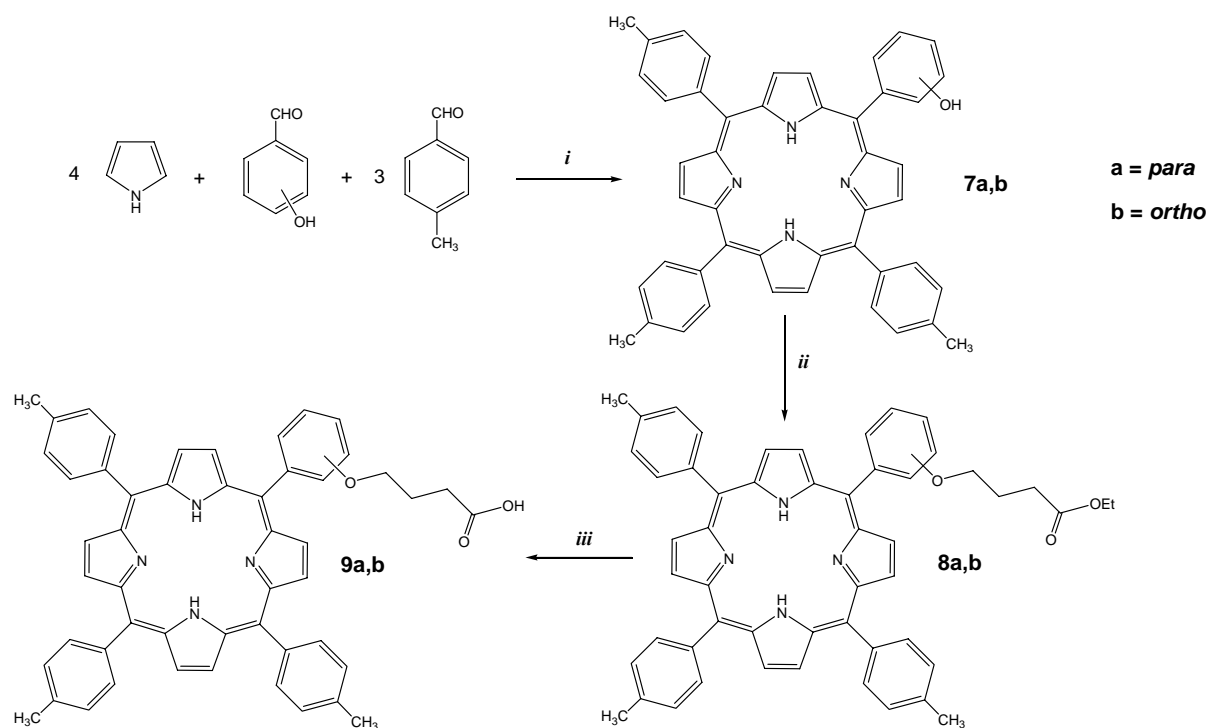


Figure II-2 : Schéma synthétique des tritolylporphyrines.
(i) C_2H_5COOH , reflux ; (ii) $Br-(CH_2)_3-COOEt$ (10 éq.), K_2CO_3 (20 éq.), DMF, t° ambiante ;
(iii) $KOH/EtOH$ (1 M), DMF, $100^\circ C$.

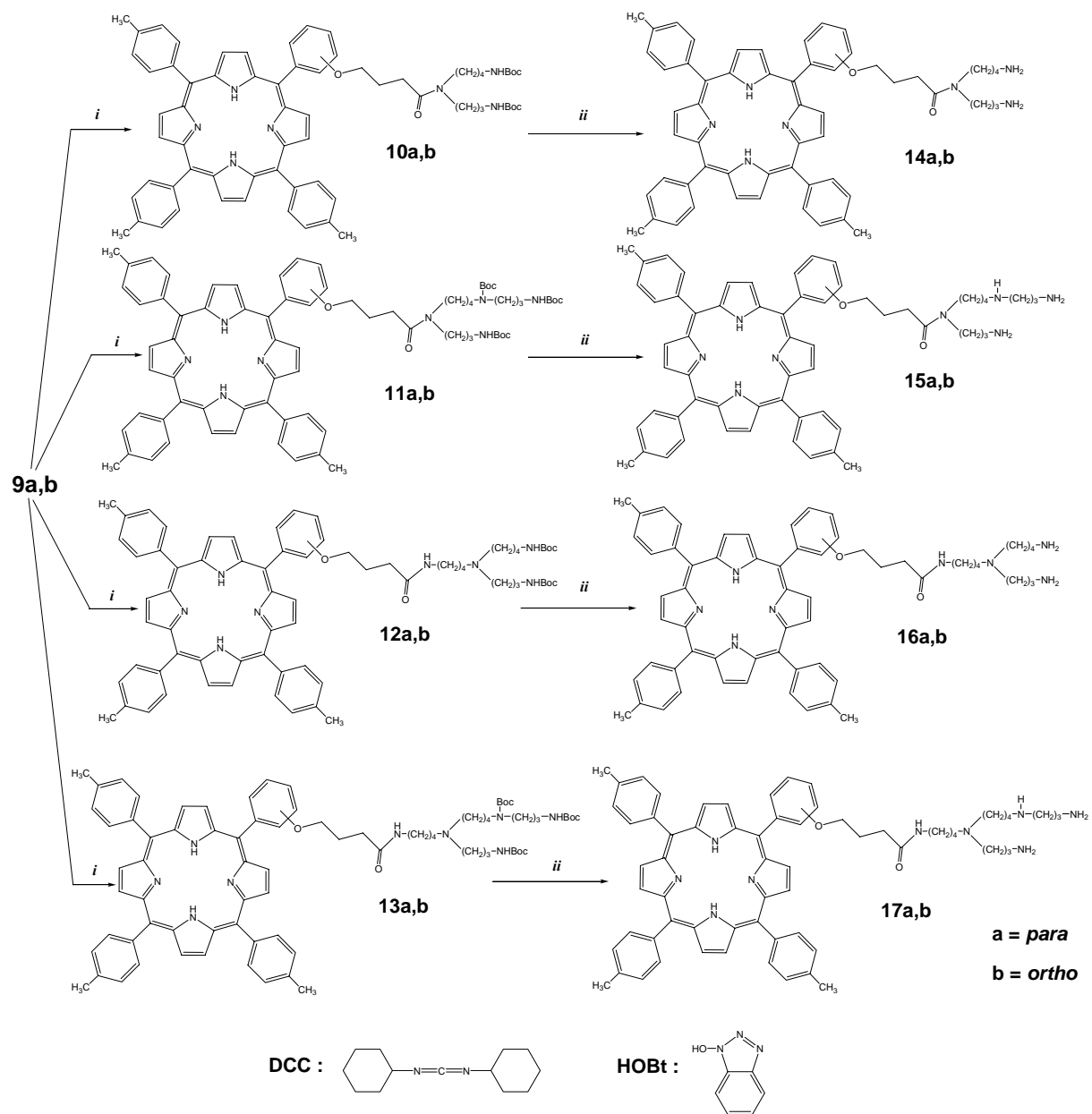


Figure II-3 : Schéma synthétique des tritylporphyrines-polyamines.
 (i) DCC (1,1 éq.), HOBt (1,1 éq.), dérivé polyaminé (1,1 éq.), DMF, t° ambiante ;
 (ii) CF₃COOH/CH₂Cl₂ (1/1), t° ambiante.

3. Synthèse des précurseurs polyaminés

3.1. Généralité

Dans un premier temps, la polyamine a été fixée directement sur les porphyrines **9a,b** par l'intermédiaire de la fonction amine secondaire. Cette stratégie nécessite donc des protections sélectives. Dans le cas de la spermidine, les deux fonctions amines primaires sont protégées. Avec la spermine, une des fonctions amines secondaires et les deux fonctions amines primaires sont protégées (figure II-4). Nous avons opté pour l'utilisation du groupement protecteur *tert*-butyloxycarbone (Boc).^{96,97} Ce groupement présente l'avantage d'être facilement éliminé en milieu acide.⁹⁸

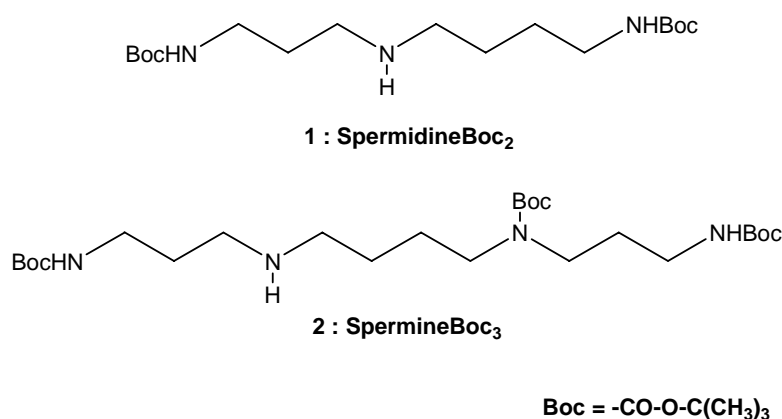


Figure II-4 : Structure de la spermidineBoc₂ et de la spermineBoc₃.

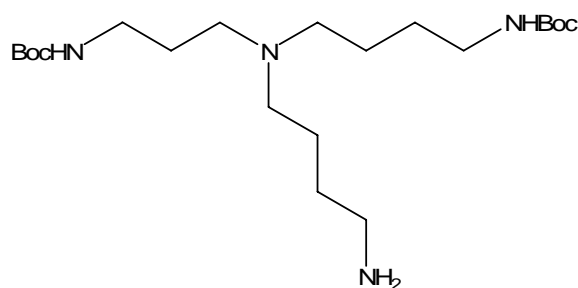
Dans une seconde phase, nous avons introduit un bras aminé à quatre carbones sur la fonction amine secondaire de la polyamine. Les analogues suivants ont été synthétisés (figure II-5) :

- la *N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butyloxycarbonylspermidine **5**,
- la *N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butyloxycarbonylspermine **6**.

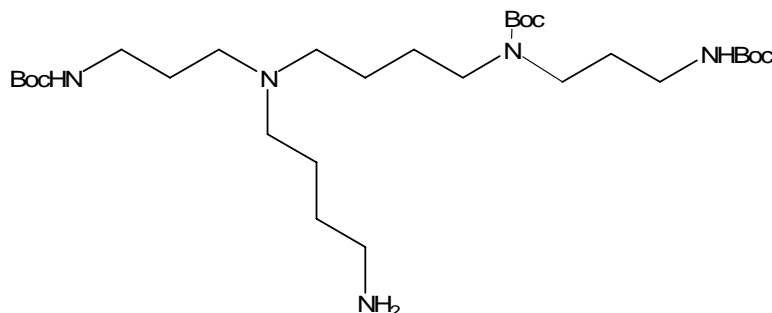
⁹⁶ V. Kuksa, R. Buchan, P.K.T. Lin ; *Synthesis*, 9, 2000, 1189-1207.

⁹⁷ J.B. Hendrickson, R. Bergeron ; *Tetrahedron Lett.*, 39, 1973, 3889-3842.

⁹⁸ I. Levchine, P. Rajan, M. Borloo, W. Bollaert, A. Haemers ; *Synthesis*, 1, 1994, 37-39.



5 : N^4 -(4-aminobutyl)- N^1,N^2 -bis-*tert*-butyloxycarbonylspermidine



6 : N^4 -(4-aminobutyl)- N^1,N^2,N^3 -tris-*tert*-butyloxycarbonylspermine

Figure II-5 : Structure des deux dérivés polyaminés **5** et **6**.

3.2. Synthèse de la spermidineBoc₂ **1** et de la spermineBoc₃ **2**

La protection des polyamines est réalisée par le 2-(*tert*-butyloxycarbonyloxyimino)-2-phénylacétonitrile (Boc-ON). Dans le cas de la spermidine on introduit 2 équivalents de Boc-ON, afin de protéger de façon préférentielle les amines primaires. Pour la spermine, on additionne trois équivalents de Boc-ON, permettant d'obtenir de façon majoritaire la protection des deux fonctions amines primaires et la protection d'une amine secondaire (figure II-6). Les réactions se déroulent dans le THF anhydre pendant 18 heures à 0°C. Après purification, la spermidineBoc₂ **1** et la spermineBoc₃ **2** sont obtenues avec des rendements respectifs de 76% et 72%. Les données physiques de ces produits sont conformes à celle de la littérature.⁹⁹

⁹⁹ G.M. Cohen, P.M. Cullis, J.A. Hartley, A. Marther, R.T. Wheelhouse. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 298-306.

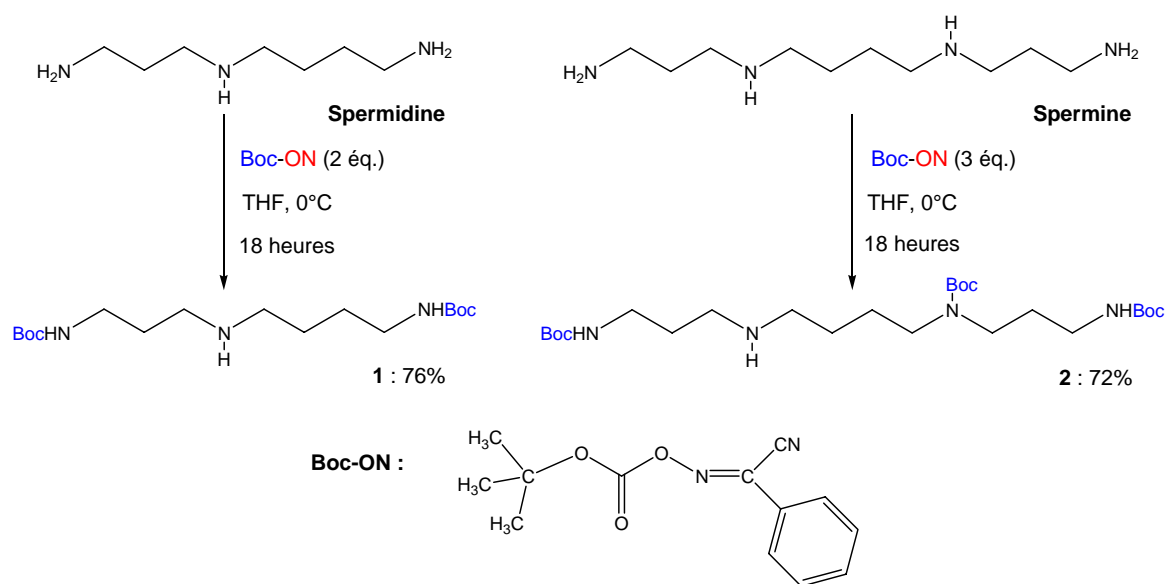


Figure II-6 : Protections des polyamines par le Boc-ON.

Avec la spermine, en présence de trois équivalents de Boc-ON, le composé tri-substitué est obtenu avec un rendement de 72%. Le produit tétra-substitué n'est observé qu'à l'état de traces. Par contre, avec quatre équivalents de Boc-ON, le composé tétra-substitué est majoritaire.

3.3. Fixation du *N*-(4-bromobutyl)phtalimide

La synthèse de la *N*⁴-(4-phtalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butyloxycarbonylspermidine **3** est réalisée par alkylation de la spermidineBoc₂ **1** par le *N*-(4-bromobutyl)phtalimide en présence de K₂CO₃, dans l'acétonitrile anhydre.¹⁰⁰ Après purification, le composé **3** est obtenu avec un rendement de 96% (figure II-7).

¹⁰⁰ P.-P. Kung, R. Bharadwaj, A.S. Fraser, D.R. Cook, A.M. Kawasaki, P.D. Cook ; *J. Org. Chem.*, 63, 1998, 1846-1852.

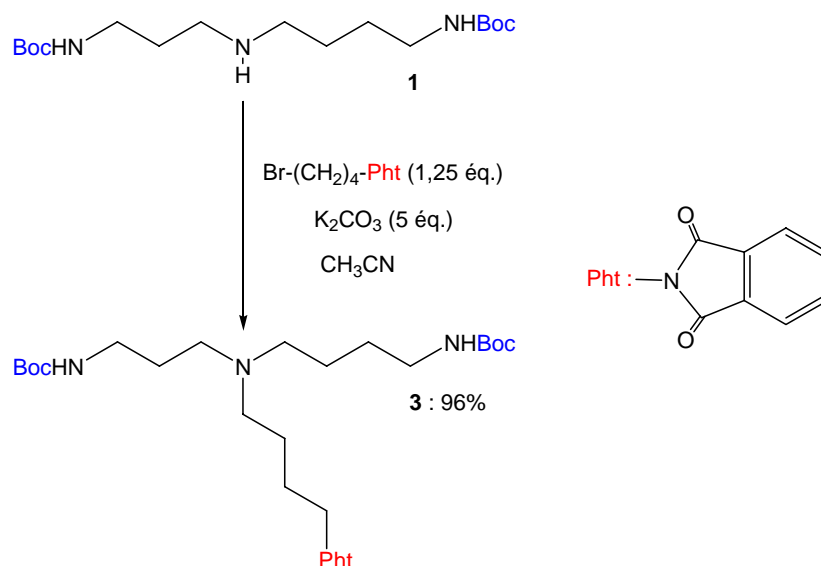


Figure II-7 : Fixation d'un bras à 4 carbones sur la spermidine.

Avec les mêmes conditions opératoires, nous avons synthétisé la N^4 -(4-phthalimidobutyl)- N^1, N^8, N^{12} -tris-*tert*-butyloxycarbonylspermine **4** avec un rendement de 95% (figure II-8).

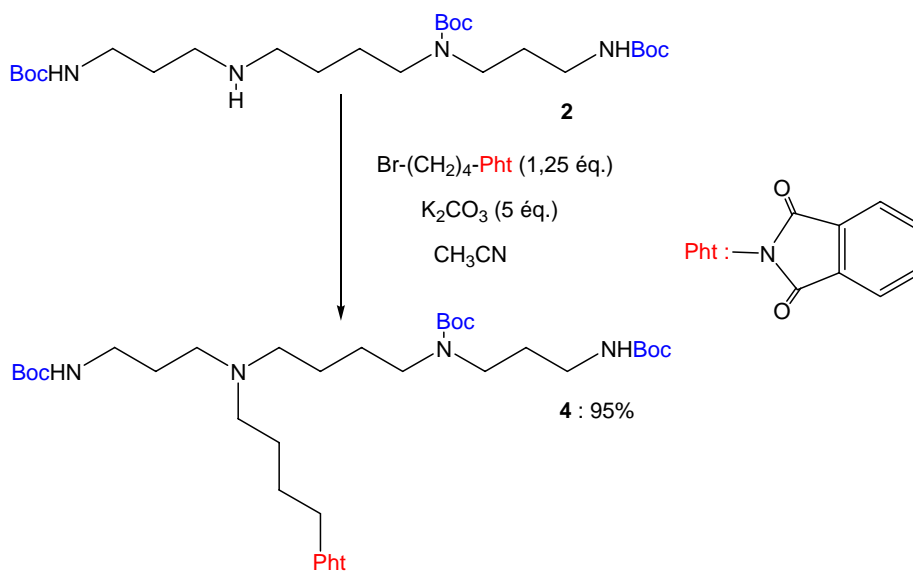


Figure II-8 : Fixation d'un bras à 4 carbones sur la spermine.

La structure des composés **3** et **4** a été confirmée par spectroscopie I.R., RMN du proton, du carbone 13 et spectrométrie de masse haute résolution.

3.4. Déprotection du groupement phtalimide

La déprotection du groupement phtalimide (méthode de Gabriel), est généralement effectuée en milieu basique. La base la plus couramment utilisée est l'hydrazine monohydrate.¹⁰¹ Cette molécule agit selon un mécanisme en deux étapes. Dans un premier temps, une molécule d'hydrazine réagit sur un des carbonyles du phtalimide puis dans un second temps, il se produit une élimination intramoléculaire conduisant à l'amine primaire et au phtalhydrazide.

Dans notre cas, la réaction d'hydrazinolyse est réalisée en additionnant un large excès d'hydrazine monohydrate. Après réaction, les composés attendus **5** et **6** sont obtenus avec des rendements respectifs de 95 % et 86 % (figure II-9). La spectroscopie I.R., la RMN du proton, la RMN du carbone 13 et la spectrométrie de masse haute résolution ont confirmé leur structure.

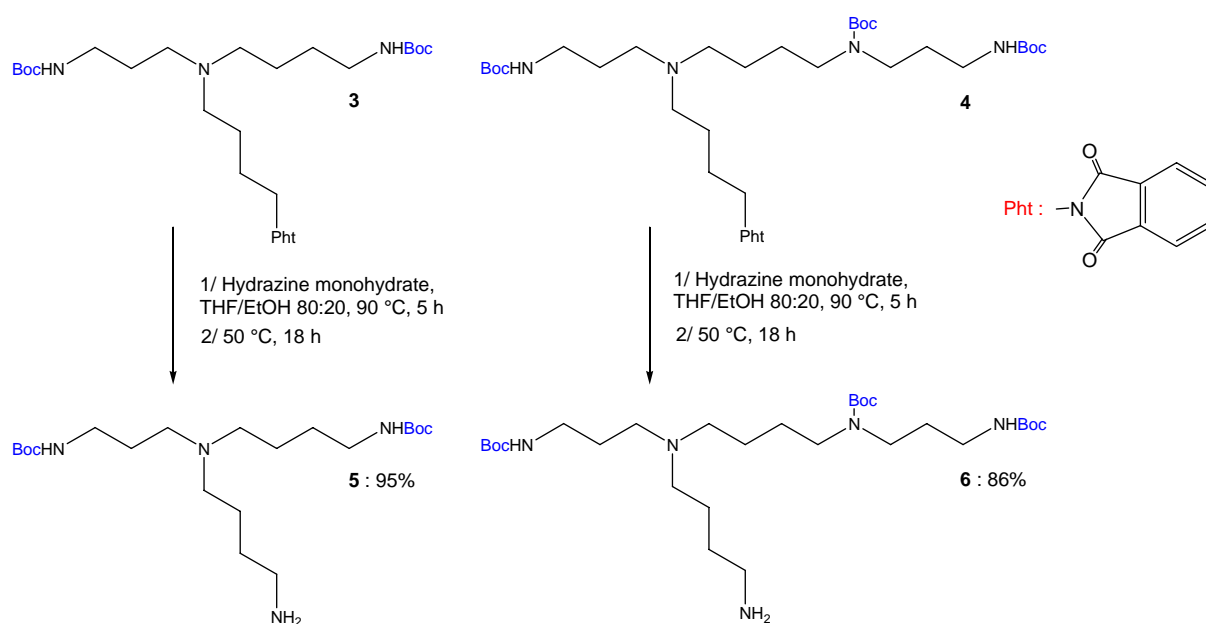


Figure II-9 : Synthèse des précurseurs polyaminés terminaux.

¹⁰¹ R. Sundaramoorthi, C. Marazano, J.-L. Fourrey, B.C. Das ; *Tetrahedron Lett.*, 25, 1984, 3191-3194.

4. Synthèse des mono *para* et *ortho*-hydroxyphényltritolylporphyrines **7a,b**

Afin d'obtenir ces deux produits, nous avons utilisé la méthode dite des "aldéhydes mixtes" décrite par Little¹⁰² présentée au chapitre I. Cette méthode est bien adaptée à la synthèse de mono-hydroxyphényltritolylporphyrines puisque ces composés cristallisent aisément et elle est relativement simple à mettre en œuvre (figure II-10).

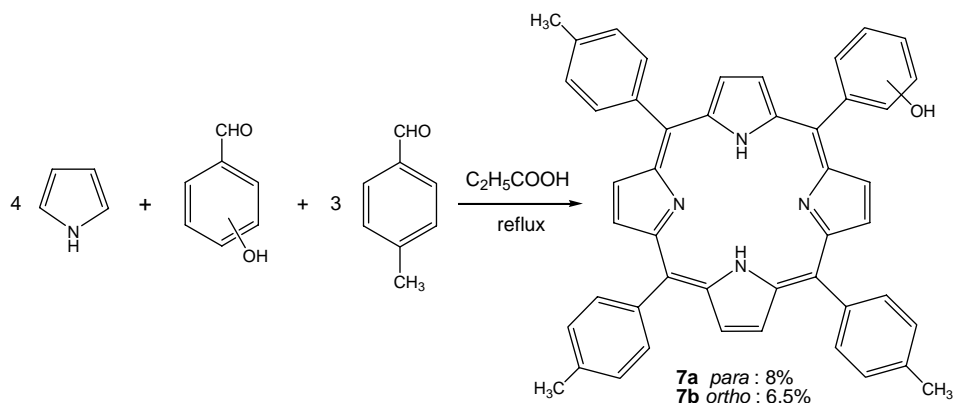


Figure II-10 : Synthèse des mono *para* et *ortho*-hydroxyphényltritolylporphyrines **7a** et **7b**.

On condense à reflux, dans l'acide propanoïque, pendant 90 minutes, des quantités stœchiométriques de pyrrole, de *para*-tolualdéhyde et de *para* ou d'*ortho*-hydroxybenzaldéhyde (proportions : 4/3/1). Après 18 heures à 5°C, les porphyrines monohydroxylées résultantes cristallisent. Après purification, les composés **7a,b** sont obtenus avec des rendements respectifs de 8% et 6,5%. Ces rendements faibles sont néanmoins conformes à ce type de réaction et résultent de la polymérisation concomitante du pyrrole.

5. Synthèse des mono carboxyporphyrines **9a,b**

5.1. Alkylation des porphyrines **7a,b**

Les deux composés **7a,b** sont alkylés par le 4-bromobutanoate d'éthyle au niveau de leur fonction phénol par une simple réaction de Williamson en milieu K₂CO₃/DMF (figure II-11).

¹⁰² R.G. Little, A.J.A. Anton, P.A. Loach, J. Ibers ; *J. Heterocycl. Chem.*, 12, 2, 1975, 343-349.

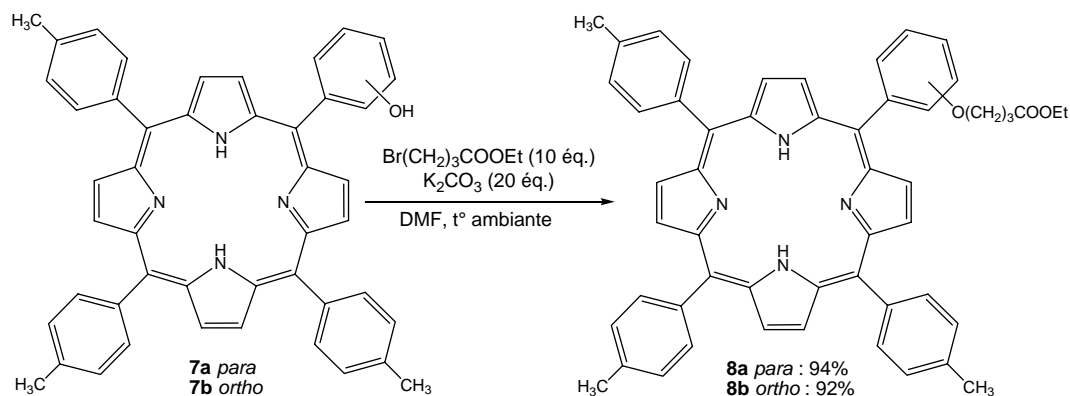


Figure II-11 : O-alkylation des mono-hydroxyph\u00e9nyltritolylporphyrines **7a** et **7b**.

Les meilleurs rendements sont obtenus apr\u00e8s 24 heures de r\u00e9action, \u00e0 temp\u00e9rature ambiante. Apr\u00e8s traitement et purification, les compos\u00e9s **8a,b** sont obtenus avec des rendements respectifs de 94 et 92%.

5.2. Saponification des porphyrines **8a,b**

Des conditions classiques de saponification ont \u00e9t\u00e9 appliqu\u00e9es pour cette r\u00e9action (figure II-12).

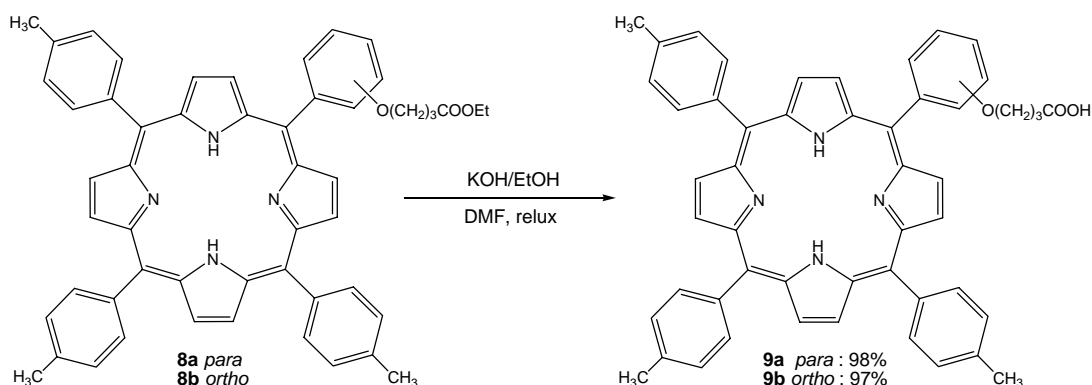


Figure II-12 : Saponification des porphyrines **8a** et **8b**.

Les porphyrines **8a,b** sont mises \u00e0 r\u00e9agir dans le DMF \u00e0 reflux, en pr\u00e9sence d'une solution \u00e9thanolique d'hydroxyde de potassium 1 M. Les compos\u00e9s **9a** et **9b** sont isol\u00e9s avec des rendements quasi-quantitatifs.

6. Formation des porphyrines-polyamines

Dans un premier temps, la spermidineBoc₂ **1** et la spermineBoc₃ **2** ont été fixées sur les carboxyporphyrines **9a** et **9b**. Ensuite, nous avons fait réagir les dérivés polyaminés **5** et **6** sur les mêmes macrocycles tétrapyrroliques. Afin de réaliser ces greffages, les agents de couplage classiques, dicyclocarbodiimide (DCC) et hydroxybenzotriazole (HOBT) ont été utilisés (figure II-13).

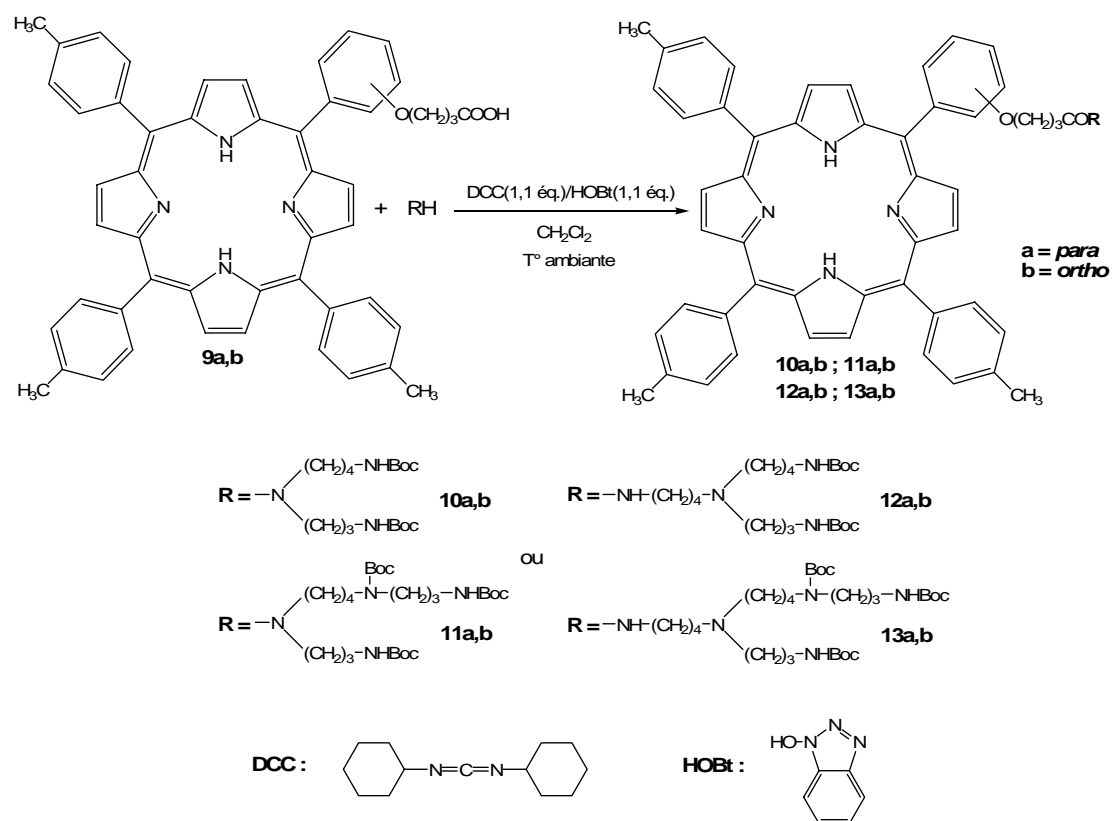


Figure II-13 : Fixation des polyamines sur les porphyrines **9a,b**.

Les meilleurs résultats ont été obtenus après 24 heures de réaction dans le DMF. Après traitement et purification, les rendements des différents produits varient entre 60 et 80% (tableau II-1).

Tableau II-1 : Rendements de couplage.

Porphyrine	Polyamine protégée	Produit obtenu	Rendement
9a	SpermidineBoc ₂	10a	71%
9b	SpermidineBoc ₂	10b	67%
9a	SpermineBoc ₃	11a	74%
9b	SpermineBoc ₃	11b	61%
9a	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermidineBoc ₂	12a	81%
9b	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermidineBoc ₂	12b	77%
9a	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermineBoc ₃	13a	74%
9b	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermineBoc ₃	13b	76%

7. Déprotection des fonctions amines

Les fonctions amines sont déprotégées à température ambiante dans un mélange acide trifluoroacétique/dichlorométhane (1/1) (figure II-14).

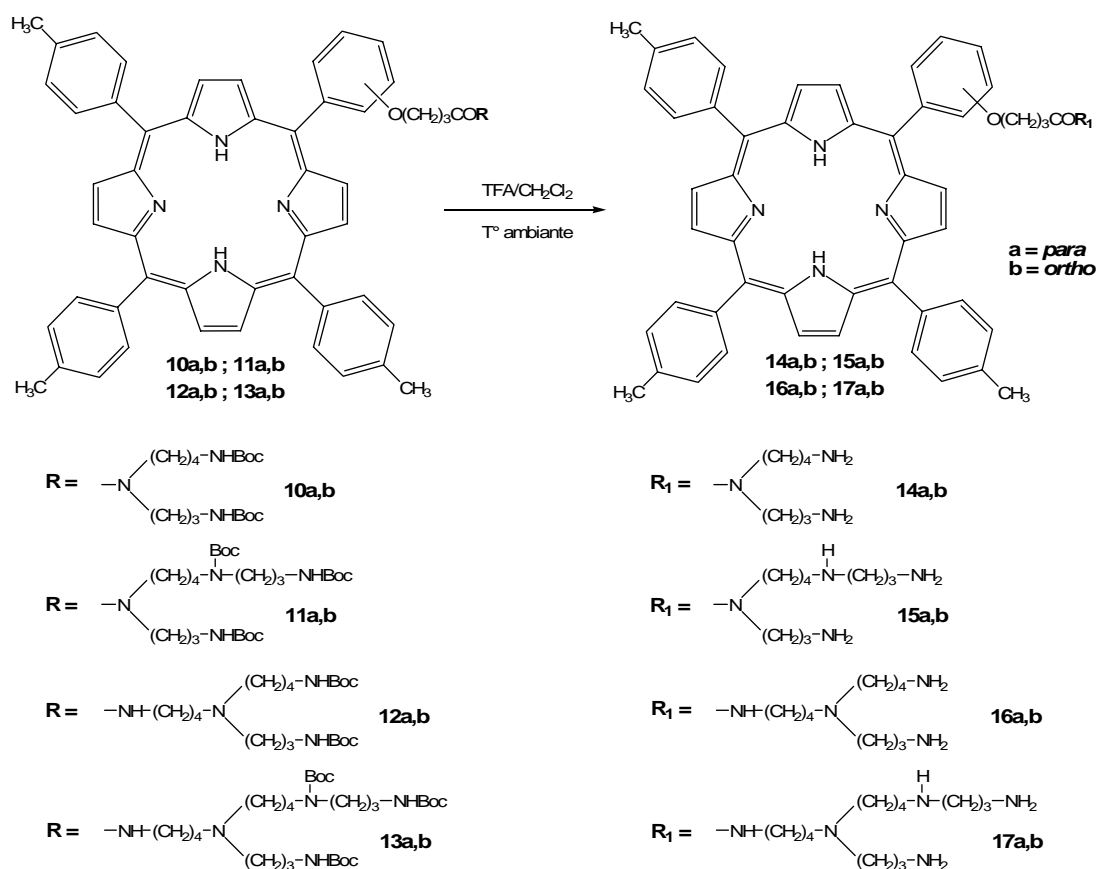


Figure II-14 : Déprotection des porphyrines-polyamines 10a,b à 13a,b.

Les résultats de déprotection sont reportés dans le tableau II-2. Nous obtenons dans tous les cas de bons rendements.

Tableau II-2 : Rendements de déprotection des porphyrines-polyamines.

Porphyrine	Polyamine	Produit obtenu	Rendement
9a	Spermidine	14a	quantitatif
9b	Spermidine	14b	94%
9a	Spermine	15a	quantitatif
9b	Spermine	15b	92%
9a	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermidine	16a	89%
9b	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermidine	16b	89%
9a	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermine	17a	quantitatif
9b	H ₂ N(CH ₂) ₄ spermine	17b	92%

8. Caractérisation spectroscopique

Les porphyrines synthétisées ont toutes été caractérisées par spectroscopie UV-visible et spectrométrie MALDI. Une étude détaillée par spectroscopie RMN du proton de toutes les porphyrines a également été réalisée.

8.1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres des composés **7a** à **9b** ont été réalisés dans le chloroforme et ceux des porphyrines-polyamines **10a** à **15b** ont été réalisés dans le dichlorométhane. Les spectres des composés **16a** à **17b** ont quant à eux été faits dans le méthanol (tableau II-3). Ils correspondent tous aux spectres généralement attendus pour les porphyrines bases libres (cf. chapitre I). Ils présentent donc une forte bande d'absorption vers 420 nm. Les spectres révèlent également la présence de quatre autres bandes de moindre intensité vers 516, 552, 592 et 648 nm nommées respectivement QIV, QIII, QII et QI.

Tableau II-3 : Bandes caractéristiques des spectres UV-Visibles des porphyrines **7a** à **17b**.
 λ_{\max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3}$ mol $^{-1}$.L.cm $^{-1}$)], à 20°C. (a : dans le chloroforme, b : dans le dichlorométhane, c : dans le méthanol)

Composés	Soret	IV	III	II	I	ϵ_{II}/ϵ_I
7a^a	418 (363,0)	516 (13,5)	552 (7,4)	592 (4,0)	648 (4,3)	0,93
7b^a	418 (339,2)	516 (14,4)	552 (6,7)	592 (4,5)	648 (4,1)	1,09
8a^a	420 (354,0)	516 (14,3)	552 (7,2)	592 (4,7)	648 (4,2)	1,12
8b^a	420 (391,0)	516 (13,4)	552 (8,1)	592 (4,6)	648 (2,8)	1,64
9a^a	420 (355,7)	517 (13,4)	553 (7,2)	592 (4,0)	648 (3,8)	1,05
9b^a	420 (388,6)	517 (15,7)	553 (9,8)	592 (4,9)	648 (4,2)	1,16
10a^b	420 (283,0)	516 (9,5)	554 (5,8)	596 (2,7)	650 (2,4)	1,12
10b^b	418 (368,1)	516 (21,1)	552 (12,1)	592 (8,1)	646 (6,5)	1,25
11a^b	420 (294,0)	516 (10,0)	554 (6,7)	594 (3 0)	650 (2,6)	1,15
11b^b	420 (363,5)	516 (17,7)	552 (10,7)	592 (6,0)	646 (4,6)	1,30
12a^b	420 (420,3)	516 (14,3)	553 (12,2)	592 (9,4)	648 (8,2)	1,14
12b^b	419 (487,9)	516 (16,0)	553 (10,5)	593 (6,1)	646 (4,3)	1,42
13a^b	422 (460,6)	517 (18,7)	553 (14,6)	595 (6,5)	648 (4,4)	1,47
13b^b	420 (446,4)	516 (14,4)	554 (9,0)	594 (5,6)	645 (3,7)	1,51
14a^b	420 (573,8)	516 (16,7)	554 (9,8)	596 (3,0)	650 (2,9)	1,03
14b^b	419 (156,7)	514 (7,2)	546 (5,3)	590 (3,1)	646 (2,0)	1,55
15a^b	420 (637,6)	516 (26,3)	554 (15,6)	596 (8,5)	650 (7,9)	1,08
15b^b	413 (176,2)	514 (6,5)	546 (4,6)	590 (2,6)	646 (1,6)	1,62
16a^c	416 (234,1)	515 (7,9)	547 (5,1)	590 (4,1)	650 (3,1)	1,32
16b^c	415 (162,7)	515 (9,6)	550 (6,3)	591 (3,9)	648 (3,4)	1,15
17a^c	415 (258,4)	514 (12,7)	549 (6,9)	590 (4,6)	646 (3,7)	1,24
17b^c	415 (143,1)	515 (10,7)	550 (7,7)	591 (5,9)	648 (5,3)	1,11

La plupart des spectres appartiennent au type *étio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des faibles aux grandes longueurs d'onde (cf. chapitre I). Le composé **7a**, présente une légère modification dans l'intensité relative des bandes I et II conduisant à un spectre atypique avec un coefficient ϵ_I supérieur à ϵ_{II} . Nous donnons à titre d'exemples, le spectre de la porphyrine-spermidine protégée **12a** et le spectre de la porphyrine-spermidine déprotégée **16a** (figure II-15).

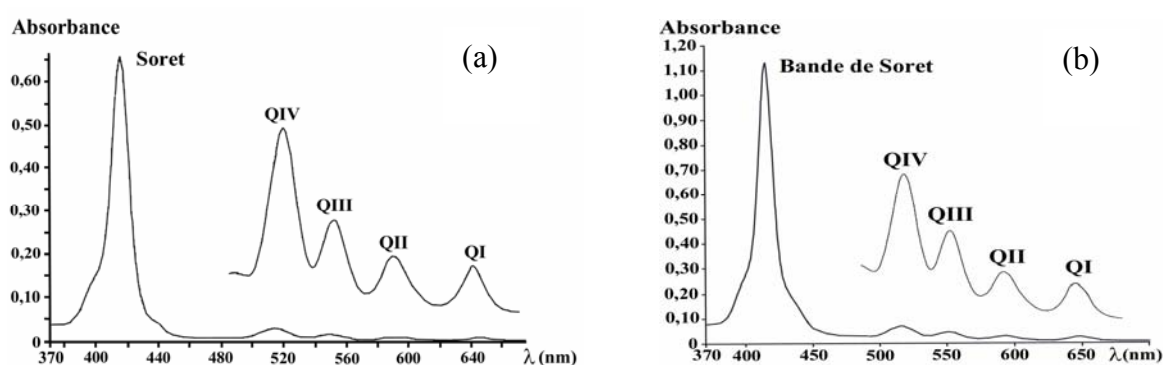


Figure II-15 : (a) Spectre UV-Visible du composé **12a** (CH_2Cl_2 , $C=1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) ;
 (b) Spectre UV-Visible du composé **16a** (MeOH , $C=4,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

8.2. Spectrométrie de masse

L'analyse structurale des précurseurs porphyriniques a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse. Comme mentionné au chapitre I, ces composés ne sont pas volatils et ne se prêtent donc pas aux techniques classiques d'ionisation. Nous avons utilisé une technique particulière par désorption laser assistée par effet matrice (technique MALDI). Cette méthode permet l'observation de l'ion quasi-moléculaire généralement sans fragmentation. Les résultats obtenus pour les porphyrines **7** à **17** sont reportés dans le tableau II-4. Tous les spectres obtenus présentent le pic quasi-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$. Dans certains cas, on observe la présence d'un massif correspondant à l'espèce moléculaire cationisée par Na^+ . Ce type d'ion est assez fréquent et peut provenir de la cible ou de l'échantillon (traces). En outre, nous constatons la présence d'ions métastables. Pour l'explication de ces ions, il faut remonter à la technique MALDI-TOF. Pour cette méthode, les ions produits par l'impact laser sont accélérés sur une distance de quelques millimètres par un potentiel de 20kV et la vitesse acquise ne dépend que de la valeur m/z . On les laisse ensuite "voler" dans une région sans champ électrique sur une distance de l'ordre du mètre et on déduit le rapport m/z de la valeur du temps de vol. Si les ions sont stables pendant la période d'accélération, la valeur du temps de vol mesuré est significative et les pics sont bien résolus dans le temps. Par contre, si les ions sont instables et se cassent pendant la période d'accélération, le temps de vol mesuré n'est pas significatif (il correspond à plusieurs espèces ioniques accélérées différemment) et de plus, il y a une distribution de temps de vol et donc de pics mal résolus.

Tableau II-4 : Spectrométrie MALDI des composés **7a** à **17b**.

Composés	Masse molaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi- moléculaire (uma)
7a	672,3	673,6
7b	672,3	673,6
8a	786,4	787,9
8b	786,4	787,9
9a	758,3	759,9
9b	758,3	759,8
10a	1085,6	1086,6
10b	1085,6	1086,6
11a	1242,7	1243,5
11b	1242,7	1243,5
12a	1156,7	1157,5
12b	1156,7	1157,6
13a	1313,8	1314,6
13b	1313,8	1314,7
14a	885,5	886,4
14b	885,5	886,5
15a	942,5	943,6
15b	942,5	943,6
16a	956,5	957,6
16b	956,5	957,5
17a	1013,6	1014,5
17b	1013,6	1014,5

A titre d'exemple, nous présentons sur la figure II-16, les spectres obtenus pour les composés **13a** et **16a**.

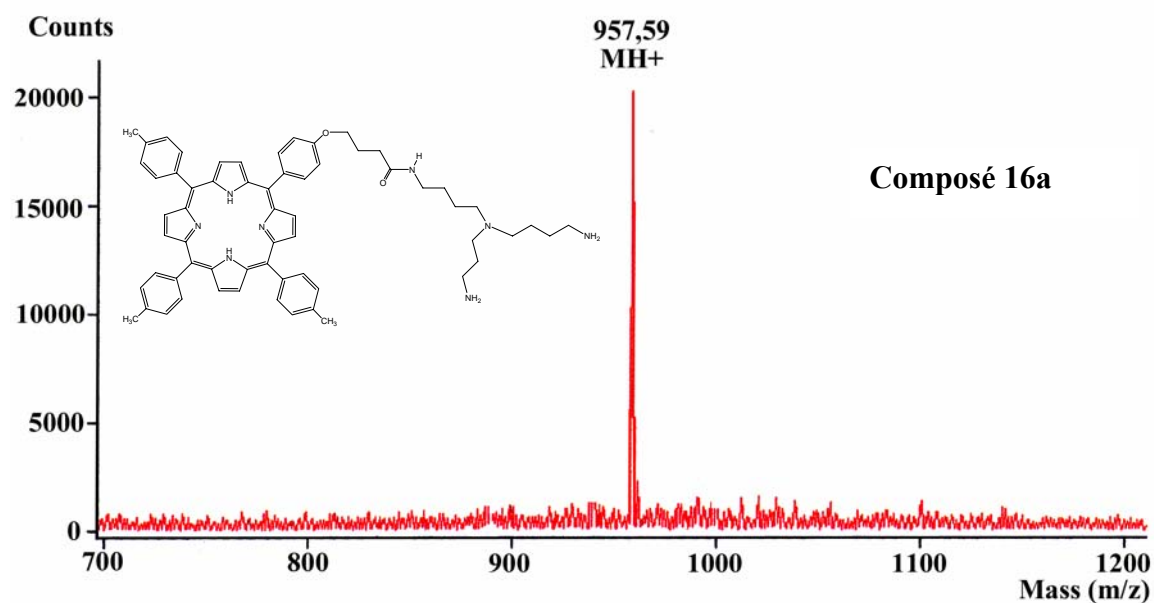
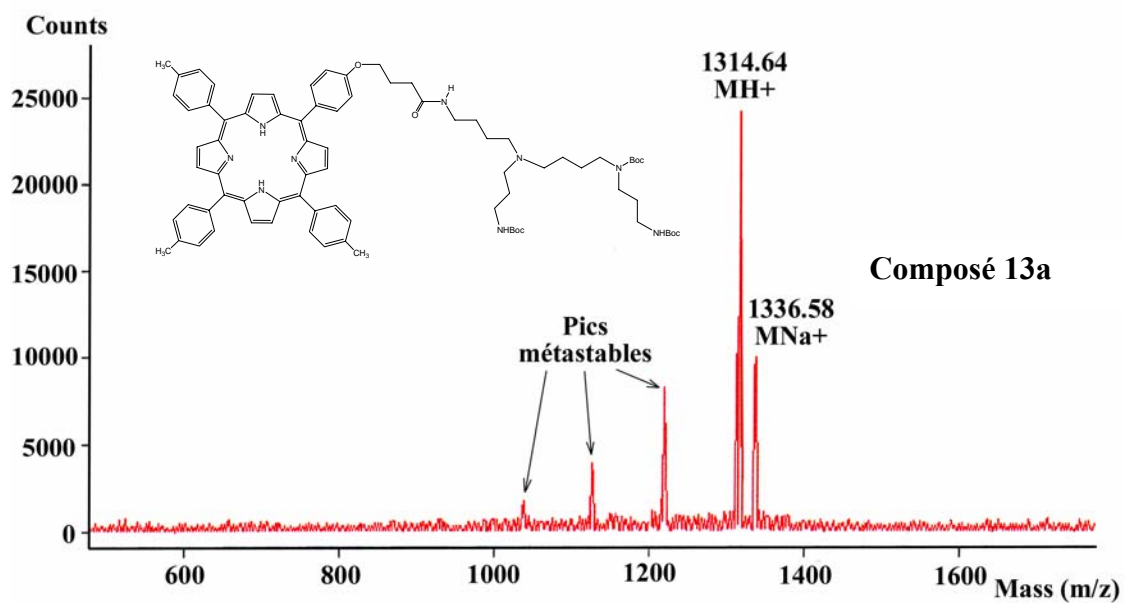


Figure II-16 : Spectres MALDI des composés **13a** et **16a**.

8.3. RMN du proton

8.3.1. RMN du proton des précurseurs (7 à 9)

Les spectres de RMN du proton des *méso*-tritolylporphyrines **7** à **9** ont été réalisés dans le chloroforme deutérié. Les tableaux II-5 et II-6 présentent les attributions des signaux observés. D'une manière générale, le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton d'un composé de ce type se compose des groupes de signaux suivants (figure II-17) :

- les protons β -pyrroliques vers 8,8 ppm,
- les protons phényliques 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 méthyliques des groupements tolyles vers 2,6 ppm.

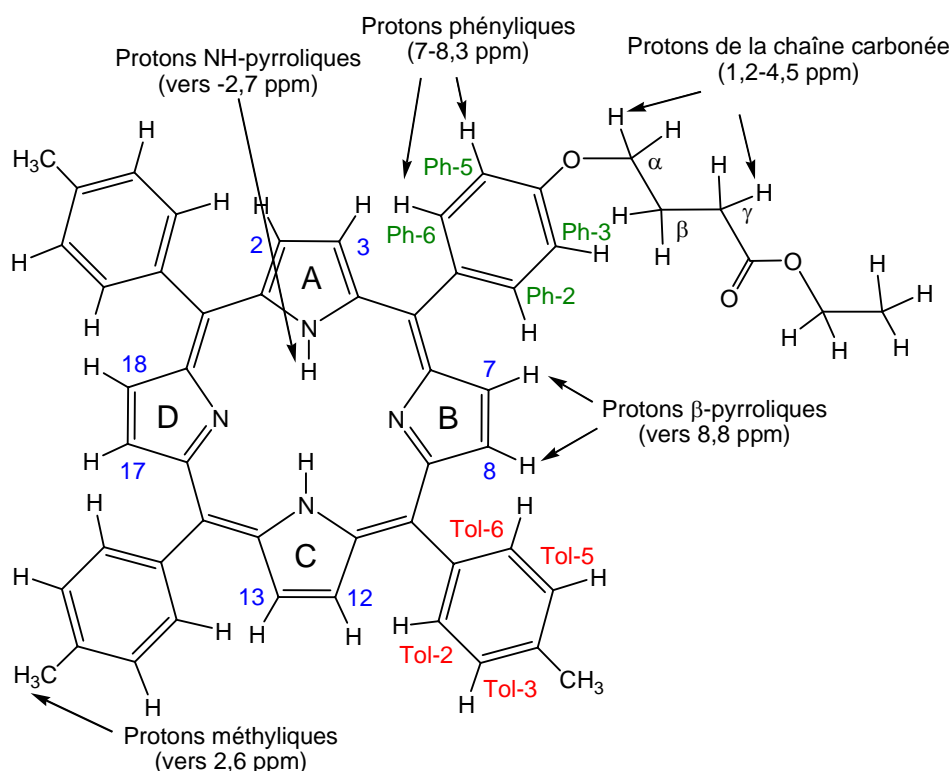


Figure II-17 : Groupes de signaux principaux du spectre RMN ^1H (exemple du composé **8a**).

