

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Sciences – Technologie – Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N°

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles

présentée et soutenue par

Mohammed KROUIT,

le 25 septembre 2006

Vers de nouveaux films photobactéricides élaborés à partir de cellulose et de porphyrines

Thèse dirigée par : M. Robert GRANET, *Docteur – Ingénieur- HDR*

M. Pierre KRAUSZ, *Professeur*

Jury

Rapporteurs :

M. Philippe MAILLARD, *Chargé de recherche au CNRS - HDR*, Institut Curie -Orsay

M. Yannick POUILLOUX, *Professeur*, Université de Poitiers - ESIP

Examineurs :

M. Christophe BEDANE, *Professeur*, Université de Limoges

M. Jacques CHRISTEN, Directeur de l'Incubateur du Limousin

M. Pierre KRAUSZ, *Professeur*, Université de Limoges

Invité :

M. Robert GRANET, *Docteur - Ingénieur - HDR*, Université de Limoges

Remerciements

« *L'Homme n'est un Homme qu'avec l'autre* » selon Nietzsche. Cette phrase prend tout son sens quand il s'agit de présenter en son propre nom le fruit issu d'une réflexion intellectuelle collective exprimée notamment au cours des nombreuses réunions de laboratoire. J'adresse donc tous mes remerciements à l'ensemble du laboratoire. Que tous ceux qui y ont participé en soient ici remerciés.

Je remercie en premier lieu le Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Monsieur le Professeur Pierre KRAUSZ, pour m'y avoir accueilli et pour m'avoir permis de réaliser ce travail durant ces quatre années de thèse. Au delà des moyens matériels que vous avez toujours su mettre à ma disposition, je vous suis reconnaissant de la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce travail ainsi que pour m'avoir communiqué dès les cours de chimie de licence votre « passion » pour la recherche.

Docteur Robert GRANET, je ne sais comment vous exprimer ma reconnaissance et mon admiration. Il n'est pas de mots pour vous remercier de m'avoir guidé durant ces années de travail, de réflexion, de doute et de remise en question. Vos qualités d'écoute, d'échange et de respect ainsi que votre dévouement sont autant de valeurs humaines que vous n'avez cessé d'exprimer au quotidien durant ces quatre années de travail. Je vous remercie également pour la confiance que vous avez su m'accorder. Bien que très engagé dans la dynamique de recherche du laboratoire, vous avez toujours su m'accorder de votre temps précieux lorsque j'en avais besoin. Vos fructueux conseils ainsi que l'enthousiasme que vous m'avez prodigué au quotidien m'ont soutenu à chaque instant. Merci encore pour avoir quotidiennement encadré mon travail et pour m'avoir fait profiter de votre savoir, de vos compétences et de votre intarissable culture.

Je remercie également l'ensemble des membres du Jury : Monsieur Philippe MAILLARD, Directeur de Recherche au CNRS et le Professeur Yannick POUILLOUX pour

l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie aussi le Professeur Christophe BEDANE pour l'honneur qu'il m'a fait d'examiner ce travail.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Jacques CHRISTEN, Directeur de l'Incubateur du Limousin, pour sa présence en tant qu'invité.

Je remercie le Docteur Jean-Claude BLAIS, Directeur de Recherche au CNRS, pour avoir réalisé les spectres MALDI de l'ensemble des composés porphyriniques synthétisés.

Je souhaite également remercier Monsieur le Docteur Pierre BRANLAND et Monsieur le Professeur Bernard VERNEUIL pour m'avoir initié à la microbiologie au cours de l'étude des propriétés photobactéricides.

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.