Tableau II-5 : RMN ¹H des tritolypporphyrines *para*-substituées **7a**, **8a** et **9a** (CDCl₃).
 δ en ppm (*J* en Hertz).

H	7a	8a	9a
<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	8,08 d (8,2)	8,12 d (8,4)	8,09 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	8,03 d (7,8)	8,11 d (7,7)	8,07 d (7,7)
3,5	7,53 d (7,8)	7,56 d (7,7)	7,23 d él. (7,7)
CH₃	2,69 s	2,69 s	2,68 s
<u>Bras espaceur</u>			
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)
CH₂ (éthyle)	-	4,25 quad. (7,2)	-
CH₃ (éthyle)	-	1,36 t (7,2)	-

Tableau II-6 : RMN ^1H des tritolyporphyrines *ortho*-substituées **7b**, **8b** et **9b** (CDCl_3).
 δ en ppm (J en Hertz).

H	7b	8b	9b
<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	7,20 m	7,30 d él. (8,0)	7,33 m
4	7,70 m	7,73 td (8,0-1,6)	7,70 tdt (8,2-1,6)
5	7,20 m	7,34 t él. (7,2)	7,33 t él. (7,2)
6	7,90 m	8,02 dd (7,2-1,6)	8,02 dd (7,2-1,6)
<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)	-

a) RMN ^1H de la porphyrine ester **8a**

A titre d'exemple, nous présentons l'étude détaillée du spectre RMN ^1H de la 5-(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)10,15,20-tritolylporphyrine **8a**. Cette tritolylporphyrine est substituée en position *para* du groupement *méso*-aryl par un bras 3-éthoxycarbonylpropyloxy (figure II-17).

Les protons β -pyrroliques résonnent sous la forme d'un singulet à 8,88 ppm. Les protons aromatiques du phényle portant la chaîne hydrocarbonée en position *para* résonnent sous la forme de deux doublets à 8,11 ppm ($J=8,4$ Hz) et à 7,26 ppm ($J=8,4$ Hz). Egalement, compte tenu de la symétrie de la molécule, les protons aromatiques des trois tolyles, résonnent sous la forme de deux doublets, à 8,12 ppm ($J=7,7$ Hz) et 7,56 ppm ($J=7,7$ Hz). En ce qui concerne les protons H- α , H- β et H- γ de la chaîne alkyle, nous pouvons observer qu'ils 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 à 2,61 ppm ($J=7,3$ Hz). Enfin, les protons NH pyrroliques sont fortement blindés et ils se situent à -2,79 ppm sous la forme d'un singulet élargi.

b) Influence de l'orientation de la substitution

Le passage de la position de la chaîne hydrocarbonée en *para* du phényle à la position *ortho* entraîne un certain nombre de changements dans les spectres RMN ^1H des tritolylporphyrines alkylées **8a,b** et **9a,b**. Une différence importante est observée au niveau du bras *O*-alkyl. Ainsi, les protons de la chaîne hydrocarbonée sont nettement plus blindés en *ortho* qu'en *para* du groupement phényle. Les protons éthyles sont également bien plus blindés lorsqu'ils sont portés par la chaîne hydrocarbonée en *ortho* qu'en *para*, car ils se trouvent dans le cône de blindage du macrocycle porphyrinique (tableau II-7).

Tableau II-7 : Variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) par passage d'une position *para* à une position *ortho*.

H	$\Delta\delta(8b-8a)$	$\Delta\delta(9b-9a)$
α	-0,39	-0,51
β	-1,01	-1,05
γ	-1,36	-1,47
CH ₂ -éthyle	-0,66	-
CH ₃ -éthyle	-0,63	-

Ces résultats ont pu être appuyés par une étude de modélisation moléculaire (CS Chem 3D Ultra[®] 7.0 ; figures II-18 et II-19). Le champ de force MM2 a été choisi. Nous constatons que dans le cas des porphyrines *ortho*, la chaîne hydrocarbonée se situe au-dessus du macrocycle, dans le cône de blindage. Ceci donne un support théorique aux résultats de RMN du proton précédemment décrits. Avec les deux porphyrines *para* substituées nous pouvons observer que la chaîne alkyle est déplacée vers l'extérieur du macrocycle. Par ailleurs, l'étude des caractéristiques géométriques de ces porphyrines montre dans tous les cas que le macrocycle est légèrement déformé et que les groupements phényles ne sont pas dans le plan du cycle.

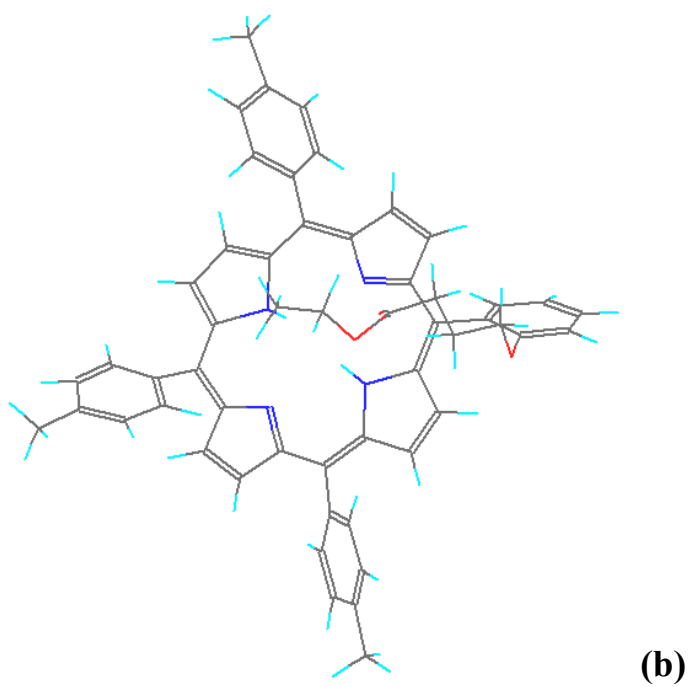
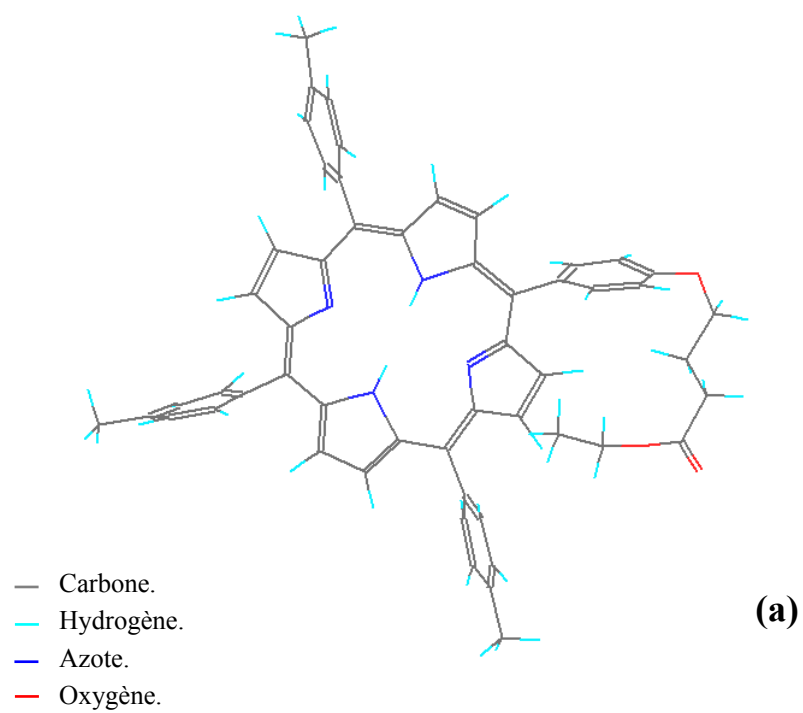


Figure II-18 : Conformations les plus stables des porphyrines ester.
 (a) Bras en position *para* (composé **8a**) ; (b) Bras en position *ortho* (composé **8b**).

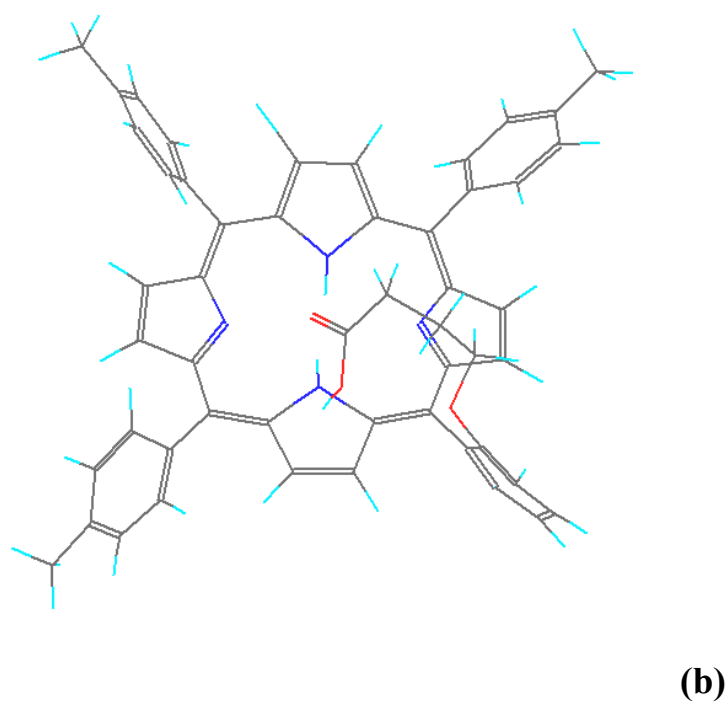
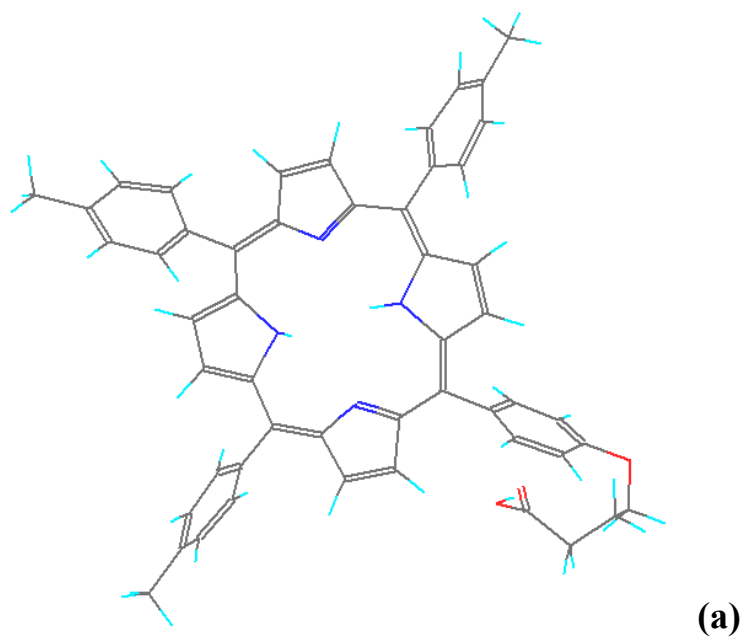


Figure II-19 : Conformations les plus stables des carboxyporphyrines.
(a) Bras en position *para* (composé **9a**) ; (b) Bras en position *ortho* (composé **9b**).

8.3.2. RMN du proton des porphyrine- polyamines (10 à 17)

Les spectres RMN ^1H des *méso*-tritolylporphyrines-polyamines protégées **10** à **13** ont été réalisés dans le chloroforme deutérié. Par contre, l'ensemble des spectres de résonance magnétique nucléaire des porphyrines-polyamines déprotégées **14** à **17** a été réalisé dans un mélange de chloroforme et de méthanol deutérié (9/1).

L'allure du spectre RMN ^1H de ces composés est très voisin des porphyrines décrites précédemment (**7-9**). Ainsi, nous retrouvons les signaux correspondant aux caractéristiques du macrocycle tétrapyrrolique. Les spectres se composent des groupes de signaux suivants (figure II-20 et II-21) :

- les protons β -pyrroliques vers 8,8 ppm,
- les protons phényles entre 7 et 8,3 ppm,
- les protons du bras espaceur et de la polyamine entre 1 et 4,5 ppm,
- les protons NH pyrroliques vers -2,7 ppm,
- les protons méthyliques des groupements tolyles vers 2,6 ppm,
- les protons du *tert*-butyloxycarbonyle vers 1,40 ppm (*seulement pour les composés protégés 10a à 13b*).

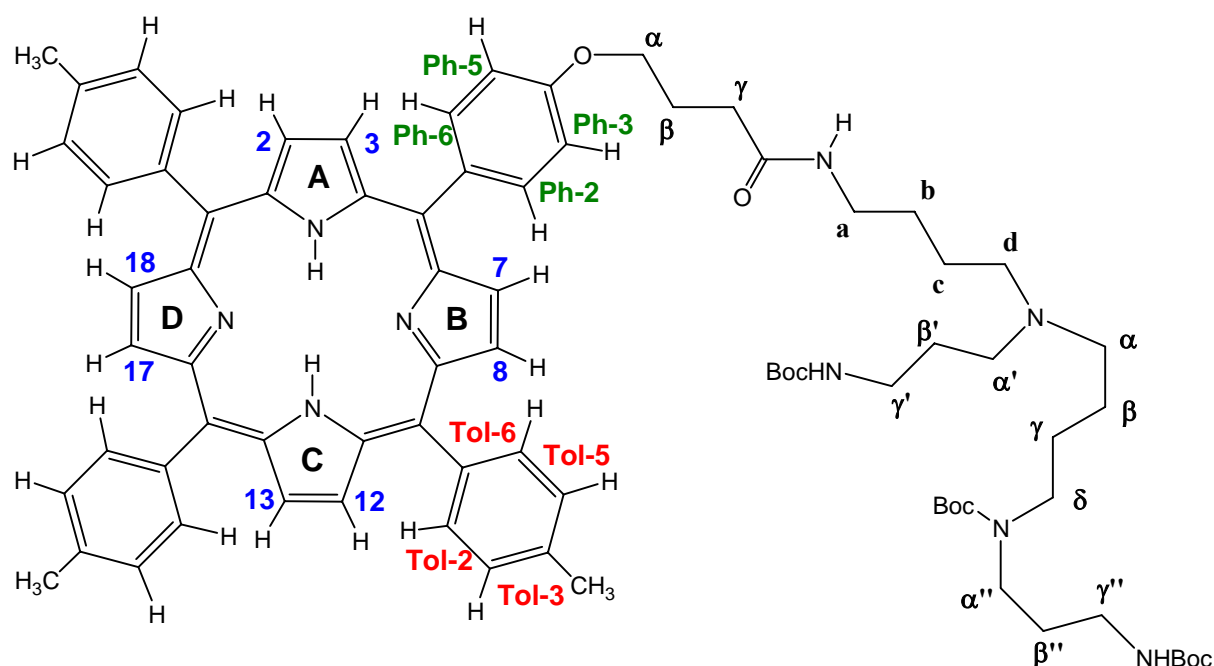


Figure II-20 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN (exemple avec le composé **13a**).

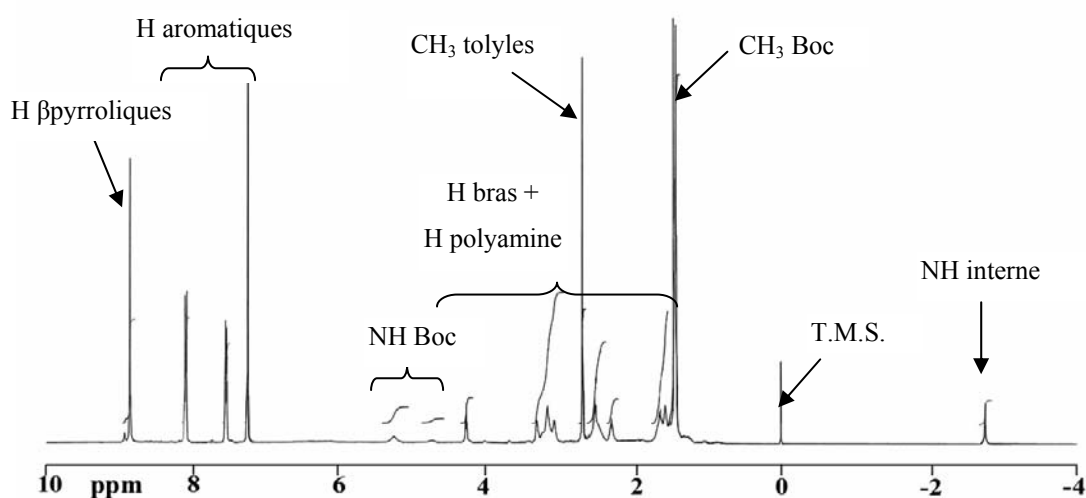


Figure II-21 : Spectre RMN ^1H du composé **13a** dans CDCl_3

L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée grâce à l'étude des intégrations et des spectres de corrélation 2D proton-proton (COSY). Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux II-8 à II-11.

Nous présentons à titre d'exemple, l'étude du spectre du composé **13a**. Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous observons que les protons β -pyrroliques résonnent sous la forme d'un singulet à 8,85 ppm. Les protons portés par le phényle, résonnent sous la forme de deux doublets à 8,11 ($J=8,2$ Hz) et à 7,26 ppm ($J=8,2$ Hz). Ceux portés par les trois tolyles, se retrouvent à 8,08 ppm (doublet, $J=8,2$ Hz) et à 7,54 ppm (doublet, $J=8,2$ Hz). Les protons H- α , H- β et H- γ du bras espaceur se situent respectivement à 4,28 ppm (triplet, $J=5,9$ Hz), à 2,30 ppm (quintuplet, $J=6,2$ Hz) et à 2,67 ppm (multiplet). Les protons NH pyrroliques sont blindés (-2,76 ppm, singulet). Concernant la polyamine, les protons du bras H-a, H-b, H-c, H-d se présentent sous la forme de multiplets et ils se trouvent respectivement à 2,53 ppm, à 1,65 ppm (pour H-b et H-c) et à 3,31 ppm. Les protons H- γ' , H- α'' , H- γ'' se trouvent à 3,17 ppm (multiplet) et le proton H- δ à 3,08 ppm (multiplet). Les protons H- α et H- α' quant à eux, résonnent sous la forme d'un multiplet à 2,53 ppm et les protons les plus blindés sont à 1,57 ppm (H- β' , H- β'') et à 1,51 ppm (H- β , H- γ). Nous observons les protons méthyliques du Boc à 1,34 ppm et ils résonnent sous la forme d'un multiplet. Enfin, les protons NHBoc se retrouvent à 5,30 et 4,74 ppm sous la forme d'un singulet.

Par comparaison avec la porphyrine **13a**, l'observation du spectre RMN ^1H du composé déprotégé **17a**, montre la disparition des signaux correspondant aux groupements Boc. Nous

remarquons également la disparition des protons des NH internes, par échange avec le solvant.¹⁰³

Tableau II-8 : Spectroscopie RMN ¹H des composés **10a**, **10b**, **11a** et **11b** (CDCl₃). δ en ppm (*J* en Hertz).

H	10a	11a	10b	11b
<u>Pyrroles</u>				
Hβ	8,88 s	8,85 s	8,85 m	8,86 m
NH interne	-2,77 s	-2,76 s	-2,76 s	-2,76 s
<u>Phényle</u>				
2	8,12 d (8,4)	8,12 d (8,4)	-	-
3	7,30 d (8,4)	7,30 d (8,4)	7,35 dél. (8,4)	7,33 dél. (8,4)
4	-	-	7,76 td (8,4-1,2)	7,75 td (8,4-1,4)
5	7,30 d (8,4)	7,30 d (8,4)	7,37 tél. (7,6)	7,35 tél. (7,6)
6	8,12 d (8,4)	8,10 d (8,4)	8,02 dd (7,6-1,2)	8,01 dd (7,6-1,4)
<u>Tolyles</u>				
2,6	8,09 d (7,6)	8,10 d (7,5)	8,06 m	8,07 m
3,5	7,57 d (7,6)	7,54 d (7,5)	7,55 d (7,6)	7,56 d (7,6)
CH₃	2,69 m	2,70 s	2,70 m	2,70 m
<u>Bras espaceur</u>				
α	4,33 t (6,0)	4,31 t (6,0)	4,01 t (6,0)	4,03 t (6,0)
β	2,33 quint. (6,0)	2,32 quint. (6,0)	1,66 m	1,66 m
γ	2,65 m	2,68 m	1,69 m	1,68 m
<u>Polyamine</u>				
α	3,45 m	3,43 m	3,45 m	3,43 m
β	1,60 m	1,60 m	1,60 m	1,60 m
γ	1,60 m	1,60 m	1,60 m	1,60 m
δ	3,15 m	3,24 m	2,50 m	2,51 m
α'	3,45 m	3,43 m	3,45 m	3,44 m
β'	1,91 m	1,88 m	1,91 m	1,88 m
γ'	3,15 m	3,11 m	2,50 m	2,51 m
α''	-	3,24 m	-	2,51 m
β''	-	1,88 m	-	1,88 m
γ''	-	3,11 m	-	2,51 m
CH₃ (Boc)	1,45 s	1,45 s	1,34 s	1,33 s
NHBoc	5,31 s-4,98 s	5,30 s-4,99 s	5,29 s-5,01 s	5,30 s-4,99 s

¹⁰³ E. Davoust, R. Granet, P. Krausz ; *Tetrahedron Lett.*, 40, 1999, 2513-2516.

Tableau II-9 : Spectroscopie RMN ¹H des composés **12a**, **12b**, **13a** et **13b** (CDCl₃).
 δ en ppm (*J* en Hertz).

H	12a	13a	12b	13b
<u>Pyrroles</u>				
Hβ	8,85 s	8,85 s	8,87 m	8,86 m
NH interne	-2,76 s	-2,76 s	-2,75 s	-2,74 s
<u>Phényle</u>				
2	8,10 d (8,4)	8,10 d (8,2)	-	-
3	7,25 d (8,4)	7,25 d (8,2)	7,29 dél. (8,2)	7,29 dél. (8,2)
4	-	-	7,75 td (8,2-1,5)	7,76 tél. (8,2-1,6)
5	7,25 d (8,4)	7,25 d (8,2)	7,40 tél. (7,3)	7,39 tél. (7,3)
6	8,10 d (8,4)	8,10 d (8,2)	8,13 m	8,13 m
<u>Tolyles</u>				
2,6	8,08 d (7,8)	8,08 d (7,7)	8,06 m	8,06 m
3,5	7,53 d (7,8)	7,54 d (7,7)	7,55 m	7,55 d (7,5)
CH ₃	2,70 s	2,69 s	2,70 s	2,70 s
<u>Bras espaceur</u>				
α	4,27 t (6,0)	4,28 t (5,9)	3,82 t (5,5)	3,83 t (5,4)
β	2,29 quint. (6,2)	2,30 quint. (6,2)	1,20 m	1,17 m
γ	2,69 m	2,67 m	1,22 m	1,20 m
<u>Polyamine</u>				
a	2,53 t (7,4)	2,53 m	1,91 m	1,91 m
b	1,65 m	1,65 m	1,25 m	1,25 m
c	1,65 m	1,65 m	1,25 m	1,25 m
d	3,31 m	3,31 m	2,64 m	2,62 m
α	2,65 m	2,53 m	1,93 m	1,93 m
β	1,49 m	1,51 m	1,13 m	1,08 m
γ	1,49 m	1,51 m	1,13 m	1,08 m
δ	3,09 m	3,08 m	2,87 m	3,16 m
α'	2,65 m	2,53 m	2,00 m	1,93 m
β'	1,57 quint. (6,0)	1,57 m	1,42 m	1,43 m
γ'	3,16 m	3,17 m	2,85 m	3,11 m
α''	-	3,17 m	-	3,16 m
β''	-	1,57 m	-	1,43 m
γ''	-	3,17 m	-	2,86 m
CH ₃ (Boc)	1,43 m	1,44 m	1,34 m	1,32 s
<u>NHBoc</u>	5,30 s-4,74 s	5,30 s-4,74 s	5,29 s-4,73 s	5,31 s-4,74 s

Tableau II-10 : Spectroscopie RMN ^1H des composés **14a**, **14b**, **15a** et **15b** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 9/1).
 δ en ppm (J en Hertz).

H	14a	15a	14b	15b
<u>Pyrroles</u>				
Hβ	8,85 s	8,86 s	8,85 m	8,83 s
<u>Phényle</u>				
2	8,15 m	8,29 m	-	-
3	7,33 d (6,6)	7,70 m	7,39 t (7,3)	7,33 t (7,4)
4	-	-	7,82 t (7,8)	7,78 t (7,5)
5	7,33 d (6,6)	7,70 m	7,46 d (8,4)	7,44 d (8,3)
6	8,15 m	8,29 m	8,03 m	8,01 m
<u>Tolyles</u>				
2,6	8,15 m	8,29 m	8,03 m	8,07 m
3,5	7,61 d (6,5)	7,70 m	7,61 m	7,61 m
CH$_3$	2,72 s	2,69 s	2,70 s	2,67 s
<u>Bras espaceur</u>				
α	4,30 m	4,22 t (6,1)	4,03 t (6,2)	4,01 m
β	2,30 m	2,30 m	1,66 m	1,58 m
γ	2,65 m	2,64 m	1,70 m	1,69 m
<u>Polyamine</u>				
α	3,47 m	3,35 m	3,31 m	3,31 m
β	1,70 m	1,67 m	1,27 m	1,28 m
γ	1,62 m	1,67 m	1,27 m	1,28 m
δ	2,96 t (6,1)	3,23 m	2,42 t (6,2)	2,78 m
α'	3,53 m	3,35 m	3,31 m	3,31 m
β'	1,79 m	1,67 m	1,27m	1,28 m
γ'	3,02 t (6,0)	2,99 m	2,52 t (6,0)	2,78 m
α''	-	3,23 m	-	2,90 m
β''	-	1,67 m	-	1,28 m
γ''	-	2,99 m	-	2,78 m

Tableau II-11 : Spectroscopie RMN ^1H des composés **16a**, **16b**, **17a** et **17b** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 9/1).
 δ en ppm (J en Hertz).

H	16a	17a	16b	17b
<u>Pyrroles</u>				
Hβ	8,86 s	8,86 s	8,87 m	8,87 s él.
<u>Phényle</u>				
2	8,10 d (8,4)	8,12 d (8,3)	-	-
3	7,27 d (8,4)	7,32 d (8,3)	7,43 dél. (8,2)	7,43 d (8,4)
4	-	-	7,80 td (8,2-1,5)	7,81 td (8,4-1,4)
5	7,27 d (8,4)	7,32 d (8,3)	7,39 m	7,40 m
6	8,10 d (8,4)	8,12 d (8,3)	8,04 dd (7,6-1,5)	8,04 dd (7,7-1,4)
<u>Tolyles</u>				
2,6	8,08 d (7,8)	8,07 d (7,7)	8,07 m	8,09 m
3,5	7,55 d (7,8)	7,58 d (7,7)	7,59 m	7,61 m
CH$_3$	2,70 s	2,71 s	2,71 s	2,71 s
<u>Bras espaceur</u>				
α	4,30 t (6,1)	4,32 t (6,0)	3,96 t (5,4)	3,97 t (5,4)
β	2,29 quint. (6,7)	2,30 quint.	1,20 m	1,18 m
γ	2,66 m	2,67 t (6,6)	1,22 m	1,20 t (7,1)
<u>Polvamine</u>				
a	2,66 m	2,60 t (7,1)	2,03 m	2,15 m
b	1,78 m	1,84 m	1,26 m	1,26 m
c	1,78 m	1,84 m	1,26 m	1,26 m
d	3,30 t (6,5)	3,35 m	2,66 m	2,65 m
α	2,60 t (6,6)	2,79 m	2,05 m	2,15 m
β	1,58 m	1,67 m	1,13 m	1,15 m
γ	1,58 m	1,67 m	1,13 m	1,15 m
δ	2,97 t (6,1)	3,10 m	2,75 t (7,0)	2,78 m
α'	2,84 t (6,6)	2,89 t (6,4)	2,08 m	2,15 m
β'	1,99 quint. (6,6)	1,85 quint.	1,37 m	1,37 m
γ'	3,11 t (6,4)	3,10 m	2,81 t (7,0)	2,78 m
α''	-	3,24 t (6,0)	-	2,90 m
β''	-	1,67 m	-	1,37 m
γ''	-	3,10 m	-	2,78 m

Chapitre III

Synthèse de protoporphyrines IX-polyamines

1. Introduction

Compte tenu des résultats de la littérature, et en raison de l'intérêt de la protoporphyrine IX en PDT, nous avons souhaité fixer sur cette dernière deux polyamines, la N^4 -(4-aminobutyl)-spermidineBoc₂ **5** et la N^4 -(4-aminobutyl)-spermineBoc₃ **6**. Ces nouvelles structures auront l'avantage de posséder deux vecteurs (polyamines) pour le ciblage des cellules cancéreuses et leur caractère amphiphile se trouvera augmenté.

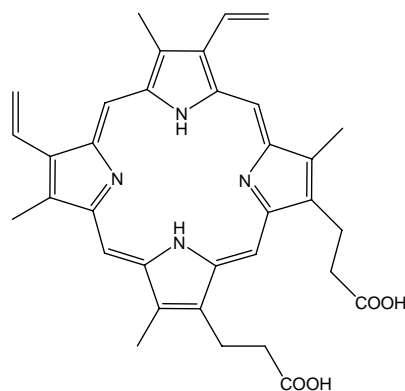


Figure III-1 : Structure de la protoporphyrine IX.

Dans la suite de notre travail, nous nous sommes donc proposés de synthétiser la protoporphyrine IX-dispermidinée et la protoporphyrine IX-disperminée présentées sur la figure III-2.

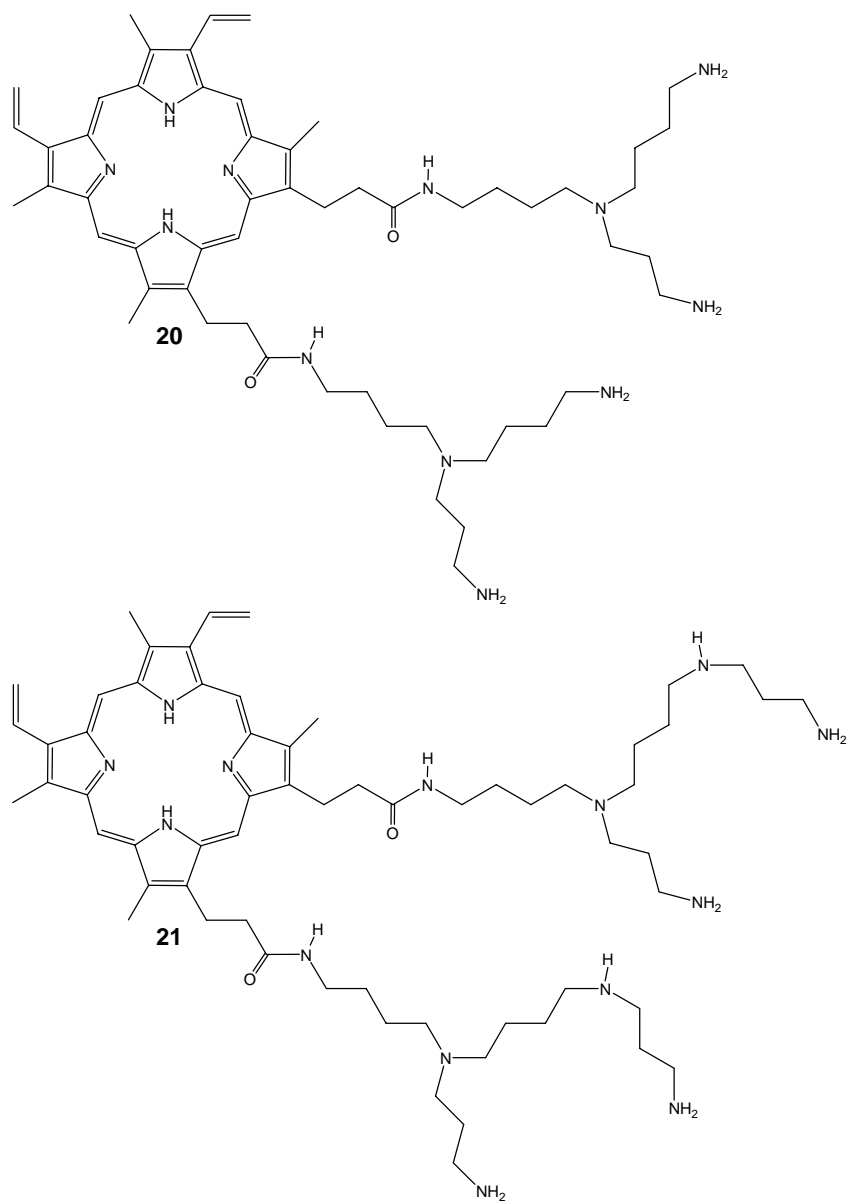


Figure III-2 : Structure des protoporphyrines IX-polyamines synthétisées.

2. Stratégie de synthèse

Les étapes de la synthèse de ces composés sont représentées sur la figure III-3. Dans un premier temps, on fixe les polyamines **5** ou **6** sur les fonctions acides carboxyliques de la protoporphyrine IX commerciale en présence de DCC et de HOBT. Les protoporphyrines polyaminées formées **18** et **19** sont ensuite déprotégées.

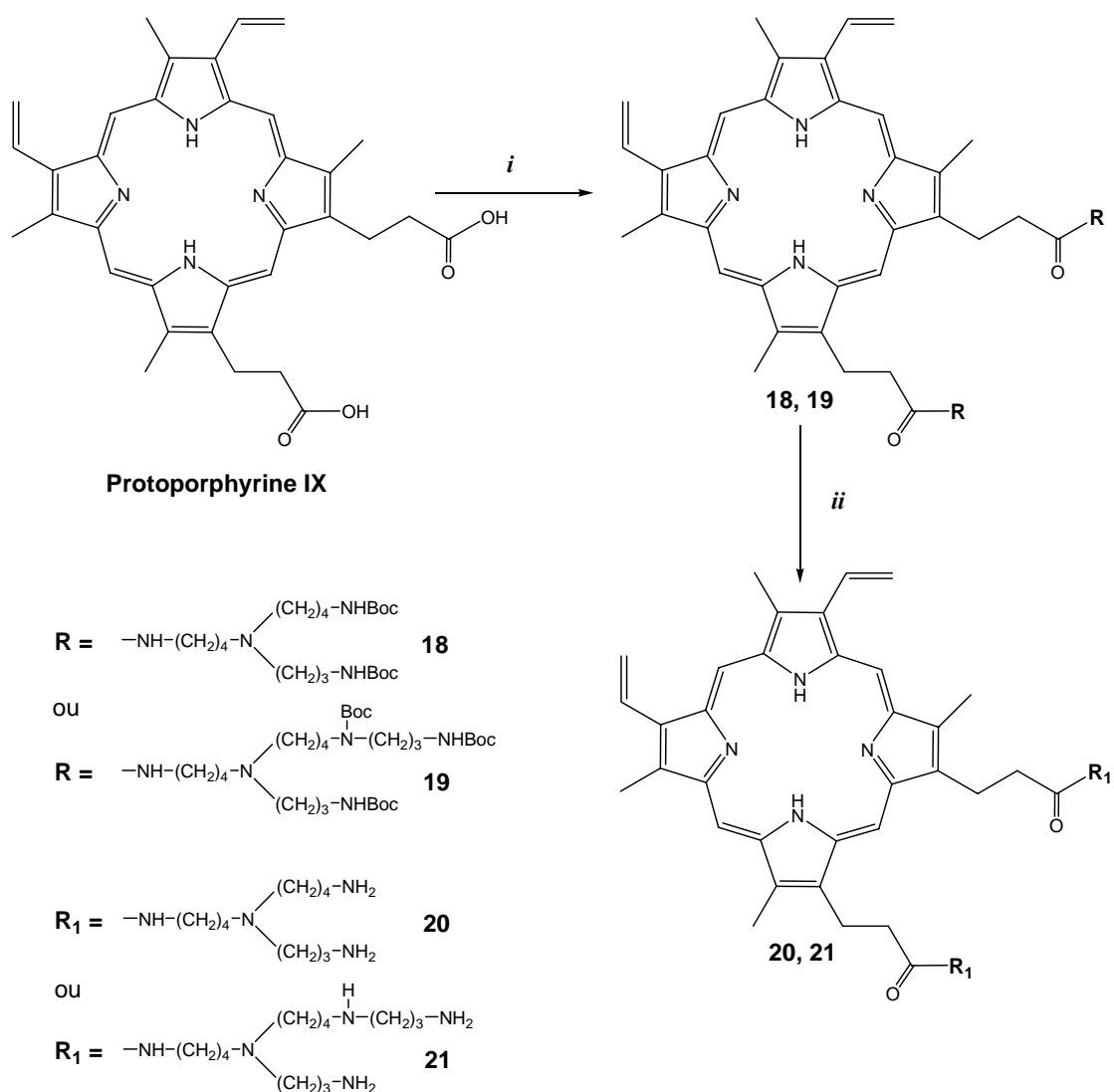


Figure III-3 : Schéma synthétique des protoporphyrines IX polyaminées **20** et **21**.
 (i) **5** ou **6** (2,2 éq.), DCC (2,2éq.), HOBT (2,2 éq.), DMF, t° ambiante ; (ii) CF₃COOH/CH₂Cl₂ (1/1), t° ambiante.

3. Fixation des polyamines protégées sur la protoporphyrine IX

La fixation des dérivés polyaminés **5** ou **6** sur la protoporphyrine IX est réalisée en 72 heures, à température ambiante, en présence de 2,2 équivalents de DCC et de HOBt (figure III-4). Après purification, les composés **18** et **19** sont obtenus avec des rendements respectifs de 80% et 85%.

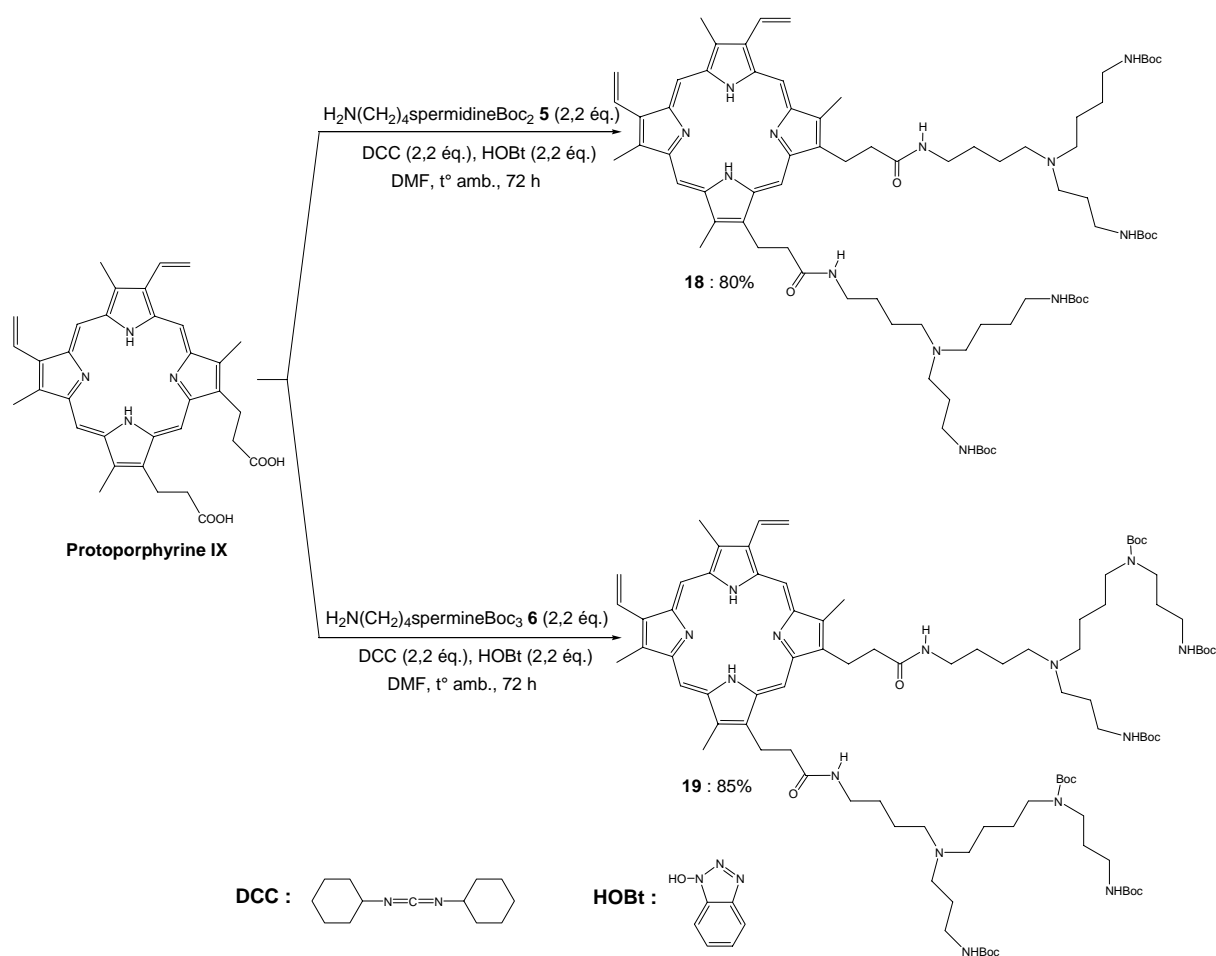


Figure III-4 : Fixation des polyamines **5** et **6** sur la protoporphyrine IX.

4. Déprotection des porphyrines polyamines

La seconde étape de la synthèse de ces deux protoporphyrines IX-polyamines consiste à enlever les Boc. Comme pour les tritolylporphyrines, les porphyrines sont solubilisées dans un mélange dichlorométhane/acide trifluoroacétique et les composés **20** et **21** sont obtenus avec des rendements quantitatifs (figure III-5).

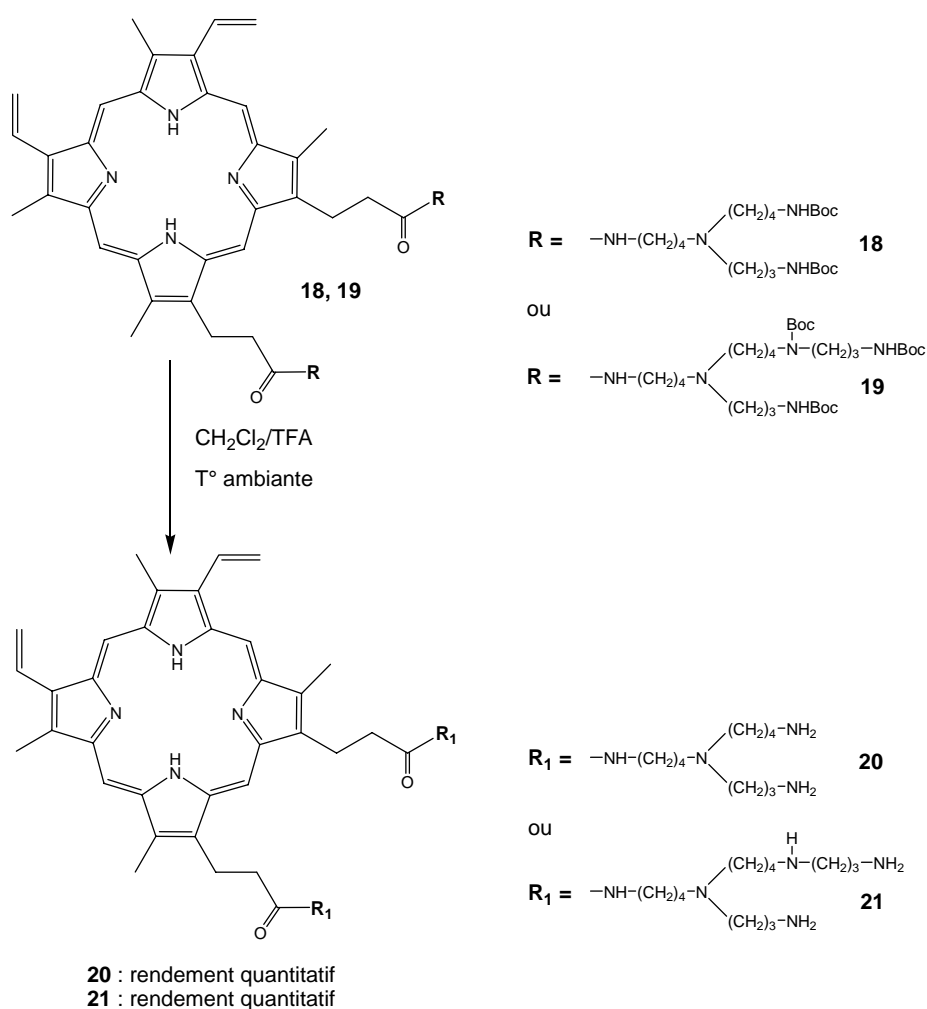


Figure III-5 : Déprotection des protoporphyrines IX-polyamines **18** et **19**.

5. Caractérisations

L'ensemble des protoporphyrines IX-polyamines a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible et spectrométrie de masse. Finalement, une étude par résonance magnétique nucléaire du proton a été réalisée sur la protoporphyrine IX et sur ses dérivés polyaminés.

5.1. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres des protoporphyrines IX-polyamines protégées par le Boc **18** et **19** ont été réalisés le dichlorométhane. En ce qui concerne les composés complètement déprotégés **20** et **21**, les mesures ont été effectuées dans le méthanol. Les résultats sont reportés dans le tableau III-1. Comme pour les tritolylporphyrines, ils correspondent aux spectres généralement attendus pour les porphyrines bases libres et sont de type *étio*.

Tableau III-1 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visibles de la protoporphyrine IX et des porphyrines-polyaminées **18** à **21**. λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3}$ mol⁻¹.L.cm⁻¹)], à 20°C.

Composés	Solvant	Soret	IV	III	II	I	$\epsilon_{\text{II}}/\epsilon_{\text{I}}$
Pp IX ¹⁰⁴	DMSO	408 (170,0)	506 (16,4)	542 (13,3)	577 (8,6)	630 (6,2)	1,39
18	CH ₂ Cl ₂	407 (113,5)	504 (8,9)	540 (8,3)	575 (5,3)	629 (3,2)	1,66
19	CH ₂ Cl ₂	406 (133,6)	505 (10,3)	540 (9,1)	574 (6,5)	629 (3,6)	1,80
20	MeOH	403 (27,0)	503 (2,5)	538 (2,1)	575 (1,3)	629 (0,9)	1,44
21	MeOH	402 (29,7)	503 (2,6)	538 (2,1)	575 (1,4)	629 (0,9)	1,56

¹⁰⁴ L.M. Scolaro, M. Castriciano, A. Roméo, S. Patané, E. Cefali ; *J. Phys. Chem. B*, 106, 2002, 2453-2459.

5.2. Spectrométrie de masse

Comme pour les *méso*-arylporphyrines, nous avons confirmé la masse molaire de toutes les protoporphyrines (**18** à **21**) par spectrométrie MALDI. Tous les résultats ont été rassemblés dans le tableau III-2 ci-dessous. Les spectres fournissent pour ces quatre porphyrines le pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$ attendu. En outre, on observe dans certains cas le pic $[M+Na]^+$. Dans le cas du composé **19**, nous observons la présence d'ions métastables.

Tableau III-2 : Spectrométrie de masse MALDI des protoporphyrines IX-polyamines.

Composés	Masse molaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire (uma)
18	1359,8	1360,4
19	1674,2	1674,7
20	958,7	959,7
21	1073,5	1073,9

Nous donnons à titre d'exemple sur la figure III-6 les spectres obtenus pour les composés **19** et **20**.

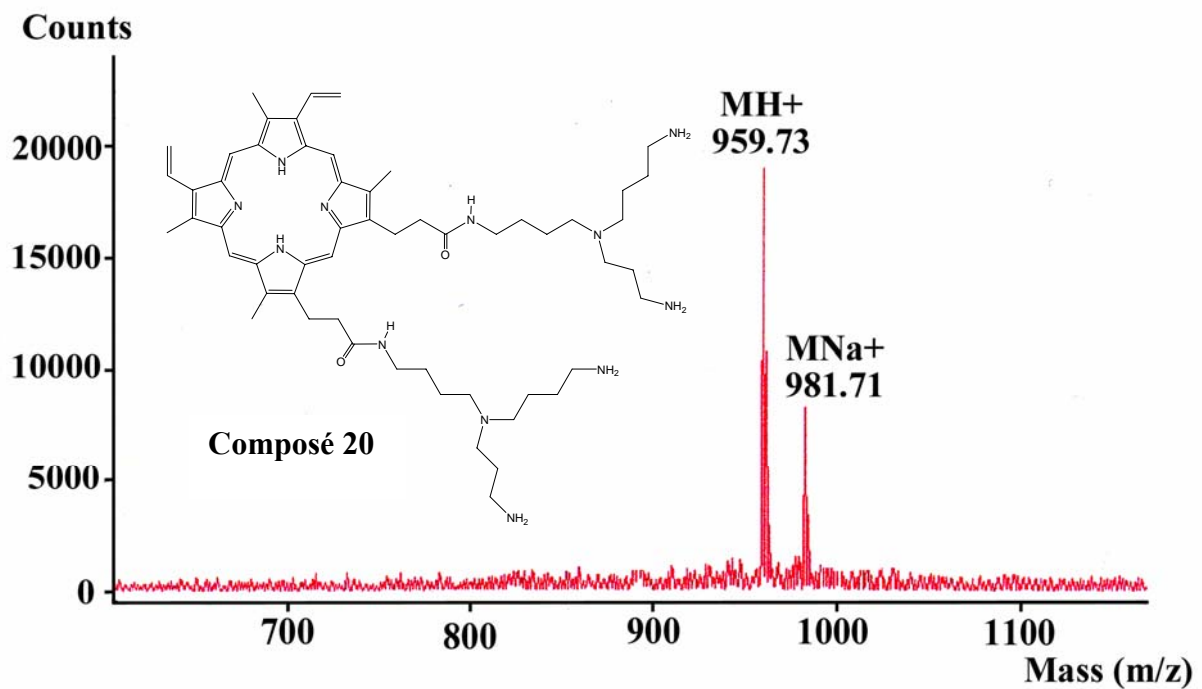
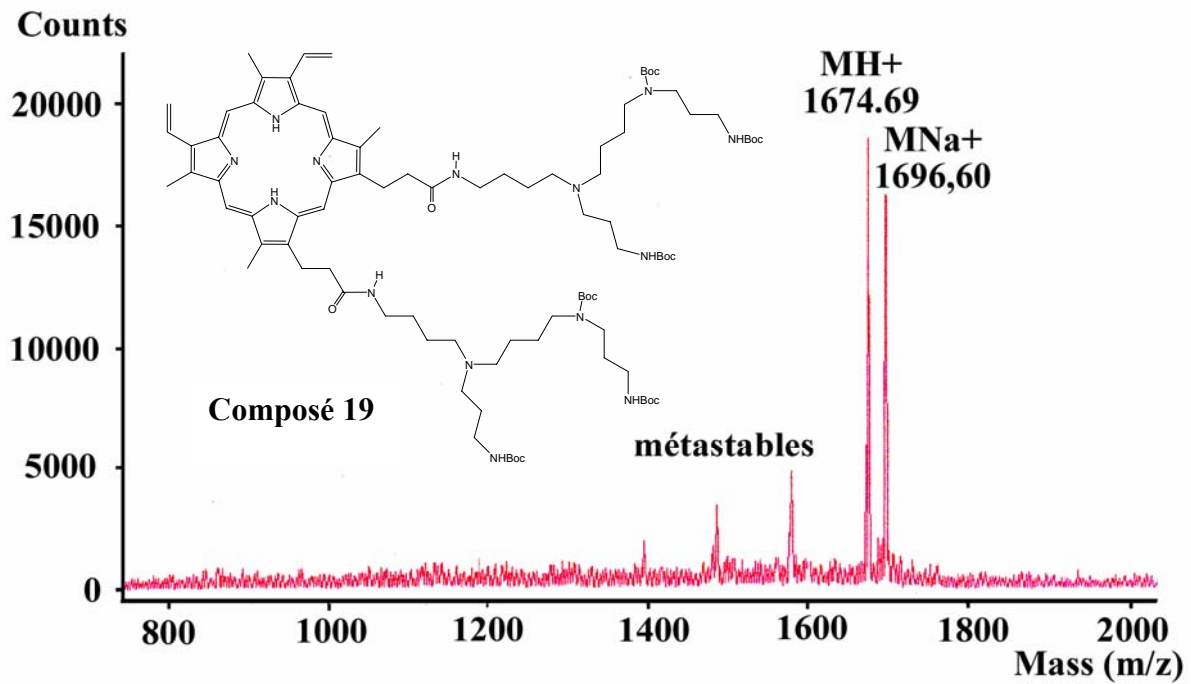


Figure III-6 : Spectres MALDI des composés 19 et 20.