Je souhaite adresser tous mes remerciements à l'équipe de l'École Doctorale ED258, Monsieur le Professeur MOVAHHEDI, Mademoiselle Gaëlle PEYRAT et Madame Germaine DEMAZOIN pour leur disponibilité et pour avoir contribué à la mise en place de formations doctorales intéressantes et utiles.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALEINTRODUCTION GENERALE	11
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE I : PORPHYRINES – CELLULOSE MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE	15
1-Structure	17
2-Caractérisation des porphyrines	21
2-1-Spectroscopie UV-Visible	21
2-2-Résonance Magnétique Nucléaire.....	23
2-2-1-Spectroscopie RMN du proton.....	23
2-2-2-Spectroscopie RMN du carbone 13.....	25
2-3-Spectrométrie de masse	25
3-Méthodes d'obtention de porphyrines	27
3-1-Synthèse de <i>meso</i> -arylporphyrines	27
3-1-1-A partir d'aldéhydes et de pyrrole.....	27
3-1-2-A partir d'unités dipyrrométhane	32
3-2-Obtention de porphyrines β -substituées à partir de pigments naturels.....	34
4-Domains d'applications des porphyrines.....	35
5-Applications thérapeutiques des porphyrines.....	36
5-1-La photothérapie dynamique des cancers	36
5-1-1-Historique de la photothérapie dynamique.....	36
5-1-2-Principe de la photothérapie dynamique	37
5-1-3-Les processus photochimiques.....	39
5-1-4-Les photosensibilisateurs utilisés en PDT	40
5-2-Utilisation en tant qu'agents antiviraux	42
5-3-Utilisation dans le traitement de la cécité	43
5-4-La thérapie photodynamique antimicrobienne.....	43
5-4-1-Inactivation photodynamique des cellules microbiennes	45
5-4-2-Mécanisme de la photoinactivation des cellules bactériennes.....	45
5-4-3-Les surfaces photobactéricides : un autre concept de la photothérapie dynamique antimicrobienne ...	46
6-La cellulose	49
6-1-Généralités et structure	49
6-2-Obtention de la cellulose	52
6-3-Chimie de la cellulose.....	52
6-3-1-Activation de la cellulose	52
6-3-2-Dissolution de la cellulose	53
6-3-2-1-Solvants dérivatisants de la cellulose.....	53
6-3-2-2-Solvants non-dérivatisants de la cellulose	54
6-4-Modifications chimiques de la cellulose.....	56
6-4-1-Acylation de la cellulose	57
6-4-1-1-Rappels.....	57
6-4-1-2-Acylation de la cellulose à partir d'anhydrides carboxyliques.....	59
6-4-1-3-Acylation de la cellulose par un chlorure d'acide carboxylique	60
6-4-1-4-Acylation de la cellulose par transestérification	60
6-4-1-5-Acylation directe de la cellulose par les acides gras	60
7-But du travail.....	63
CHAPITRE II : SYNTHÈSE DE LAURATES DE CELLULOSE MÉS0-ARYLPORPHYRIQUES... 67	67
1-Introduction.....	69
2-Stratégie de synthèse	71
3-Synthèse des porphyrines	73
3-1-Synthèse de la <i>para</i> -hydroxyphényltritolylporphyrine selon la méthode de Little	73
3-2-Synthèse de la <i>para</i> -hydroxyphényltritolylporphyrine selon la méthode de Lindsey	73
3-3-Synthèse des carboxyporphyrines 3 et 5	74
3-3-1-Alkylation de la <i>p</i> -hydroxyphényltritolylporphyrine.....	75
3-3-2-Déprotection des porphyrines ester 2 et 4	76