5.3. Spectroscopie RMN

Les protoporphyrines IX-polyamines protégées (**18**, **19**) et déprotégées (**20**, **21**) ont tous été analysées par spectroscopie RMN du proton. L'attribution des signaux a été effectuée sur la base des courbes d'intégration et en s'appuyant sur les spectres de corrélation proton-proton. Les spectres RMN ^1H des composés **18** et **19** ont été réalisés dans le chloroforme deutérié, par contre les spectres de RMN ^1H des produits déprotégés **20** et **21** ont été réalisés dans le méthanol deutérié. Une des caractéristiques principales de la protoporphyrine IX et de ses analogues est qu'excepté le plan de la porphyrine, ces composés ne possèdent aucun élément de symétrie. L'attribution précise des protons à l'intérieur de chaque groupe des substituants s'avère donc difficile. D'une manière générale, les spectres RMN proton de ces porphyrines se composent des groupes de signaux suivants (figure III-7 et figure III-8) :

- les protons *méso* vers 10 ppm,
- les protons vinyliques entre 6,1 et 8,4 ppm,
- les protons du bras espaceur et de la polyamine entre 1 et 4,4 ppm,
- les protons NH pyrroliques entre -3,6 et -4,4 ppm,
- les protons méthyliques vers 3,5 ppm,
- les protons du Boc vers 1,40 ppm (*seulement pour les composés protégés 18 et 19*).

La protoporphyrine IX-spermidineBoc₂ **18** par exemple montre quatre protons *méso* vers 10 ppm et ils résonnent tous sous la forme d'un singulet. Les protons CH vinyliques résonnent sous la forme de deux doubles doublets à 8,14 ppm ($J=17,7$ Hz, 11,6 Hz) et à 8,13 ppm ($J=11,7$ Hz, 11,6 Hz). Les protons CH_2 résonnent sous la forme de deux doubles doublets à 6,34 ppm ($J=17,7$ Hz) et à 6,21 ppm ($J=11,6$ Hz). Nous pouvons observer les protons méthyliques sous la forme de quatre singulets à 3,60, 3,57, 3,49 et 3,47 ppm. Les protons NH pyrroliques sont très fortement blindés et ils se retrouvent à -3,69 ppm sous la forme d'un singulet. Nous trouvons les protons H- α et H- β des deux chaînes alkyles à 4,26 ppm (triplet, $J=7,7$ Hz) et à 3,45 ppm (multiplet). En ce qui concerne les protons de la polyamine, les protons du bras se situent pour H-a à 2,30 ppm, pour H-b,c à 1,47 ppm et pour H-d à 3,24 ppm. Les protons H- γ' et H- δ se retrouvent à 2,87 ppm (multiplet). Les protons H- α et H- α' résonnent sous la forme d'un multiplet et se situent respectivement à 2,42 ppm et à 2,57 ppm. Les protons H- β' résonnent sous la forme d'un quintuplet à 1,59 ppm ($J=6,8$ Hz). Puis, les protons les plus blindés H- β et H- γ , des deux spermidines résonnent sous la forme d'un

multiplet entre 1,20 et 1,59 ppm. Enfin, nous observons les protons méthyliques du Boc à 1,34 ppm et les protons NHBoc à 5,30 et 4,74 ppm.

Les produits déprotégés **20** et **21** quant à eux montrent la disparition des signaux des groupements protecteurs Boc. Nous pouvons noter également comme avec les arylporphyrines polyamines, que les protons des NH internes ne sont plus présents sur les spectres.

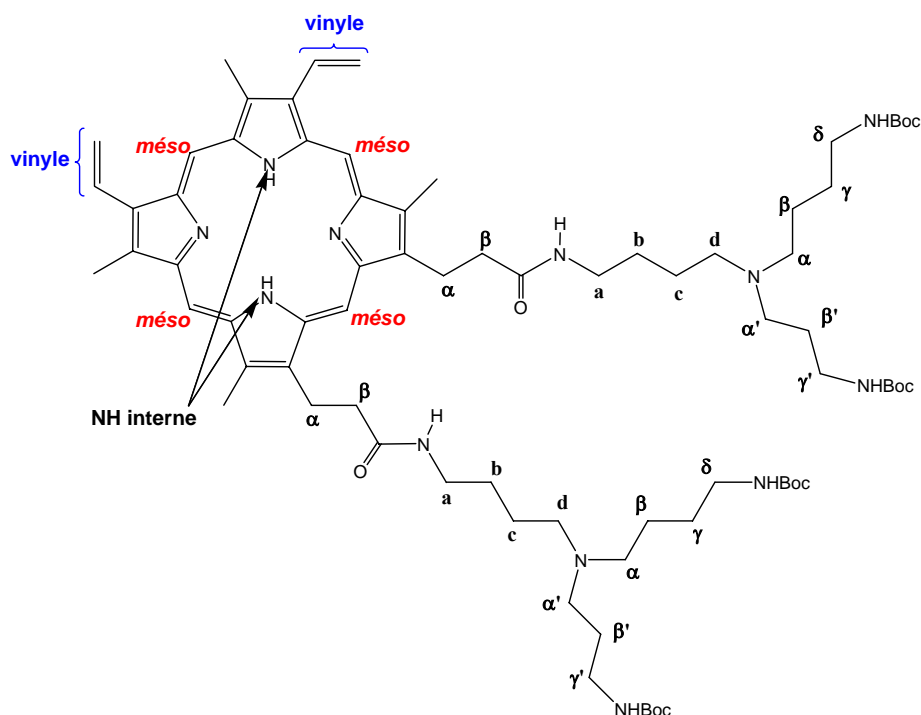


Figure III-7 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN (exemple avec le composé **18**).

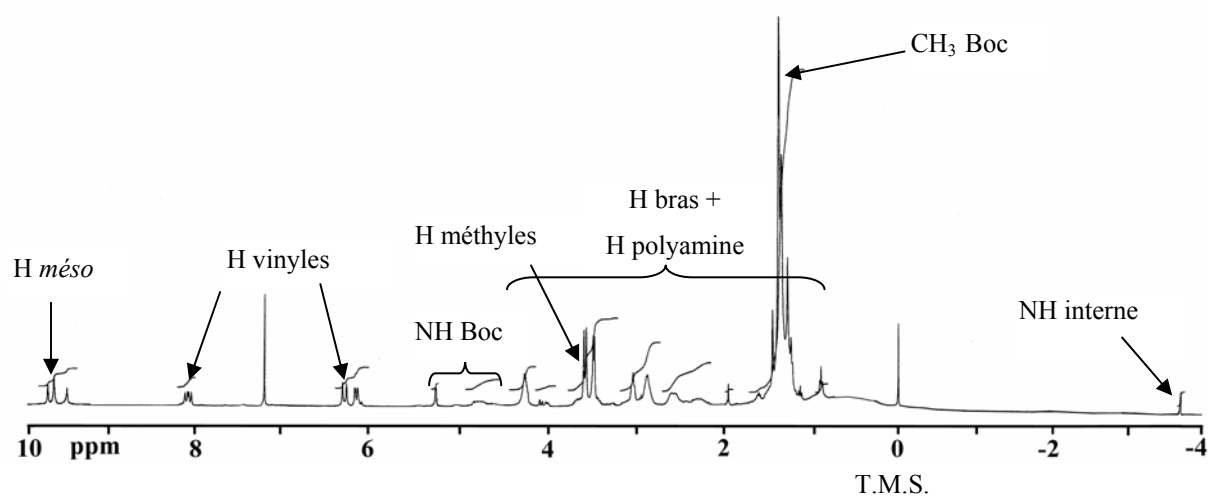


Figure III-8 : Spectre RMN ¹H du composé **18**.

L'ensemble des résultats obtenus a été rassemblé dans les tableaux III-3 et III-4.

Tableau III-3 : RMN ¹H de la protoporphyrine IX et des composés **18** et **19** (CDCl₃). δ en ppm (*J* en Hertz).

H	Protoporphyrine IX	18	19
<u>Pyrroles</u>			
Hméso	10,12 s ; 10,02 s	9,76 s ; 9,69 s	9,94 s ; 9,90s
	10,00 s ; 9,96 s	9,68 s ; 9,54 s	9,88 s ; 9,75s
NH internes	-4,35 s	-3,69 s	-3,71 s
<u>Vinyles</u>			
<u>CH=CH₂</u>	8,35 dd (17,5-11,5)	8,14 dd (17,7-11,6)	8,18 dd (17,7-11,7)
<u>CH=CH₂</u>	8,32 dd (17,5-11,5)	8,13 dd (17,7-11,6)	8,13 dd (17,7-11,7)
<u>CH=CH₂</u>	6,34 d (17,5)	6,34 d (17,7)	6,34 d (17,7)
<u>CH=CH₂</u>	6,16 d (11,5)	6,21 d (11,6)	6,21 d (17,7)
<u>CH₃ méthyles</u>	3,65 m	3,60 s-3,57 s 3,49 s-3,47 s	3,60s-3,58 s 3,50 s-3,49 s
<u>Bras espaceurs</u>			
α	4,28 t (7,7)	4,26 t (7,7)	4,30 m
β	3,13 t (7,7)	3,45 m	3,50 m
<u>Polyamines</u>			
a	-	2,30 m	2,42 m
b	-	1,47 m	1,49 m
c	-	1,47 m	1,49 m
d	-	3,24 m	3,25 m
α	-	2,42 m	2,48 m
β	-	1,43-1,20 m	1,45-1,19 m
γ	-	1,43-1,20 m	1,45-1,19 m
δ	-	2,87 m	3,00 m
α'	-	2,57 m	2,57 m
β'	-	1,59 quint. (6,8)	1,59 m
γ'	-	2,87 m	3,00 m
α''	-	-	3,13 m
β''	-	-	1,65 m
γ''	-	-	3,00 m
CH₃ (Boc)	-	1,37 m	1,42 m
<u>NHBoc</u>	-	5,29 s-4,80 s	5,30 s-4,79 s

Tableau III-4 : RMN ¹H des composés **20** et **21** (CD₃OD). δ en ppm (*J* en Hertz).

H	20	21
<u>Pyrroles</u>		
Hméso	9,46 s (3H)	9,52 s (3H)
	9,34 s (1H)	9,41 s (1H)
<u>Vinyles</u>		
<u>CH=CH₂</u>	8,17 dd (17,4-11,6)	8,33 dd (17,7-11,7)
<u>CH=CH₂</u>	8,09 dd (17,4-11,6)	8,17 dd (17,7-11,7)
<u>CH=CH₂</u>	6,40 d (17,4)	6,36 d (17,4)
<u>CH=CH₂</u>	6,30 d (11,6)	6,35 d (17,4)
<u>CH₃ méthyles</u>	3,50 m	3,50 m
<u>Bras espaceurs</u>		
α	4,29 m	4,33 m
β	3,34 m	3,34 m
<u>Polyamines</u>		
a	3,01-2,64 m	3,22-2,88 m
b	1,55-1,16 m	1,45-1,26 m
c	1,55-1,16 m	1,45-1,26 m
d	3,01-2,64 m	3,22-2,88 m
α	3,01-2,64 m	1,45-1,26 m
β	1,55-1,16 m	1,45-1,26 m
γ	1,55-1,16 m	1,45-1,26 m
δ	3,01-2,64 m	3,22-2,88 m
α'	3,01-2,64 m	3,22-2,88 m
β'	1,55-1,16 m	1,45-1,26 m
γ'	3,01-2,64 m	1,45-1,26 m
α''	-	3,22-2,88 m
β''	-	1,45-1,26 m
γ''	-	3,22-2,88 m

Chapitre IV

Synthèse de chlorines e6-polyamines

1. Introduction

Comme nous l'avons mentionné au chapitre I, la recherche de nouveaux photosensibilisateurs s'oriente vers la synthèse de composés parfaitement purs ayant un maximum d'absorption entre 650 et 800 nm.^{105,106} Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à la chlorine e6, issue de la chlorophylle a.¹⁰⁷ La chlorine e6 est substituée par des groupes méthyliques, éthyliques, vinyliques, et possède trois fonctions acides carboxyliques facilement modifiables (figure IV-1).

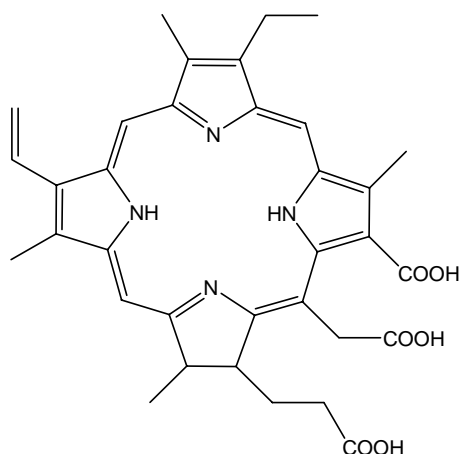


Figure IV-1 : Structure de la chlorine e6.

Au cours de ce travail, une chlorines e6 trispermidinée **24** et une chlorine e6 trisperminée **25** ont été synthétisées (figure IV-2). Nous avons introduit trois polyamines (**5** ou **6**) sur la carboxychlorine dans le but de créer une molécule amphiphile, avec une partie hydrophile contenant trois vecteurs cellulaires et une partie hydrophobe constituée du macrocycle.

¹⁰⁵ G. Zheng, M. Aoudia, D. Lee, M.A. Rodgers, K.M. Smith, T.J. Dougherty, R.K. Pandey. ; *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 2000, 3113-3121.

¹⁰⁶ R. Bonnett, R.D. White, U.-J. Winfield, M.C. Berenaum ; *Biochem J.*, 261, 1989, 277-280.

¹⁰⁷ P. Wongsinkongman, A. Brossi, H.-K. Wang, K.F. Bastow, K.-H. Lee ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(3), 2002, 583-591.

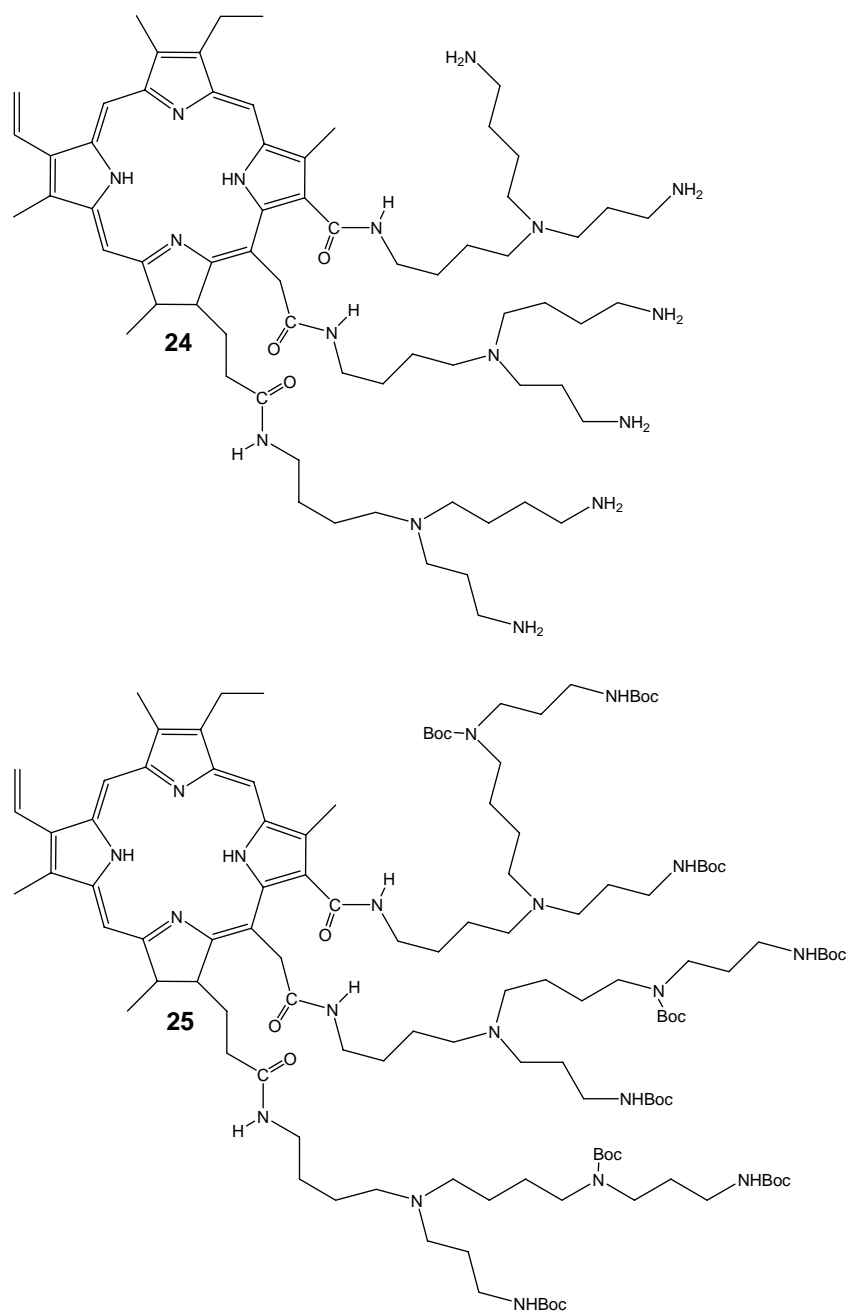


Figure IV-2 : Structure des composés synthétisés.

2. Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse adoptée a été décrite sur la figure IV-3. Comme précédemment, nous fixons les dérivés polyaminés **5** ou **6** sur la chlorine e6 en utilisant le DCC et le HOBT, puis nous libérons les amines.

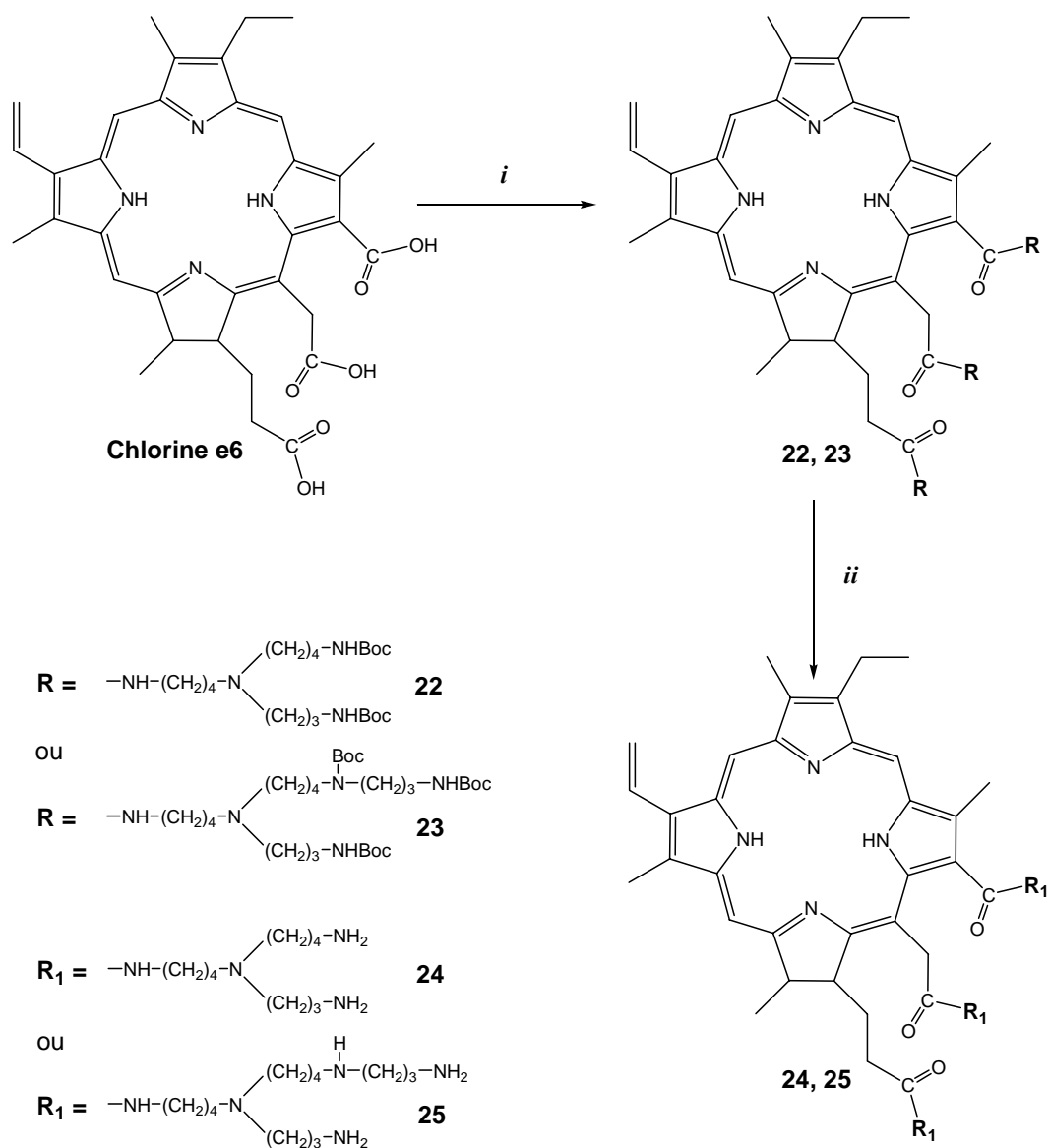


Figure IV-3 : Schéma synthétique des chlorines e6 polyaminées **24** et **25**.
(i) **5** ou **6** (20 éq.), DCC (20 éq.), HOBT (20 éq.), DMF, t° ambiante ; (ii) CF₃COOH/CH₂Cl₂ (1/1), t° ambiante.

3. Fixation des polyamines protégées sur la chlorine e6

La fixation de trois molécules de N^4 -(4-aminobutyl)- N^1,N^8 -bis-*tert*-butoxycarbonyl-spermidine **5** ou de trois molécules de N^4 -(4-aminobutyl)- N^1,N^8,N^{12} -tris-*tert*-butoxycarbonyl-spermine **6** sur la chlorine e6 est réalisée en utilisant 20 équivalents de DCC et de HOBT. La réaction se déroule dans le DMF, à température ambiante pendant 96 heures. Après purification la chlorine e6 dispermidinéeBoc₂ **22** et la chlorine e6 disperminéeBoc₃ **23** ont été obtenues avec des rendements respectifs de 71% et de 72% (figure IV-4).

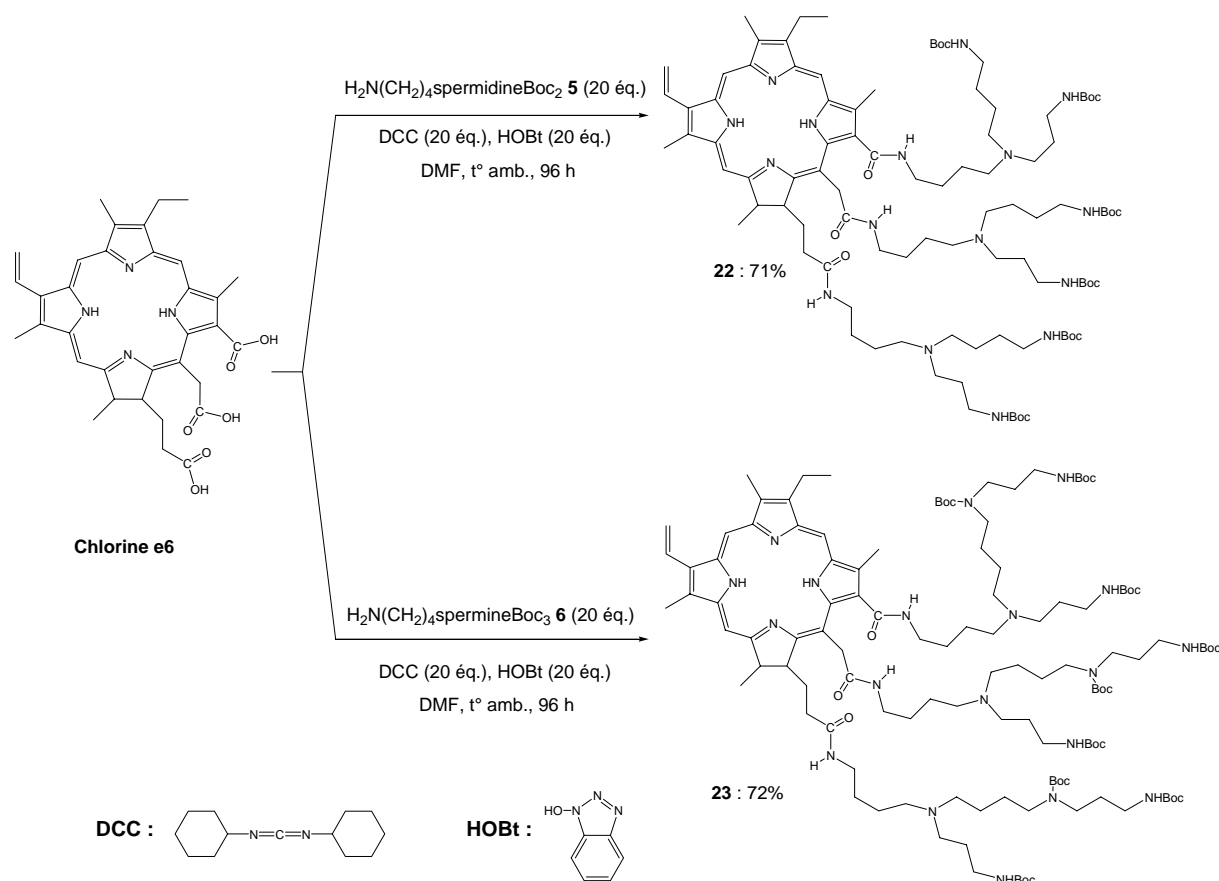


Figure IV-4 : Fixation des polyamines **5** et **6** sur la chlorine e6.

5. Caractérisations

5.1. Spectroscopie UV-visible

Le spectre UV-visible de ces composés correspondent aux spectres attendus pour de telles structures. Par rapport aux porphyrines, la bande de Soret est légèrement déplacée vers le rouge et la bande QI est beaucoup plus intense. Un exemple de tels spectres est représenté sur la figure IV-6.

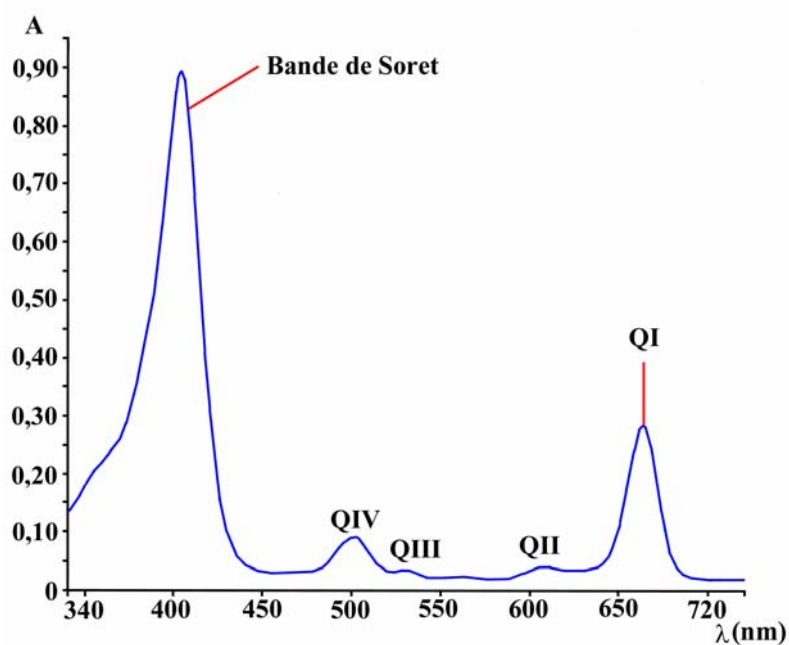


Figure IV-6 : Spectre UV-visible du composé **22** (CH_2Cl_2 , $C=9,45 \cdot 10^{-6} \text{mol.L}^{-1}$).

Les spectres des deux chlorines e6-polyamines protégées **22** et **23** ont été réalisés dans le dichlorométhane. Par contre, les spectres des composés **24** et **25** ont été réalisés dans le méthanol. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Spectre UV-visible de la chlorine e6-triméthylester (mesurée dans CHCl₃), des chlorines e6-polyamines protégées (composés **22** et **23**) et déprotégées (composés **24** et **25**). λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3}$ mol⁻¹.L.cm⁻¹)], à 20°C.

Composés	Soret	IV	III	II	I
Chlorine e6-triméthylester ¹⁰⁸	403 (91,2)	501 (8,9)	531 (4,3)	609 (4,1)	665 (28,1)
22	404 (94,8)	502 (9,8)	530 (3,9)	609 (4,3)	663 (30,3)
23	403 (100,2)	502 (9,3)	530 (3,2)	607(3,3)	663 (31,3)
24	398 (99,5)	499 (8,5)	526 (2,3)	606 (2,8)	660 (29,4)
25	400 (96,4)	500 (8,5)	526 (3,1)	606 (3,2)	661 (27,4)

5.2. Spectrométrie de masse

Les quatre chlorines e6-polyamines **22**, **23**, **24** et **25** ont été analysées par spectrométrie MALDI et les résultats ont été rassemblés dans le tableau IV-2. Les spectres fournissent pour ces quatre porphyrines le pic quasi-moléculaire [M+H]⁺ attendu. Dans le cas des chlorines e6-polyamines protégées, nous observons la présence de pics métastables.

Tableau IV-2 : Spectrométrie de masse MALDI des chlorines e6-polyamines.

Composés	Masse molaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire (uma)
22	1792,2	1791,9
23	2264,1	2263,7
24	1191,8	1191,8
25	1363,1	1363,4

¹⁰⁸ P. Wongsinkongman, A. Brossi, H.-K. Wang, K.F. Bastow. K.-H. Lee ; *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(3), 2002, 583-591.

Nous donnons, à titre d'exemple sur la figure IV-7, le spectre obtenu pour le composé **22** et sur la figure IV-8 le spectre du composé final **24**.

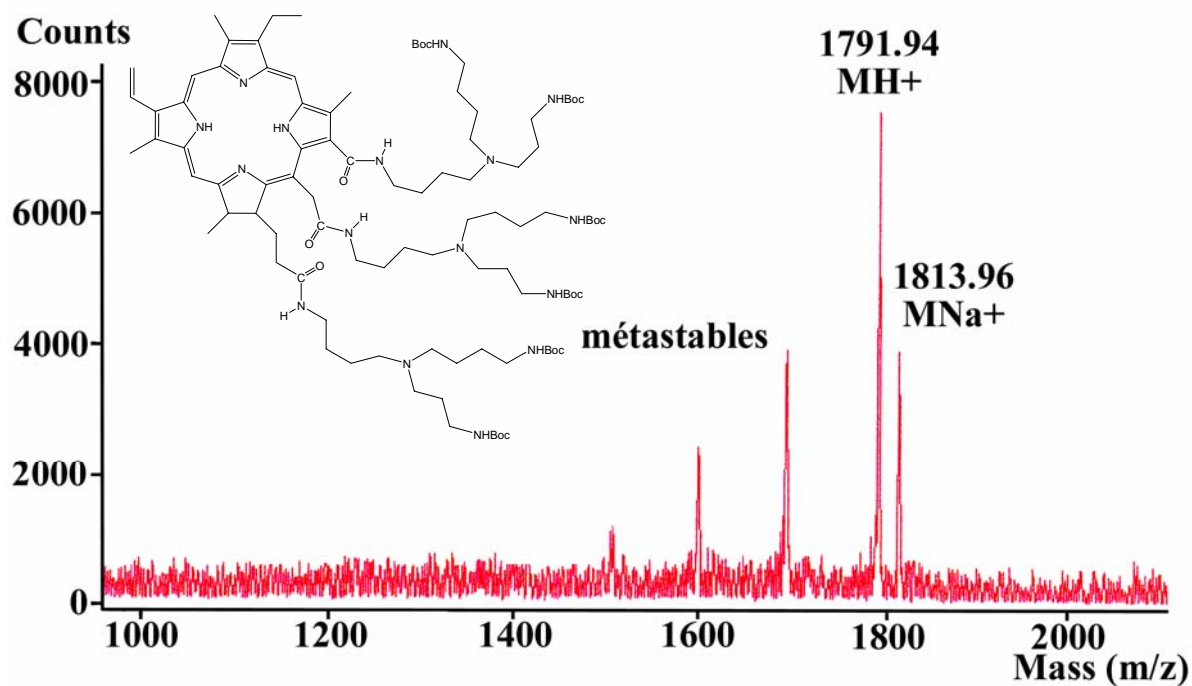


Figure IV-7 : Spectre MALDI du composé **22**.

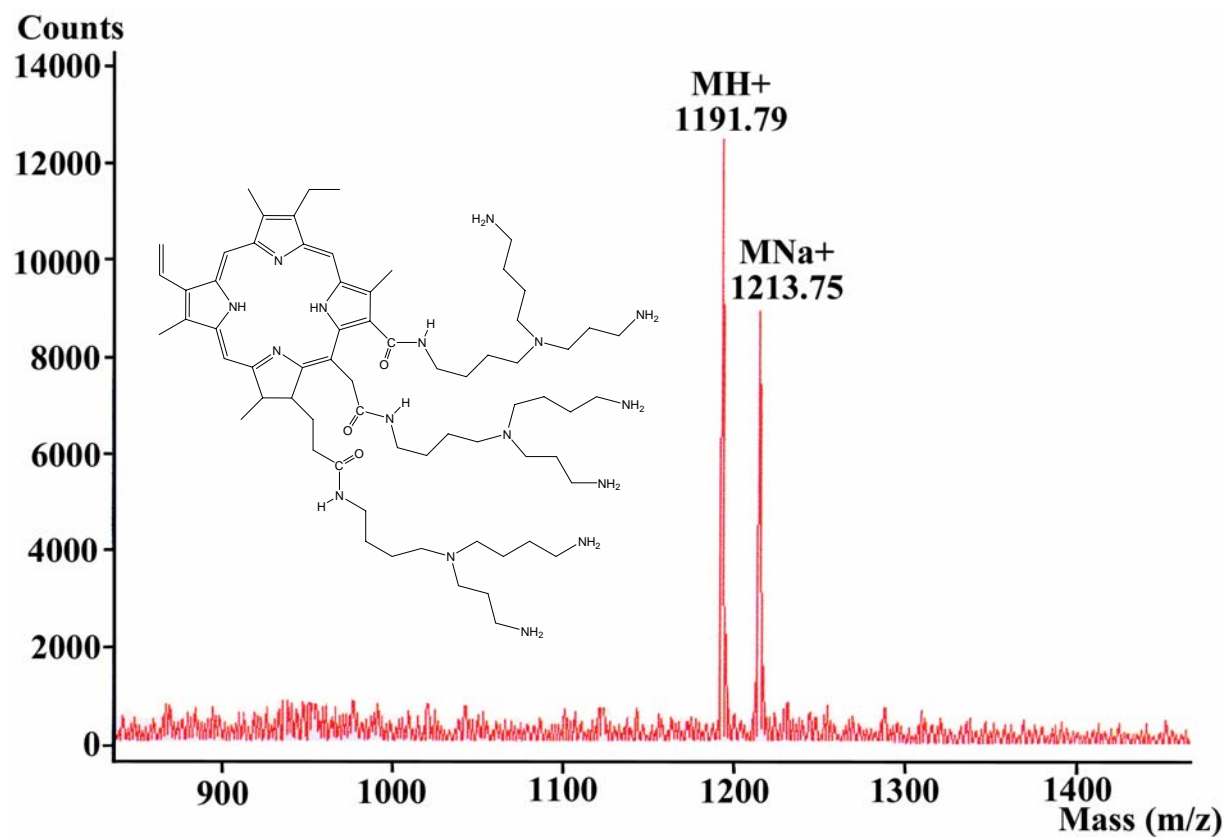


Figure IV-8 : Spectre MALDI du composé **24**.

5.3. Spectroscopie RMN

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton de la chlorine e6 a été enregistré dans le DMF deutérié, par contre les spectres des chlorines e6 polyaminées protégées **22** et **23** ont été réalisés dans le chloroforme deutérié. Enfin, les spectres RMN du proton des composés **24** et **25** ont été effectués dans le méthanol deutérié. Comme pour les protoporphyrines, la chlorine e6 et ses dérivés ne possèdent aucun élément de symétrie. Ainsi, l'attribution précise des protons à l'intérieur de chaque groupe de substituant s'avère extrêmement difficile. D'une manière générale, la RMN du proton de ces composés comprend les familles de signaux suivants (figures IV-9 et IV-10) :

- les protons *méso* vers 10 ppm,
- les protons vinyliques entre 6,1 et 8,4 ppm,
- les protons éthyliques entre 1,2 et 3,9 ppm,
- les protons du bras espaceur et de la polyamine entre 1 et 5,6 ppm,
- les protons NH pyrroliques entre -1,4 et -2 ppm,
- les protons méthyliques entre 1,7 et 3,5 ppm,
- les protons H-17 et H-18 entre 4,2 et 4,8 ppm,
- les protons du *tert*-butyloxy-carbonyle vers 1,40 ppm (*seulement pour les composés protégés 22 et 23*).

Par comparaison avec la protoporphyrine décrite dans le chapitre précédent, la RMN du proton de la chlorine e6 fait apparaître deux signaux caractéristiques entre 4,2 et 4,8 ppm correspondent aux protons H-17 et H-18 dus à la réduction du macrocycle.

Nous avons choisi, comme base d'étude des spectres des chlorines e6-polyamines, celui du composé **22**. Les protons *méso* résonnent, sous la forme de trois singulets à 9,71, 9,66 et 8,83 ppm. Les protons vinyliques $-\text{CH}=\text{CH}_2$ résonnent sous la forme de deux doubles doublets à 6,36 ppm ($J=17,8$ Hz, 1,2 Hz) et à 6,14 ppm ($J=11,6$ Hz, 1,2 Hz). Nous observons le proton $-\text{CH}=\text{CH}_2$ à 8,33 ppm et il se présente sous la forme d'un double doublet ($J=17,8$ Hz, 11,6 Hz). Quant aux protons éthyliques, ils résonnent sous la forme d'un quadruplet à 3,85 ppm (CH_2-CH_3 , $J=7,2$ Hz) et d'un triplet à 1,71 ppm (CH_2-CH_3 , $J=7,2$ Hz). Les protons des méthyles résonnent sous la forme de trois singulets (3,58, 3,50, 3,33 ppm) et d'un doublet à 1,71 ppm ($J=7,1$ Hz). Ces derniers sont couplés au proton H-18 et ils se présentent sous la forme d'un quadruplet à 4,49 ppm ($J=7,0$ Hz). Le proton H-17, résonne sous la forme d'un

doublet élargi à 4,26 ppm ($J=8,7$ Hz). Concernant les protons du bras du macrocycle, nous observons trois multiplets à 5,29, 2,42, 2,21 ppm correspondant respectivement à H-a, H- α et à H- β . Les protons NH pyrroliques sont comme dans le cas des porphyrines, très fortement blindés, mais ils ne sont pas équivalents et ils se retrouvent à -1,69 ppm et à -1,94 ppm sous la forme d'un singulet. Concernant la polyamine, les protons du bras se trouvent à 2,37 ppm pour H-a, à 1,47 ppm pour H-b,c et à 3,25 ppm pour H-d. Ces derniers se présentent tous sous la forme d'un multiplet et leurs déplacements sont comparables à la protoporphyrine IX-dispermidinéeBoc₂ (composé **18**). Les protons H- γ' et H- δ résonnent sous la forme d'un multiplet à 2,8 ppm et les protons H- α et H- α' se situent respectivement à 2,47 ppm et 2,59 ppm (multiplets). Les protons H- β' résonnent sous la forme d'un multiplet à 1,59 ppm et les protons les plus blindés H- β et H- γ , des deux spermidines résonnent sous la forme d'un multiplet entre 1,12 et 1,43 ppm. Enfin, nous observons les protons méthyliques du Boc à 1,37 ppm (multiplet) et les protons NHBoc se situent à 5,28 et à 4,76 ppm sous la forme de singulets.

Les chlorines e6-polyamines déprotégées **24** et **25**, par comparaison aux composés **22** et **23**, montrent la disparition des protons NHBoc. Comme pour les arylporphyrines-polyamines et les protoporphyrines-polyamines, nous remarquons la disparition des NH internes, par échange avec le solvant.

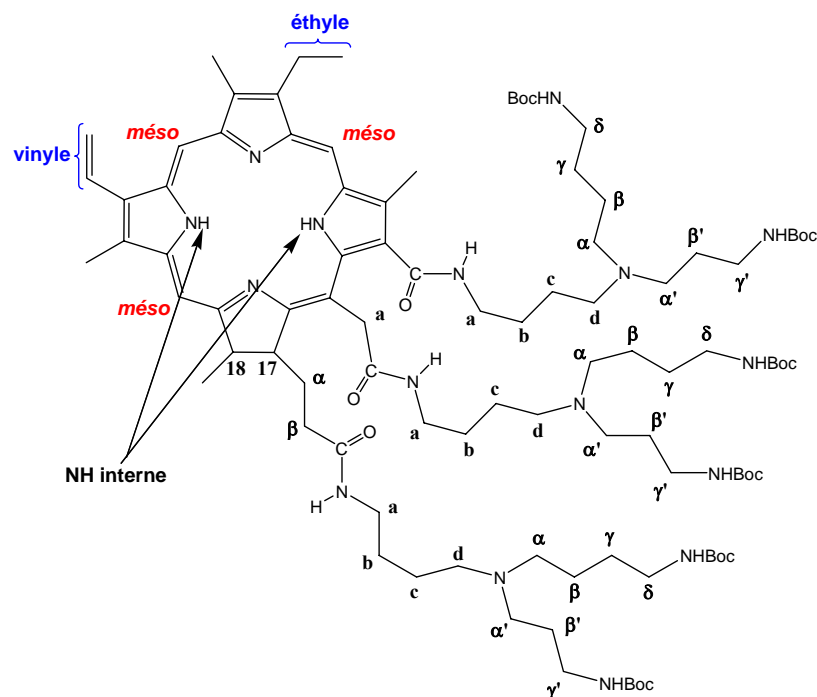


Figure IV-9 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN (exemple avec le composé **22**).

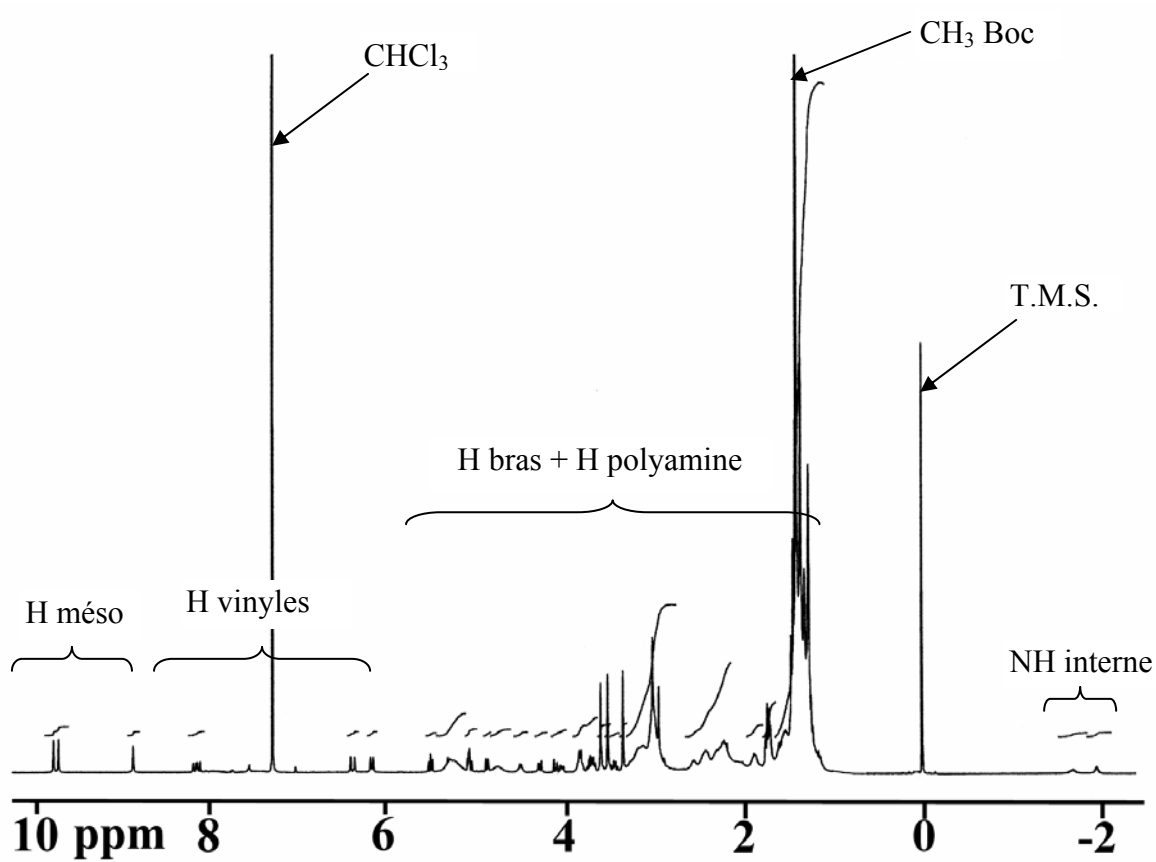


Figure IV-10 : Spectre RMN ^1H du composé 22.

L'ensemble des résultats obtenus a donc été rassemblé dans les tableaux IV-3 et IV-4.

Tableau IV-3 : RMN ¹H de la chlorine e6 (DMF deutérié) et des composés **22** et **23** (CDCl₃).
 δ en ppm (*J* en Hertz).

H	Chlorine e6	22	23
<u>Pyrroles</u>			
Hméso	9,89 s ; 9,79 s ; 9,20 s	9,71 s ; 9,66 s ; 8,83 s	9,71 s ; 9,66 s ; 8,82 s
NH internes	-1,42 s ; -1,68 s	-1,69 s ; -1,94 s	-1,68 s ; -1,95 s
<u>Vinyle</u>			
CH=CH₂	8,33 dd (17,8-11,6)	8,36 dd (17,8-11,6)	8,10 dd (17,9-11,5)
CH=CH₂	6,46 dd (17,8-1,2)	6,36 dd (17,8-1,2)	6,36 dd (17,9-1,1)
	6,17 dd (11,6-1,2)	6,14 dd (11,6-1,2)	6,15 dd (11,5-1,1)
<u>Ethyle</u>			
CH₂-CH₃	3,85 quad. (7,2)	3,81 quad. (7,3)	3,80 m
CH₂-CH₃	1,71 t (7,2)	1,26 m	1,26 m
CH₃ méthyles	3,67 s ; 3,56 s	3,58 s ; 3,50 s	3,58 s ; 3,50 s
	3,34 s ; 1,77 d (7,1)	3,33 s ; 1,71 d (7,1)	3,33 s, 1,71 m
H-17	4,62 d él. (8,8)	4,26 d él. (8,7)	4,26 d él. (8,8)
H-18	4,71 quad. (7,1)	4,49 quad. (7,0)	4,47 quad. (6,7)
<u>Bras espaceurs</u>			
a	5,57 m	5,29 m	5,30 m
α	2,77 m	2,42 m	2,40 m
β	2,30 m	2,21 m	2,20 m
<u>Polyamines</u>			
a	-	2,37 m	2,40 m
b	-	1,47 m	1,47 m
c	-	1,47 m	1,47 m
d	-	3,25 m	3,20 m
α	-	2,47 m	2,40 m
β	-	1,43-1,12 m	1,47-1,14 m
γ	-	1,43-1,12 m	1,47-1,14m
δ	-	2,89 m	3,00 m
α'	-	2,59 m	2,54 m
β'	-	1,59 m	1,58 m
γ'	-	2,89 m	3,00 m
α''	-	-	3,15 m
β''	-	-	1,71 m
γ''	-	-	3,00 m
CH₃ (Boc)	-	1,37 m	1,40 m
<u>NHBoc</u>	-	5,28 s ; 4,76 s	5,24 s ; 4,71 s

Tableau IV-4 : RMN ¹H des composés **24** et **25** (dans CD₃OD).
 δ en ppm (*J* en Hertz).

H	24	25
<u>Pyrroles</u>		
Hméso	9,84 s ; 9,74 s ; 9,09 s	9,82 s ; 9,74 s ; 9,07 s
<u>Vinyle</u>		
CH=CH₂	8,20 dd (17,8-11,6)	8,21 dd (17,8-11,6)
CH=<u>CH₂</u>	6,44 dd (17,8-1,2)	6,41 dd (17,8-1,2)
	6,21 dd (11,6-1,2)	6,20 dd (11,6-1,2)
<u>Ethyle</u>		
CH₂-CH₃	3,85 m	3,79 m
CH₂-<u>CH₃</u>	1,28 m	1,26 m
<u>CH₃ méthyles</u>	3,62 s ; 3,54 s	3,57 s ; 3,51 s
	3,34 s ; 1,75 m	3,31 s ; 1,75 s
H-17	4,42 d él. (9,2)	4,48 m
H-18	4,68 quad. (7,0)	4,67 m
<u>Bras espaceurs</u>		
a	5,35 m	5,33 m
α	2,28 m	2,28 m
β	2,53 m	2,54 m
<u>Polyamines</u>		
a	2,14 m	3,22-2,64 m
b	2,03-1,15 m	2,01-1,26 m
c	2,03-1,15 m	2,01-1,26 m
d	3,20-2,85 m	3,22-2,64 m
α	3,20-2,85 m	2,01-1,26 m
β	2,03-1,15 m	2,01-1,26 m
γ	2,03-1,15 m	2,01-1,26 m
δ	3,20-2,85 m	3,22-2,64 m
α'	3,20-2,85 m	3,22-2,64 m
β'	2,03-1,15 m	2,01-1,26 m
γ'	3,20-2,85 m	2,01-1,26 m
α''	-	3,22-2,64 m
β''	-	2,01-1,26 m
γ''	-	3,22-2,64 m

Chapitre V

Evaluations biologiques

1. Introduction

1.1. Généralités

Une étude préliminaire d'activité biologique a été réalisée avec les tritolylporphyrines-polyamines (composés **10a** à **11b** ; **14a** à **17b**), les protoporphyrines-polyamines (**20** et **21**) et les chlorines e6-polyamines (**24** et **25**). Nous avons tout d'abord évalué l'aptitude de ces composés à produire de l'oxygène singulet, étant donné que ce dernier est l'agent toxique principal en PDT. Puis nous avons cherché à déterminer la photocytotoxicité des photosensibilisateurs sur la lignée cellulaire leucémique promyélocytaire K562. Par la suite, une étude *in vitro* a été réalisée avec les protoporphyrines IX-polyamines **20** et **21**, en utilisant la même lignée cellulaire, dans le but d'identifier des signes d'apoptose ou de nécrose dans les cellules traitées. Avec cet objectif, nous avons étudié la chute du potentiel mitochondrial, l'activation des caspases 3 et 9 et la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique par translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe au moyen de l'Annexine V.

1.2. La mort cellulaire

La mort cellulaire joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de l'organisme, et le dérèglement des mécanismes a été identifié dans de nombreuses pathologies.¹⁰⁹ C'est un processus complexe, qui peut intervenir selon deux modes différents : la nécrose ou l'apoptose. Ils se différencient par des circonstances, des modifications morphologiques et des mécanismes moléculaires distincts.

¹⁰⁹ A. Cuzinet, Z. Hérincs ; *Médecine/Sciences*, 18, 2002, 841-852.

1.2.1. La nécrose

La nécrose est considérée comme une mort cellulaire “désordonnée”. Elle peut être provoquée par des agents physiques extérieurs ou des agents infectieux. Au cours de la nécrose, les cellules gonflent, les membranes se rompent, la chromatine disparaît et les enzymes hydrolytiques contenues principalement dans les lysosomes sont libérées.^{110,111} Il se produit une réaction inflammatoire et l’architecture du tissu se désorganise.

1.2.2. L’apoptose

La mort cellulaire par apoptose est très différente de la mort cellulaire par nécrose (tableau V-1 et figure V-1). Par opposition à la nécrose, l’apoptose (mort cellulaire programmée) est considérée comme une mort cellulaire “ordonnée”.¹¹² Cette forme particulière de mort cellulaire est dite programmée en ce sens que la cellule a la capacité de déclencher ou de réprimer son autodestruction en fonction des signaux qu’elle reçoit de son environnement.

Tableau V-1 : Comparaison des caractéristiques principales de la mort cellulaire par nécrose et par apoptose.

Caractéristiques	Apoptose	Nécrose
Condition de la mort cellulaire	Programmée Individuelle	“Désordonnée” Mort d’un groupe entier de cellules
Mode	Actif (ATP dépendant)	Passif
Vitesse d’accomplissement	Lente	Rapide
Volume cellulaire	Diminué	Augmenté
Lyse de la membrane plasmique	Dernière étape	Première étape
Organites intracellulaires	Compacts	Lysés
Réaction inflammatoire	Aucune	Importante
Cicatrisation	Pas de cicatrice	Cicatrisation fibreuse

¹¹⁰ M.A. Hotz, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz ; *Exp. Cell. Res.*, 201, 1992, 184-191.

¹¹¹ G.R. Bicknell, G.M. Cohen ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 1995, 40-47.

¹¹² A. Mignon, N. Rouquet, V. Joulin ; *Médecine/Sciences*, 14, 1998, 9-17.

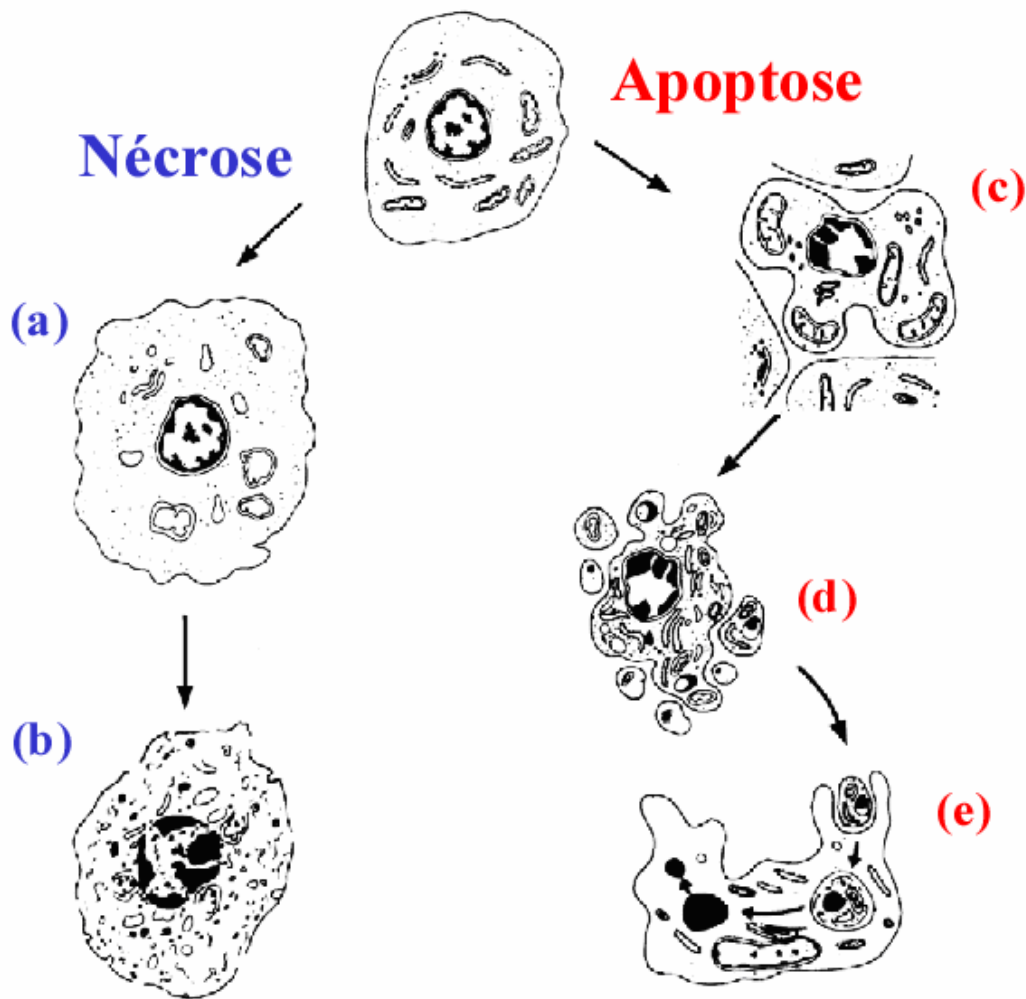


Figure V-1 : Comparaison des modifications morphologiques au cours de la nécrose et de l'apoptose. (a) Gonflement irréversible de la cellule. (b) Rupture membranaire et désintégration de la cellule. (c) Condensation de la cellule. (d) Fragmentation de la cellule et formation des corps apoptotiques. (e) Phagocytose.

L'apoptose est un phénomène physiologique permettant l'élimination de cellules lésées, non fonctionnelles ou potentiellement dangereuses (cellules tumorales). Elle joue un rôle déterminant au cours des processus physiologiques aussi différents que le développement, le dysfonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, ou le renouvellement cellulaire.

L'apoptose se divise chronologiquement en trois phases distinctes : l'initiation, l'exécution et la dégradation (figure V-2).

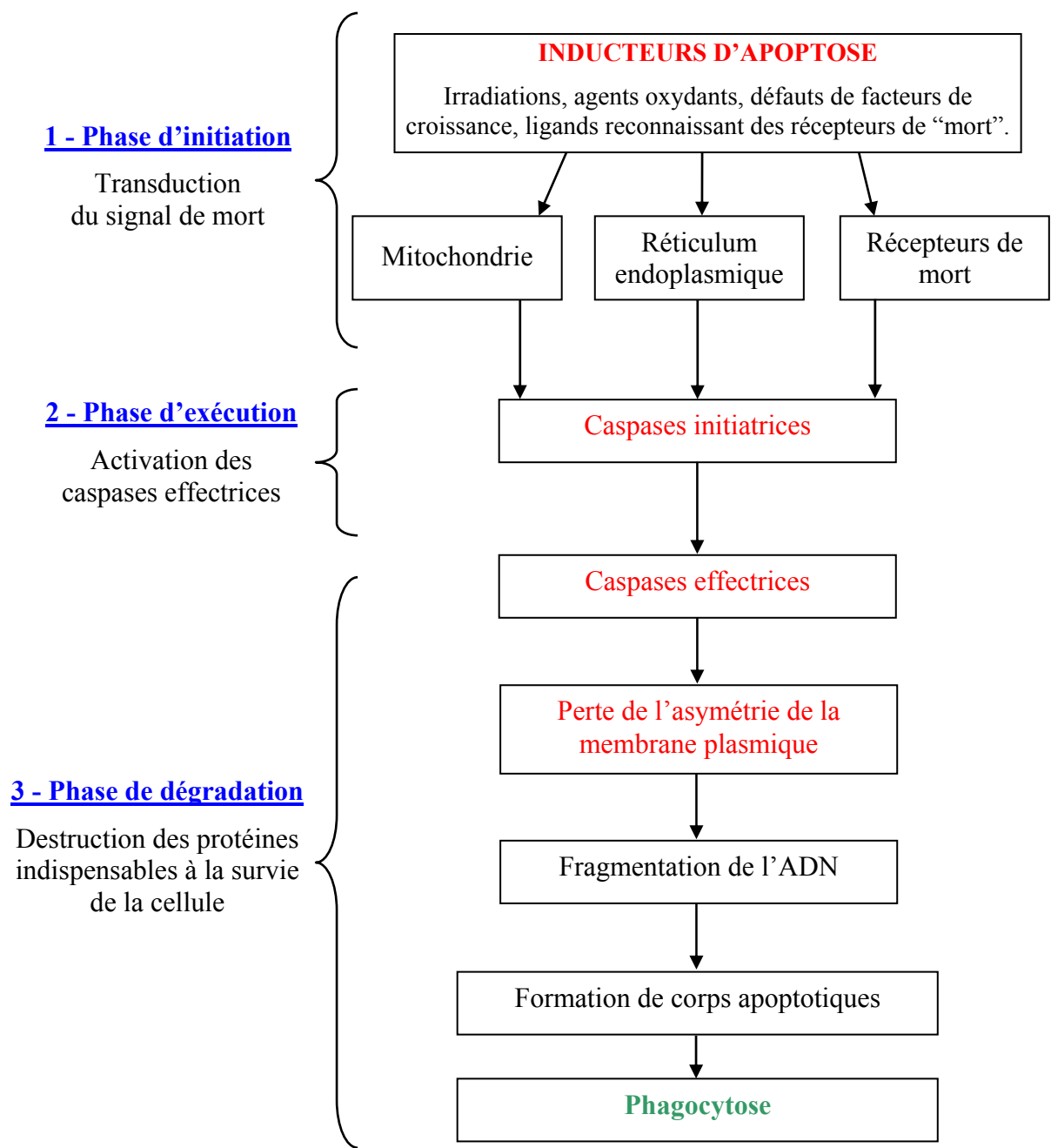


Figure V-2 : Différentes étapes de l'apoptose. Trois phases se distinguent : la phase d'initiation, la phase d'exécution et la phase de dégradation.

Pendant la phase d'induction, la cellule reçoit de son environnement un signal de mort, (figure V-3) c'est-à-dire l'ordre de s'autodétruire. Cette première phase est réversible en ce sens que la perception d'un signal de mort n'induit pas systématiquement la destruction de la cellule. Une très grande variété de stimuli sont capables d'induire l'apoptose, comme certaines hormones, des facteurs de croissance, des agents génotoxiques, des ligands reconnaissant des récepteurs de mort cellulaire. L'apoptose peut être induite ou inhibée par des signaux qui naissent dans l'environnement extérieur de la cellule, mais aussi par des

signaux naissant dans le milieu intracellulaire. La survenue d'altérations génétiques peut provoquer l'apoptose, si ces dernières sont trop importantes pour être réparables. De même, une atteinte de l'intégrité membranaire des mitochondries, du réticulum endoplasmique, ou une anomalie dans les processus de division cellulaire, peut déclencher l'autodestruction de la cellule.

La phase d'exécution est la phase au cours de laquelle la décision de mort ou de survie cellulaire est prise. La mitochondrie joue un rôle essentiel dans le contrôle du signal de mort via les protéines de la famille Bcl-2. Cette famille comprend des protéines anti- (Bcl-2, Bcl-Xl...) ou pro-apoptotique (Bax, Bid...).¹¹³ Les protéines anti-apoptotiques sont en partie localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, et elles empêchent la libération d'apoptogènes comme le cytochrome c et l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Les protéines pro-apoptotiques quant à elles participent à l'activation des caspases initiatrices responsables de l'autodestruction de la cellule. Les caspases sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu acide aspartique d'où leur nom (le "c" correspond à leur appartenance à la famille des protéases à cystéine et le terme "aspase" évoque le fait que ces enzymes clivent leur substrat après un résidu acide aspartique). Les caspases contiennent quatre domaines principaux, un pro-domaine, une grande sous-unité, un domaine de liaison et une petite sous-unité. Elles sont synthétisées sous la forme de pro-enzymes inactives et elles sont activées par clivage après des résidus aspartate. Ce clivage qui se fait soit par auto-association, soit après association avec une autre caspase permet la libération du pro-domaine et l'assemblage de la caspase sous sa forme active. Les caspases peuvent donc transmettre et amplifier les signaux de l'apoptose en activant les autres caspases par réaction protéolytique spécifique. La famille des caspases comptant actuellement 14 enzymes est divisée en deux groupes en fonction de la longueur de leur pro-domaine. Les caspases à pro-domaine long correspondent aux caspases "initiatrices" (caspases 2, 8, 9) et elles agissent en amont des caspases à pro-domaine court appelées caspases "effectrices" (caspase 3, 7). La protéine p53 (polypeptide d'un poids moléculaire de 53000 daltons) a également un rôle important dans la phase d'exécution de l'apoptose. Elle joue un rôle complexe, anti-apoptotique ou pro-apoptotique selon les circonstances. Elle veille à l'intégrité du génome cellulaire et lorsque survient une altération génétique, elle oblige la cellule à interrompre sa multiplication et à réparer la lésion. Si l'ADN est trop endommagé pour être

¹¹³ P. Juin, F.-M. Vallette, *Médecine/Sciences*, 16, 2000, 261-269.

réparé, p53 induira l'apoptose de la cellule. Les radicaux libres oxygénés (ROS) semblent par exemple jouer un rôle essentiel dans l'activation des voies apoptotiques par l'intermédiaire de p53.

La phase de dégradation se traduit par des altérations cytosoliques, nucléaires et membranaires qui vont conduire à la mort cellulaire. Durant cette phase, il y a activation des caspases effectrices et des endonucléases. Le rôle des caspases effectrices est de détruire les protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Elles peuvent activer des enzymes spécialisées dans le maintien de l'intégrité structurale, inhiber des enzymes responsables de la réparation de l'ADN ou encore inhiber des enzymes impliquées dans la régulation des voies métaboliques et mitogéniques. Les endonucléases quant à elles sont responsables de la dégradation de l'ADN en oligonucléotides.

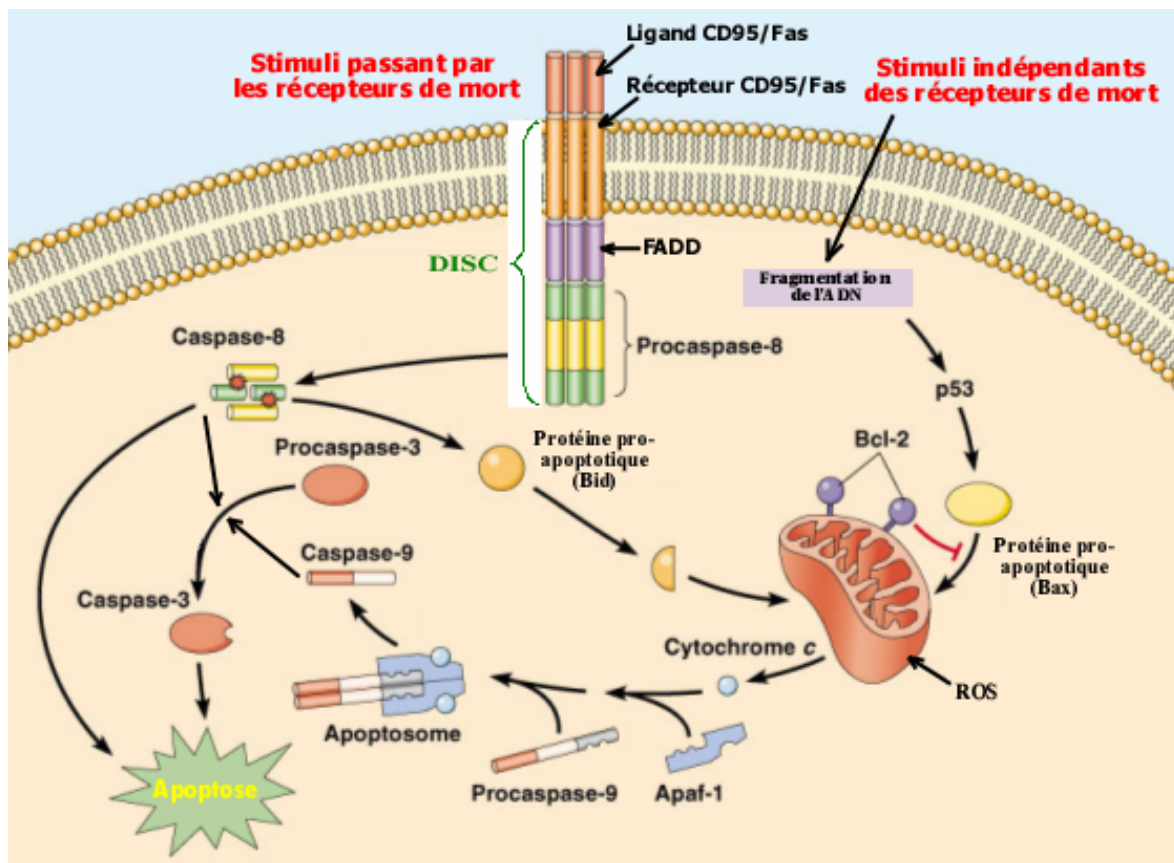


Figure V-3 : Schéma général représentant les deux voies principales de déclenchement de la mort cellulaire. Une première voie passe par les récepteurs de mort (récepteur Fas par exemple). L'oligomérisation de Fas engendrée par l'interaction avec son ligand, permet le recrutement du FADD et de la pro-caspase 8. Le complexe multiprotéique ainsi formé a été appelé DISC. Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération de la caspase 8 dans le cytosol, qui va à son tour cliver un certain nombre de caspases effectrices comme la caspase 3. Une deuxième voie peut être déclenchée après la fragmentation de l'ADN ou par les radicaux libres oxygénés (ROS : Reactive Oxygen Species). Cette voie passe par la mitochondrie. Le cytochrome c libéré dans le cytoplasme se lie à la protéine Apaf1 (apoptosis activating factor) et à la pro-caspase 9 en présence d'ATP formant un apoptosome. Ce complexe aboutit à l'activation de la caspase 9 qui à son tour active les caspases effectrices.

2. Résultats et discussion

2.1. Production d'oxygène singulet

Nous avons dans un premier temps, évalué l'aptitude des composés synthétisés (**10-11**, **14-17**, **20**, **21**, **24** et **25**) à produire de l'oxygène singulet selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Ce test consiste à contrôler par chromatographie sur couche mince la formation d'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol, à partir d'acétate d'ergostérol en présence de porphyrine, sous bullage d'air et sous irradiation lumineuse.¹¹⁴ Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'hématoporphyrine (Hp) qui est un indicateur d'oxygène singulet connu. Ce test nous a permis de mettre en évidence qualitativement, pour tous les composés, la production d'oxygène singulet.

2.2. Le Photofrin II®

Le Photofrin II®, comme il a été mentionné dans la partie expérimentale, a été utilisé comme référence pour les tests *in vitro* de photothérapie dynamique. Sa photocytotoxicité, sans pré-incubation préalable dans le milieu de culture cellulaire (J0) est faible jusqu'à 90 minutes d'irradiation, et après 120 minutes elle augmente fortement puisque nous observons un pourcentage de cellules non viables de 50% (figure V-4, histogramme a). Par contre, après 24 heures d'incubation avec les cellules phototraitées (J1), nous constatons une augmentation notable de la mort cellulaire. Ainsi, à J1, après 60 minutes de traitement PDT, le pourcentage de mort cellulaire est voisin de 30%, et à J0 il n'est que de 10%. Après 120 minutes d'irradiation, et à J1, le pourcentage de cellules mortes a nettement augmenté et il est supérieur à 80%.

Une pré-incubation préalable des cellules, en présence du Photofrin, améliore sa photocytotoxicité (figure V-4, histogramme b). A J0, après 30 minutes d'irradiation, nous observons 20% de mort cellulaire et après 120 minutes d'irradiation, environ 70% des cellules ont leur membrane cellulaire perméabilisée (IP⁺). Après 24 heures d'incubation (J1), le

¹¹⁴ G. Ohloff ; *Pure Appl. Chem.*, 43(3-4), 1975, 481-502.

pourcentage de cellules mortes augmente considérablement. Ainsi, après 60 minutes d'irradiation, le pourcentage de cellules non viables est proche de 90%.

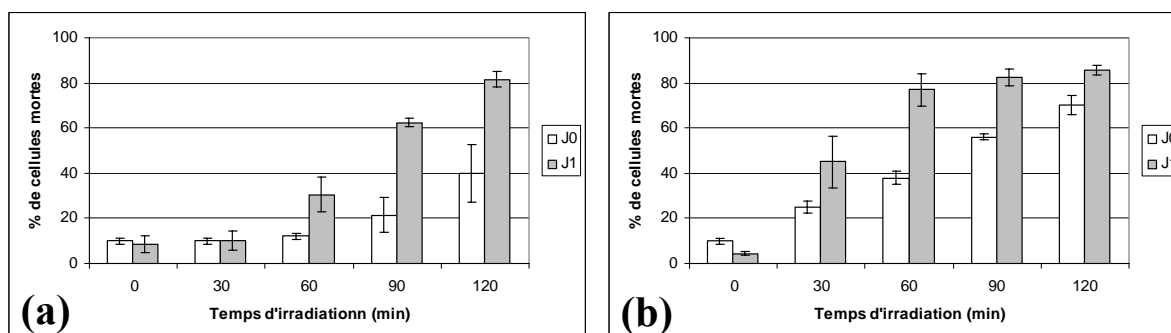


Figure V-4 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec le Photofrin II[®] à la concentration de 1,25 µg/ml. (a) Les cellules sont mises en incubation avec le Photofrin II[®] et irradiées. (b) Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec le Photofrin II[®] et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

2.3. Les tritolylporphyrines-polyamines – La mort cellulaire

2.3.1. Les tritolylporphyrines-polyamines protégées (10a,b et 11a,b)

Le traitement PDT avec les porphyrines-polyamines **10a,b** et **11a,b**, sans pré-incubation, montre des résultats comparables (figure V-5). L'activité de ces porphyrines reste faible. En effet, après 120 minutes d'irradiation à la lumière blanche, le pourcentage de cellules non viables n'excède pas 20%.

La pré-incubation des porphyrines-polyamines protégées par le Boc n'améliore pas leur photocytotoxicité (figure V-6). Ainsi, le traitement PDT réalisé après 18 heures de pré-incubation (J0) avec les porphyrines **10b** ou **11b** provoque la mort de 18% des cellules. Ce pourcentage après 24 heures d'incubation (J1), augmente et atteint 30%.

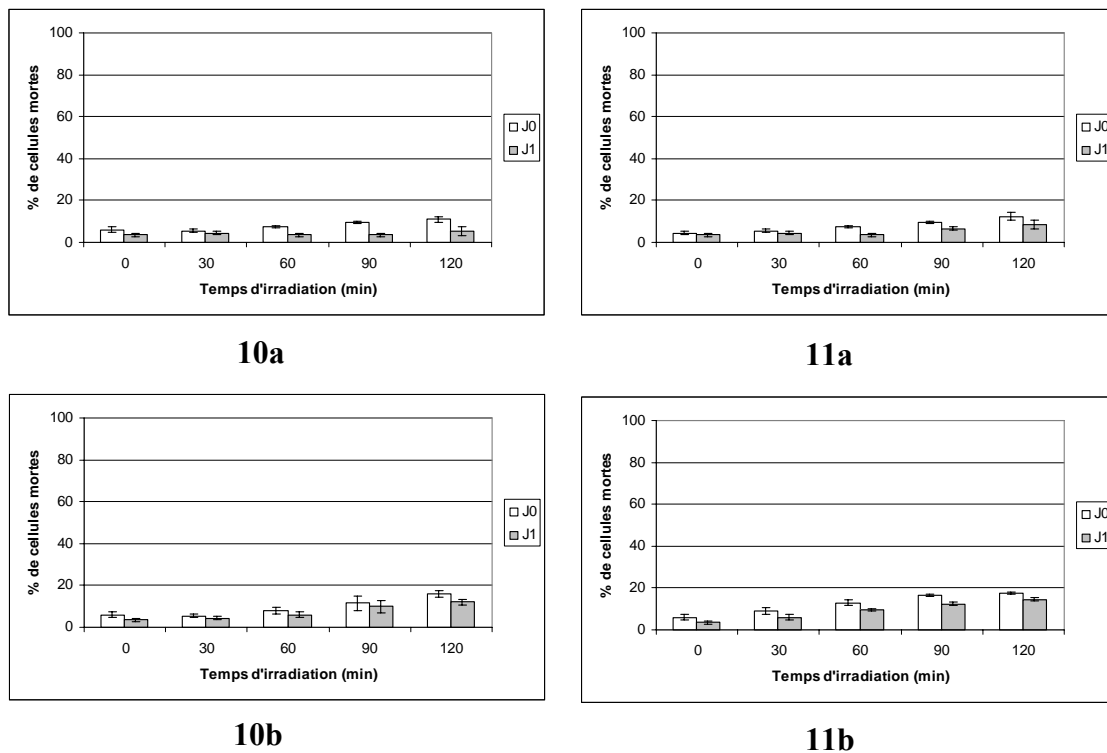


Figure V-5 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **10a,b** et **11a,b** à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont mises en incubation avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

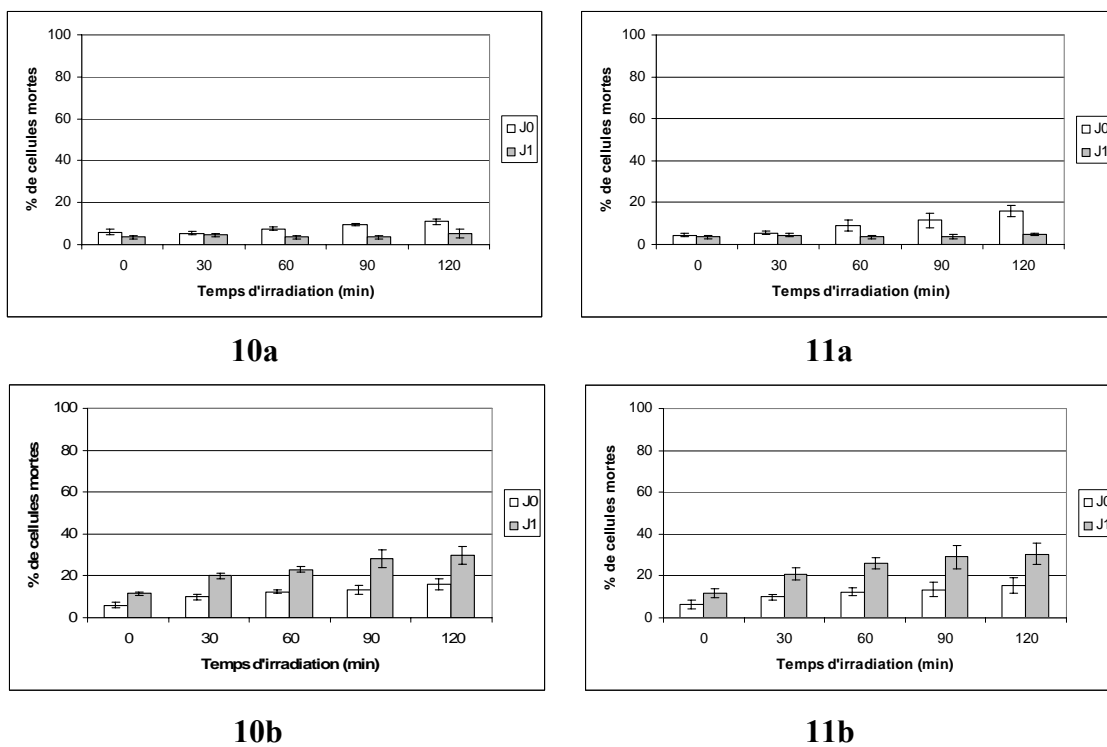


Figure V-6 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **10a,b** et **11a,b** à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

2.3.2. Les tritolylporphyrines-polyamines (**14a,b** et **15a,b**)

Les porphyrines polyamines déprotégées à la concentration de 2 μM (figure V-7), sans pré-incubation présentent une photocytotoxicité plus importante que leurs homologues protégés. La différence est la plus significative avec les tritolylporphyrines-polyamines en *ortho* (**14b** et **15b**). Après 120 minutes d'irradiation et 24 heures d'incubation, la mort cellulaire est proche de 90%. Cette dernière n'était que d'environ 18% avec les porphyrines **10b** et **11b**.

La photocytotoxicité est également augmentée en effectuant une pré-incubation préalable des porphyrines avec les cellules (figure V-8). Dans ces conditions, les porphyrines en *ortho* montrent des résultats intéressants puisqu'ils présentent une activité comparable au Photofrin. Avec les composés **14b** et **15b**, après 30 minutes d'irradiation et à J1, on observe 80% de cellules non viables.

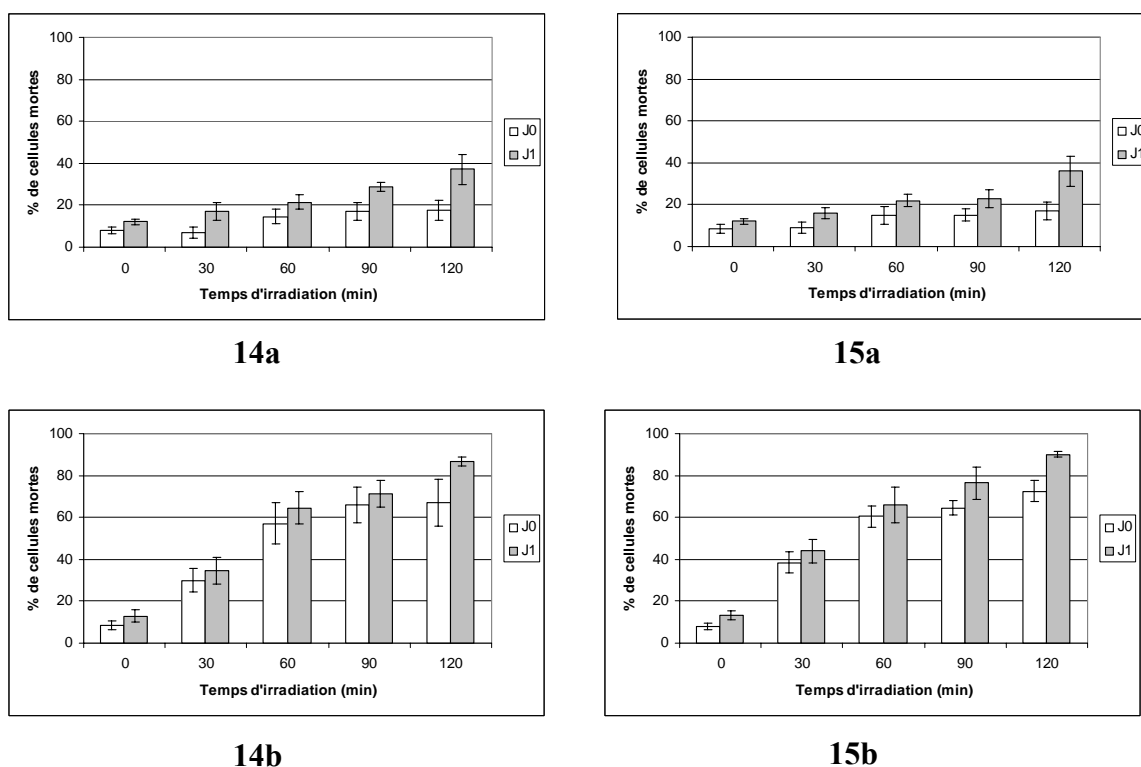
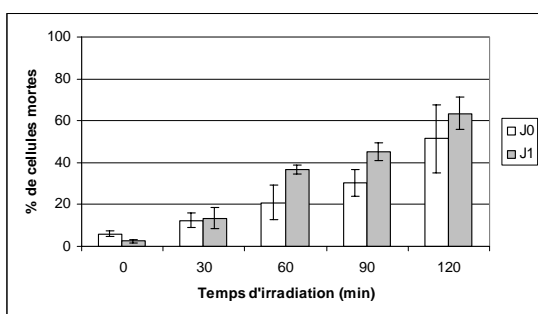
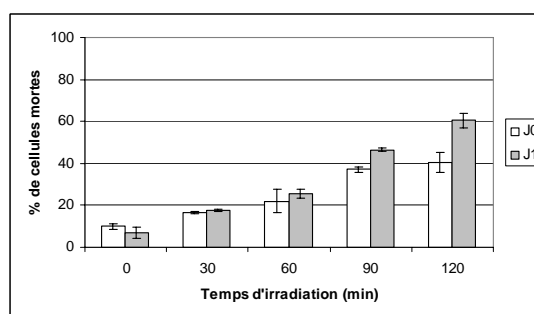


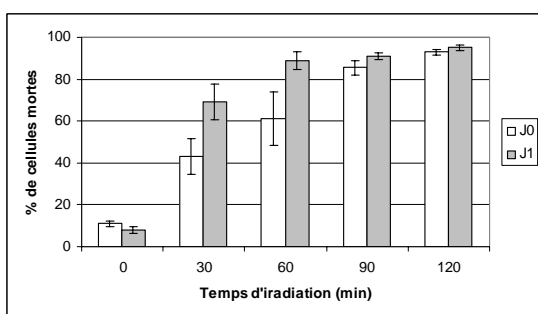
Figure V-7 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **14a,b** et **15a,b** à la concentration de 2 μM . Les cellules sont mises en incubation avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.



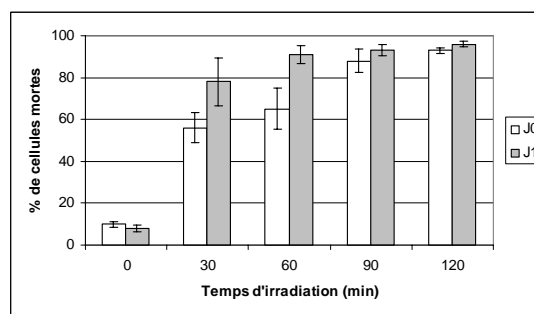
14a



15a



14b



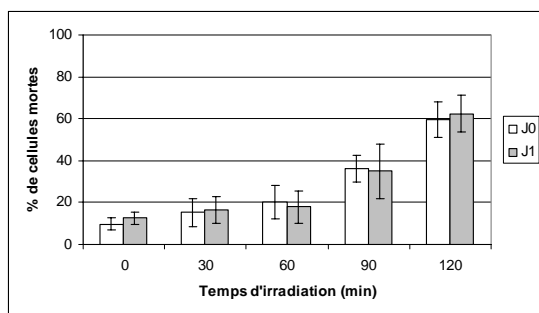
15b

Figure V-8 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **14a,b** et **15a,b** à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

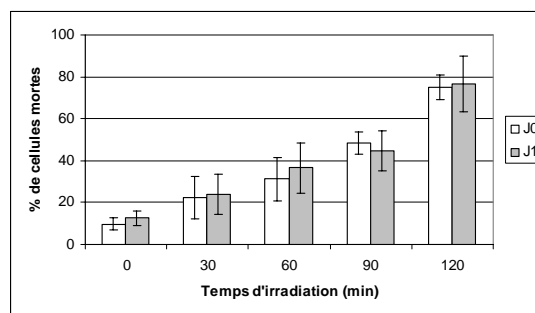
2.3.3. Les tritolylporphyrines-polyamines (**16a,b** et **17a,b**)

L'activité photocytotoxique de ces porphyrines, sans pré-incubation, est plus importante que leurs homologues **14a,b** et **15a,b** (figure V-9). Par exemple, avec le composé **16a**, après 120 minutes d'irradiation et 24 heures d'incubation (J1), nous observons une mortalité cellulaire voisine de 60%. Dans les mêmes conditions, le composé **14a**, était responsable de la mort de 38% des cellules.

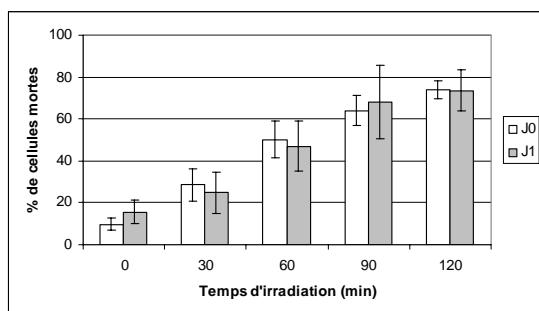
La pré-incubation, améliore les résultats de photocytotoxicité des tritolylporphyrines-polyamines (figure V-10). Ainsi, après pré-incubation et 90 minutes d'irradiation, le composé **17a** entraîne la mort de 80% des cellules. Le même photosensibilisateur, sans pré-incubation, et après traitement PDT, est responsable de la perméabilité membranaire de 40% des cellules. Le nombre de cellules non viables a donc été doublé. Les porphyrines **16b** et **17b** présentent une photocytotoxicité plus importante que le Photofrin. En effet, après 30 minutes d'irradiation, avec la porphyrine-spermidine **16b**, le pourcentage de cellules non viables est proche de 60%, et avec la porphyrine-spermine **17b** ce pourcentage est de 80%.



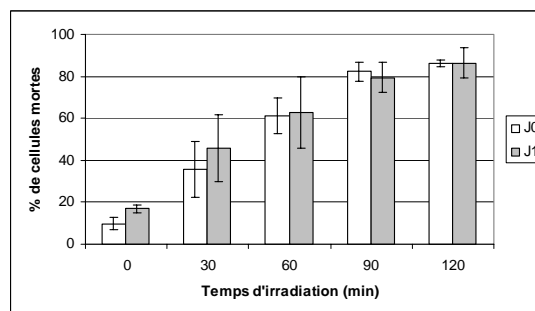
16a



17a

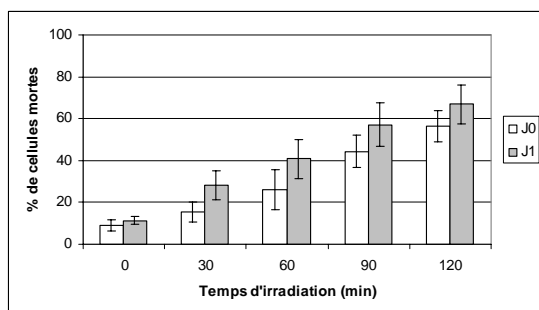


16b

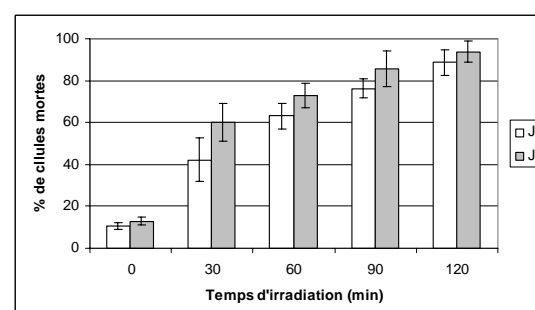


17b

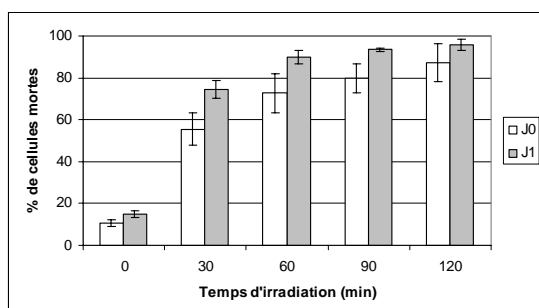
Figure V-9 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **16a,b** et **17a,b** à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont mises en incubation avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.



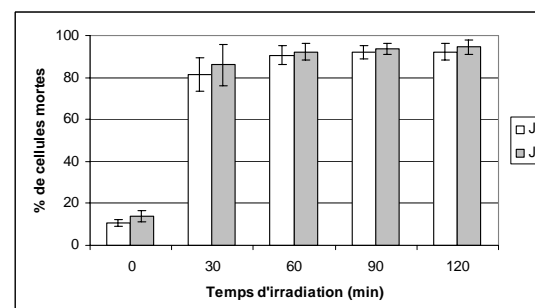
16a



17a



16b



17b

Figure V-10 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **16a,b** **17a,b** à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

2.3.4. Les protoporphyrines-polyamines (**20** et **21**)

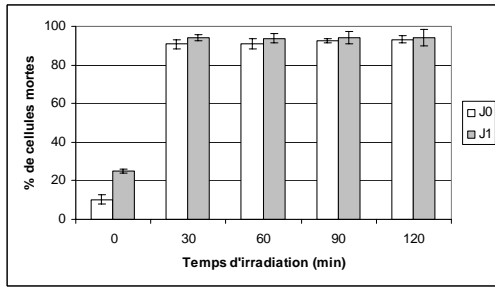
a/ La mort cellulaire

L'activité photocytotoxique des protoporphyrines-polyamines **20** et **21** a été étudiée à trois concentrations différentes. Dans un premier temps, le traitement PDT a été réalisé avec une concentration en porphyrine de 2 μM . Puis, nous avons apprécié la mort cellulaire à deux autres concentrations en photosensibilisateur (0,2 μM , et 0,02 μM). L'activité de ces deux porphyrines a été comparée à la protoporphyrine IX diméthylester et au Photofrin.

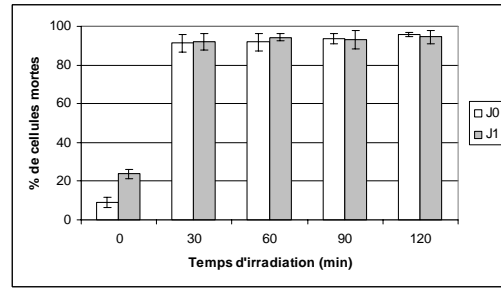
A la concentration de 2 μM , que se soit avec ou sans pré-incubation, les protoporphyrines IX-polyamines sont responsables, après 30 minutes d'irradiation, de la mort de 90% des cellules (figures V-11 et V-12). Par contre, après pré-incubation de la protoporphyrine IX diméthylester dans le milieu de culture cellulaire et 120 minutes de phototraitement, le pourcentage de cellules IP⁺ est voisin de 50%. Ces résultats montrent que les protoporphyrines **20** et **21** ont une photocytotoxicité bien plus importante que la protoporphyrine IX diméthylester et que le Photofrin.

En présence de 0,2 μM de porphyrines, sans pré-incubation, et à J0, on observe une mort cellulaire supérieure au Photofrin. Par exemple, avec la porphyrine **21** et après 120 minutes d'irradiation, 70% des cellules ont perdu leur intégrité physique. La pré-incubation des porphyrines **20** et **21** pendant 18 heures, n'améliore pas le pourcentage de mort cellulaire.

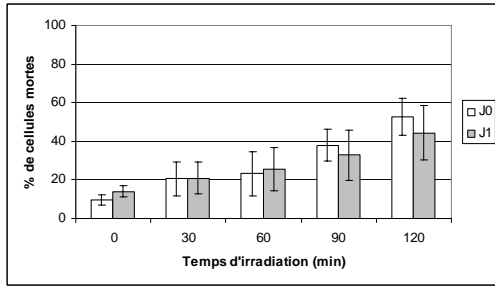
Le traitement PDT, effectué avec les protoporphyrines **20** et **21**, à la concentration 0,02 μM , a peu d'effets sur les cellules K562. Après pré-incubation de ces photosensibilisateurs et traitement PDT, le pourcentage de cellules IP⁺ est proche de 40%, et à J1 on observe une diminution du pourcentage de viabilité. Ainsi, le Photofrin et la protoporphyrine IX diméthylester ont une phototoxicité plus importante que les protoporphyrines-polyamines à la concentration de 0,02 μM .



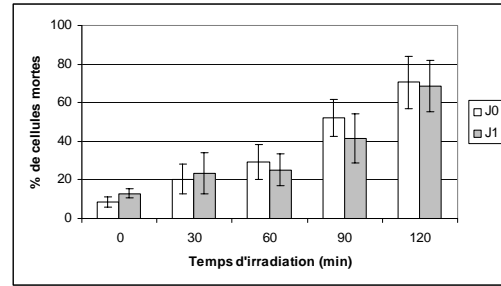
20 (2μM)



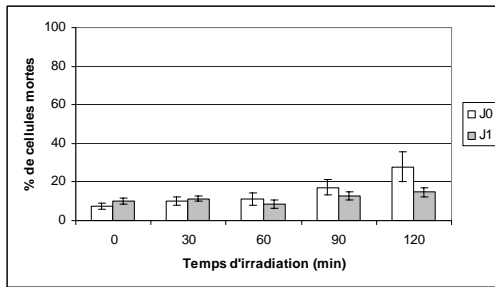
21 (2μM)



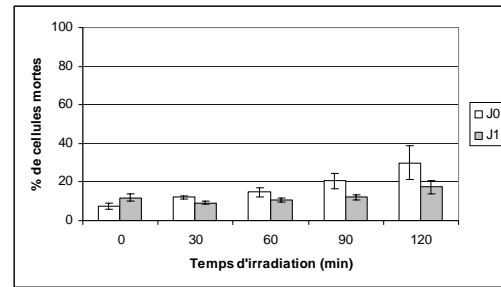
20 (0,2μM)



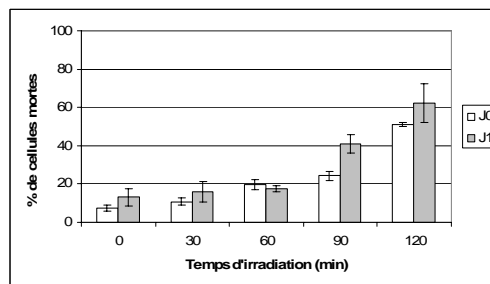
21 (0,2μM)



20 (0,02μM)

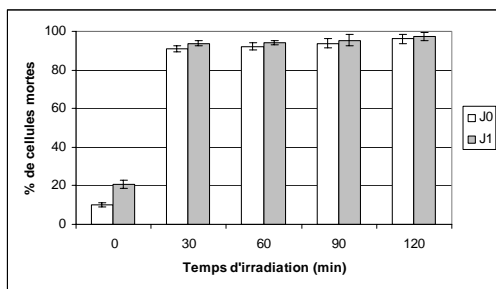


21 (0,02μM)

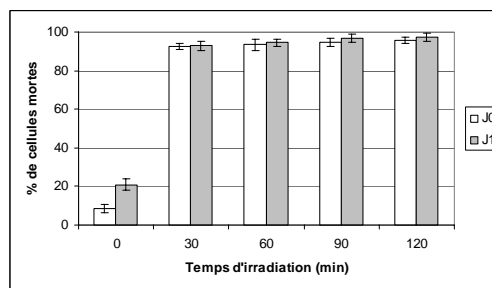


**Protoporphyrine IX
diméthylester
(2μM)**

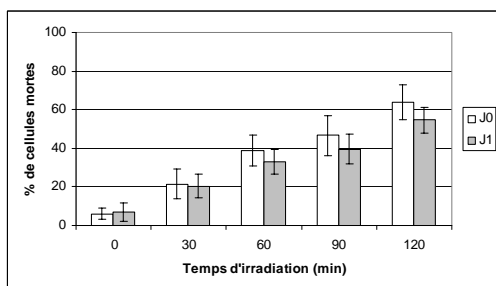
Figure V-11 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **20** et **21** (2 μM, 0,2μM et 0,02μM), et avec la protoporphyrine IX diméthylester (2μM). Les cellules sont mises en incubation avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.



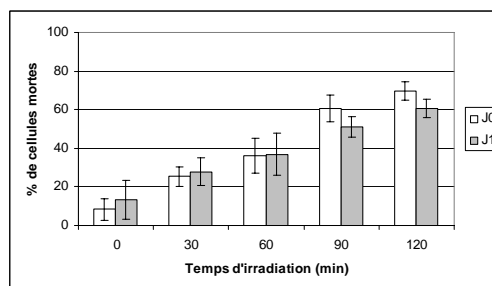
20 (2μM)



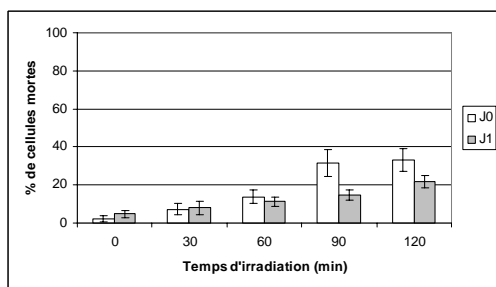
21 (2μM)



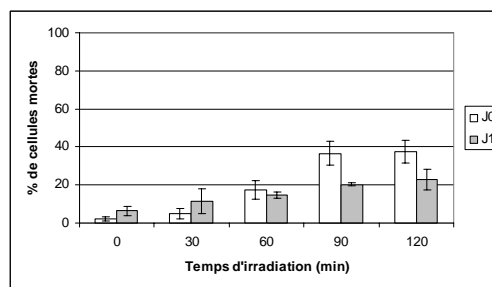
20 (0,2μM)



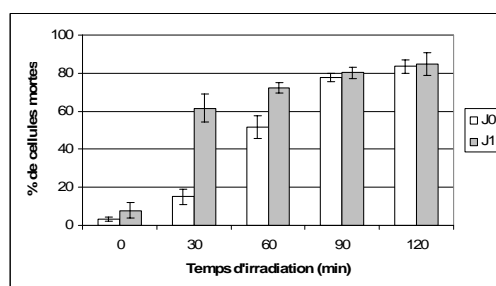
21 (0,2μM)



20 (0,02μM)



21 (0,02μM)



**Protoporphyrine IX
diméthylester
(2μM)**

Figure V-12 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **20** et **21** (2 μM, 0,2μM et 0,02μM), et avec la protoporphyrine IX diméthylester (2μM). Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

b/ La chute du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

La mesure du potentiel mitochondrial a été réalisée à différents temps d'irradiation (10, 30 et 60 minutes). Les cellules ont été irradiées soit immédiatement après l'addition du photosensibilisateur (2 μM), soit après une pré-incubation de 18 heures à l'obscurité (figure V-13). Le $\Delta\Psi_m$ est détecté par l'incorporation du DiOC₆(3), qui est une sonde cationique lipophile.

Les cellules phototraitées par les protoporphyrines IX-polyamines, à la concentration de 2 μM , présentent une chute du potentiel mitochondrial supérieure à celle du Photofrin et de la protoporphyrine IX diméthylester. De plus, nous constatons que la pré-incubation augmente le pourcentage de cellules DiOC₆⁻ (pourcentage de cellules présentant une chute du potentiel mitochondrial). Ainsi, par exemple, après 18 heures de pré-incubation avec le composé **21** et 10 minutes d'irradiation, le pourcentage de cellules DiOC₆⁻ est d'environ 30%. Sans pré-incubation, seulement 5% des cellules présentent une chute du potentiel mitochondrial. Avec les protoporphyrines IX-polyamines et à la concentration de 0,2 μM , la chute du potentiel membranaire est plus faible. Elle est cependant de 20%, avec pré-incubation et 60 minutes d'irradiation.

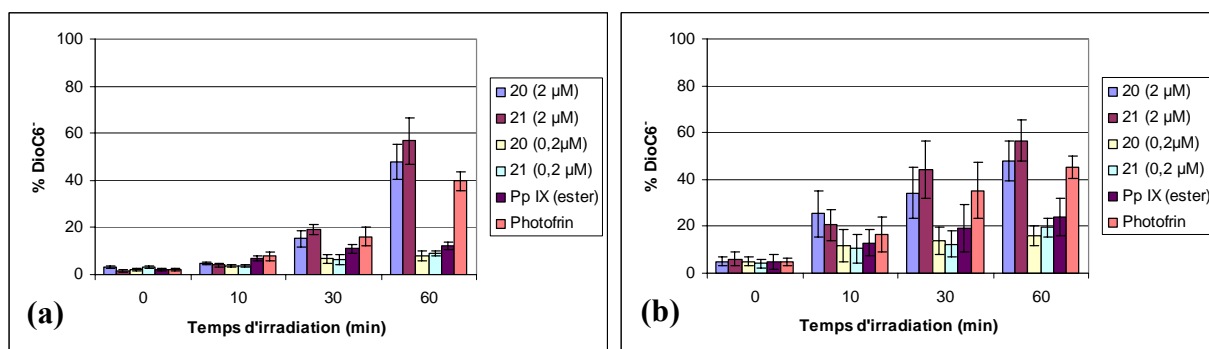


Figure V-13 : Chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) induite par la PDT effectuée par les porphyrines **20** et **21** (2 μM et 0,2 μM), la protoporphyrine IX diméthylester (2 μM) et le Photofrin II[®]. (a) Les cellules sont irradiées pendant 10, 30 ou 60 minutes. (b) Les cellules sont mises en incubation pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées pendant 10, 30 ou 60 minutes. Les cellules sont prélevées immédiatement après le traitement PDT, afin de mesurer le $\Delta\Psi_m$ par l'incorporation de DiOC₆ (les cellules présentant une chute du potentiel mitochondrial sont marquées DiOC₆⁻). Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

c/L'activation de la caspase 9

Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures en présence des photosensibilisateurs et ensuite elles sont irradiées pendant 30 minutes. La caspase-9 sous forme active est mesurée après fixation avec la CaspTag™ Caspase-9(LEHD), un inhibiteur peptidique spécifique de la caspase-9 (figures V-14 et V-15).

Après 30 minutes d'irradiation, en présence du Photofrin, environ 40% des cellules possèdent la caspase-9 sous forme active. Ce résultat est comparable au témoin positif (incubation pendant 4 heures avec la camptothécine). En ce qui concerne la protoporphyrine IX-spermidine, après 30 minutes d'irradiation, environ 70% des cellules possèdent la caspase-9 sous forme active. Avec la protoporphyrine IX-spermine ce pourcentage est bien supérieur puisqu'il est proche de 90%. Ainsi, d'après ces résultats, nous pouvons noter que le Photofrin et les deux protoporphyrines IX-polyamines activent la caspase 9.

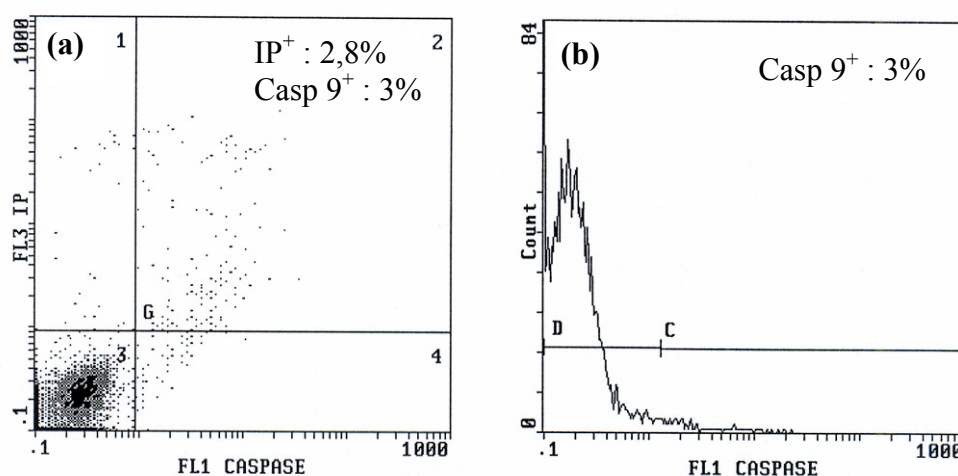
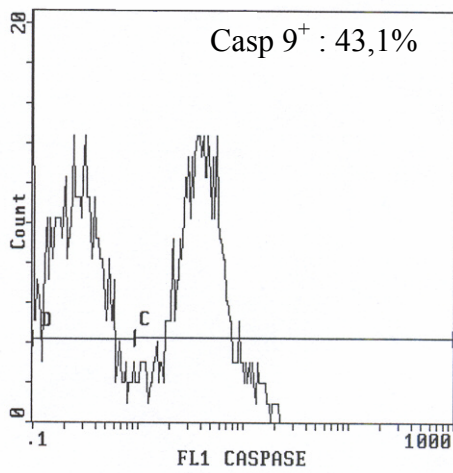
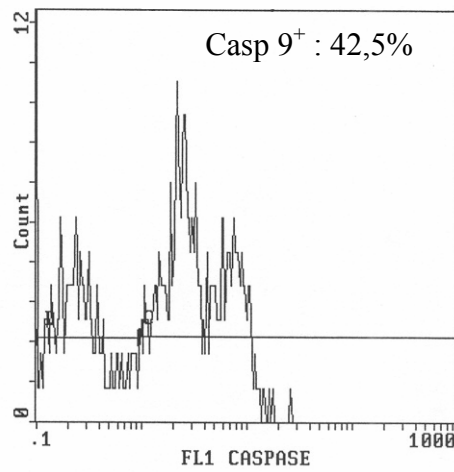


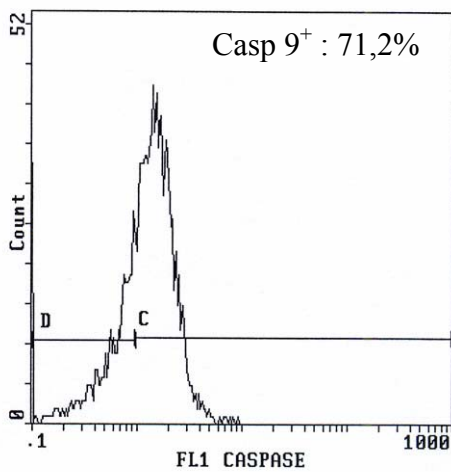
Figure V-14 : (a) Témoin négatif (cellules non traitées par la PDT). L'axe des X représente le marquage au CaspTag™ Caspase-9 (LEHD) et l'axe des Y le marquage à l'iodure de propidium. Les cellules sont dans ce cas IP⁻ et Caspase 9⁻ (quadrant 3). (b) Témoin négatif. L'axe X représente le marquage au CaspTag™ Caspase-9 (LEHD) et l'axe Y le nombre de coups (count). Dans ce cas, 2% des cellules sont Caspase 9⁺.



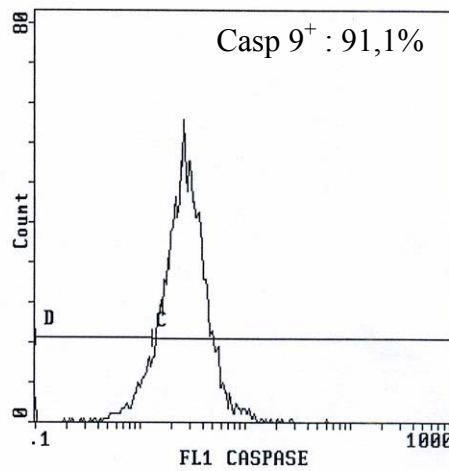
T+ : Camptothécine



Photofrin II[®]



20



21

Figure V-15 : Activation de la caspase-9 par la PDT effectuée par les protoporphyrines IX-polyamines **20** et **21**, et le Photofrin. Les histogrammes représentent le nombre d'évènements (events, axe des Y) en fonction de l'intensité de fluorescence (axe des X). Les cellules à caspase 9 négative (-) se retrouvent dans la première décade, tandis que des cellules à caspase 9 positive (+) se retrouvent à partir de la deuxième décade. La première figure montre le résultat de 4 heures d'incubation avec la camptothécine à la concentration de 2 µg/ml avec les cellules K562 : Témoin⁺.

d/ L'activation de la caspase 3

Au vu des résultats précédent, il nous a paru intéressant de regarder si les protoporphyrines IX-polyamines activaient la caspase 3 (caspase effectrice). Les cellules ont été pré-incubées pendant 18 heures avec ces porphyrines et irradiées pendant 30 minutes. Ensuite la caspase-3 sous forme active a été mesurée après fixation avec la CaspTagTMCaspase-3(DEVD), un inhibiteur peptidique spécifique de la caspase-3 active (figures V-16 et V-17).

Les résultats révèlent qu'après 30 minutes d'irradiation, en présence du Photofrin, environ 27% des cellules possèdent la caspase-3 sous forme active. La protoporphyrine IX-spermidine, après 30 minutes d'irradiation, est responsable de l'activation de la caspase-3 dans 85% des cellules. Avec la protoporphyrine IX-spermine ce pourcentage avoisine les 98%. Ainsi, après traitement PDT, le Photofrin et les deux protoporphyrines-IX polyamines entraînent l'activation de la caspase 3. La voie apoptotique passant par la mitochondrie serait donc déclenchée.

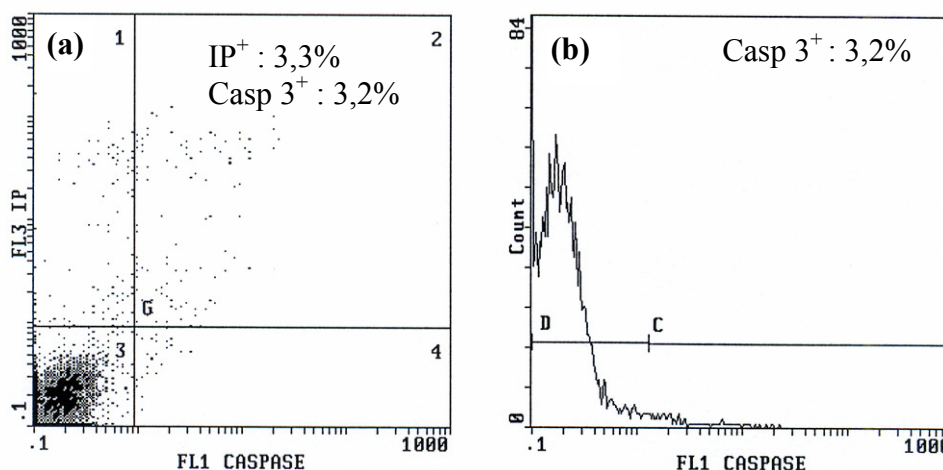
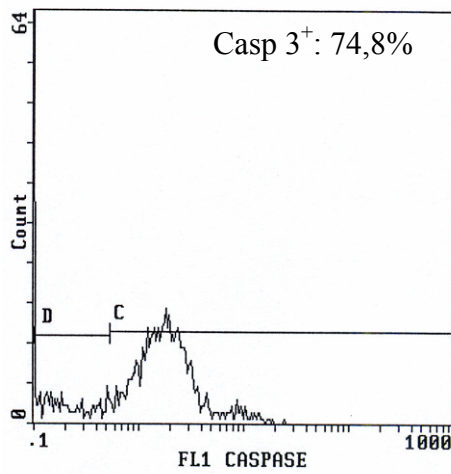
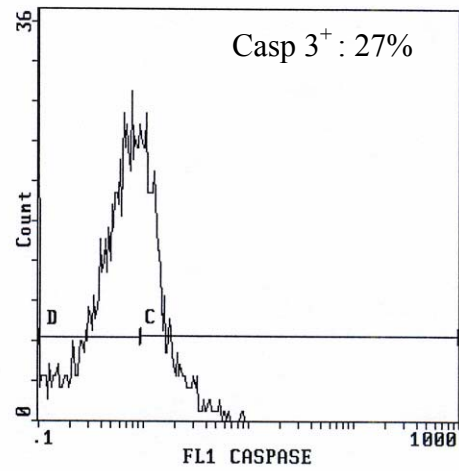


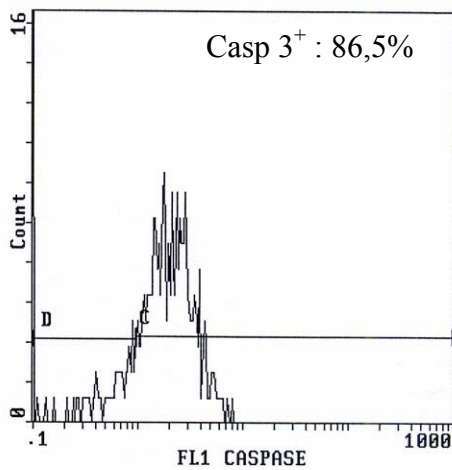
Figure V-16 : (a) Témoin négatif (cellules non traitées par la PDT). L'axe des X représente le marquage au CaspTagTMCaspase-3 (DEVD) et l'axe des Y le marquage à l'iodure de propidium. Les cellules sont dans ce cas IP⁺ et Caspase 3⁺ (quadrant 3). (b) Témoin négatif. L'axe des X représente le marquage au CaspTagTMCaspase-3 (DEVD) et l'axe Y le nombre de coups (count). Dans ce cas, 3,2% des cellules sont Caspase 3⁺.



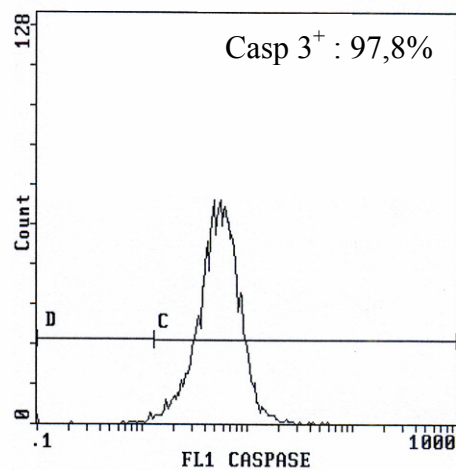
T+ : Camptothécine



Photofrin II[®]



20



21

Figure V-17 : Activation de la caspase-3 par la PDT effectuée par les protoporphyrines IX-polyamines **20** et **21**, et le Photofrin. Les histogrammes représentent le nombre d'évènements (events, axe des Y) en fonction de l'intensité de fluorescence (axe des X). Les cellules à caspase 3 négative (-) se retrouvent dans la première décade, tandis que des cellules à caspase 3 positive (+) se retrouvent à partir de la deuxième décade. La première figure montre le résultat de 4 heures d'incubation avec la camptothécine à la concentration de 2 µg/ml avec les cellules K562 : Témoin⁺.

e/L'Annexine V

Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures en présence des porphyrines et ensuite l'irradiation est réalisée pendant 30 minutes (figure V-18 et figure V-19). Les résultats dans un premier temps montrent que le Photofrin induit une perte de l'asymétrie de la membrane plasmique. La population cellulaire passe par le quadrant 4, Annexine⁺ et Iodure de propidium⁻. Ensuite, la population monte vers le quadrant 2, Annexine⁺ et IP⁺. Le pourcentage d'Annexine⁺, est finalement de 24,3%. Par contre nous pouvons remarquer que les protoporphyrines IX-polyamines passent directement du quadrant 3 (Annexine⁻, IP⁻), au quadrant 1 correspondant à l'Annexine⁻ et à l'iodure de propidium⁺. Avec la protoporphyrine IX-spermidine, le pourcentage d'Annexine⁺ observé est de 19,9% et avec la protoporphyrine IX-spermine, il est de 33,1%. Nous pouvons noter que ces pourcentages sont voisins au Photofrin. Par contre le parcours des populations cellulaires est différent.

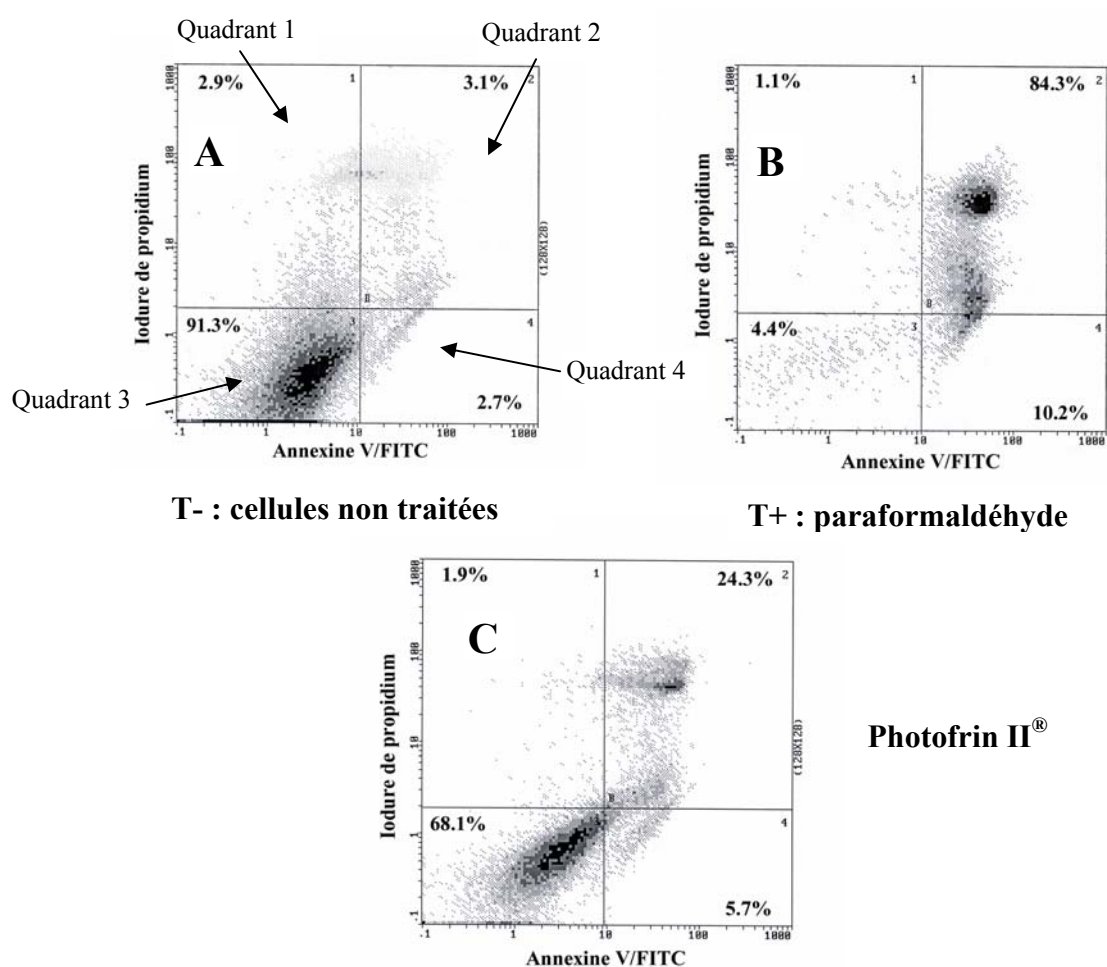


Figure V-18 : (A) Cellules non traitées : Annexine V négatif et Iodure de propidium négatif. (B) Cellules incubées pendant 18 heures avec du paraformaldéhyde : Annexine V positif et Iodure de propidium négatif (C) Cellules incubées pendant 18 heures avec le Photofrin et irradiées. L'axe des X représente le marquage avec l'Annexine V/FITC et l'axe des Y représente le marquage à l'iodure de propidium (IP).

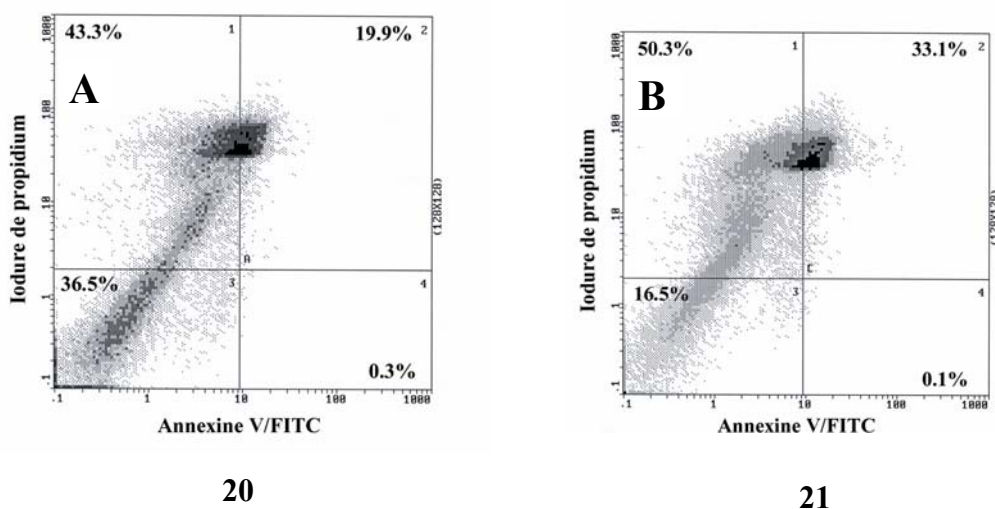


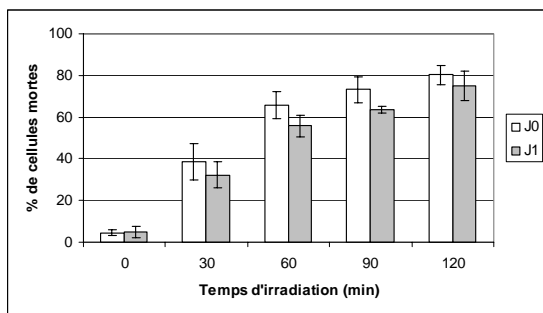
Figure V-19 : (A) Cellules incubées pendant 18 heures avec la porphyrine **20** et irradiées. (B) Cellules incubées pendant 18 heures avec la porphyrine **21** et irradiées. L'axe des X représente le marquage avec l'Annexine V/FITC et l'axe des Y représente le marquage à l'iodure de propidium (IP).

2.3.5. Les chlorines e6-polyamines (**24** et **25**)

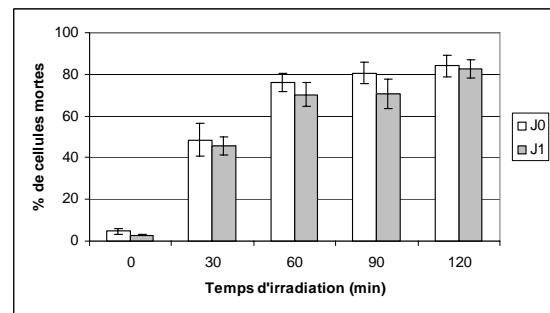
Dans un premier temps, nous avons irradié avec deux tubes fluorescents les cellules en présence de chlorines e6-polyamines avec ou sans pré-incubation (figures V-20 et V-21). Le Photofrin et la chlorine e6 ont été employés comme référence.

Les chlorines e6-polyamines déprotégées à la concentration de 2 μ M, sans pré-incubation présentent une photocytotoxicité supérieure à celle du Photofrin. En effet, après 30 minutes d'irradiation en présence de la chlorine e6-spermidine, le pourcentage de cellules non viables est de 40%. Dans les mêmes conditions, avec le Photofrin le pourcentage de cellules IP⁺ est de 10%. Après 120 minutes d'irradiation en présence des composés **24** ou **25**, le pourcentage de cellules mortes est voisin de 80%, et avec le Photofrin il est de 40%. Par contre, à J1, l'activité photocytotoxique de ces composés devient équivalente. Si l'on compare l'activité des chlorines e6-polyamines à la chlorine e6 nous remarquons aisément que les polyamines augmentent l'activité photocytotoxique. Ainsi par exemple, après 30 minutes d'irradiation avec la chlorine sperminée **25**, le pourcentage de cellules IP⁺ est de 50%. Dans les mêmes conditions et avec la chlorine e6 le pourcentage de cellules non viables est de 20 %.

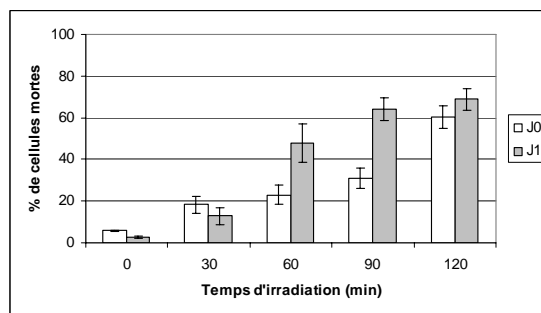
La pré-incubation des chlorines-polyamines pendant 18 heures dans le milieu de culture cellulaire n'augmente pas leur photocytotoxicité. En effet si l'on compare les diagrammes, nous observons des similitudes dans les résultats. Par exemple, que se soit avec ou sans pré-incubation de la chlorine e6-spermidine dans le milieu cellulaire, et après 120 minutes d'irradiation, le nombre de cellules mortes est proche de 80%. Par contre, en ce qui concerne la chlorine e6, sa photocytotoxicité est améliorée après incubation de 18 heures. Elle reste cependant inférieure aux chlorines **24** et **25**. A J0, après 60 minutes de traitement PDT, en présence de chlorine e6, le pourcentage d'IP⁺ est de 40%. Dans les mêmes conditions, avec la chlorine e6-spermine **25**, le pourcentage de cellules mortes est de 60%.



24



25



Chlorine e6

Figure V-20 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les chlorines **24**, **25** et la chlorine e6, à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont mises en incubation avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

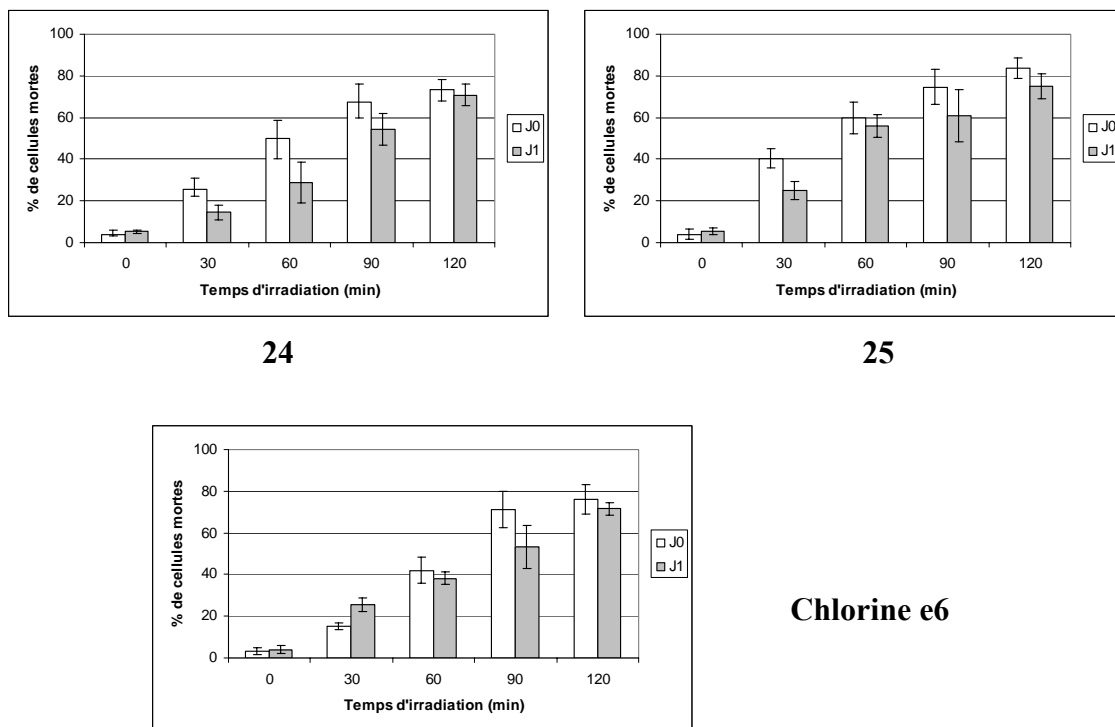


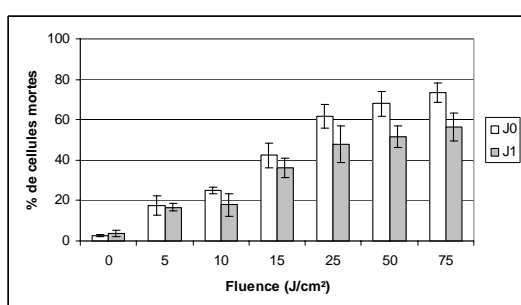
Figure V-21 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les porphyrines **24**, **25** et la chlorine e6, à la concentration de 2 μ M. Les cellules sont pré-incubées pendant 18 heures avec une de ces porphyrines et irradiées. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Dans un second temps, nous avons irradié avec une lampe émettant dans le rouge les cellules en présence de chlorines e6-polyamines. Pour tous les essais, les photosensibilisateurs ont été incubés pendant 3 heures avec les cellules. La chlorine e6 et le Photofrin ont été utilisés comme référence (figure V-22).

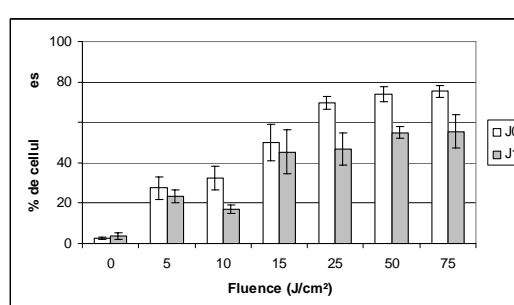
Après traitement PDT, nous constatons que les chlorines e6-polyamines sont plus photocytotoxiques que la chlorine e6. A la fluence de 5 J/cm² (1min13s), avec la chlorine e6-spermine le pourcentage de cellules non viables est voisin de 30%. Dans les mêmes conditions et avec la chlorine e6 le pourcentage de cellules IP⁺ est de 5%. A la fluence de 25 J/cm² avec le composé **25**, le pourcentage de cellules mortes est de 70%. Ce dernier n'est que de 30% avec la chlorine e6. Nous pouvons noter qu'avec les chlorines e6-polyamines, le pourcentage de cellules IP⁺ diminue après 24 heures d'incubation (J1). Cette chute du nombre de cellules non viables peut être expliquée par le fait qu'après 24 heures d'incubation, le milieu de culture contient peu de cellules et il présente surtout des débris cellulaires. Cette

conclusion a pu être établie grâce à une numération systématique des cellules sur lame de Malassez (à J0 et à J1) et après observation au microscope.

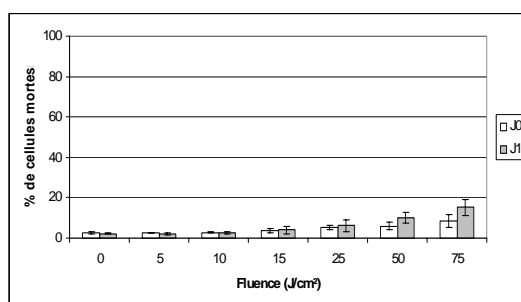
Il est intéressant également de noter que le Photofrin a une faible activité photocytotoxique. En effet, à une fluence de 75 J/cm², le pourcentage de cellules viables ne dépasse pas 10% à J0 et 20% à J1. Ce résultat pouvait être attendu, puisque le Photofrin possède une bande d'absorption QI faible vers 660 nm. Ainsi, avec ce protocole la *mésotétrahydroxyphénylchlorine* (Foscan®) serait une bonne référence.



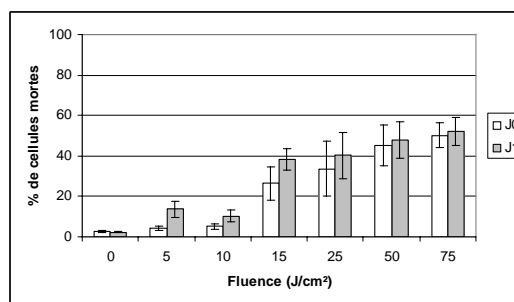
24



25



Photofrin II®



Chlorine e6

Figure V-22 : Mort cellulaire induite par la PDT effectuée avec les chlorines 24, 25 et la chlorine e6, à la concentration de 2 µM. Les cellules sont pré-incubées pendant 3 heures avec une de ces porphyrines et irradiées avec une lampe émettant dans le rouge. Chaque histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes.

3. Conclusion

Au cours de cette étude, dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence la production d'oxygène singulet par les différentes porphyrines et chlorines-polyaminées. Puis, nous avons étudié l'activité photocytotoxique de ces photosensibilisateurs synthétiques vis-à-vis des cellules K562.

La première série de *para* ou d'*ortho*-carboxypropyloxyphényltritolylporphyrines portant une molécule de spermidineBoc₂ ou de spermineBoc₃ (composés **10a,b** et **11a,b**) a montré une photocytotoxicité très faible. Par contre, leurs homologues déprotégés (composés **14a,b** et **15a,b**) ont révélé une photoactivité significative. Ces premiers résultats ont donc permis de montrer que la présence de fonctions amines libres sur la polyamine rendait le photosensibilisateur photocytotoxique. Les carboxyporphyrines de la série suivante portant une molécule de N⁴-aminobutylspermidine ou de N⁴-aminobutylspermine (porphyrines **16a,b** et **17a,b**) se sont révélées être efficaces. Cependant, comme avec les séries précédentes, les composés *ortho* se sont trouvés être plus photocytotoxiques que leurs homologues en *para*. Ces résultats ont été observés à chaque fois dans notre laboratoire,¹¹⁵ avec des séries différentes, comme avec des thiopropylxyphényltritolylporphyrines portant une unité glucidique (glucose, galactose, mannose)¹¹⁶ ou des carboxyporphyrines portant le motif RGD (séquence d'acides aminés Arginine-Glycine-Acide Aspartique).¹¹⁷ Une explication à ces résultats peut être que de part leur structure, les porphyrines *ortho*, limitent leur agrégation. Ainsi, les photosensibilisateurs sont plus facilement disponibles.

Les protoporphyrines IX-polyamines (**20** et **21**) ont donné les meilleurs résultats de photocytotoxicité. A la concentration de 2 µM, l'activité s'est révélée être remarquable, et à 0,2 µM, ces porphyrines ont une photoactivité comparable au Photofrin (concentration pondérale dix fois supérieure). La protoporphyrine IX diméthylester est beaucoup moins efficace que ses homologues polyaminés. Ainsi, les polyamines semblent avoir un rôle prédominant dans l'acheminement du photosensibilisateur dans la cellule. Elles doivent par la suite interagir avec diverses structures essentielles pour la survie des cellules. Par exemple,

¹¹⁵ Y-M Huang ; *Thèse de l'Université de Limoges*, 2001.

¹¹⁶ I. Sylvain ; *Thèse de l'Université de Limoges*, 59-1999.

¹¹⁷ V. Chaleix ; *Thèse de l'Université de Limoges*, 26-2003.

elles peuvent se fixer aux structures anioniques, de la membrane cytoplasme¹¹⁸ ou encore avec l'ADN.¹¹⁹ Les protoporphyrines IX-polyamines **20** et **21**, à la concentration de 2µM, ont permis d'observer la chute du potentiel mitochondrial, l'activation des caspases 9 et 3 (respectivement caspases initiateuses et caspases effectrices). Cependant, elles n'ont pas engendré de perte de l'asymétrie de la membrane plasmique (test Annexine V négatif). Ces premiers résultats suggèrent que des événements précoces ont été déclenchés chez les cellules traitées par la PDT. Les deux protoporphyrines IX-polyamines **20**, **21** semblent déclencher la voie apoptotique au niveau de la mitochondrie puisque son potentiel est modifié et qu'il y a activation de la caspase 9. Ainsi, nous pouvons envisager le schéma suivant (figure V-23) :

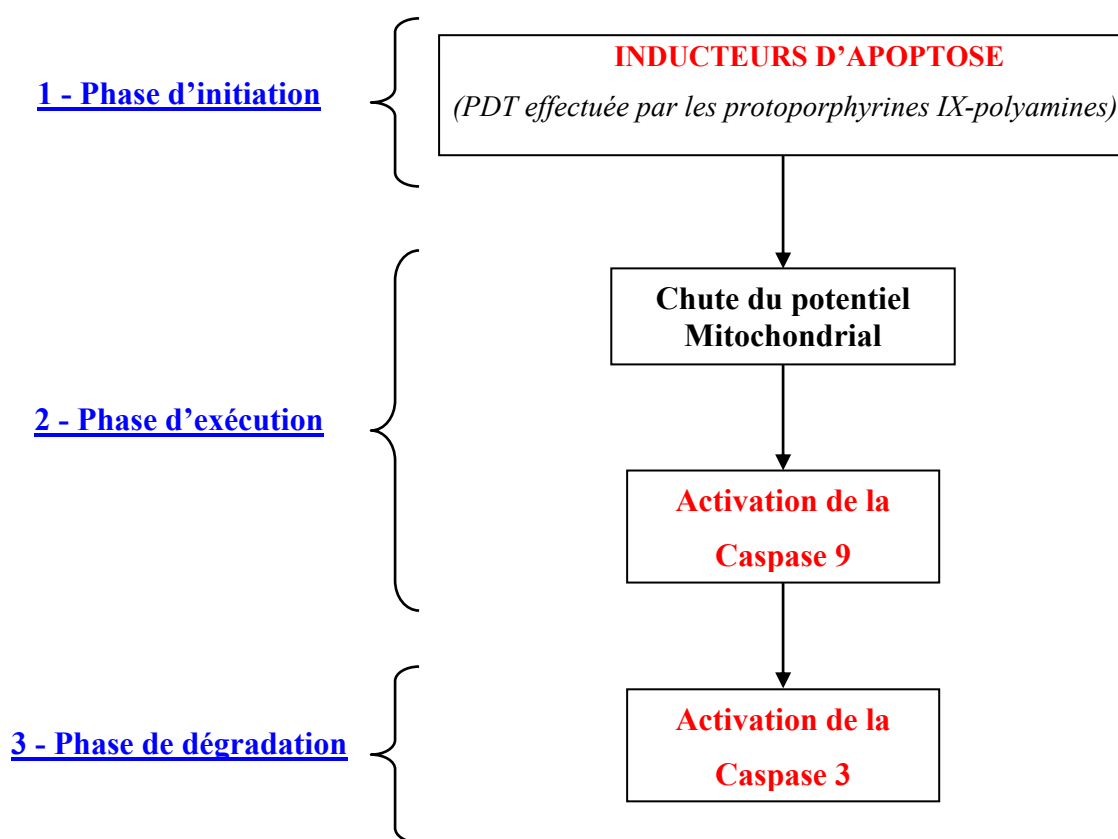


Figure V-23 : Représentation du déclenchement de la voie apoptotique au niveau de la mitochondrie par les protoporphyrines IX-polyamines (composés **20** et **21**).

¹¹⁸ R.H. Davis, D.R. Morris, P. Coffino ; *Microbiol. Rev.*, 56(2), 1992, 280-290.

¹¹⁹ J. Pelta, F. Livolant, J.L. Sikorav ; *J. Biol. Chem.*, 271(10), 1999, 5656-5662.

Cependant, le test à l'Annexine V étant négatif, des essais complémentaires avec des concentrations en porphyrine plus faibles devront être mises en place afin de confirmer ces résultats.

Enfin, les chlorines e6-polyamines **24** et **25**, soumises à une irradiation à la lumière blanche ou avec une lampe émettant dans le rouge, ont montré une activité photocytotoxique plus importante que le Photofrin et la chlorine e6. Par la suite, des essais supplémentaires devront être réalisés afin de déterminer la nature de la mort cellulaire par comparaison avec une chlorine commerciale, la *m*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC).

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé pour la première fois une série de *méso*-arylporphyrines polyaminées pour lesquelles des polyamines (spermidine ou spermine) ont été greffées sur la tritylporphyrine portant une fonction acide carboxylique libre. Ces polyamines doivent permettre d'améliorer le ciblage des cellules cancéreuses. Deux types de fixation ont été réalisés. Tout d'abord, les polyamines ont été directement fixées par la fonction amine secondaire libre sur la fonction acide de la porphyrine en présence de DCC et de HOBt. Par la suite, les polyamines naturelles ont été fonctionnalisées par l'intermédiaire d'un bras aminobutyle et deux précurseurs ont été synthétisés, la N^4 -(4-aminobutyl)-spermidineBoc₂ et la N^4 -(4-aminobutyl)-spermineBoc₃. Ces derniers ont été ensuite greffés sur les carboxyporphyrines. Au cours de notre travail, nous avons augmenté la quantité d'unités polyamines fixée sur le photosensibilisateur afin d'obtenir un éventail plus large de molécules potentiellement photosensibles. Ainsi, les deux précurseurs polyaminés ont été fixés sur deux photosensibilisateurs d'origine naturelle, la protoporphyrine IX et la chlorine e6. Cette dernière molécule possède à la différence des porphyrines, une activation importante dans le rouge (vers 660 nm), ce qui lui confère une meilleure activité *in-vivo*. Ces nouvelles structures protégées et déprotégées, ont été caractérisées par spectrométrie MALDI, spectroscopie UV-Visible et RMN du proton.

Les premiers essais d'activité biologique, *in vitro*, de ces porphyrines et chlorines-polyaminées ont été réalisés sur la lignée cellulaire K562 et seuls les composés déprotégés ont montré une activité photocytotoxique après une irradiation à la lumière blanche. Les protoporphyrines-polyamines se sont avérées être les photosensibilisateurs avec l'activité la plus importante. Une étude plus approfondie des événements impliqués dans ce processus ont montré une chute du potentiel mitochondriale, l'activation de la caspase 9 et enfin l'activation de la caspase 3. Cependant, nous n'avons pas pu observer la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique avec le test à l'Annexine V. Ces résultats semblent nous orienter vers un processus de mort cellulaire par apoptose. Enfin, les chlorines e6-polyamines, après traitement PDT des cellules avec une lampe émettant dans le rouge, se sont révélées être photocytotoxiques. Leur activité anticancéreuse avec ce type d'irradiation est très intéressante pour une application thérapeutique.

Par la suite, nous envisageons, l'élaboration de chlorines de synthèse substituées par des polyamines. Des études complémentaires devront être réalisées afin de confirmer la nature du processus de mort cellulaire, en particulier, par des essais à plus faible concentration en photosensibilisateur et par l'utilisation de la microscopie confocale. Une comparaison d'activité photocytotoxique sera réalisée sur différentes lignées cancéreuses et des tests *in vivo* seront mis en place. Enfin, lors des études *in vitro* et *in vivo*, nous envisagerons également d'utiliser un inhibiteur de la synthèse des polyamines, comme le DFMO, afin de potentialiser l'effet du photosensibilisateur polyaminé.

Chapitre VI

Partie expérimentale

1. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés est présentée dans le tableau VI-1. Toutes les puretés ont été testées avec les procédures classiques (températures de fusion, traces d'eau mesurées par IR).

Tableau VI-I : Réactifs et solvants.

Réactifs et solvants	Origines
Acétate d'éthyle, 99,8%	SDS
Acétone, 99%	ELEVETEC
Acétonitrile, 99,6%	FISHER
Acide acétique, 99,8%	FISHER
Acide chlorhydrique, 35%	FISHER
Acide propanoïque, 99%	ACROS
Acide trifluoroacétique, 99%	ACROS
Boc-ON, 99%	ALDRICH
4-bromobutanoate d'éthyle, 95%	ALDRICH
Carbonate de potassium (séché 24 heures à l'étuve, à 100°C)	ALDRICH
Chlorine e6, 98%	FRONTIER SCIENTIFIC
Chloroforme, 99,9%	SDS
Dichlorométhane, 99,8% (distillé sous vide sur P ₂ O ₅ , puis sur CaH ₂)	SDS
Dicyclohexylcarbodiimide, 99%	ACROS
N,N-diméthylacétamide, 99%	ACROS
Diméthylformamide, 99,8%	SDS
Diméthylsulfoxyde, 99,9%	RIDEL-DEHAEN
Ethanol absolu	ELVETEC
Ether de pétrole	FISHER

Hydrazine monohydrate, 98%	ACROS
2-hydroxybenzaldéhyde (distillé sous vide sur CaH ₂)	ALDRICH
4-hydroxybenzaldéhyde, 99%	ACROS
1-hydroxybenzotriazole (H ₂ O<5%)	ALDRICH
Hydroxyde d'ammonium	ACROS
Hydroxyde de sodium	ACROS
Méthanol	FISHER
N-(4-bromobutyl)phthalimide, 98%	FLUKA
Para-tolualdéhyde, 97% (distillé sous vide sur CaH ₂)	ALDRICH
Protoporphyrine IX, ≥95%	ALDRICH
Protoporphyrine IX diméthylester, ≥95%	ALDRICH
Pyrrole (distillé sous vide sur CaH ₂)	ALDRICH
Spermidine, 99%	ALDRICH
Spermine, 98%	ALDRICH
Tétrahydrofurane, 99,9%	ACROS
Toluène 99%	SDS
Triéthylamine, 99,5%	SDS

2. Chromatographie

2.1. Chromatographie sur couche mince

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

- par observation directe dans le cas de produits colorés comme les porphyrines,
- par vaporisation d'une solution de fluorescéine dans le mélange 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 vaporisation d'une solution de ninhydrine suivie d'un chauffage à 100°C pour les produits aminés,
- par révélation à l'iode pour les produits aminés,
- par observation sous une lampe UV pour les produits aromatiques.

2.2. Chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice

Les chromatographies sur couche mince préparatives sont réalisées sur des plaques de verre (20 cm × 20 cm) à l'aide de 80 g de silice (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) et de 220 mL d'eau distillée. Puis, elles sont séchées à l'air libre et activées à 100°C, pendant deux heures.

2.3. Chromatographie sur colonne

Pour les séparations par chromatographie en phase normale, nous avons utilisé de la silice 60 ACC, 20-40 µm provenant de SDS. Dans tous les cas, les colonnes sont préalablement 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. Toutes les porphyrines à purifier sont dissoutes dans un minimum de solvant identique à l'éluant puis elles sont introduites en tête de colonne. L'élution des composés peut être accélérée par une légère surpression d'air comprimé. L'éluant est ensuite fractionné afin de récupérer le produit pur désiré.

2.4. 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 BUCHI comprenant une pompe B688 moyenne pression pilotée par un formateur de gradient binaire B687 et associée à une colonne BUCHI de dimension (H 23 cm × Ø 1,5 cm). 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.

3. Analyses

3.1. Température de fusion

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

3.2. Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visibles ont été réalisés sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25, piloté par le logiciel UVWinlab. La cuve utilisée est une cuve en quartz de 1 cm de trajet optique. Les longueurs d'onde correspondant aux absorbances maximales λ_{\max} sont exprimées en nanomètre et les coefficients d'absorption en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3. Spectroscopie Infra-Rouge

Les spectres Infra-Rouge (FTIR) ont été réalisés avec un appareil Perkin Elmer 1310, sur des échantillons conditionnés en pastille KBr. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

3.4. Spectroscopie RMN

Les spectres sont effectués 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 exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations retenues sont les suivantes : s (singulet), s él. (singulet élargi), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), ddd (double double doublet), quad. (quadruplet), quint. (quintuplet) et m (multiplet).

3.5. Spectroscopie de masse MALDI

Les spectres de masse MALDI ont été effectués au Laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'Université de Paris VI par le Docteur Jean-Claude Blais avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite.

3.6. 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.

3.7. Production d'oxygène singlet

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⁻¹. L'ensemble est maintenu sous bullage d'air comprimé et sous éclairage fourni par deux lampes de 100 Watts. Les résultats des tests de production d'oxygène singlet réalisés sur les porphyrines-polyamines sont quantitativement comparés par chromatographie sur couche mince à ceux obtenus pour l'hématoporphyrine qui est un inducteur connu d'oxygène singlet. Au cours de ces essais, l'acétate d'ergostérol est utilisé comme accepteur d'oxygène singlet afin de former l'endoperoxyde d'ergostérol. L'analyse des produits formés met en évidence, après quinze minutes d'irradiation, la présence d'endoperoxyde et donc la formation d'oxygène singlet pour toutes les porphyrines testées (figure VI-1).

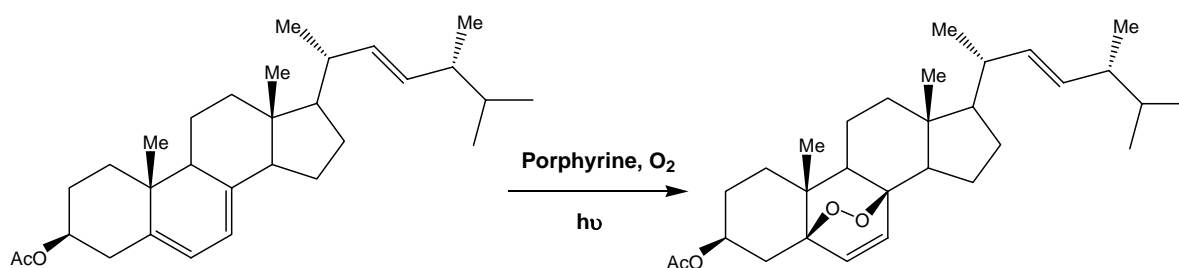
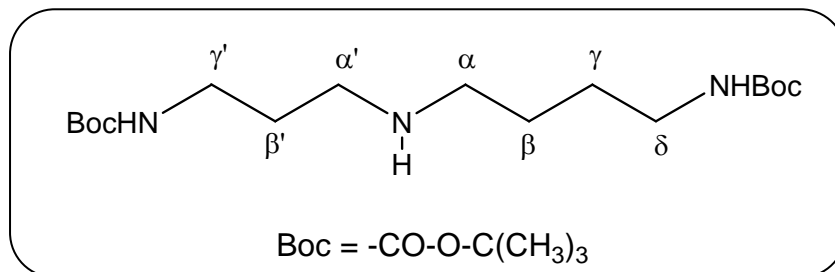


Figure VI-1 : Formation d'endoperoxyde.

4. Synthèses

*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butyloxycarbonyl-spermidine (**1**)



6,80 g (27,6 mmol, 2 éq.) de Boc-ON sont dissous dans 30 ml de THF anhydre et sont ajoutés goutte à goutte à 2,16 mL (13,8 mmol) de spermidine. A ce mélange on additionne 5,77 mL (41,4 mmol, 3 éq.) de triéthylamine. Le mélange réactionnel est ensuite laissé sous argon, pendant 16 heures à 0°C. On évapore sous vide et le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est ensuite laissé pendant 16 heures à 0°C. Après évaporation du solvant, l'huile obtenue est dissoute dans 50 mL de dichlorométhane, lavée avec de la soude à 5% (2×50mL), puis à l'eau distillée (3×50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation, le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant CHCl₃/MeOH de 100/0 à 50/50) et la deuxième fraction est récupérée. On obtient finalement 3,62 g du produit **1** (76 %) après recristallisation dans l'éther de pétrole.

R_F=0,35 (acétate d'éthyle/acétone/acide acétique/eau 5/3/1/1).

T_F=80°C (litt. T_F=79°C-80°C)¹²⁰.

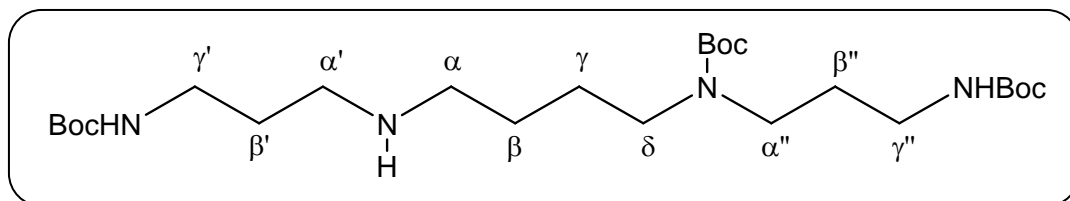
IR ν(cm⁻¹) : 3373, 2977, 2929, 1685 (C=O), 1520, 1165.

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25°C) δ, 5,22 (s, 1H, NH_{Boc}), 4,90 (s, 1H, NH_{Boc}), 3,19 (quad., J=6,0 Hz, 2H, H_{γ'}), 3,12 (quad., J=5,9 Hz, H_δ), 2,65 (t, J=6,6 Hz, 2H, H_{α'}), 2,60 (t, J=6,6 Hz, 2H, H_α), 1,65 (quint., J=6,6 Hz, 2H, H_{β'}), 1,52 (quint., J=6,5 Hz, 2H, H_γ), 1,50 (quint., J=6,5 Hz, 2H, H_β), 1,44 (s, 18H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ, 156,15 (CO), 156,05 (CO), 78,93 (C(CH₃)₃), 49,45 (CH_{2α}), 47,75 (CH_{2α'}), 40,45 (CH_{2δ}), 39,25 (CH_{2γ'}), 29,89 (CH_{2β'}), 28,45 (C(CH₃)₃), 27,85 (CH_{2β}), 27,39 (CH_{2γ}).

¹²⁰ S. Nagarajan, B. Ganem ; 50(26), *J. Org. Chem.*, 1985, 298-306.

***N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butyloxycarbonyl-spermine (2)**



En utilisant le même protocole que pour le composé **1**, avec 1,83 g (7,41 mmol, 3 éq.) de Boc-ON, 500 mg (2,47 mmol) de spermine et 1,38 mL (9,88 mmol, 4 éq.) de triéthylamine, le composé **2** est obtenu avec un rendement de 72% (897 mg), sous la forme d'une huile jaune.

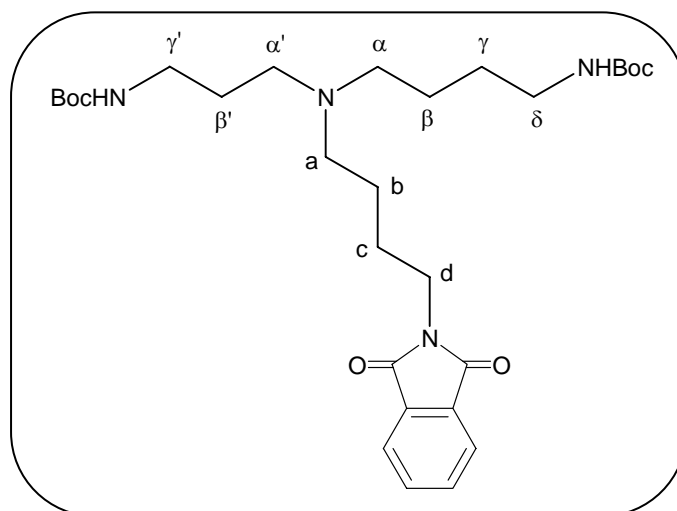
$R_f=0,48$ (acétate d'éthyle/acétone/acide acétique/eau 5/3/1/1).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3348, 2976, 2932, 1693 (C=O), 1520, 1172.

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25°C) δ , 5,31 (s, 1H, NH*Boc*), 5,11 (s, 1H, NH*Boc*), 3,24 (m, 2H, H α'), 3,20 (m, 2H, H γ''), 3,14 (m, 2H, H δ), 3,10 (m, 2H, H γ'), 2,66 (t, J=6,8 Hz, 2H, H α'), 2,60 (t, J=6,9 Hz, 2H, H α), 1,65 (m, 4H, H β' et H β''), 1,55 (m, 2H, H β ou H γ), 1,46 (m, 2H, H β ou H γ), 1,44 (s, 27H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ , 156,13 (CO), 155,98 (CO), 155,44 (CO), 79,74 (C(CH₃)₃), 79,45 (C(CH₃)₃), 78,93 (C(CH₃)₃), 49,63 (CH₂ α), 47,71 (CH₂ α'), 46,80 (CH₂ δ), 43,93 (CH₂ α''), 39,17 (CH₂ γ''), 37,45 (CH₂ γ'), 29,96 (CH₂ β' ou CH₂ β''), 29,25 (CH₂ β' ou CH₂ β''), 28,45 (C(C(CH₃)₃), 27,36 (CH₂ β ou CH₂ γ), 26,45 (CH₂ β ou CH₂ γ).

***N*⁴-(4-phtalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butyloxycarbonylspermidine (**3**)**



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, on introduit 875 mg (2,48 mmol) de spermidineBoc₂ **1**, 875 mg (3,10 mmol, 1,25 éq.) de *N*-(4-bromobutyl)phtalimide, 1,73 g (12,4 mmol, 5 éq.) de carbonate de potassium et 20 mL d'acétonitrile. La réaction se déroule pendant 18 heures, à reflux, sous agitation. Le milieu est ensuite refroidi et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est lavée avec du NaHCO₃ (2×50 ml) et avec de l'eau distillée (2×50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium, filtration, évaporation et purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 80/20), on isole 1,3 g d'une huile jaune (composé **3**, Rdt 96%).

R_f=0,44 (CH₂Cl₂/EtOH 90/10).

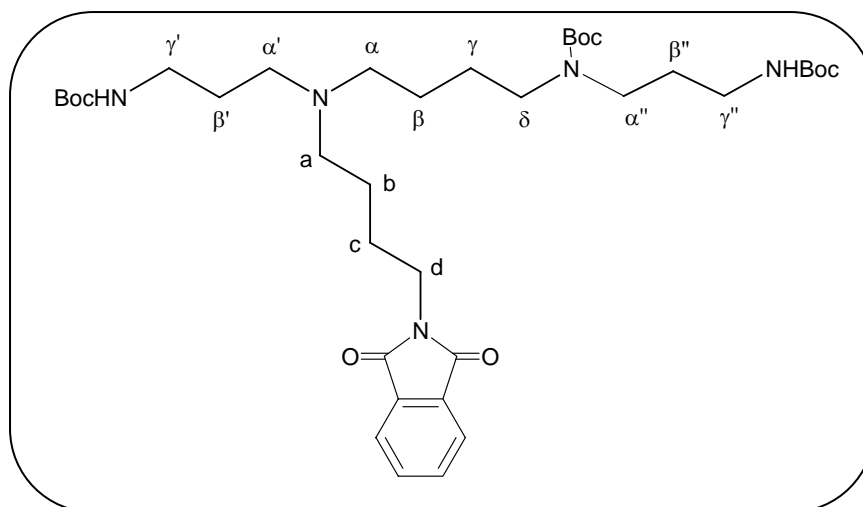
IR ν(cm⁻¹) : 3354, 2975, 2932, 1772, 1713 (C=O), 1170.

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25°C) δ, 7,84 (dd, J=3,1 et J=5,1, 2H, H3-5 Ar), 7,71 (dd, J=3,1 et J=5,1, 2H, H2-4 Ar), 5,34 (s, 1H, NH_{Boc}), 4,91 (s, 1H, NH_{Boc}), 3,70 (t, J=7,2 Hz, 2H, Hd), 3,14 (m, 2H, Hγ'), 3,14 (m, 2H, Hδ), 2,44 (m, 6H, Hα, Hα' et Ha), 1,71 (quint., J=7,2 Hz, 2H, Hc), 1,63 (quint., J=7,2 Hz, 2H, Hb) 1,48 (m, 6H, Hβ, Hγ et Hβ'), 1,44 (s, 18H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ, 168,38 (CO), 156,08 (CO), 133,41 (CH3-5 Ar), 132,14 (C1-6 Ar), 123,70 (CH2-4 Ar) 79,46 (C(CH₃)₃), 78,74 (C(CH₃)₃), 53,64-53,27-52,25 (CH₂α, CH₂α' et CH₂a), 40,51 (CH₂δ), 39,85 (CH₂γ'), 37,83 (CH₂d), 29,6 9 (CH₂β'), 28,46 (C(CH₃)₃), 26,89 (CH₂b), 26,47 (CH₂c), 24,45 (CH₂β), 23,98 (CH₂γ).

SM Haute Résolution : calculée pour l'ion [M+H]⁺. C₂₉H₄₇N₄O₆ : m/z théorique 547,3496.
m/z trouvée : 547,3496.

***N*⁴-(4-phtalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butyloxycarbonylspermine (4)**



La méthode utilisée est la même que pour le composé 3. La réaction de 1,277 g (2,54 mmol) de composé 2, de 896 mg (3,17 mmol, 1,25 équ.) de *N*-(4-bromobutyl)phtalimide et de 1,767 g (12,69 mmol, 5 équ.) de carbonate de potassium, dans 20 mL d'acétonitrile, mène après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 90/10) à 95% de composé 4 (huile jaune, 1,693 g).

R_f=0,49 (CH₂Cl₂/EtOH 90/10).

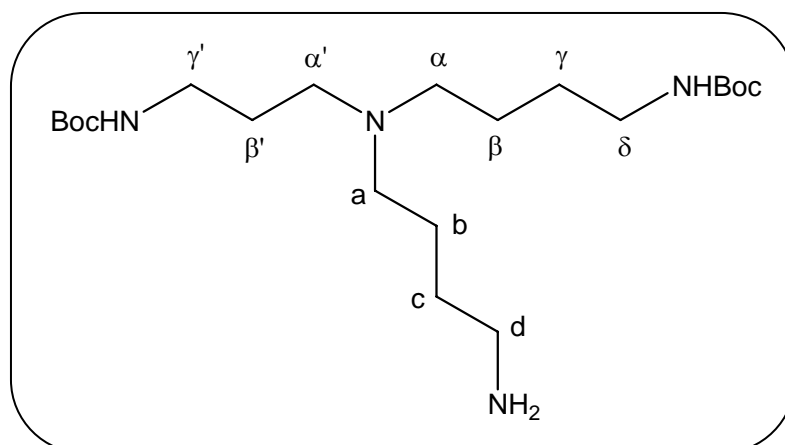
IR ν(cm⁻¹) : 3356, 2974, 2935, 1771, 1711 (C=O), 1171.

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25°C) δ, 7,84 (dd, J=3,1 et J=5,4, 2H, H3-5 Ar), 7,71 (dd, J=3,1 et J=5,4, 2H, H2-4 Ar), 5,40 (s, 1H, NH_{Boc}), 4,91 (s, 1H, NH_{Boc}), 3,70 (t, J=7,2 Hz, 2H, Hd), 3,24 (m, 2H, Hα''), 3,15 (m, 2H, Hγ''), 3,12 (m, 2H, Hγ'), 3,10 (m, 2H, Hδ), 2,39 (m, 6H, Hα, Hα' et Ha), 1,68 (m, 4H, Hb et Hc), 1,59 (m, 2H, Hβ''), 1,48 (m, 6H, Hβ, Hγ et Hβ'), 1,44 (s, 27H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ, 168,42 (CO), 156,04 (CO), 133,91 (CH3-5 Ar), 132,14 (C1-6 Ar), 123,20 (CH2-4 Ar) 79,46 (C(CH₃)₃), 78,74 (C(CH₃)₃), 77,22 (C(CH₃)₃), 53,74-53,37-52,58 (CH₂α, CH₂α' et CH₂a), 46,91 (CH₂δ), 43,93 (CH₂α''), 44,13 (CH₂γ''), 39,87 (CH₂γ'), 37,83 (CH₂d), 28,47 (C(CH₃)₃), 28,39-28,27 (CH₂b et CH₂c), 27,04-26,48-25,99-24,33 (CH₂β, CH₂β', CH₂β'' et CH₂γ).

SM Haute Résolution : calculée pour l'ion [M+H]⁺. C₃₇H₆₂N₅O₈ : m/z théorique 704,4598. m/z trouvée : 704,4592.

***N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butyloxycarbonylspermidine (5)**



Dans un bicol, surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 1,070 g (1,96 mmol) de composé **3** et 15 mL d'un mélange binaire THF/EtOH 80/20. Puis 4,76 mL (98 mmol, 50 éq.) d'hydrazine monohydrate sont additionnés. Le mélange est agité pendant 5 heures à 90°C, puis maintenu pendant 18 heures à 50°C. Le mélange réactionnel est refroidi et ensuite le THF et l'EtOH sont évaporés sous vide. Le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est lavée avec de la soude à 5% (2×50 mL), puis avec de l'eau distillée (3×50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium, filtration, évaporation et purification sur colonne de silice (éluant MeOH + 3% d'hydroxylamine), le composé **5** est isolé sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 95% (776 mg).

$R_f=0,35$ (MeOH + 5% NH₄OH).

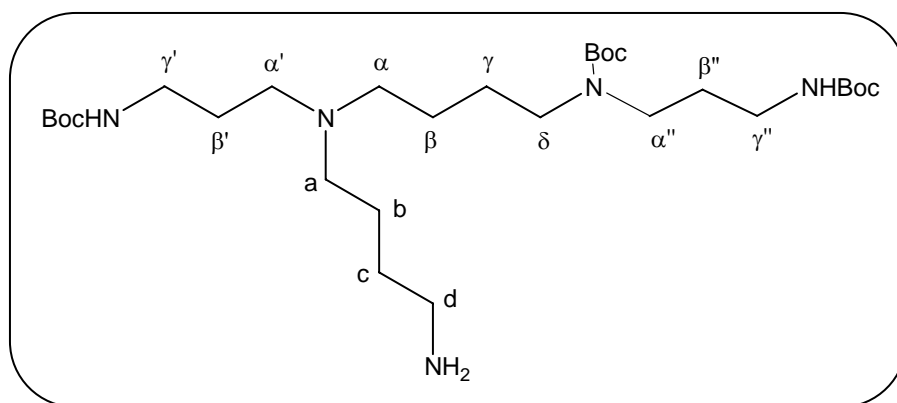
IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3347, 2974, 2933, 1693 (C=O), 1173.

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25°C) δ , 5,53 (s, 1H, NHBoc), 4,87 (s, 1H, NHBoc), 3,16 (m, 2H, H γ'), 3,12 (m, 2H, H δ), 2,70 (t, J=6,4 Hz, 2H, H δ), 2,44 (t, J=6,5 Hz, 2H, H α'), 2,38 (m, 4H, H α , H α), 1,60 (quint., J=6,5 Hz, 2H, H β'), 1,47 (m, 8H, H β , H γ , H β et H c), 1,44 (s, 18H, CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ , 156,05 (CO), 79,46 (C(CH₃)₃), 78,76 (C(CH₃)₃), 53,88-53,64-52,08 (CH₂ α , CH₂ α' et CH₂a), 42,16 (CH₂ δ), 40,45 (CH₂ γ'), 40,06 (CH₂d), 29,6 (CH₂ β'), 28,46 (C(C)₃), 27,99 (CH₂b), 26,72 (CH₂c), 24,42 (CH₂ β), 24,32 (CH₂ γ).

SM Haute Résolution : calculée pour l'ion [M+H]⁺. C₃₇H₆₂N₅O₈ : m/z théorique 417,3441.
m/z trouvée : 417,3440.

***N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butyloxycarbonylspermine (6)**



Dans les mêmes conditions que pour le composé **5**, la réaction de 1,225 g (1,78 mmol) de composé **4**, dissous dans 15 mL d'un mélange binaire THF/EtOH 80/20, avec 4,33 mL (89 mmol, 50 éq.) d'hydrazine monohydrate, fournit après purification, 780 mg de composé **6** (huile jaune, Rdt 86%).

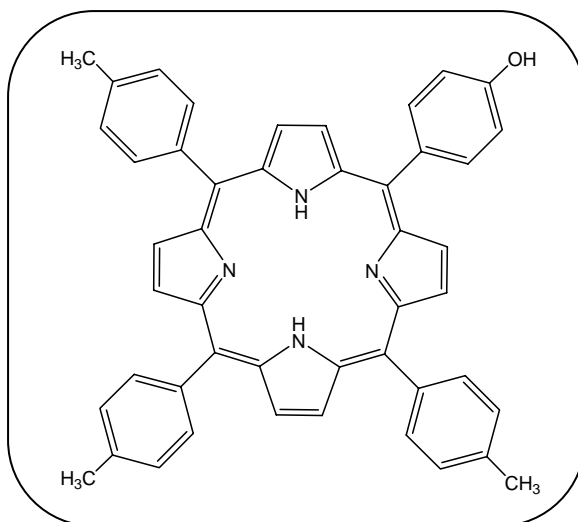
$R_f=0,40$ (MeOH + 5% NH_4OH).

IR $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3353, 2974, 2932, 1693 (C=O), 1172.

RMN ^1H (400,13 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ en ppm, 5,32 (s, 1H, NHBoc), 4,83 (s, 1H, NHBoc), 3,24 (m, 2H, $\text{H}\alpha''$), 3,16 (m, 2H, $\text{H}\gamma''$), 3,14 (m, 2H, $\text{H}\gamma'$), 3,10 (m, 2H, $\text{H}\delta$), 2,70 (t, $J=6,4$ Hz, 2H, Hd), 2,44 (t, $J=6,5\text{Hz}$, 2H, $\text{H}\alpha'$), 2,38 (m, 4H, $\text{H}\alpha$ et $\text{H}\alpha$), 1,65 (m, 2H, $\text{H}\beta''$), 1,60 (quint., $J=6,4$ Hz, 2H, $\text{H}\beta'$), 1,50 (m, 4H, Hb , Hc) 1,44 (m, 27H, CH_3) 1,39 (m, 4H, $\text{H}\beta$, $\text{H}\gamma$)
RMN ^{13}C (CDCl_3) δ en ppm, 156,09 (CO), 79,46 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 78,76 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 77,35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 53,96-53,71 ($\text{CH}_2\alpha$, $\text{CH}_2\alpha$) 52,70 ($\text{CH}_2\alpha'$), 46,93 ($\text{CH}_2\gamma'$), 43,69 ($\text{CH}_2\alpha''$), 42,13 (CH_2d), 40,00 ($\text{CH}_2\gamma''$), 37,47 ($\text{CH}_2\delta$), 31,65-29,71-26,94-24,52-24,32 ($\text{CH}_2\beta'$, CH_2b , CH_2c , $\text{CH}_2\beta$, $\text{CH}_2\gamma$), 28,49 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

SM Haute Résolution : calculée pour l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$. $\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_5\text{O}_8$: m/z théorique 574,4544.
 m/z trouvée : 574,4544.

5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (7a)



Un mélange de 3,30 g (27 mmol) de *para*-hydroxybenzaldéhyde et de 9,55 mL (81 mmol, 3 éq.) de *para*-tolualdéhyde, dissous dans 300 mL d'acide propanoïque, est introduit dans un bicol surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium. Le mélange est chauffé à 120°C pendant 15 minutes, ensuite, 7,49 mL (108 mmol, 4 éq.) de pyrrole sont ajoutés goutte à goutte dans le bicol. La réaction se déroule pendant 1 heure 30 à l'abri de toute source lumineuse. Le mélange réactionnel est alors refroidi puis laissé 18 heures à 5°C. Les cristaux obtenus sont filtrés sur Büchner et rincés abondamment à l'éthanol absolu. Un mélange de 2,78 g de porphyrines et de goudrons est obtenu. 700 mg de brut sont adsorbés sur Florisil[®], introduits en tête d'une colonne de silice (30×5 cm), puis élués avec un gradient de solvants chloroforme/éther de pétrole (95/5 à 100/0). La tétratolylporphyrine (H₂TTP) constitue la première fraction éluee. On obtient après purification par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (éluant toluène/acétone : 93/7), 365 mg de produit **7a** (Rdt 8%).

R_f=0,33 (CH₂Cl₂).

UV-visible (tableau II-3).

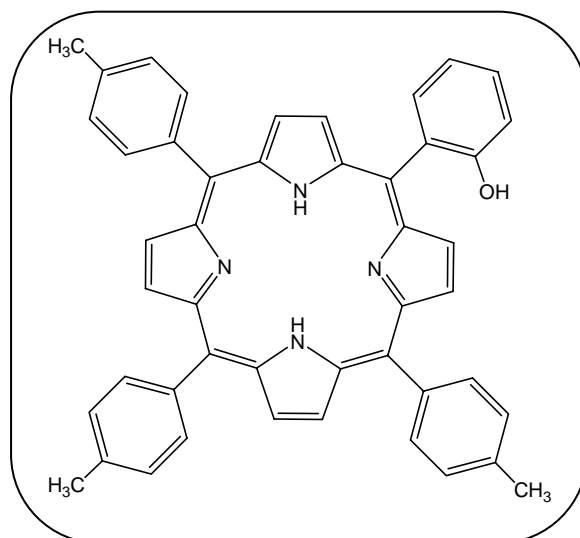
RMN¹H (tableaux II-5).

SM MALDI (tableaux II-4).

Les données physiques de ce composé sont conformes à celles de la littérature.¹²¹

¹²¹ A. Bourhim, O. Gaud, R. Granet, P. Krausz, M. Spiro ; *Synlett*, 8, 1993, 563-564.

5-(2-hydroxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (7b)



La méthode utilisée est la même que pour le composé **7a**. Ainsi, la réaction de 3,30 g (27 mmol) de salicylaldéhyde et de 9,55 mL (81 mmol, 3 éq.) de *para*-tolualdéhyde, en présence de 300 mL d'acide propanoïque et de 7,49 mL (108 mmol, 4 éq.) de pyrrole, fournit après purification sur colonne de silice (chloroforme/éther de pétrole, 95/5 à 100/0) et purification par chromatographie sur plaques préparatives (éluant chloroforme/éther de pétrole : 70/30), 333 mg de produit **7b** (Rdt 6,5%).

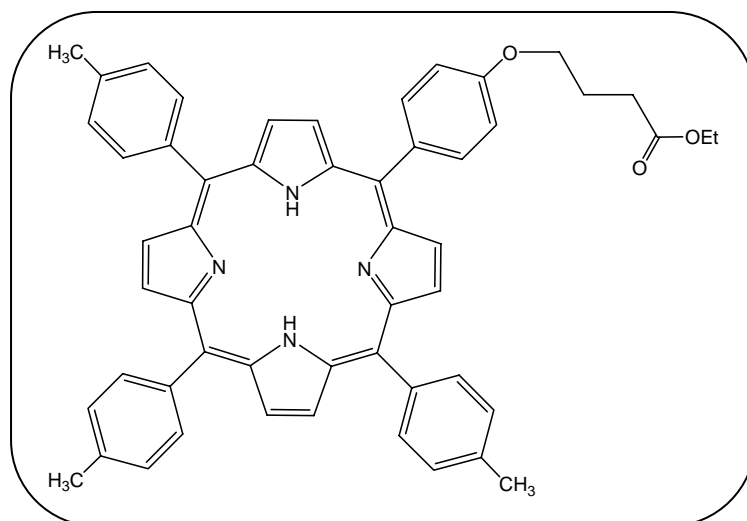
$R_f=0,70$ (CH_2Cl_2).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-6).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (**8a**)



Dans un bicol, surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 231 mg (0,34 mmol) de *para*-hydroxyphényltritolylporphyrine **7a**, 488 μ L (3,40 mmol, 10 eq.) de 4-bromobutanoate d'éthyle, 947 mg (6,80 mmol, 20 eq.) de carbonate de potassium et 20 mL de DMF anhydre. On obtient après 24 heures à température ambiante un mélange que l'on extrait au chloroforme (50 mL). Cette phase organique est lavée à l'eau distillée (3 \times 75 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et le chloroforme ainsi que le DMF restant sont évaporés sous pression réduite. Le brut est alors purifié par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (éluant CHCl_3) et on isole 254 mg de composé **8a** (Rdt 94%).

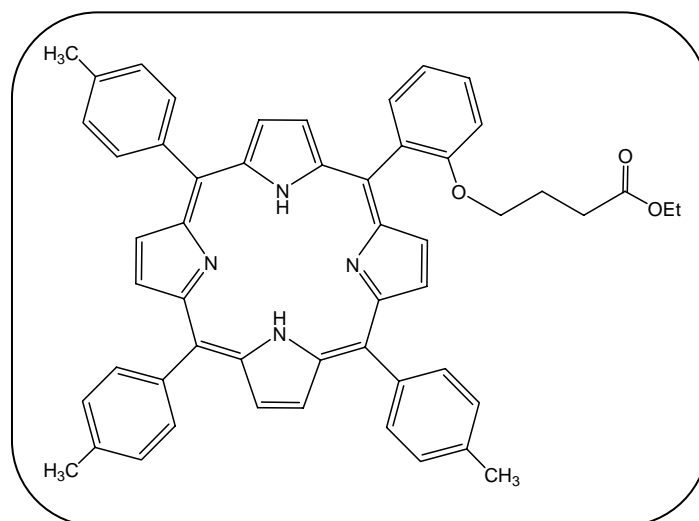
$R_f=0,56$ (CHCl_3).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-5).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[3-éthoxycarbonylpropyloxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (**8b**)



En utilisant le même protocole que pour la synthèse du composé **8a** nous avons pu obtenir le composé **8b**. Ainsi, la réaction de 262 mg (0,39 mmol) d'*ortho*-hydroxyphényltritolylporphyrine **7b** avec 561 μ L (3,9 mmol, 10 éq.) de 4-bromobutanoate d'éthyle dans 20 mL de DMF anhydre, en présence de 1,086 g (7,8 mmol, 20 éq.) de carbonate de potassium, fournit après traitement et purification par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (éluant CHCl_3) 282 mg de composé **8b** (92%).

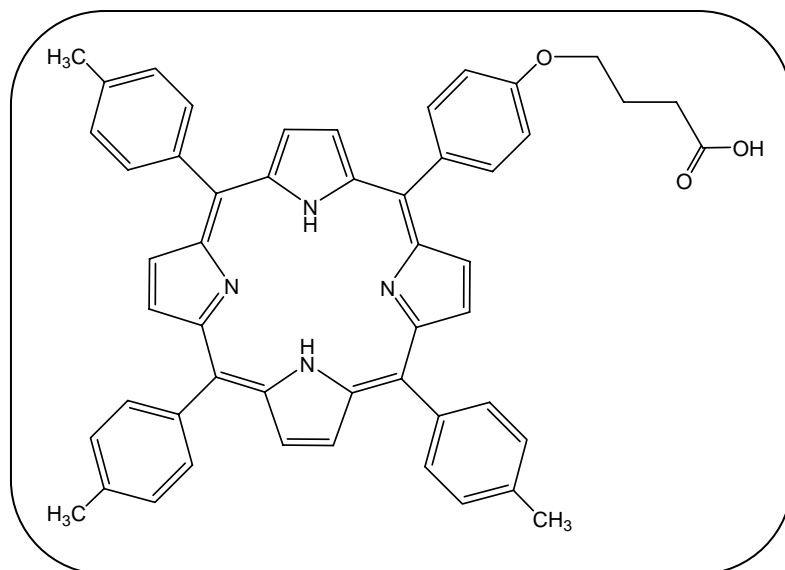
$R_f=0,66$ (CHCl_3).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-6).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[3-carboxypropyloxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (**9a**)



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, 220 mg (0,28 mmol) de composé **8a** sont dissous dans 15 mL de DMF, puis 10 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 heure à reflux, refroidi et ensuite le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est neutralisée par addition d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 mol.L⁻¹ et lavée avec de l'eau distillée (2×50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium, et purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 90/10), le composé **9a** est isolé avec un rendement de 98% (208 mg).

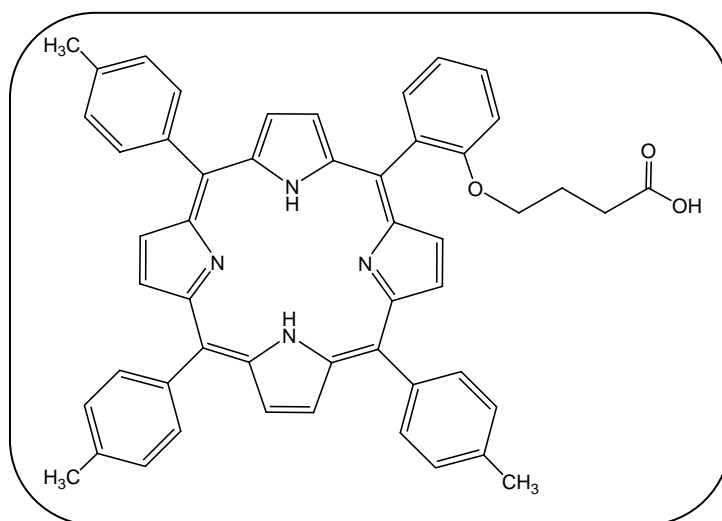
R_f=0,53 (CHCl₃/EtOH 95/5).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-5).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[3-carboxypropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (**9b**)



En utilisant le même protocole que pour le composé **9a**, la réaction de 236 mg (0,30 mmol) de composé **8b**, dissous dans 15 mL de DMF, avec 10 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹, fournit après purification, 221 mg de composé **9b** (Rdt 97%).

R_f=0,49 (CHCl₃/EtOH 95/5).

UV-visible (tableau II-3).

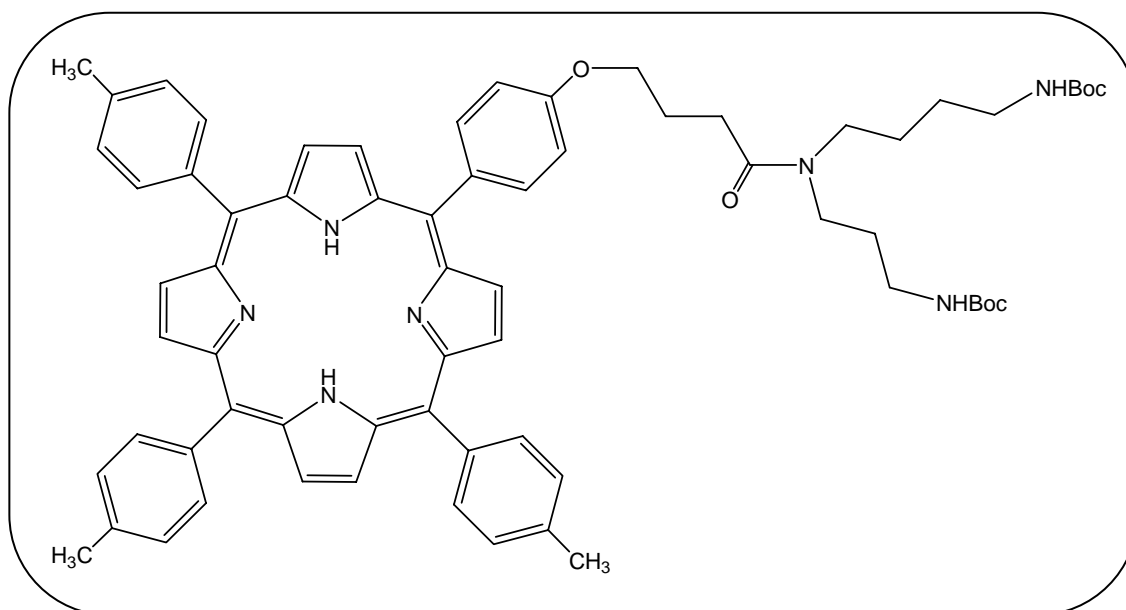
RMN¹H (tableaux II-6).

SM MALDI (tableaux II-4).

Méthode générale de fixation des polyamines sur les fonctions acides carboxyliques portées par les carboxyporphyrines

Dans un bicol, surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on introduit la carboxyporphyrine (**9a** ou **9b**) solubilisée dans du DMF, 1,1 éq. de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide et 1,1 éq. de 1-hydroxybenzotriazole. L'ensemble est laissé sous agitation, à température ambiante, pendant 30 minutes. Puis, on additionne goutte à goutte au mélange réactionnel la polyamine (**1**, **2**, **5** ou **6**) préalablement dissoute dans du DMF. Après 42 heures, sous agitation et à température ambiante, le DMF est évaporé et la phase organique est extraite au dichlorométhane (50 mL). Le brut est filtré et rincé au dichlorométhane. La solution est lavée à l'eau distillée (3×50 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Après purification du brut sur plaques préparatives de gel de silice on obtient le composé désiré.

5-[N⁴-(N¹,N⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine)-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (10a)



La réaction de 25 mg (72,5 μmol , 1,1 eq.) de spermidineBoc₂ **1**, avec 50 mg (65,9 μmol) de porphyrine **9a**, en présence de 15 mg (72,5 μmol , 1,1 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 10 mg (72,5 μmol , 1,1 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole, fournit après traitement et purification sur plaques préparatives de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/EtOH 95/5), 51 mg de composé **10a** (Rdt 71%).

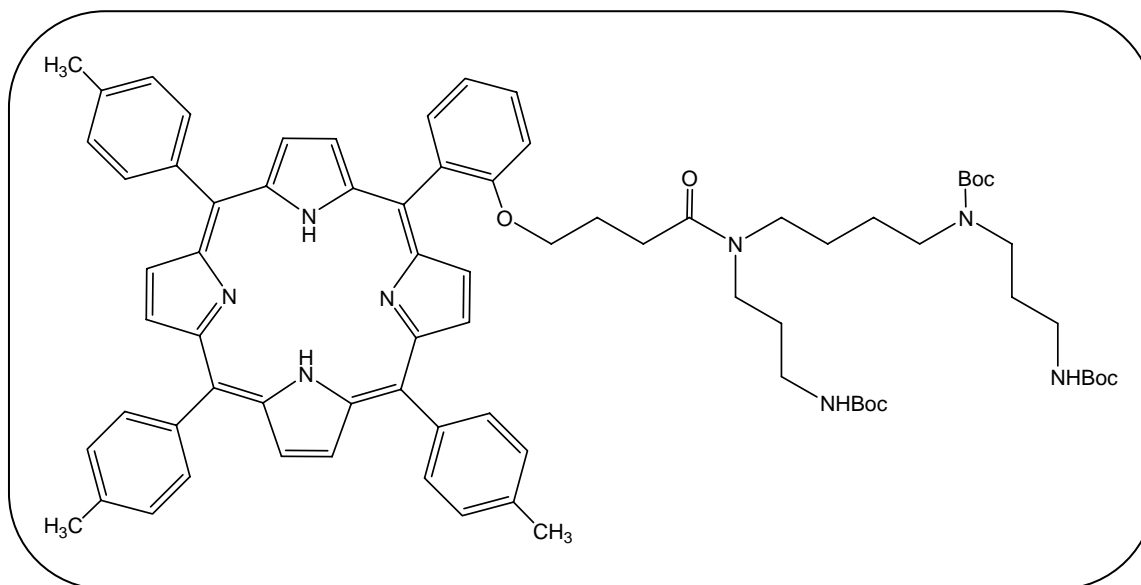
R_f=0,50 (CH₂Cl₂/EtOH 95/5).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-8).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[N⁴-(N¹,N⁸,N¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine)-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolyl-porphyrine (11b)



La réaction de 44 mg (87,0 μmol , 1,1 eq.) de spermineBoc₃ **2**, avec 60 mg (79,1 μmol) de porphyrine **9b**, en présence de 18 mg (79,1 μmol , 1,1 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 12 mg (79,1 μmol , 1,1 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole, fournit après traitement et purification (éluant CH₂Cl₂/EtOH 95/5), 60 mg de composé **11b** (Rdt 61%).

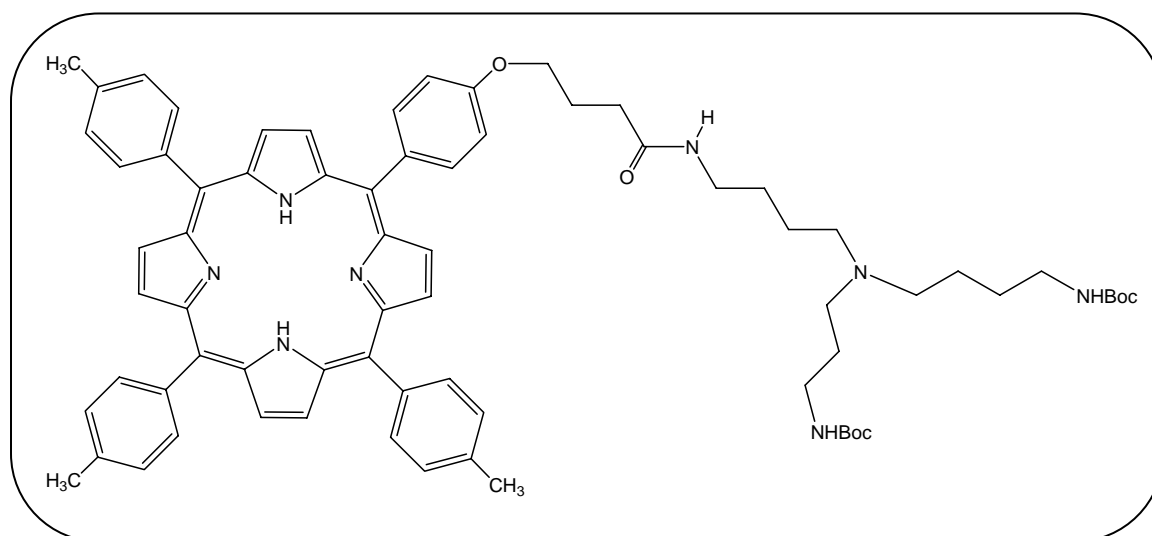
R_f=0,36 (CH₂Cl₂/EtOH 95/5).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-8).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[N¹-(4-aminobutyl)-N⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspemidine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (12a)



La réaction de 31 mg (72,5 μmol , 1,1 eq.) de composé **5**, avec 52 mg (68,6 μmol) de porphyrine **9a**, en présence de 16 mg (68,6 μmol , 1,1 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 10 mg (68,6 μmol , 1,1 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole, fournit après traitement et purification (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 85/15), 65 mg de composé **12a** (Rdt 81%).

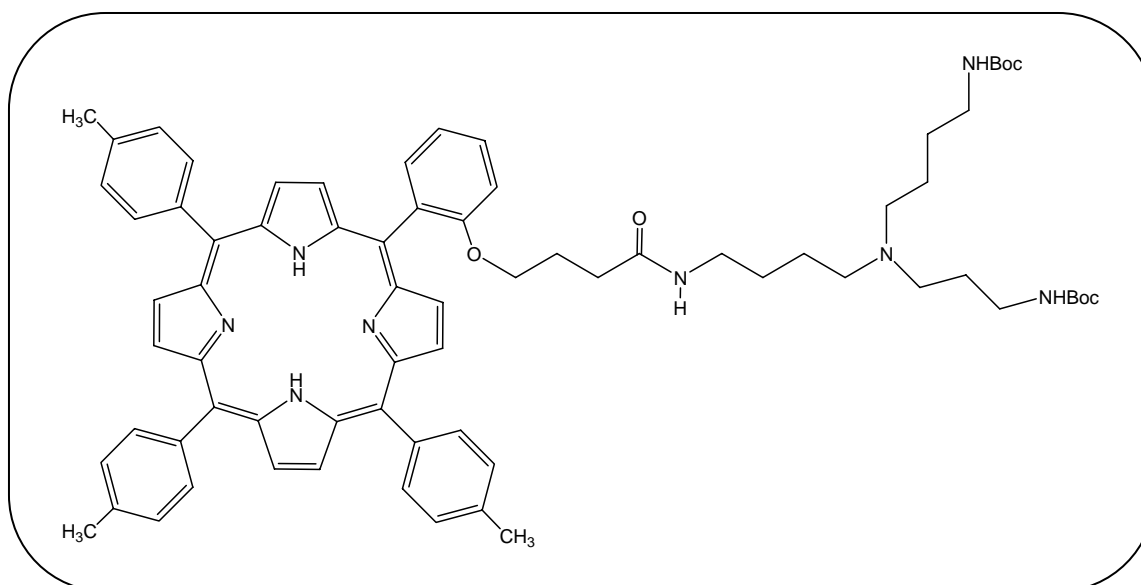
$R_f=0,63$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 70/30).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-9).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[N⁴-(4-aminobutyl)-N¹,N⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylpermidine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (12b)



La réaction de 25 mg (59,5 μ mol, 1,1 eq.) du composé **5**, avec 41 mg (54,1 μ mol) de porphyrine **9b**, en présence de 12 mg (59,5 μ mol, 1,1 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 8 mg (59,5 μ mol, 1,1 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole, fournit après traitement et purification (éluant CH₂Cl₂/EtOH 85/15), 57 mg de composé **12b** (Rdt 77%).

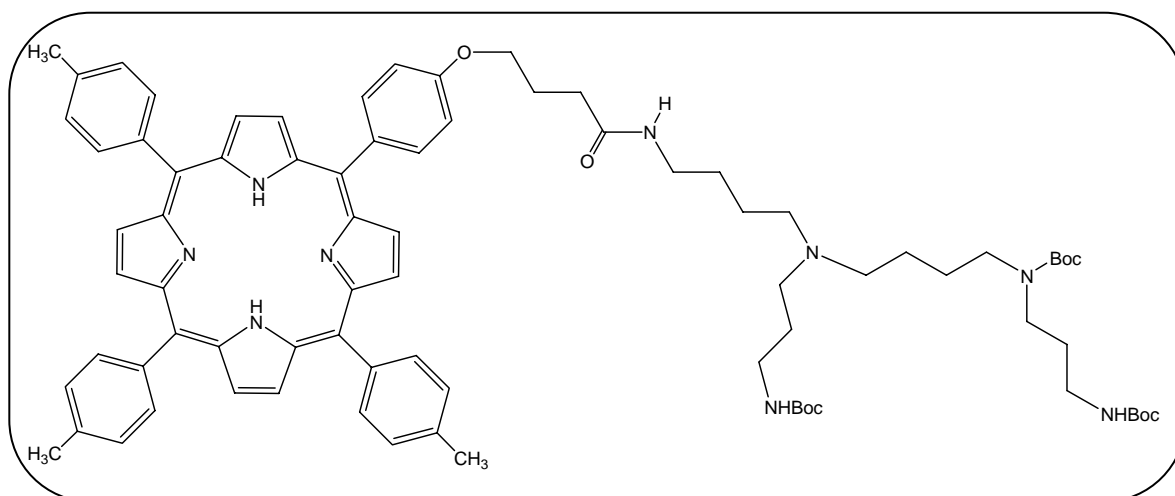
R_f=0,41 (CH₂Cl₂/EtOH 85/15).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-9).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[N⁴-(4-aminobutyl)-N¹,N⁸,N¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine)-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (13a)



La réaction de 86 mg (0,15 mmol, 1,1 éq.) de composé **6**, avec 106 mg (0,14 mmol) de porphyrine **9a**, en présence de 31 mg (0,15 mmol, 1,1 éq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 20 mg (0,15 mmol, 1,1 éq.), de 1-hydroxybenzotriazole fournit après traitement et purification sur plaques préparatives de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/EtOH 85/15), 65 mg de composé **13a** (Rdt 74%).

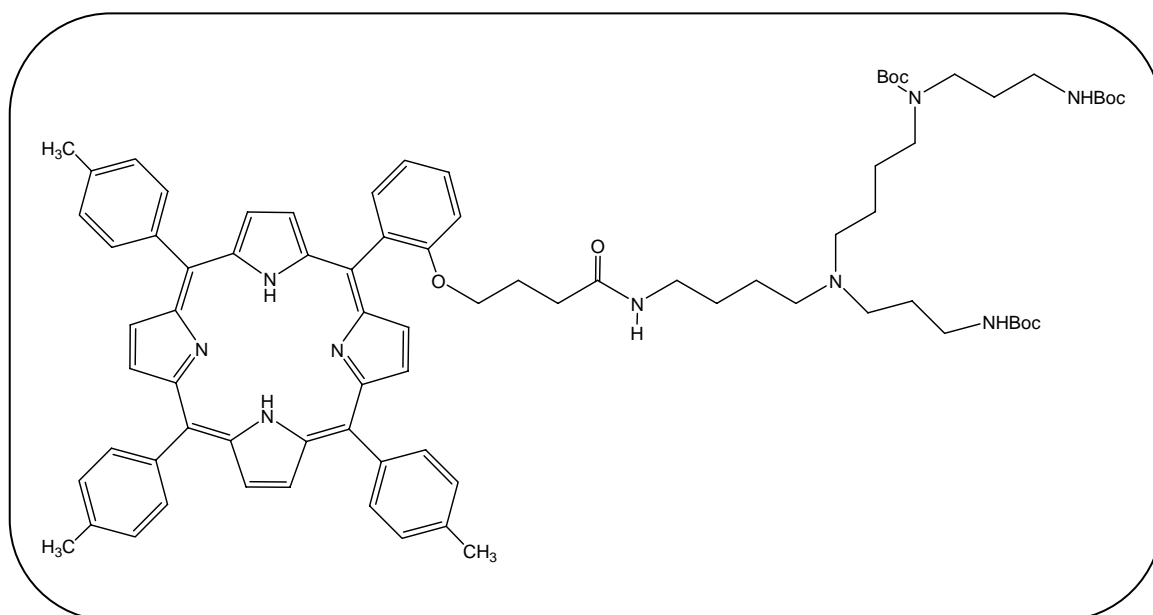
R_f=0,48 (CH₂Cl₂/EtOH 80/20).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-9).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-[N⁴-(4-aminobutyl)-N¹,N⁸,N¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine)-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (13b)



La réaction de 29 mg (50,8 μmol , 1,1 eq.) de composé **6**, avec 35 mg (46,2 μmol) de porphyrine **9b**, en présence de 10 mg (50,8 μmol , 1,1 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 7 mg (50,8 μmol , 1,1 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole, fournit après traitement et purification sur plaques préparatives de gel de silice (éluant CH₂Cl₂/EtOH 85/15), 46 mg de composé **13b** (Rdt 76%).

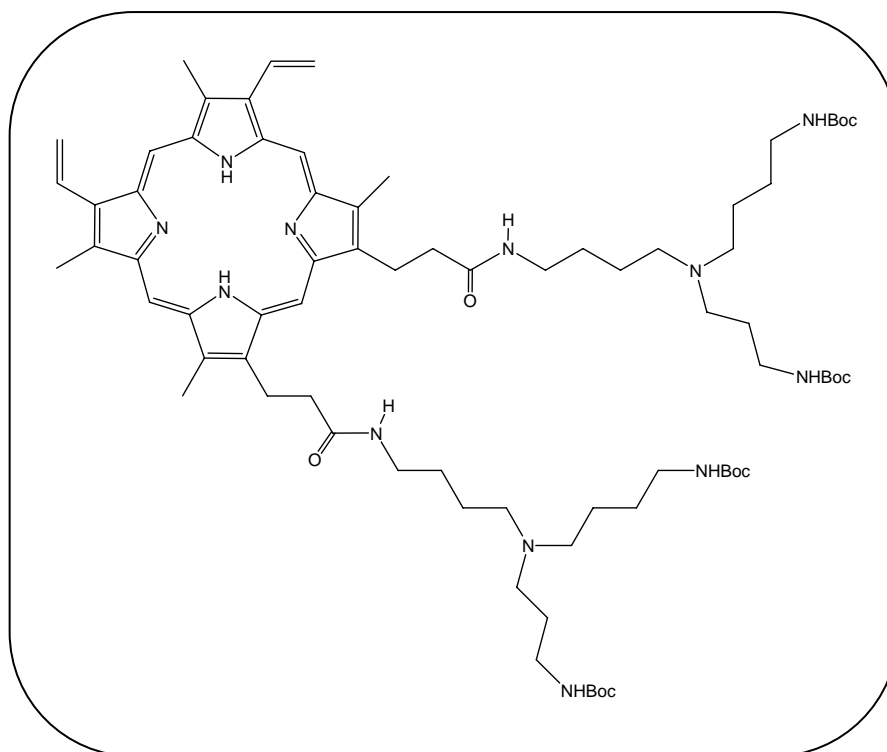
R_f=0,45 (CH₂Cl₂/EtOH 80/20).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-9).

SM MALDI (tableaux II-4).

13,17-di-[3-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine]-2,7,12,18-tétraméthyl-8,13-divinyl-porphine (18)



Dans un bicol, surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 70 mg (0,12 mmol) de Protoporphyrine IX, 53,6 mg (0,26 mmol, 2,2 éq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, 35,1 mg (0,26 mmol, 2,2 éq.) de 1-hydroxybenzotriazole et 20 ml de DMF anhydre. L'ensemble est laissé sous agitation, à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, 108,3 mg (0,26 mmol, 2,2 éq.) de composé **5**, dissous dans 20 ml de DMF sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. Après 72 heures sous agitation et à température ambiante, le DMF est évaporé et la phase organique est extraite avec 50 mL de dichlorométhane. La solution est lavée à l'eau distillée (3×50 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Après purification du brut sur plaques préparatives de gel de silice (CH₂Cl₂/EtOH 80:20 + 1% Et₃N), on obtient 132 mg de composé **18** (Rdt 80%).

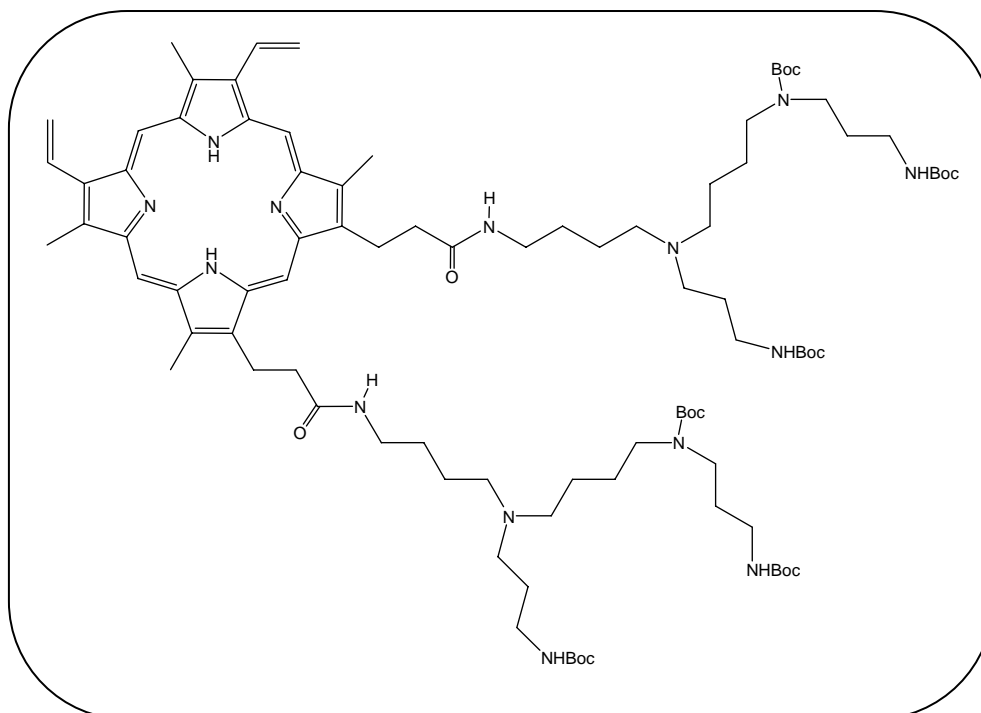
R_f=0,45 (acétate d'éthyle/acétone/acide acétique/eau 5/3/1/1).

UV-visible (tableau III-1).

RMN¹H (tableaux III-3).

SM MALDI (tableaux III-2).

13,17-di-[3-amidoéthyl- N^4 -(4-aminobutyl)- N^1,N^8,N^{12} -tris-*tert*-butoxycarbonylspermine]-2,7,12,18-tétraméthyl-8,13-divinyl-porphine (19)



Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite pour le composé **18**. La réaction de 123 mg (215,1 μmol , 2,2 éq.) de composé **6**, avec 55 mg (97,8 μmol , 1 éq.) de Protoporphyrine IX, en présence de 44 mg (215,1 μmol , 2,2 éq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 29 mg (215,1 μmol , 2,2 éq.) de 1-hydroxybenzotriazole fournit après traitement et purification sur plaques préparatives de gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 + 1% Et_3N), 139 mg de composé **19** (Rdt 85%).

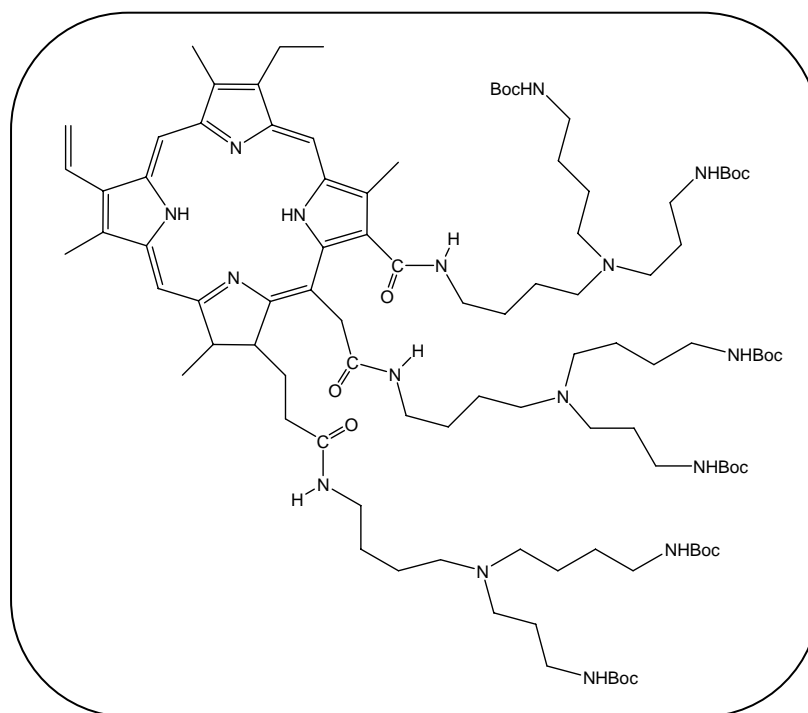
$R_f=0,62$ (acétate d'éthyle/acétone/acide acétique/eau 5/3/1/1).

UV-visible (tableau III-1).

RMN^1H (tableaux III-3).

SM MALDI (tableaux III-2).

13-[amido-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspemidine]-17-[2-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspemidine]-15-[3-amidométhyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspemidine]-8-éthyl-2,7,12,18-tétraméthyl-8-vinyl-chlorine (22)



Dans un bicol, surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 15 mg (25,1 μmol) de chlorure e6, 103 mg (0,50 mmol, 20 eq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, 68 mg (0,50 mmol, 20 eq.) de 1-hydroxybenzotriazole et 15 ml de DMF anhydre. L'ensemble est laissé sous agitation, à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, 209 mg (0,67 mmol, 20 eq.) de composé **5** dissous dans 20 ml de DMF sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel. Après 96 heures sous agitation et à température ambiante, le DMF est évaporé et la phase organique est extraite avec 50 mL de dichlorométhane. La solution est lavée à l'eau distillée (3 \times 50 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Après purification du brut sur plaques préparatives de gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 + 2% Et_3N), on obtient 32 mg de composé **22** (Rdt 71%).

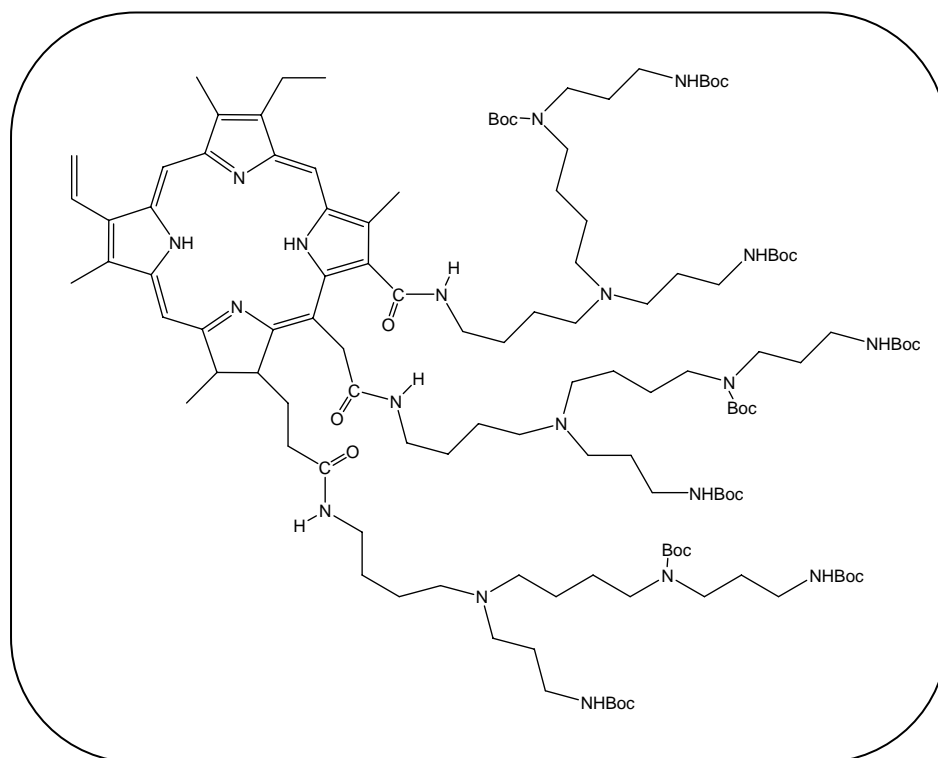
$R_f=0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80/20 + 1% Et_3N).

UV-visible (tableau IV-1).

RMN¹H (tableaux IV-3).

SM MALDI (tableaux IV-2).

13-[amido-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine]-17-[2-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine]-15-[3-amidométhyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine]-8-éthyl-2,7,12,18-tétraméthyl-8-vinylchlorine (23**)**



Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite pour le composé **22**. La réaction de 209 mg (0,67 mmol, 20 éq.) de composé **6**, avec 15 mg (25,1 μ mol) de chlorure de cobalt, en présence de 68 mg (0,50 mmol, 20 éq.) de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, et de 68 mg (0,50 mmol, 20 éq.) de 1-hydroxybenzotriazole fournit après traitement et purification sur plaques préparatives de gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 + 1% Et_3N), 32 mg de composé **23** (Rdt 71%).

$R_f=0,39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80/20 + 1% Et_3N).

UV-visible (tableau IV-1).

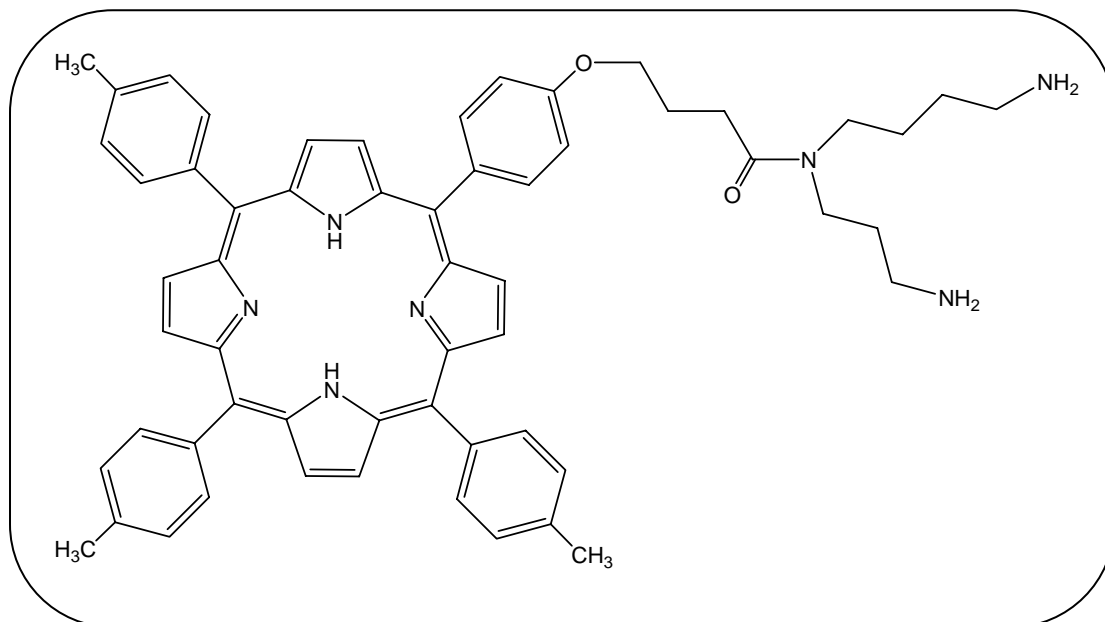
RMN¹H (tableaux IV-3).

SM MALDI (tableaux IV-2).

Méthode générale de déprotection des amines des polyamines

Dans un bicol, surmonté d'une garde à CaCl_2 , la porphyrine-polyamine protégée avec le *tert*-butyloxycarbonyle est dissoute dans 10 ml de dichlorométhane et 10 ml d'acide trifluoroacétique. La réaction se déroule pendant deux heures, à température ambiante. Après évaporation, la porphyrine-polyamine déprotégée est dissoute dans un mélange dichlorométhane/méthanol (70/30), neutralisée sur résine basique, filtrée et rincée avec du méthanol. Après évaporation, on récupère la porphyrine-polyamine déprotégée.

5-(4-[N⁴-spermidine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (14a)



La réaction de 25 mg (0,023 mmol) de composé **10a**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 20 mg de composé **14a** (rendement quantitatif).

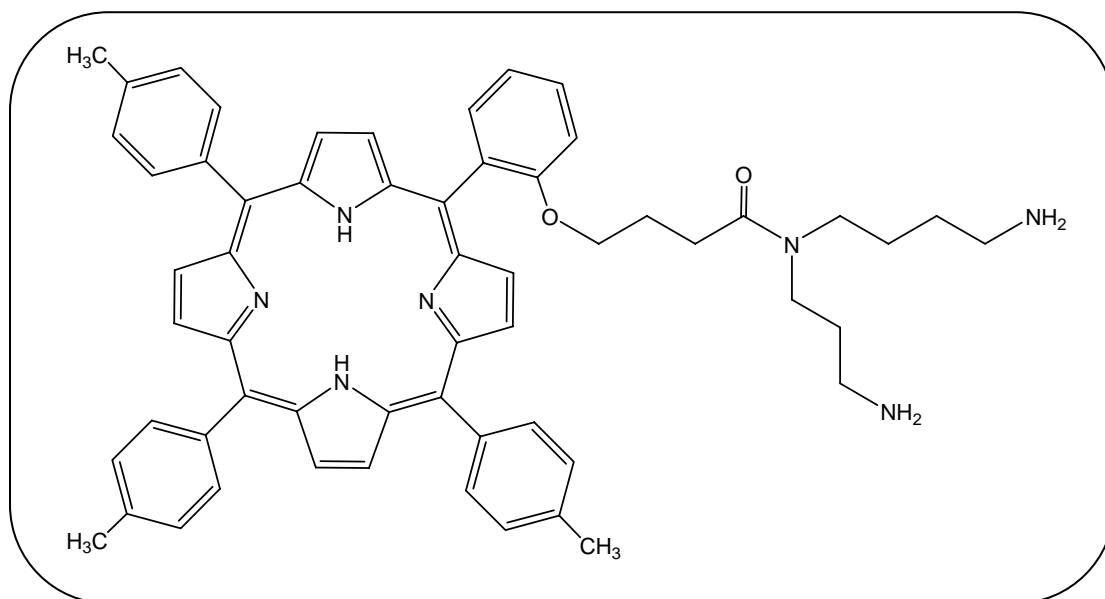
$R_f=0,39$ (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

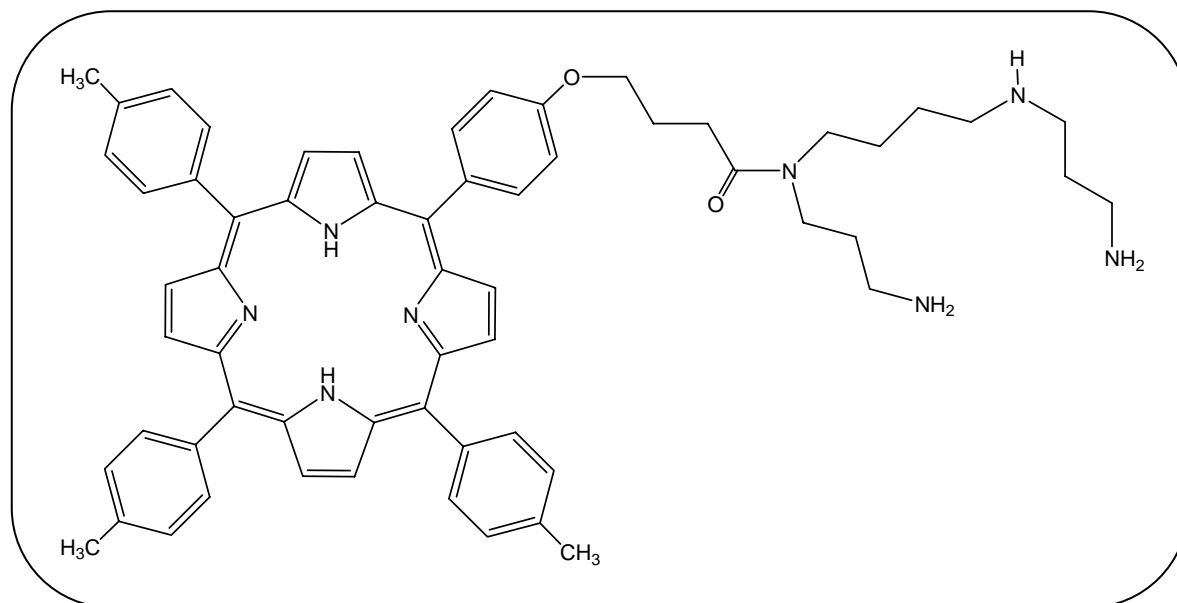
RMN¹H (tableaux II-10).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[N⁴-spermidine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (14b)



5-(4-[N⁴-spermine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (15a)



La réaction de 85 mg (0,068 mmol) de composé **11a**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 64 mg de composé **15a** (rendement quantitatif).

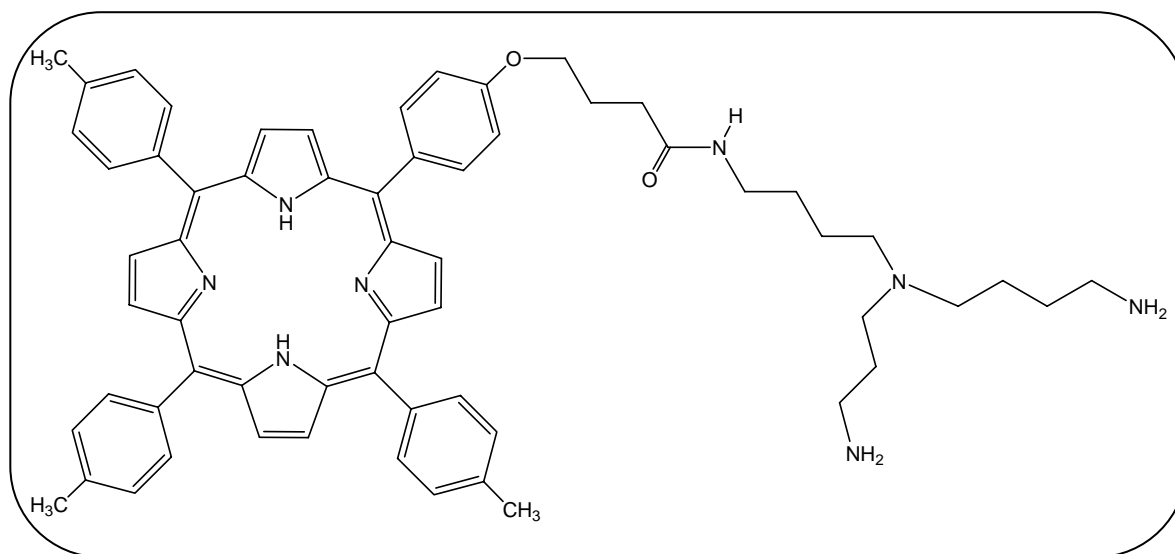
$R_f=0,42$ (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-10).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-[N⁴-(4-aminobutyl)spermidine-3-amidopropoxy]phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine (16a)



La réaction de 41 mg (0,035 mmol) de composé **12a**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, et après purification par chromatographie moyenne pression phase inverse (éluant CH₃CN/H₂O 80/20 + 0,5% de TFA), fournit 30 mg de composé **16a** (Rdt 89%).

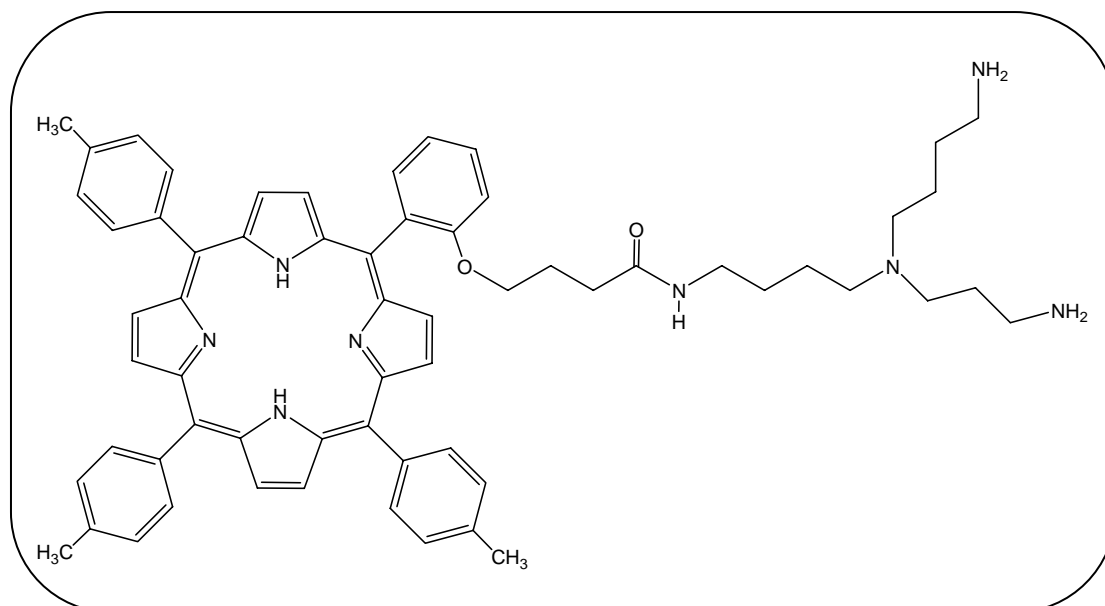
R_f=0,45 (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-11).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[N⁴-(4-aminobutyl)spermidine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (16b)



La réaction de 41 mg (0,035 mmol) de composé **12b**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, et après purification par chromatographie moyenne pression phase inverse (éluant CH₃CN/H₂O 80/20 + 0,5% de TFA), fournit 31 mg de composé **16b** (Rdt 92%).

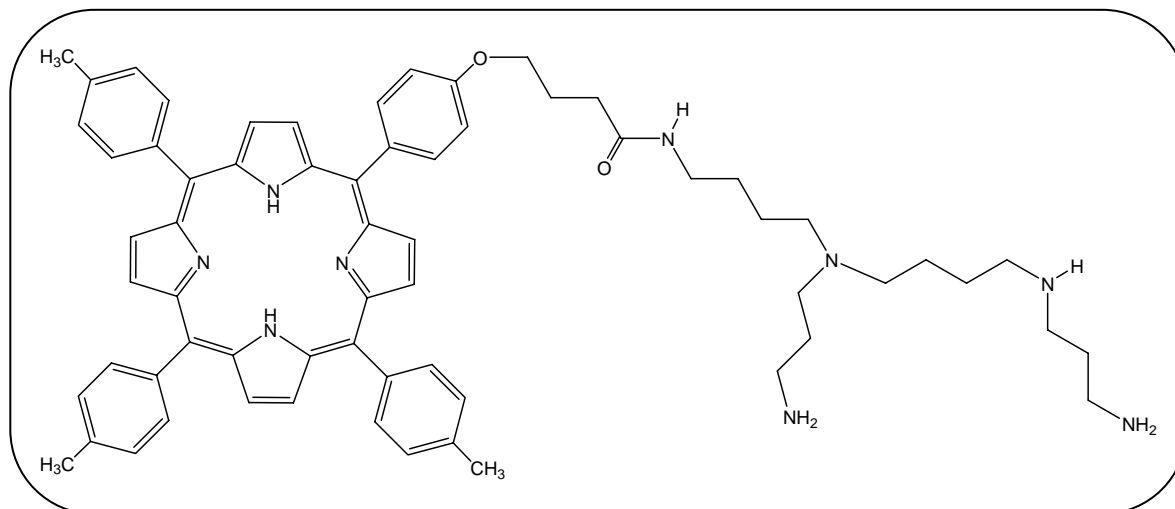
R_f=0,58 (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-11).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(4-[N⁴-(4-aminobutyl)spermine)-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (17a)



La réaction de 35 mg (0,027 mmol) de composé **13a**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 27 mg de composé **17a** (rendement quantitatif).

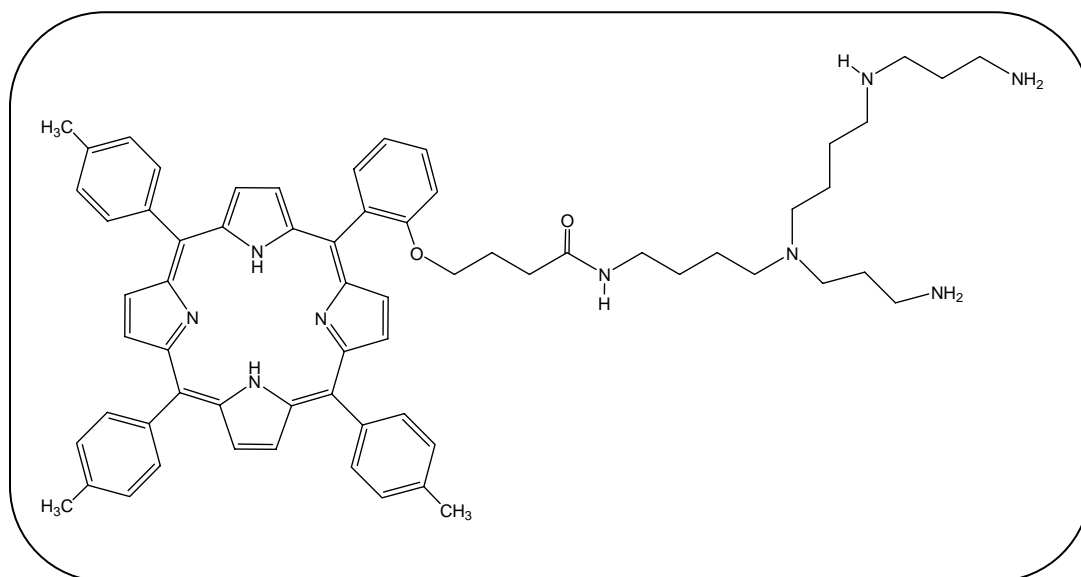
$R_f=0,60$ (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-11).

SM MALDI (tableaux II-4).

5-(2-[N⁴-(4-aminobutyl)spermine-3-amidopropoxy]phényl)-10,15,20-tritolylporphyrine (17b)



La réaction de 39 mg (0,030 mmol) de composé **13b**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, et après purification par chromatographie moyenne pression phase inverse (éluant CH₃CN/H₂O 80/20 + 0,5% de TFA), fournit 28 mg de composé **17b** (Rdt 92%).

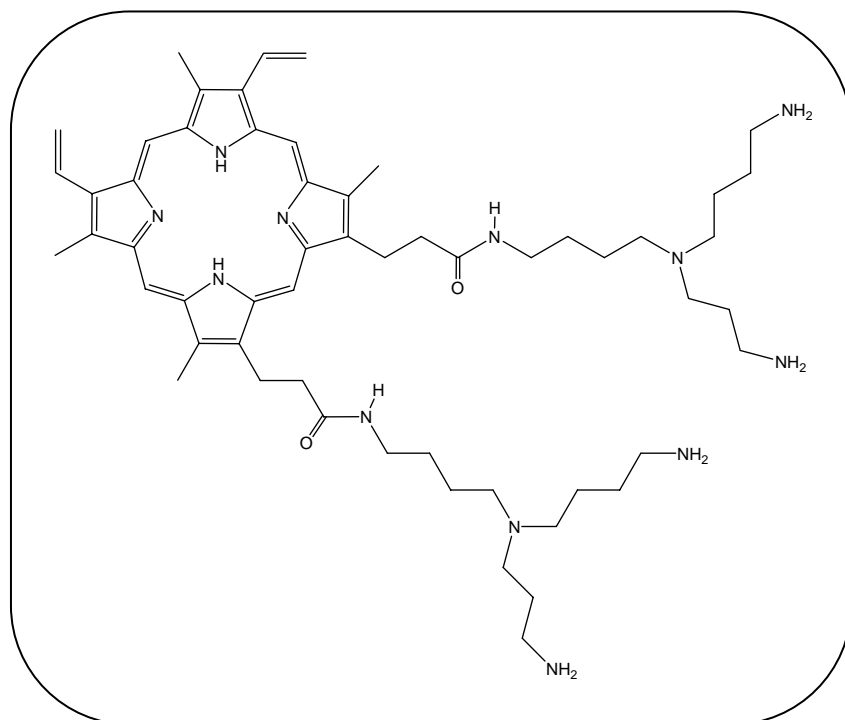
R_f=0,64 (CH₃CN/H₂O 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau II-3).

RMN¹H (tableaux II-11).

SM MALDI (tableaux II-4).

13,17-di-[3-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermidine]-2,7,12,18-tétraméthyl-8,13-divinyl-porphine (20)



La réaction de 42 mg (0,031 mmol) de composé **18**, dissous dans 15 ml d'acide trifluoroacétique et 15 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 30 mg de composé **20** (rendement quantitatif).

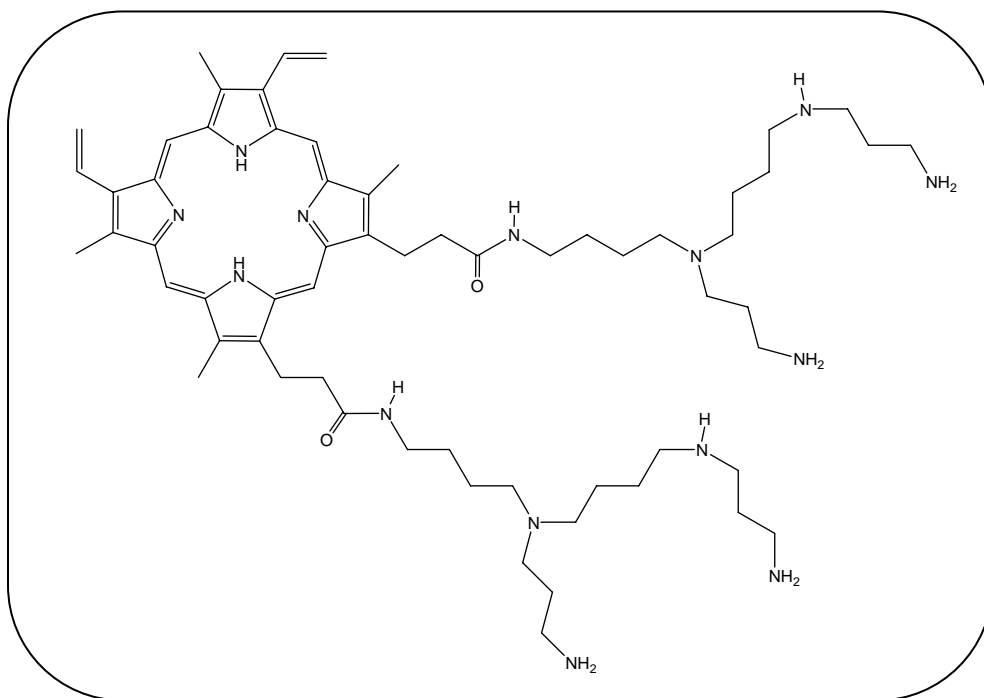
$R_f=0,58$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau III-1).

RMN¹H (tableaux III-4).

SM MALDI (tableaux III-2).

13,17-di-[3-amidoéthyl- N^4 -(4-aminobutyl)-spermine]-2,7,12,18-tétraméthyl-8,13-divinylporphine (21)



La réaction de 38 mg (0,023 mmol) de composé **19**, dissous dans 15 ml d'acide trifluoroacétique et 15 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 25 mg de composé **21** (rendement quantitatif).

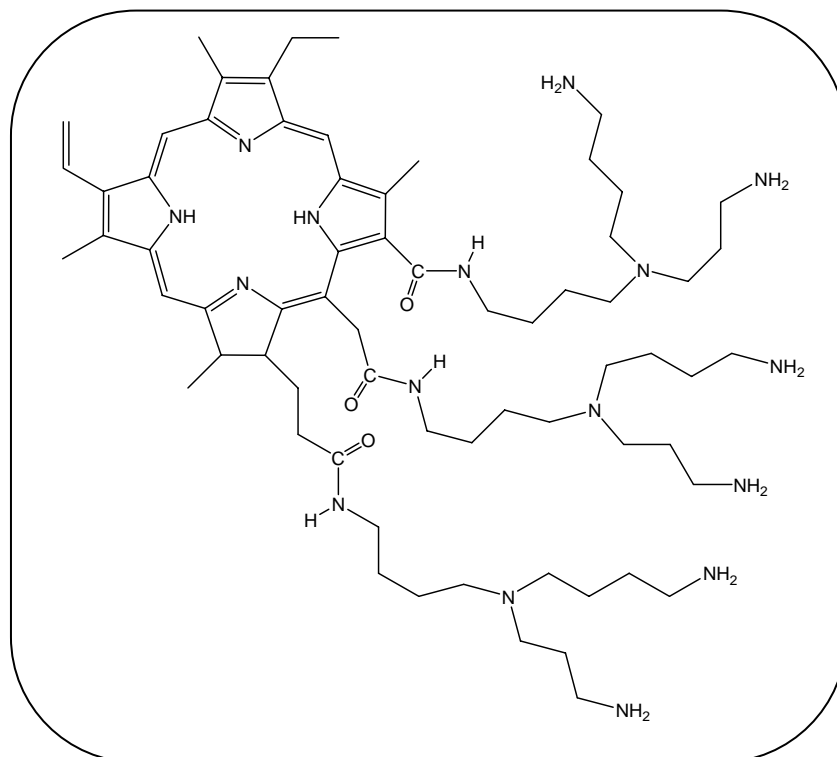
$R_f=0,60$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau III-1).

RMN¹H (tableaux III-4).

SM MALDI (tableaux III-2).

13-[amido-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermidine]-17-[2-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermidine]-15-[3-amidométhyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermidine]-8-éthyl-2,7,12,18-tétraméthyl-8-vinyl-chlorine (24**)**



La réaction de 19 mg (0,011 mmol) de composé **22**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 13 mg de composé **24** (rendement quantitatif).

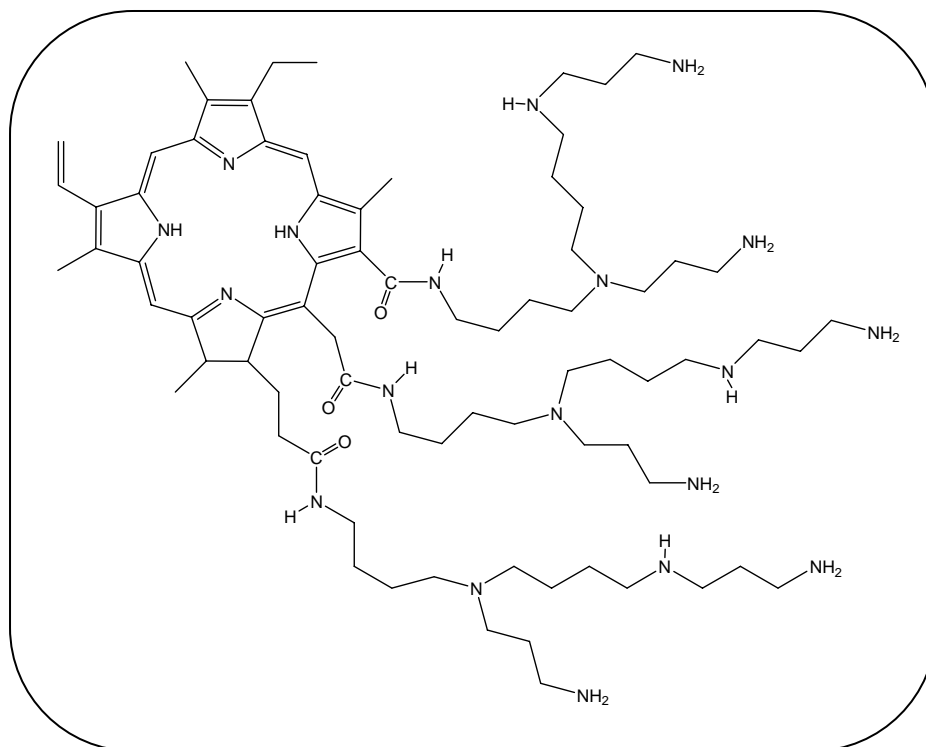
$R_f=0,58$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 + 1% acide trifluoroacétique)

UV-visible (tableau IV-1).

RMN¹H (tableaux IV-4).

SM MALDI (tableaux IV-2).

13-[amido-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermine]-17-[2-amidoéthyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermine]-15-[3-amidométhyl-*N*⁴-(4-aminobutyl)-spermine]-8-éthyl-2,7,12,18-tétraméthyl-8-vinyl-chlorine (25)



La réaction de 15 mg (0,007 mmol) de composé **23**, dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique et 10 ml de dichlorométhane, dans les conditions décrites dans la méthode générale de déprotection des amines, fournit 10 mg de composé **25** (rendement quantitatif).

$R_f=0,60$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 + 1% acide trifluoroacétique).

UV-visible (tableau IV-1).

RMN¹H (tableaux IV-4).

SM MALDI (tableaux IV-2).

5. Culture cellulaire

5.1. Les cellules K562

Nous avons utilisé, la lignée cellulaire K562, sensible à l'adriamycine, provenant d'un clone de leucémie promyélocytaire humaine multipotente.¹²²

5.2. Conditions de culture cellulaire

Les cellules sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI-1640 (Sigma) contenant 10% de sérum de veau fœtal (VWR), en présence de 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma) et de 1% de L-glutamine (Sigma). Les cultures sont placées dans un incubateur, à 37°C, sous une atmosphère humide, saturée en vapeur d'eau et à 5% en CO₂. Les cellules sont maintenues en phase exponentielle (1.10⁵ à 1.10⁶ cellules/mL) et le milieu de culture est changé 3 fois par semaine.

5.3. Conditions de photoirradiation des cellules

Les cellules K562 sont dans un premier temps récupérées et lavées une fois dans du RPMI-1640 (centrifugation à 200 g, à 4°C, pendant 10 minutes). Puis, elles sont mises dans du milieu RPMI-1640 frais.

Les cellules sont ensuite déposées dans des plaques 24 puits à raison de 5.10⁵ cellules/mL. Après addition des conjugués porphyrine-polyamine, (2 µM : concentration finale pour les tests de photocytotoxicité), on effectue soit une pré-incubation de 18 heures, ou bien on irradie immédiatement les cellules. L'irradiation avec les porphyrines est réalisée par deux tubes fluorescents (2×30 W), avec une légère agitation afin d'éviter la sédimentation des cellules au fond des puits. La fluence mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique (munie d'une sphère d'intégration) est de 100 W/m². En ce qui concerne les conjugués chlorure-polyamine, dans un premier temps nous avons utilisé le premier protocole dans le but de comparer l'activité de ces molécules avec celles des porphyrines-polyamines. Ensuite, une

¹²² E.A. Machado, D.A. Gerard, C.B. Lozzio, B.B. Lozzio, J.R. Mitchell, D.W. Golde ; *Blood.*, 63(5), 1984, 1015-1022.

pré-incubation de 3 heures a été réalisée et l'irradiation a été effectuée par une lampe émettant dans le rouge (PhotoDyn 501 ; COSMEDICO).

5.4. Les photosensibilisateurs

Les tritolylporphyrines-polyamines protégées par le Boc (**10a** à **11b**) et déprotégées (**14a** à **17b**) ainsi que la protoporphyrine IX dimethylester sont solubilisées dans le DMA (concentration de la solution mère : 2 mM). Les protoporphyrines IX-polyamines (**20** et **21**), les chlorines e6-polyamines (**24** et **25**) et la chlorine e6 sont quant à elles solubilisées à 2 mM dans du tampon phosphate (1mM ; NaCl : 13,8 mM, KCl : 2,7mM ; pH=7,4 à 25°C, Sigma).

Le Photofrin II[®] (Porphimer Sodium) a été utilisé comme référence pour la PDT. Il a été préparé à la concentration finale de 1,25 µg/mL. Cette concentration est équivalente à une concentration d'hématoporphyrine de 2µM sur la base d'une masse molaire de 625 g/mol.

5.5. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse qui permet l'examen de cellules isolées entraînées dans un flux liquide (figure VI-2). Les cellules, alignées les unes derrière les autres et séparées défilent à grande vitesse devant une source laser. Le passage des cellules dans un cytomètre est précédé d'une étape de marquage avec des fluorochromes spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire. La quantité de lumière diffractée dans l'axe du faisceau laser, également appelée diffraction aux petits angles est proportionnelle à la taille de la cellule. Par contre la quantité de lumière diffractée à 90° par rapport à l'axe du laser donne une information sur la granulosité, la structure interne. L'intensité de fluorescence émise sera fonction de la quantité de fluorochrome fixée et elle sera analysée et mesurée par une série de photomultiplicateurs sensibles à différentes portions du spectre visible (EPICS[®] XL, Beckman Coulter).

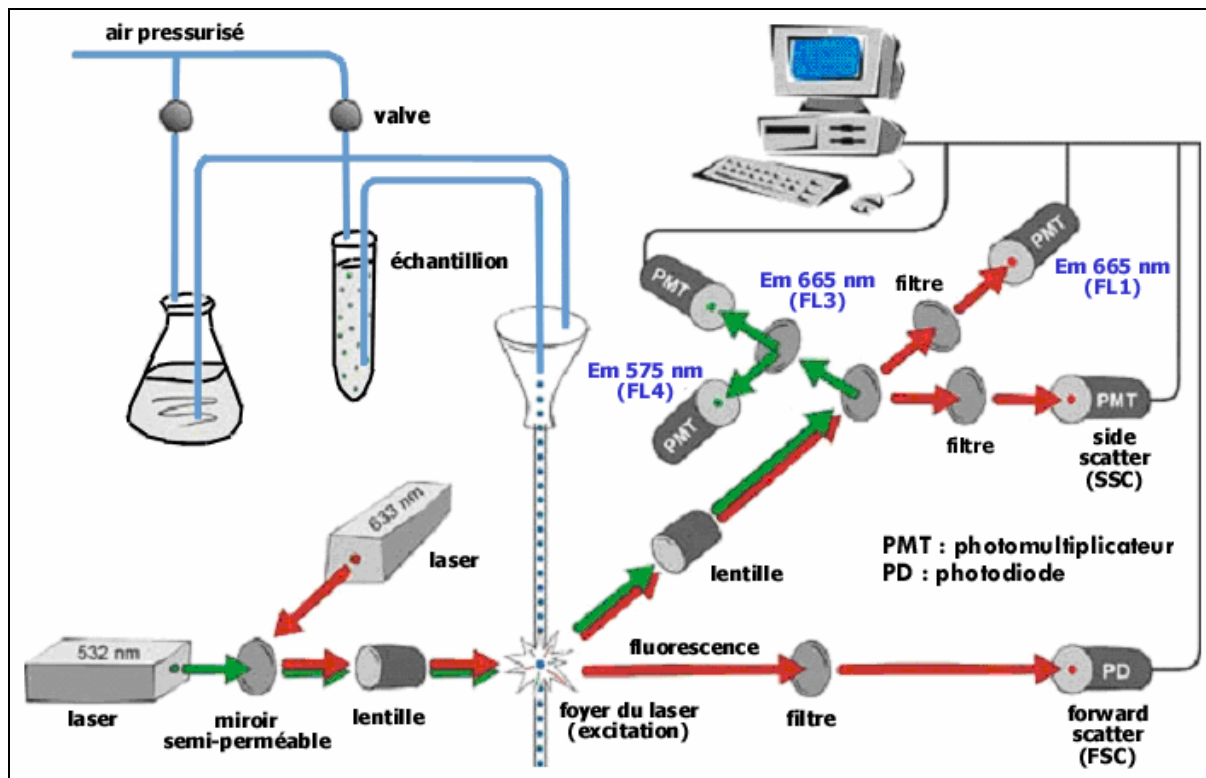


Figure VI-2 : Principe du cytomètre en flux.

5.6. Les marqueurs fluorescents

5.6.1 Mesure de la perméabilité membranaire

L'intégrité de la membrane plasmique a été testée grâce à l'iodure de propidium (IP ; figure VI-3). Cette molécule est couramment utilisée en cytométrie en flux pour observer la perméabilité membranaire d'une cellule et donc en déduire son état physiologique. La membrane plasmique se révèle imperméable à l'iodure de propidium. Dans le cas où la membrane cellulaire est abîmée, le fluorochrome entre dans la cellule. Ce composé possède une forte affinité pour les acides nucléiques double brin et plus particulièrement pour l'ADN (il s'intercale rapidement dans l'ADN).¹²³ La complexation du propidium par les acides nucléiques entraîne une forte augmentation de la fluorescence de ce fluorochrome. Ainsi, une cellule dont la membrane plasmique sera devenue perméable au propidium, laissera entrer ce fluorochrome qui en se complexant aux acides nucléiques, rendra la cellule fluorescente. Selon ce principe, après un traitement PDT, l'évolution du pourcentage de mortalité d'une population cellulaire peut être déterminée grâce à la cytométrie en flux.

¹²³ A. Krishan ; *J. Cell. Biol.*, 66(1), 1975, 521-530.

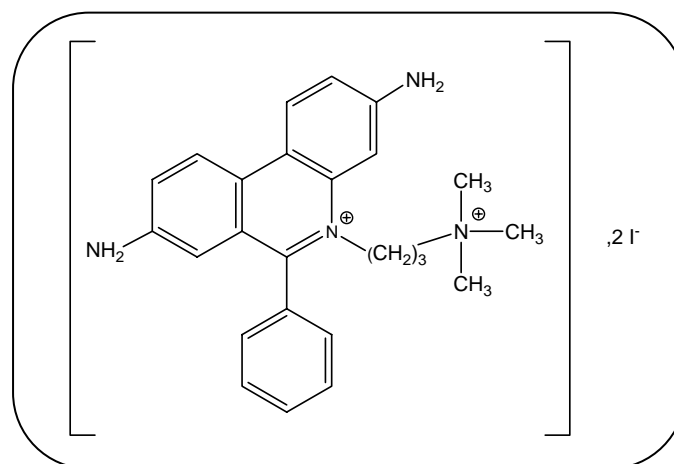


Figure VI-3 : Structure de l'iodure de propidium.

L'iodure de propidium utilisé se présente sous la forme de cristaux (Sigma) ; il est solubilisé dans du tampon phosphate (1mM ; NaCl : 13,8 mM, KCl : 2,7mM ; pH=7,4 à 25°C, Sigma). La solution est ensuite stérilisée par filtration sur membrane (0,22 μ m, unité de filtration MILLIPORE, VWR) et peut être conservée pendant plusieurs semaines à 4°C, à l'obscurité. Une solution est préparée à la concentration de 0,5 mg/mL. Afin d'évaluer la viabilité cellulaire on ajoute 100 μ L de suspension cellulaire à 20 μ L d'iodure de propidium. Après 15 minutes d'incubation, 400 μ L du tampon phosphate est ajouté. La quantification est réalisée alors après passage de l'échantillon dans le cytomètre en flux. L'excitation de l'iodure de propidium est réalisée avec la raie à 488 nm d'un laser à argon ; l'émission de la fluorescence rouge est recueillie à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm.

Lors de chaque expérience, la viabilité cellulaire est évaluée immédiatement après irradiation (J0). Ensuite, les cellules sont placées dans un incubateur. L'intégrité de la membrane plasmique est alors mesurée 24 heures après irradiation (J1). Ce protocole nous permet ainsi d'apprécier l'évolution de la mort cellulaire.

Tous les photosensibilisateurs ont été testés pour leur cytotoxicité en les incubant à l'obscurité pendant 2 jours. Aucune de ces porphyrines-polyamines n'a induit la mort cellulaire et n'inhibe la croissance cellulaire.

5.6.2. Mesure du potentiel mitochondrial

La mesure du potentiel mitochondrial a été réalisée avec l'iodure de 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC₆(3)) ; figure VI-4).¹²⁴ Ce marquage permet d'apprécier l'état physiologique de la mitochondrie.

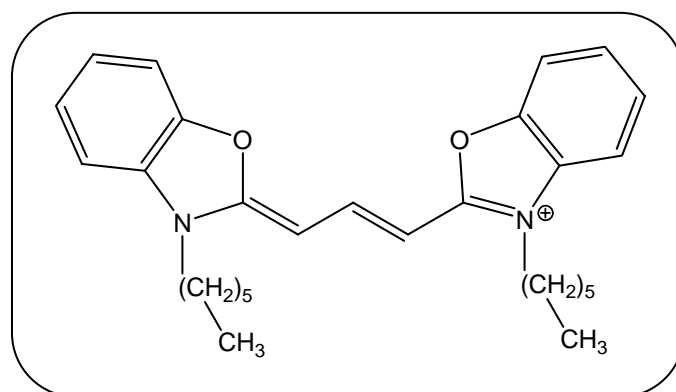


Figure VI-4 : Structure du DiOC₆(3).

Le DiOC₆(3), est une sonde cationique lipophile, qui peut facilement diffuser à travers la membrane cellulaire et qui s'accumule dans la matrice mitochondriale à la faveur de la polarisation de la membrane interne. Ce fluorochrome est excité par une lumière bleue et la fluorescence verte résultante est collectée après un passage dans un filtre passe-bande.

Une solution mère de DiOC₆(3) est préparée dans l'éthanol à 95%, à la concentration de 25 µM et elle est conservée quelques jours à 4°C et à l'obscurité. Après photoirradiation, 100 µL de la suspension cellulaire sont prélevés et on ajoute 11 µL de DiOC₆(3) (concentration de 2,5 µM). Cette préparation est ensuite mise à incuber 15 minutes à 37°C et à l'obscurité. Les cellules sont alors analysées par cytométrie en flux.

5.6.3 Mesure de l'activation de la caspase 9

Nous avons utilisé le dérivé "CaspaTagTM Caspase-9 (LEHD)", commercialisé par Intergin, afin de déterminer la présence de caspase 9 active. Ce dérivé fluorescent pénètre facilement dans les cellules et il se fixe spécifiquement sur la caspase 9 lorsque cette enzyme

¹²⁴ R. Levensen, I.G. Macara, R.L. Smith, L. Cantley, D. Housman ; *Cell.*, 28(4), 1982, 855-863.

est activée (la forme pro-caspase 9 ne présentant pas d'affinité pour le dérivé). La spécificité de ce dérivé provient de la séquence LEHD (leucyl-glutamyl-histidyl-aspartyl).

Le protocole que nous avons utilisé a été décrit par Intergin. Dans un premier temps, la solution mère de FAM-LEHD-FMK (carboxyfluorescéine-leucyl-glutamyl-histidyl-aspartyl-fluorométhylcétone) lyophilisée est reconstituée avec 40 μ l de DMSO (concentration résultante 150 \times) et stockée à -20°C. Avant son utilisation, cette solution mère est diluée au 1/5 dans du tampon phosphate, pH 7,4 (30 \times). Après irradiation des cellules, un aliquote de 300 μ L de cellules à la densité de 10⁶ cellules/mL est transféré dans un tube. Puis 10 μ L de FAM-LEHD-FMK (30 \times) sont additionnés à suspension cellulaire et les cellules sont mises à incuber pendant 1 heure (37°C, 5% CO₂). Ensuite, 2 mL du tampon phosphate sont ajoutés et les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est aspiré et les cellules sont resuspendues dans 2 ml de tampon phosphate. Elles sont centrifugées une nouvelle fois ; les cellules sont resuspendues dans 400 μ L de tampon phosphate et 20 μ L d'iodure de propidium sont ajoutés (0,5 mg/mL). Après 15 minutes d'incubation, l'émission est mesurée à 530 nm et l'émission de la fluorescence rouge est recueillie à des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Un témoin positif a été réalisé sur des cellules incubées avec de la camptothécine (figure VI-5) à la concentration de 2 μ g/mL pendant 4 heures.

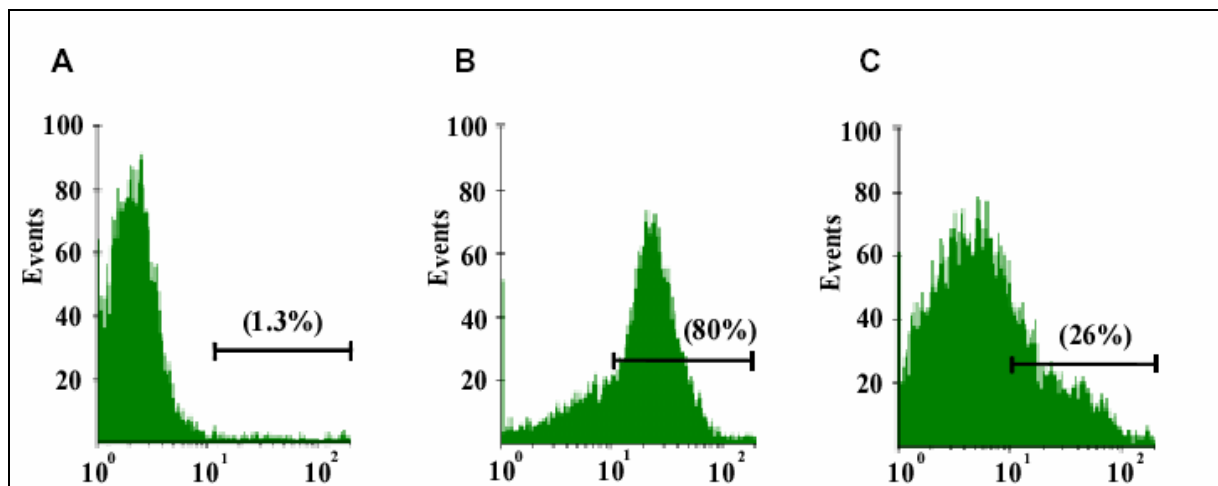


Figure VI-5 : (A) cellules non traitées : témoin négatif. (B) cellules traitées avec de la camptothécine : témoin positif (en absence d'un inhibiteur zLEHD-FMK de la caspase 9. (C) cellules traitées avec la camptothécine : témoin positif (en présence de l'inhibiteur zLEHD-FMK de la caspase 9. Les histogrammes représentent le nombre d'évènements (events, axe des Y) en fonction de l'intensité de fluorescence (axe des X). Les cellules caspase 9 négative (-) se retrouvent dans la première décade, tandis que des cellules caspase 9 positive (+) se retrouvent à partir de la deuxième décade.

5.6.4 Mesure de l'activation de la caspase 3

De nombreuses études ont montré que la photothérapie dynamique induite par les porphyrines provoque l'activation de la caspase 3.^{125,126} C'est une caspase effectrice de la famille des protéases à cystéine et son activation sert comme marqueur précoce de l'apoptose pour les études en cytométrie en flux.¹²⁷

Dans ce cas, nous avons employé le dérivé "CaspaTagTM Caspase-3 (DEVD)" afin de déterminer la présence de caspase 3 active. Ce dérivé fluorescent se fixe spécifiquement sur la caspase 3 lorsque cette enzyme est activée (la forme pro-caspase 3 ne présentant pas d'affinité pour le dérivé). La spécificité du dérivé est déterminée par la séquence DEVD (aspartyl-glutamyl-valyl-aspartyl)

Suivant le même protocole que précédemment mais en utilisant le peptide FAM-DEVD-FMK nous avons pu déterminer l'activité de la caspase 3. L'intensité de l'émission a été mesurée à 530 nm et l'émission de la fluorescence rouge a été recueillie à des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Un témoin positif a également été réalisé sur des cellules incubées avec de la camptothécine (figure VI-6) à la concentration de 2µg/mL pendant 4 heures.

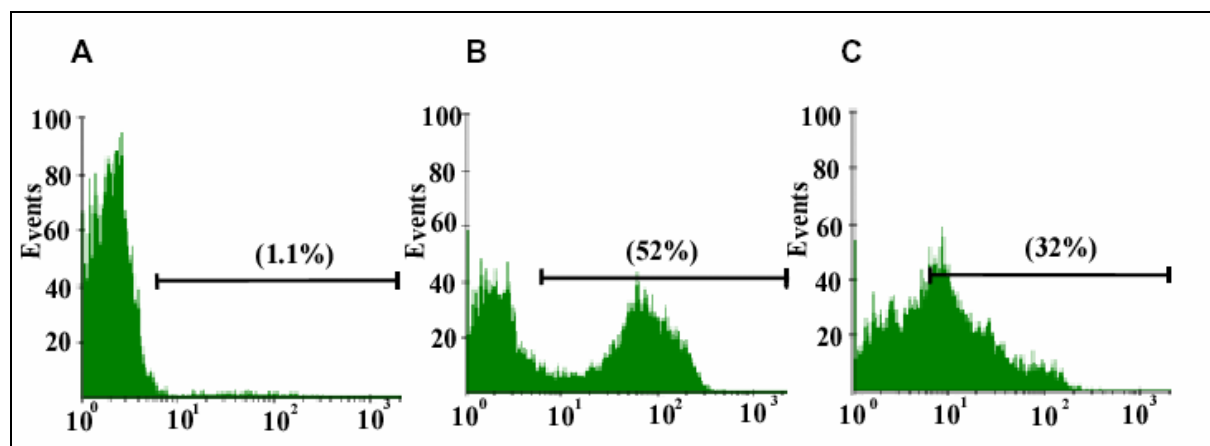


Figure VI-6 : (A) cellules non traitées : témoin négatif. (B) cellules traitées avec la camptothécine : témoin positif (en absence de l'inhibiteur zDEVD-FMK de la caspase 3. (C) cellules traitées avec de la camptothécine : témoin positif (en présence d'un inhibiteur zDEVD-FMK de la caspase 3. Les histogrammes représentent le nombre d'évènements (events, axe des Y) en fonction de l'intensité de fluorescence (axe des X). Les cellules caspase 3 négative (-) se retrouvent dans la première décade, tandis que des cellules caspase 3 positive (+) se retrouvent à partir de la deuxième décade.

¹²⁵ T.J. Mc Garrity, L.P. Peiffer, D.J. Granville, C.M. Carthy, J.G. Levy ; *Cancer lett.*, 163, 2001, 33-41.

¹²⁶ O. Inanami, A Yoshito, K. Takahashi, W. Hiraoki ; *Photochem. Photobiol.*, 70, 4, 1999, 650-655.

¹²⁷ F. Durrieu, F. Belloc, L. Lacoste, P. Dumain ; *Exp. Cell. Res.*, 240, 2, 1998, 165-175.

5.6.5. Détection des phases précoces de l'apoptose

Une des premières étapes de l'apoptose est la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique par translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne vers le feuillet externe (figure VI-7). Toutefois la membrane garde son intégrité contrairement aux cellules nécrotiques. L'Annexine V est une protéine qui se lie avec une haute affinité à la phosphatidylsérine (PS) en présence d'ions calcium. Le protocole de couplage de l'Annexine V à la molécule de FITC (rapport stoechiométrique 1:1) n'altère pas cette capacité. L'Annexine V est donc un marqueur de choix pour mesurer la perte de l'asymétrie de la membrane plasmique.

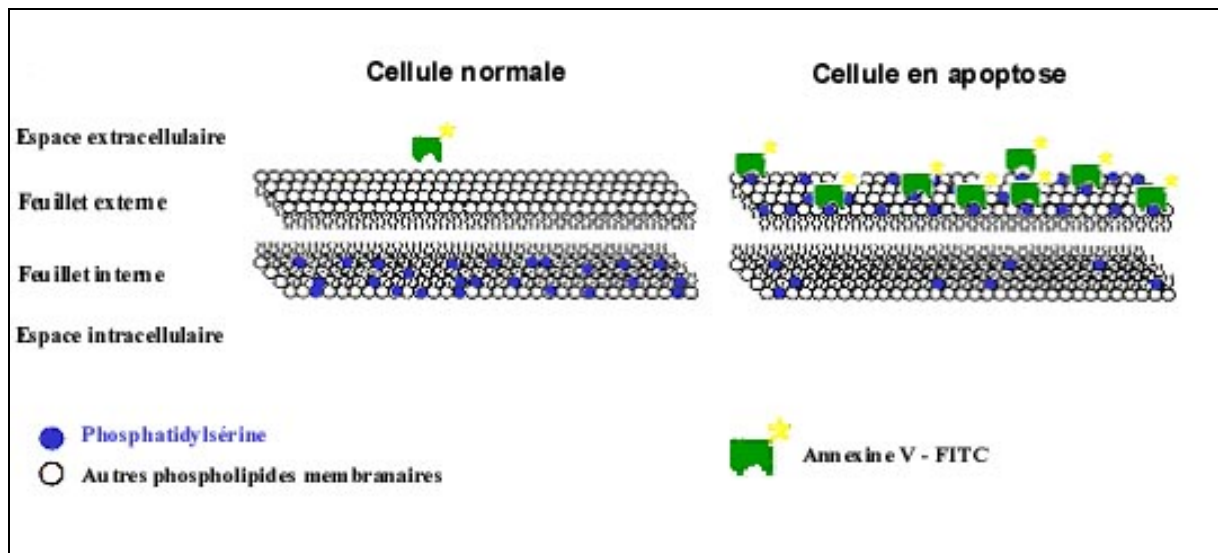


Figure VI-7 : Principe du test DAKO ApopTEST™.

Le double marquage Annexine V/FITC, Iodure de Propidium (test DAKO ApopTEST™) permet donc de différencier quatre phénotypes (figure VI-8) :

- Cellules Annexine V/FITC et IP négatives : cellules viables,
- Cellules Annexine V/FITC positives et IP négatives : cellules en début d'apoptose,
- Cellules Annexine V/FITC positives et IP positives : cellules en fin d'apoptose,
- Cellules Annexine V/FITC négatives et IP positives : cellules en nécrose.

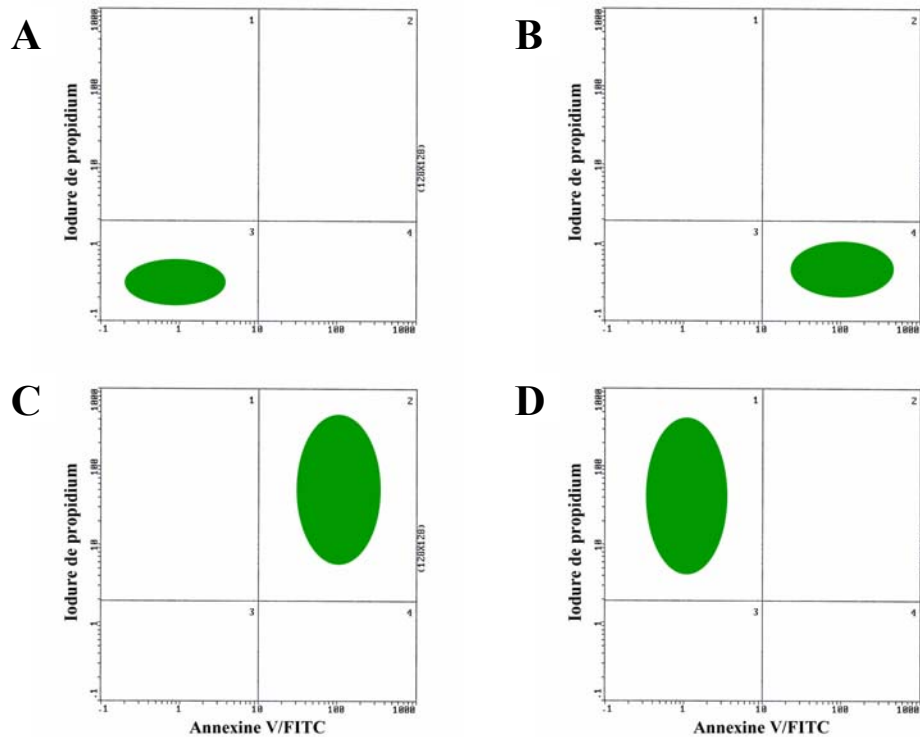
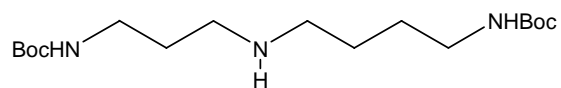


Figure VI-8 : (A) Cellules Annexine V négatif et Iodure de propidium négatif : cellules viables. (B) Cellules Annexine V positif et Iodure de propidium négatif : cellules en début d’apoptose. (C) Cellules Annexine V et IP positif : cellules en apoptose tardive. (D) Cellules Annexine V négatif et IP positif : cellules nécrotiques. L’axe des X représente le marquage avec l’Annexine V/FITC et l’axe des Y représente le marquage à l’iodure de propidium (IP).

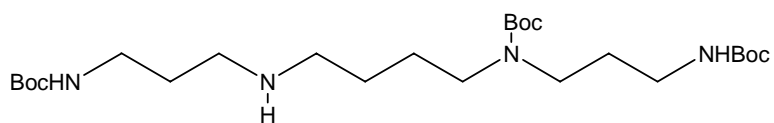
En pratique, la solution d’Annexine V/FITC est prête à l’emploi et 250 μg d’Iodure de Propidium doivent être dissous dans 1 mL d’eau distillée à la concentration finale de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et stocké dans la glace. L’excitation de l’IP et de l’Annexine est réalisée par la raie à 488 nm d’un laser à argon ; l’émission de fluorescence verte de l’Annexine est collectée entre 500 et 540 nm avec un filtre “passe bande”, tandis que la fluorescence rouge de l’IP est recueillie pour des longueurs d’onde supérieures à 600 nm.

Après 30 minutes d’irradiation, les cellules sont lavées avec du milieu de culture et remises en suspension dans du tampon PBS froid à raison de 10^5 à 10^6 cellules/mL ; 96 μl de suspension cellulaire sont ajoutés par tube, puis 1 μL d’Annexine V/FITC, 2,5 μL d’Iodure de Propidium et 250 μL de tampon dilué froid sont additionnés dans chaque tube. Parallèlement au marquage à l’Annexine V/FITC et à l’IP, réalisé sur des cellules ayant subi un traitement en PDT, un témoin positif est effectué sur des cellules incubées avec du paraformaldéhyde dilué à 3% dans du PBS.

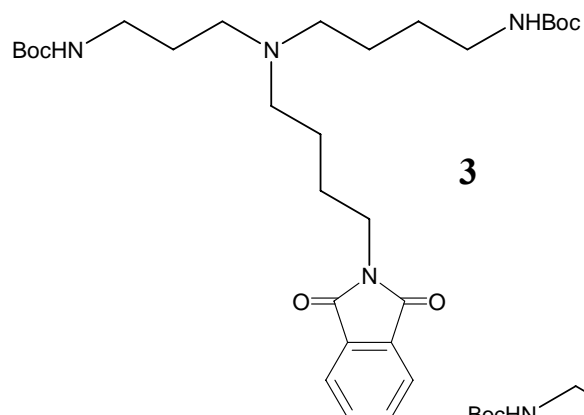
Liste des composés synthétisés



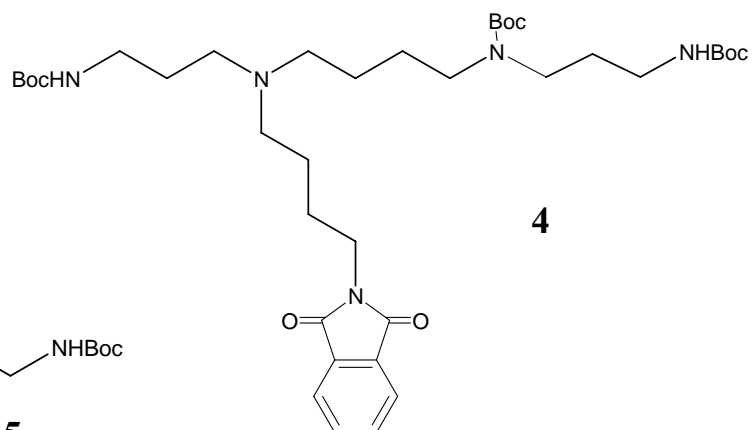
1



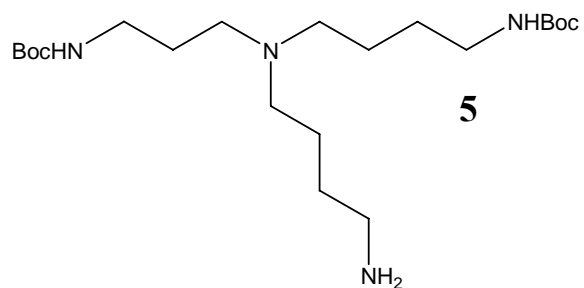
2



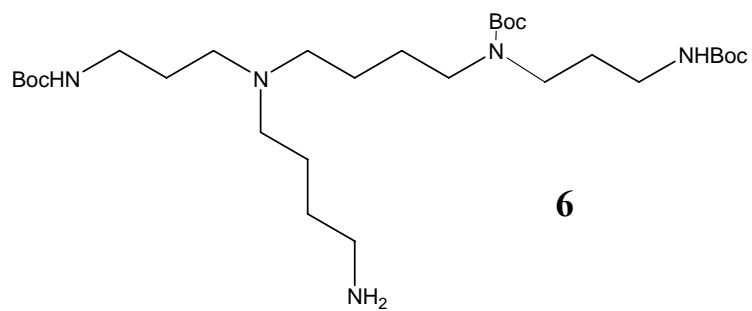
3



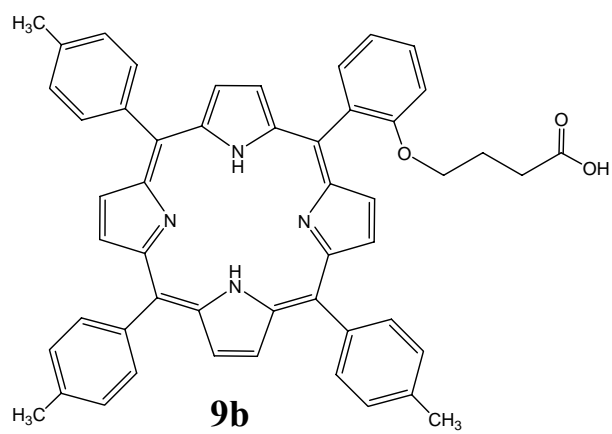
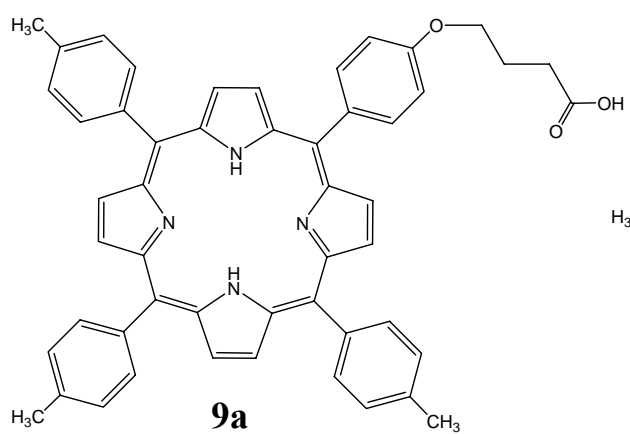
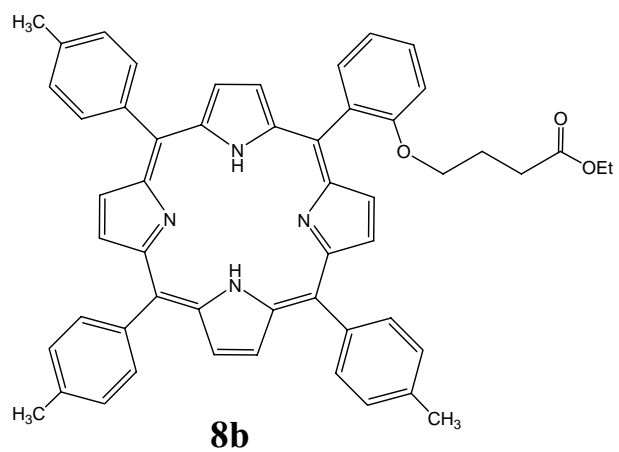
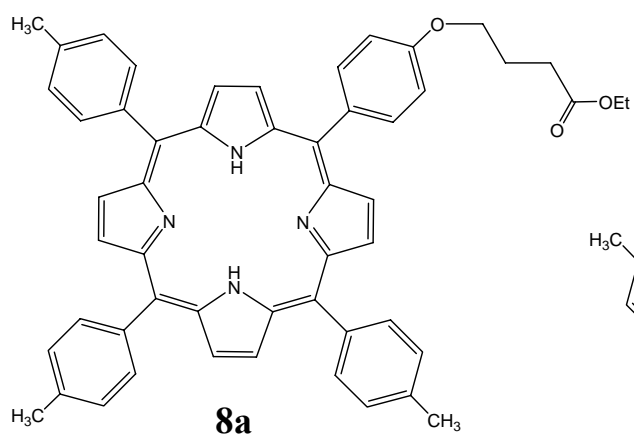
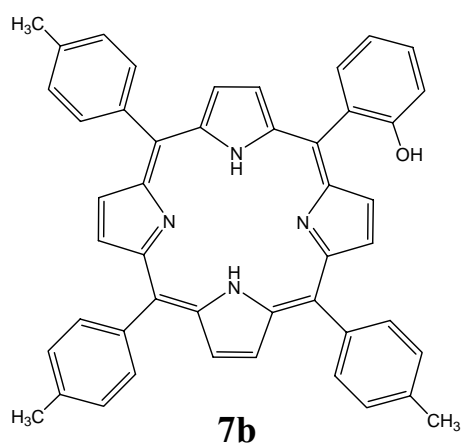
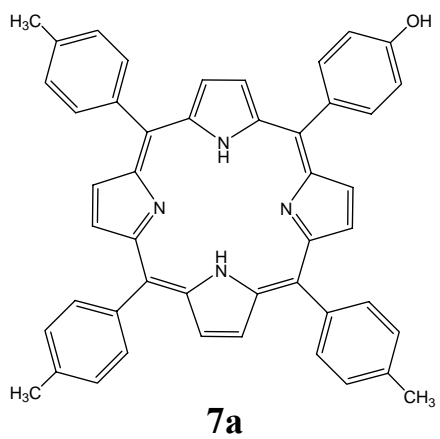
4

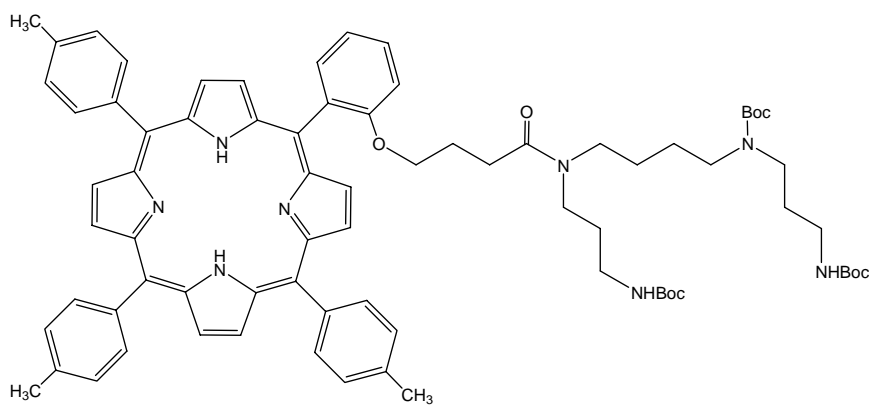
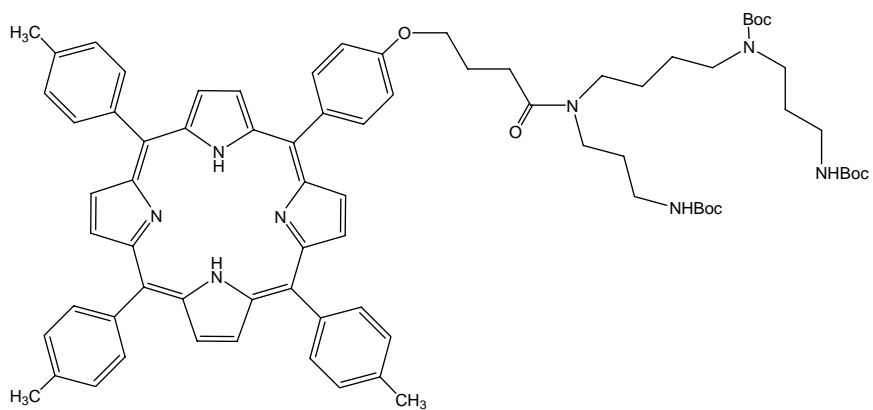
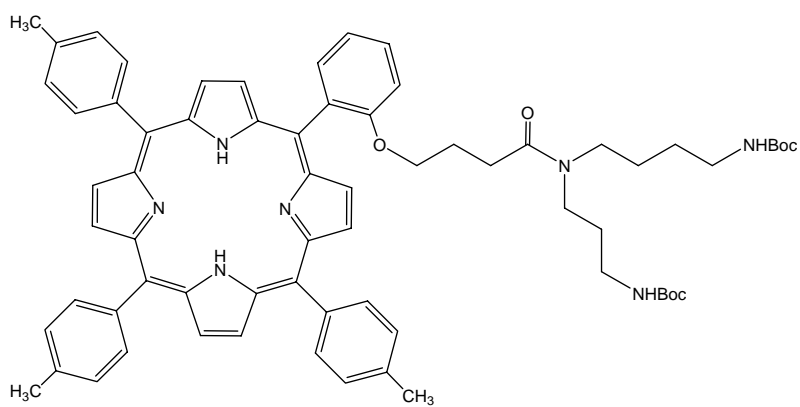
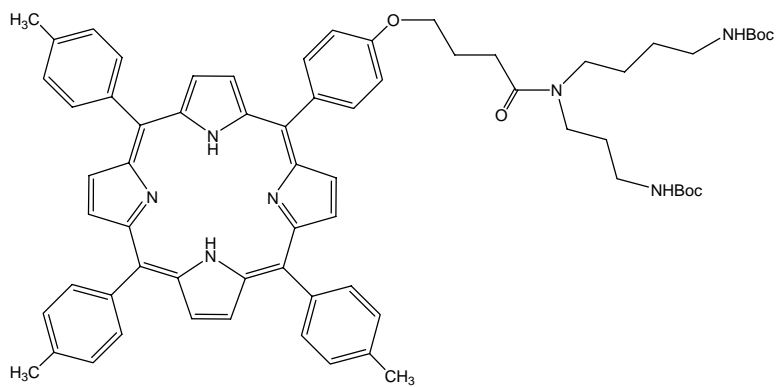


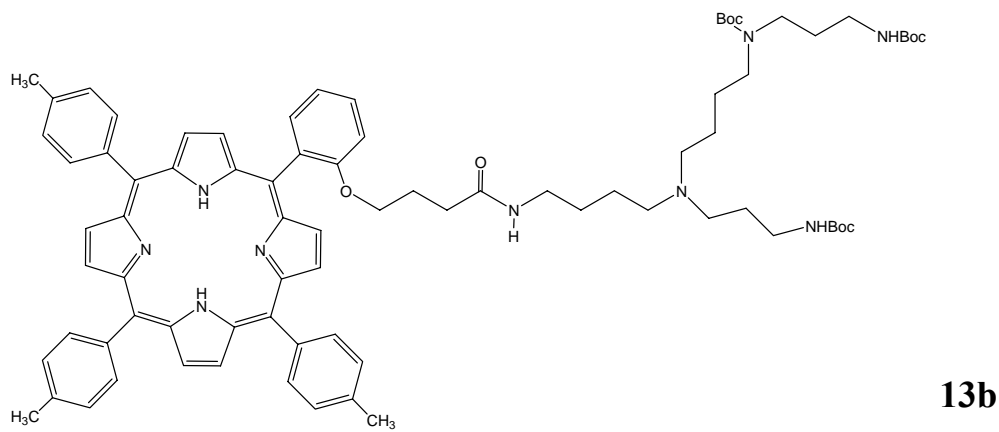
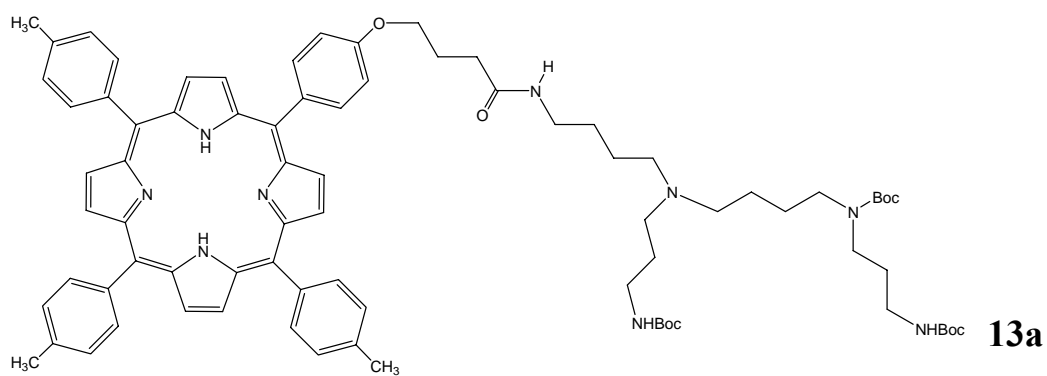
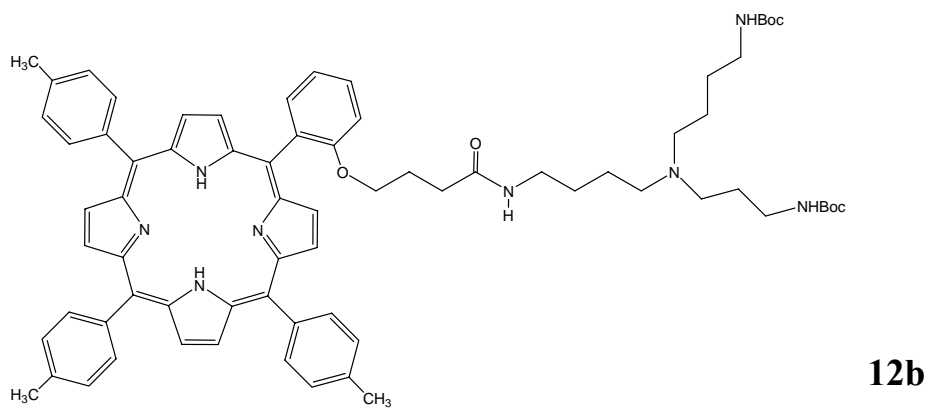
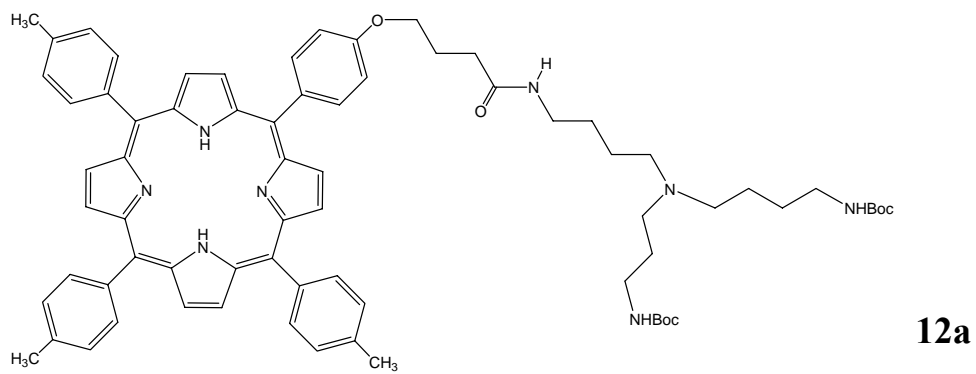
5

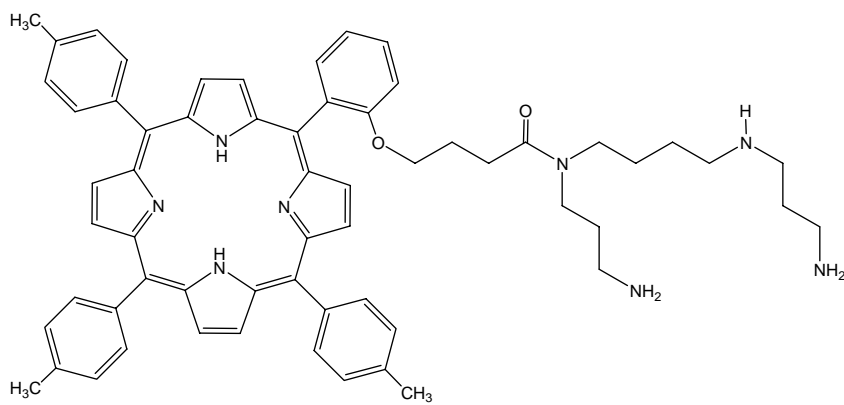
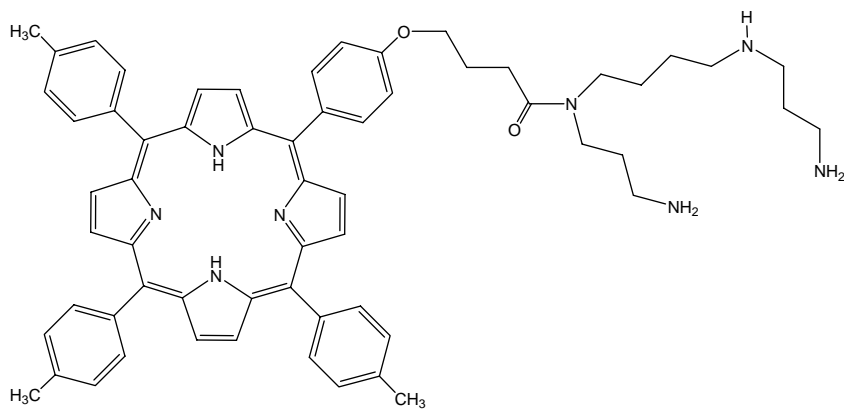
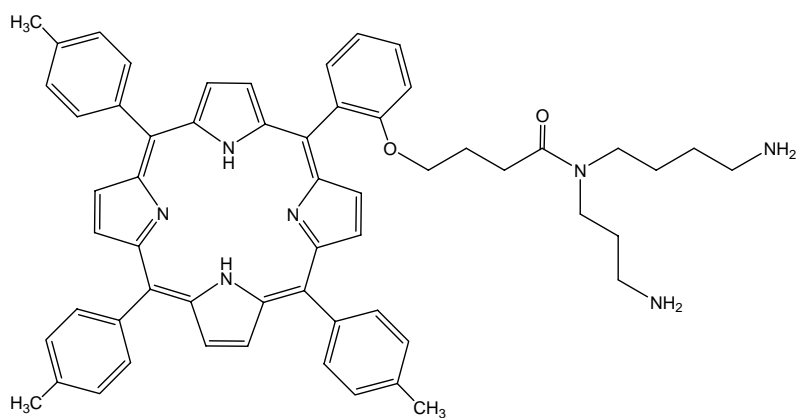
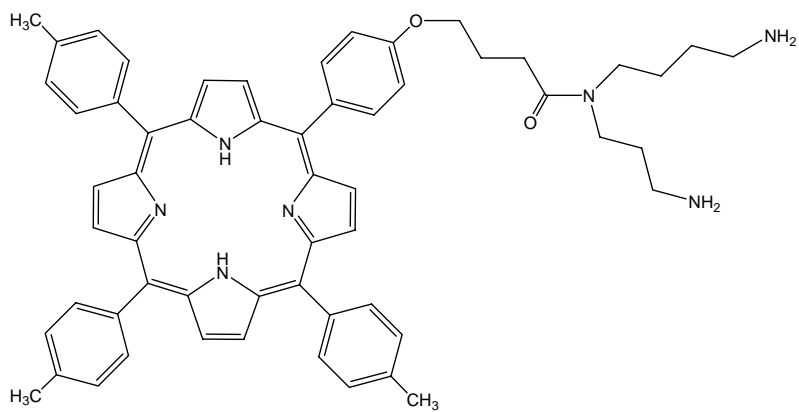


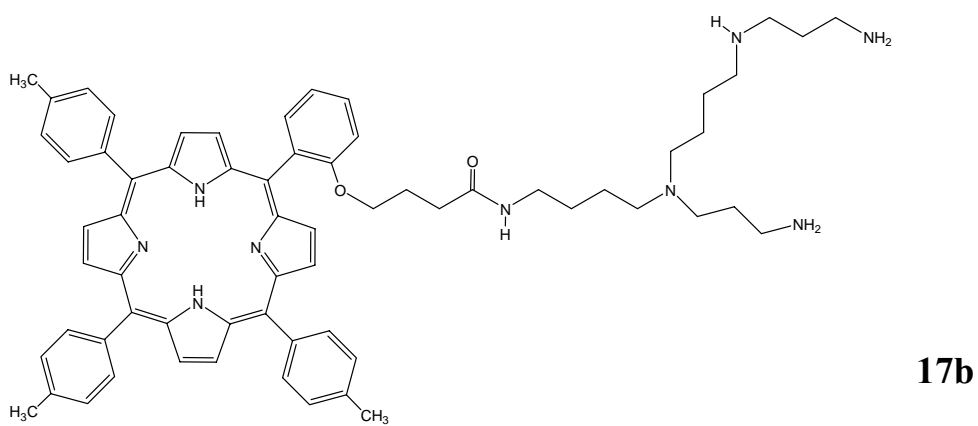
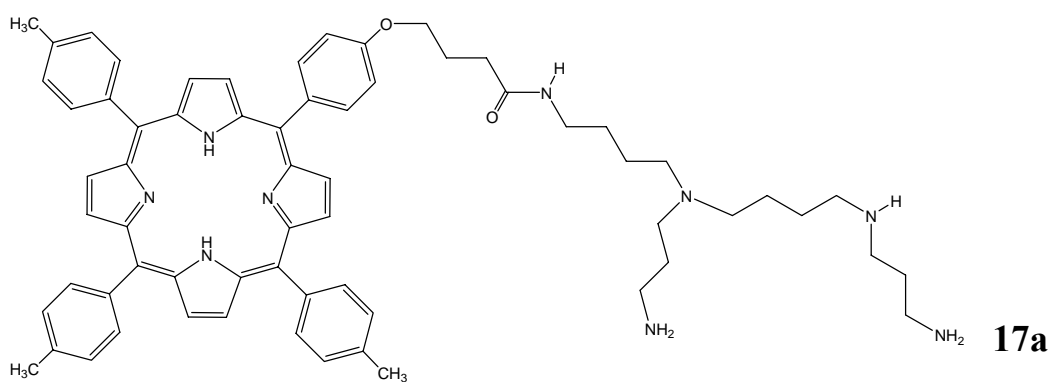
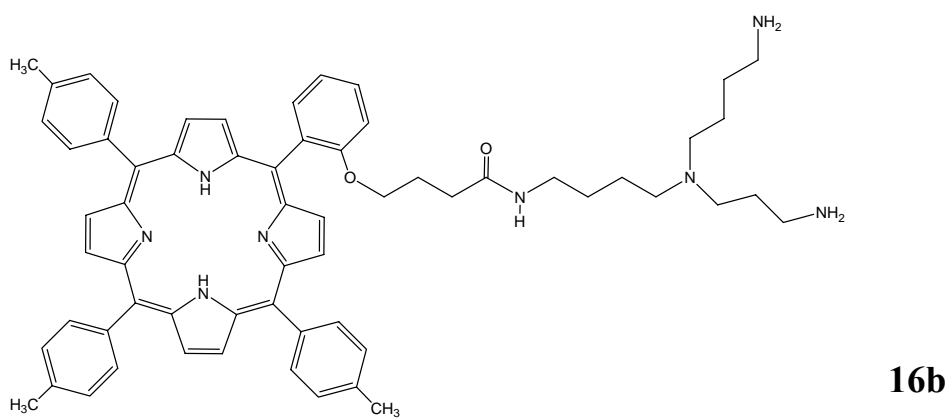
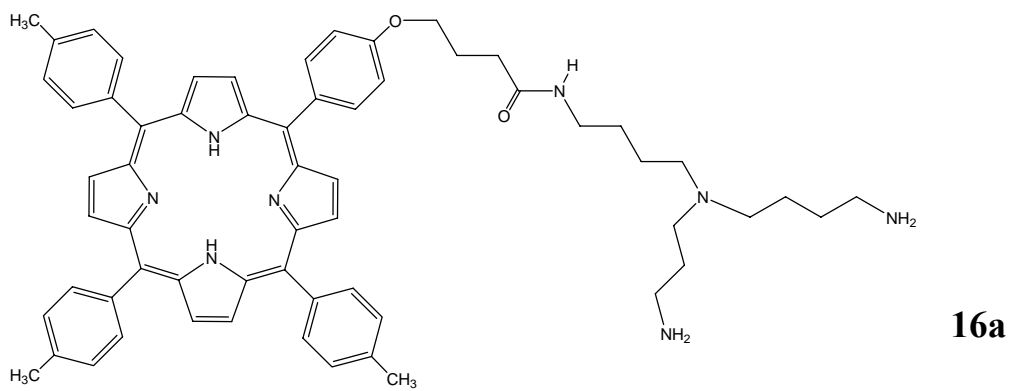
6

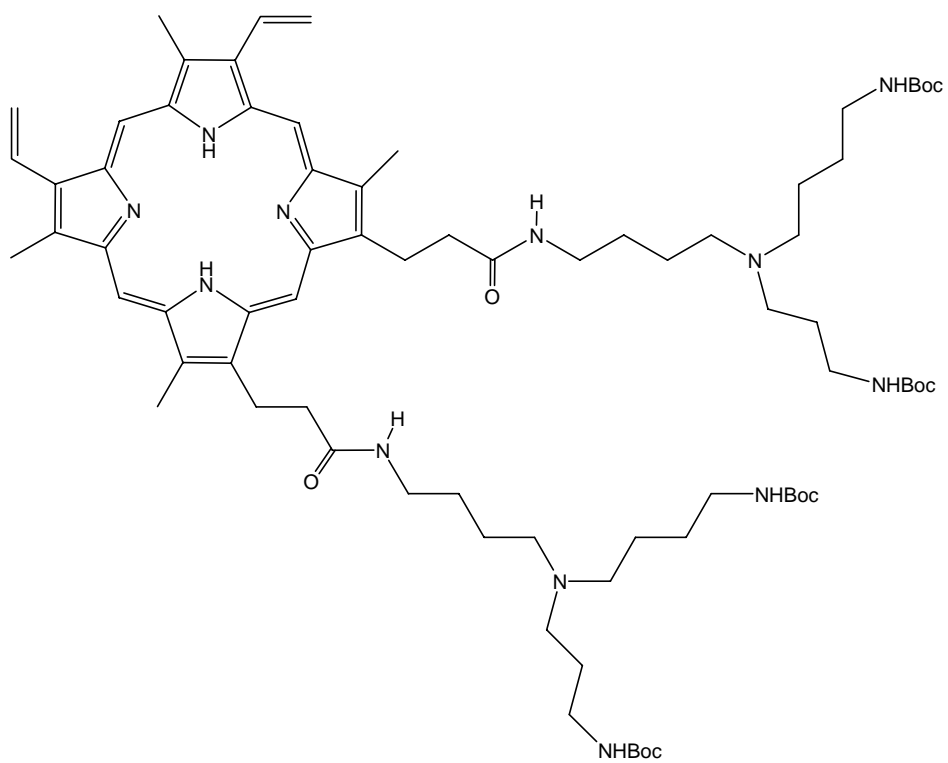




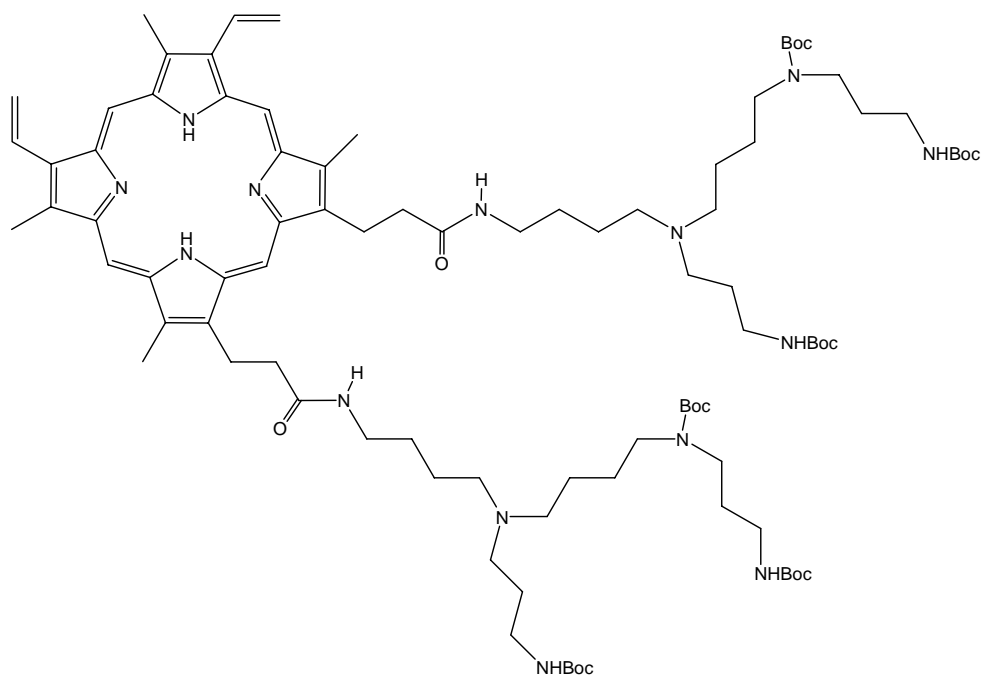




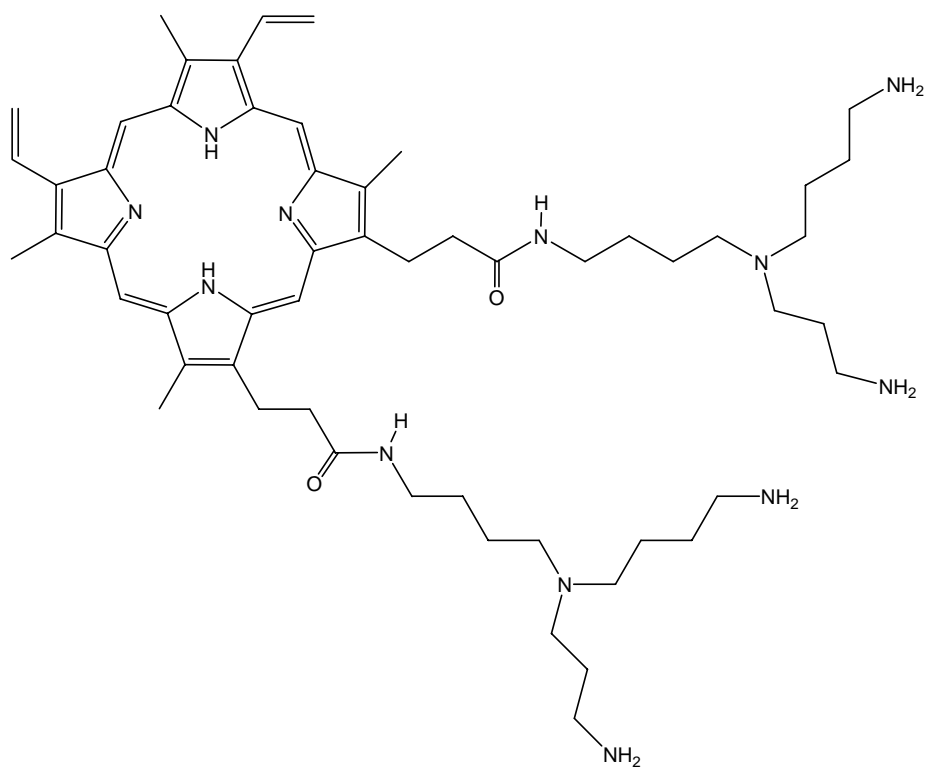




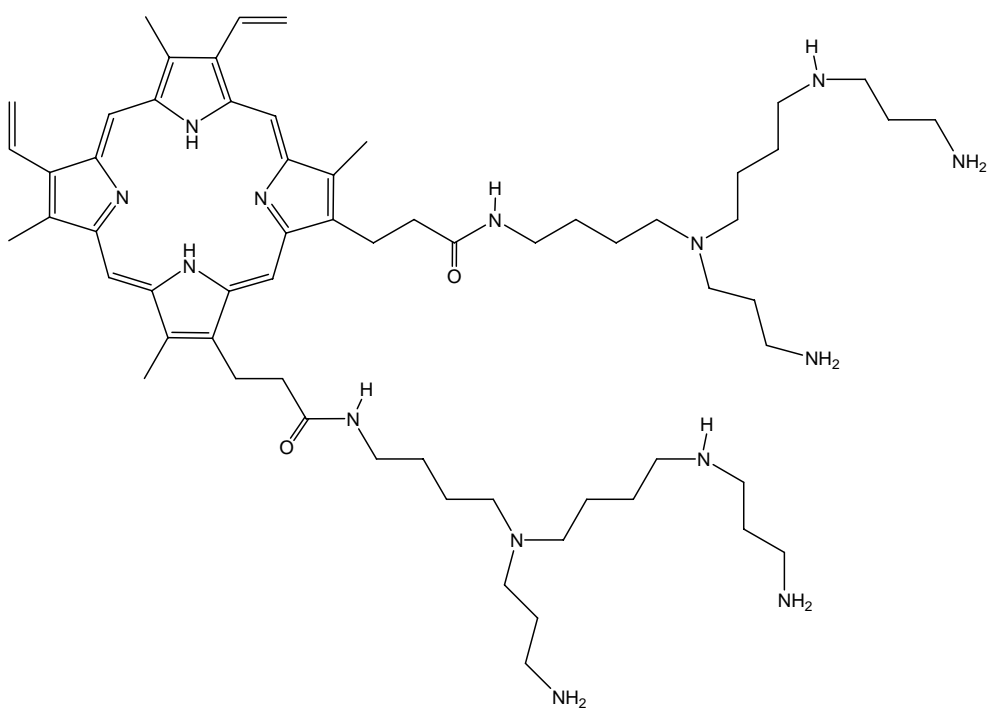
18



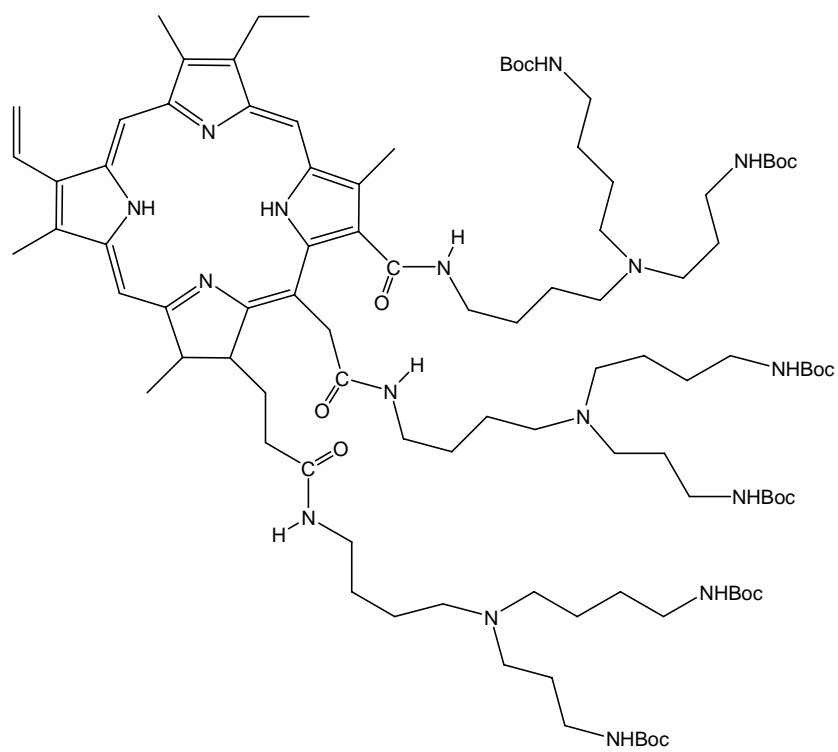
19



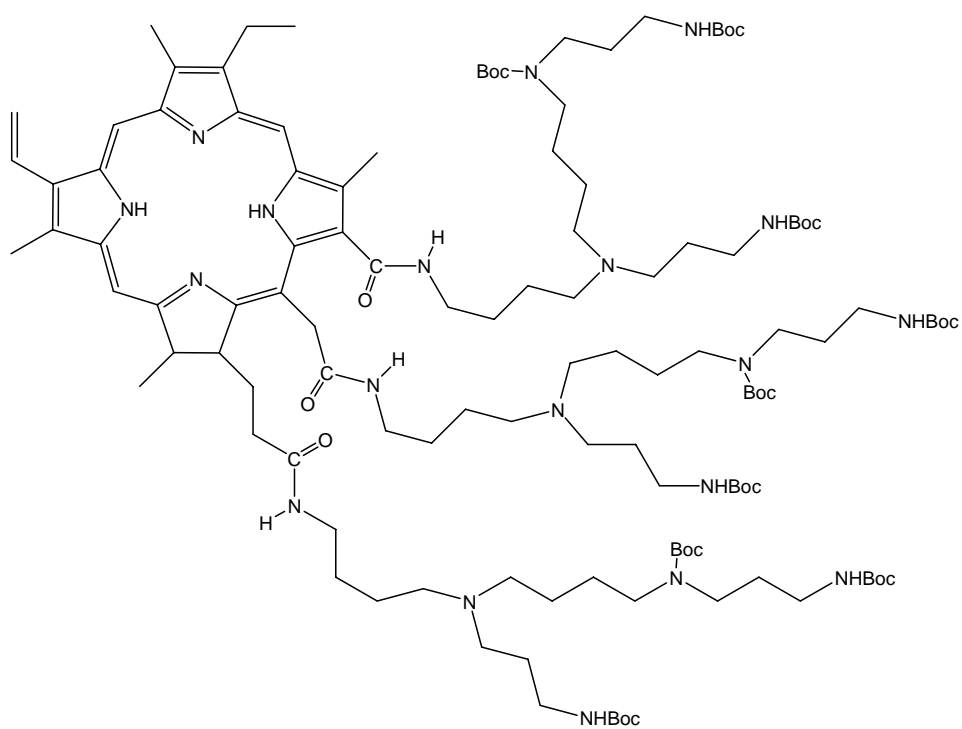
20



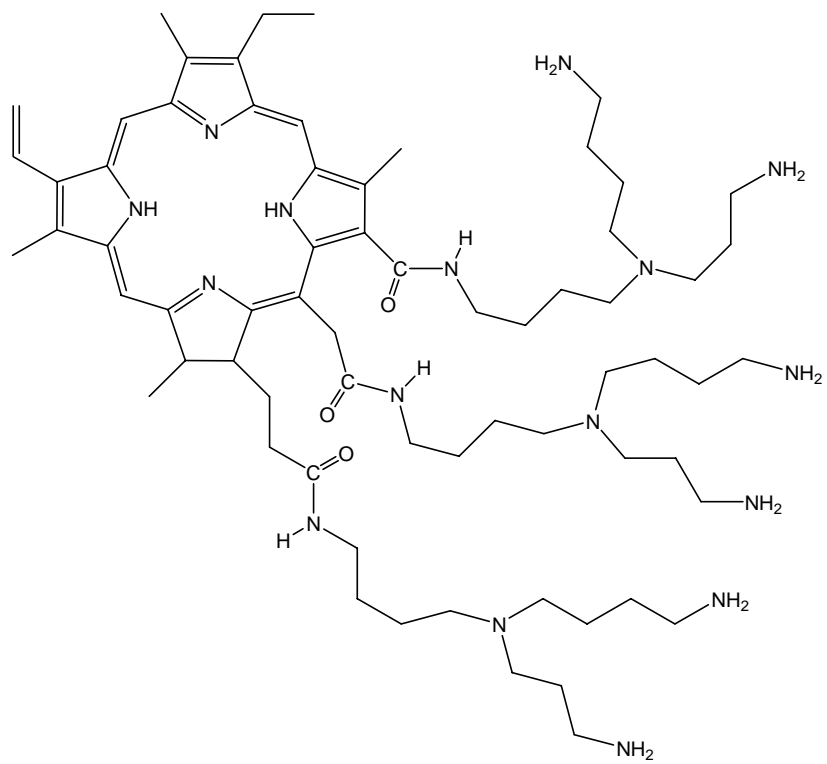
21



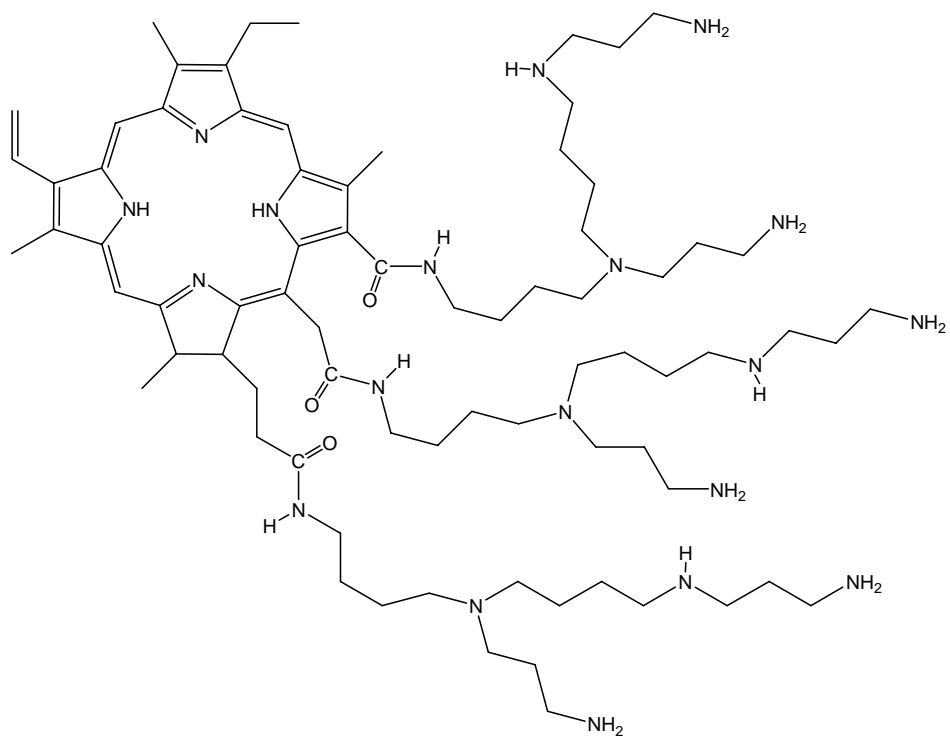
22



23



24



25

Lexique

Anabolisme : Ensemble des réactions chimiques des organismes vivants, permettant la synthèse de substances à partir des éléments de base fournis par l'alimentation, et aboutissant à la construction ou au renouvellement des tissus.

Annexine V: Protéine des macrophages ayant la capacité en présence de calcium de se fixer aux phosphatidylsérines et de reconnaître les cellules en apoptose.

Apoptose : Mécanisme responsable de la suppression physiologique des cellules et semble être intrinsèquement programmé. Ce mode de mort des cellules équilibre la mitose en réglant la taille des tissus animaux et en intervenant dans les processus pathologiques liés à la croissance des tumeurs.

Apoptosome : Complexe formé par l'association de la protéine Apaf-1, du cytochrome c et de la pro-caspase 9.

Camptothécine : Composé qui inhibe sélectivement la topoisomérase humaine de type I.

Caspases : Enzymes (protéases) responsables de la phase d'initiation ou d'exécution de l'apoptose. Leur activation conduit à la mort de la cellule.

Catabolisme : Ensemble des réactions de dégradation biochimique de substances organiques.

Cellule de Malassez : Est utilisée pour faire des dénombrements de cellules ou autres éléments observables au microscope. Elle consiste en une mince plaque de verre dans laquelle sont gravés des carrés de 50 µm de côté.

Cellule leucémique promyélocytaire : Cellule maligne dérivée d'un promyélocyte ; cellule intermédiaire dans la formation d'un globule blanc à partir d'une cellule souche bloquée à ce

stade de maturation. Les cellules leucémiques promyélocytaire se caractérisent par une cassure et un échange entre les chromosomes 15 et 17 (une partie du chromosome 15 se rattache au chromosome 17 et inversement).

Chromatine : Substance essentiellement formée d'ADN et de protéines, présente sous forme de granules dans le noyau cellulaire, fixant les colorants basiques.

Homéostasie : Tendance des êtres vivants à maintenir constantes les conditions de vie.

Lysosome : Vésicule contenant des enzymes hydrolytiques permettant la destruction de composés cellulaires variés : lipides, protéines, acides nucléiques.

Métabolisme : Ensemble des réactions chimiques de transformation de matière et d'énergie, catabolisées par des enzymes, qui s'accomplissent dans tous les tissus de l'organisme vivant.

Nécrose : mort cellulaire "désordonnée", provoquée par des agents physiques extérieurs ou des agents infectieux. Au cours de la nécrose, les cellules gonflent et ensuite les membranes se rompent.

Paraformaldéhyde : Polymère de formaldéhyde. En solution dans un milieu tamponné, il se dépolymérise pour former du formaldéhyde. Ce dernier réagissant avec les fonctions amines des protéines et conduisant à la formation de liaisons croisées entre les sous-unités protéiques.

Phagocytose : Processus par lequel certaines cellules englobent des particules ou d'autres cellules, les absorbent puis les digèrent.

Potentiel mitochondrial : Différence de potentiel électrique existant entre l'espace intermembranaire et la matrice de la mitochondrie.

ROS (Reactive oxygen species) : Espèces responsables d'effets toxiques pour la cellule. Ils incluent les radicaux hydroxyl, peroxy, l'ion superoxyde, l'oxygène singulet et les peroxinitrites.