3-4-Caractérisation.....	76
3-4-1-Spectroscopie UV-visible.....	76
3-4-2-Spectrométrie de masse.....	78
3-4-3-Spectroscopie RMN ¹ H.....	79
4-Synthèse de matériaux plastiques <i>meso</i> -arylporphyriniques.....	82
4-1-Généralités.....	82
4-2-Résultats et discussion.....	84
4-2-1-Dissolution de la cellulose.....	84
4-2-2-Présentation des synthèses.....	84
4-2-2-1-Estérification de la cellulose par les <i>meso</i> -arylporphyrines.....	84
4-2-2-2-Estérification des celluloses porphyriniques par l'acide laurique.....	85
4-2-3-Caractérisation des laurates de cellulose <i>meso</i> -arylporphyriniques synthétisés.....	86
4-2-3-1-Spectroscopie IR.....	87
4-2-3-2-Spectroscopie UV-visible.....	88
4-2-3-3-Spectroscopie RMN ¹ H.....	89
4-2-3-4-Le rendement massique.....	93
4-2-3-5-Les degrés de substitution.....	93
4-2-4-Optimisation des paramètres réactionnels.....	94
4-2-4-1-Effet de la température.....	95
4-2-4-2-Cinétique de la réaction.....	96
4-2-4-3-Effet de la stoechiométrie en acide laurique.....	98
4-2-4-4-Influence de la pyridine.....	99
4-2-4-5-Effet de la stoechiométrie en porphyrine.....	102
CONCLUSION	106
CHAPITRE III : SYNTHÈSE DE LAURATES DE CELLULOSE PROTOPORPHYRINIQUES.....	107
1-Introduction.....	109
2-Stratégie de synthèse.....	110
3-Résultats et discussion.....	113
3-1-Synthèse de matériaux plastiques protoporphyriniques par estérification de la cellulose (voie A).....	113
3-1-1-Caractérisation des laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés.....	114
3-1-1-1-Spectroscopie IR.....	114
3-1-1-2-Spectroscopie UV-visible.....	114
3-1-1-3-Spectroscopie RMN ¹ H.....	115
3-1-2-Effet de la stoechiométrie en protoporphyrine IX sur les degrés de substitution et sur le rendement massique.....	116
3-2-Synthèse de matériaux plastiques protoporphyriniques par acylation de la cellulose sous activation micro-onde (voie B).....	119
3-2-1-Rappel sur l'activation micro-onde.....	119
3-2-1-1-Généralités.....	119
3-2-1-2-Phénomène physique.....	119
3-2-1-3-Effets de solvant.....	120
3-2-1-4-Interprétations.....	121
3-2-1-5-Applications des micro-ondes.....	122
3-2-2-Synthèse du chlorure d'acide de protoporphyrine IX.....	122
3-2-3-Acylation de la cellulose par les chlorures d'acide sous activation micro-onde.....	123
3-2-3-1-Mise au point de la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX sous irradiation micro-onde.....	126
3-2-4-Effet de la stoechiométrie en chlorure d'acide de protoporphyrine IX.....	131
3-3-Comparaison des deux voies de synthèse des laurates de cellulose protoporphyriniques.....	133
CONCLUSION	135
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE DE CHLOROACÉTATES DE CELLULOSE PYRIDYLPORPHYRINIQUES CATIONIQUES.....	137
1-Introduction.....	139
2-Stratégie de synthèse.....	140
3-Synthèse de la <i>para</i> -pyridyltritolylporphyrine.....	142
3-1-Synthèse de la <i>para</i> -pyridyltritolylporphyrine selon la méthode de Little.....	142
3-2-Synthèse de la <i>para</i> -pyridyltritolylporphyrine selon la méthode de Lindsey.....	142
3-3-Caractérisation.....	143
3-3-1-Spectroscopie UV-visible.....	144
3-3-2-Spectrométrie de masse.....	144
3-3-3-Spectroscopie RMN ¹ H.....	145
4-Résultats et discussion.....	146
4-1-Synthèse des chloroacétates de cellulose.....	146

4-1-1-Acylation de la cellulose par le chlorure d'acide chloroacétique	146
4-1-2-Caractérisation structurale des chloroacétates de cellulose synthétisés.....	147
4-1-2-1-Spectroscopie Infra-rouge.....	147
4-1-2-2-Spectroscopie RMN ¹ H	148
4-1-2-3-Le rendement massique	149
4-1-2-4-Le degré de substitution.....	149
4-1-3-Etude cinétique de la réaction d'acylation.....	150
4-1-4-Etude de l'effet de la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique sur la réaction d'acylation	151
4-2-Synthèse des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques.....	152
4-2-1-Alkylation de la <i>para</i> -monopyridyltritylporphyrine par les chloroacétates de cellulose	153
4-2-2-Caractérisation des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques synthétisés	154
4-2-2-1-Spectroscopie Infrarouge	154
4-2-2-2-Spectroscopie UV-visible	156
4-2-2-3-Spectroscopie RMN ¹ H	156
4-2-2-4-Le degré de substitution en pyridylporphyrine	159
4-2-2-5-Le rendement molaire de la réaction d'alkylation	159
4-2-3-Influence de la température sur la réaction d'alkylation.....	160
4-2-4-Etude cinétique de la réaction d'alkylation	161
4-2-5-Synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques possédant divers degrés de substitution en pyridylporphyrine	162
CONCLUSION	163
CHAPITRE V : ETUDE PRELIMINAIRE D'ACTIVITE BIOLOGIQUE	165
1-Evaluation de la production d'oxygène singulet	167
2-Evaluation de l'activité photobactéricide des esters de cellulose porphyriniques	168
CONCLUSION GENERALE	175
CHAPITRE VI : PARTIE EXPERIMENTALE.....	177
1-Réactifs et solvants.....	179
2-Chromatographie.....	181
2-1-Chromatographie sur couche mince.....	181
2-2-Chromatographie sur colonne.....	181
3-Analyses.....	181
3-1-Température de fusion	181
3-2-Analyses élémentaires	182
3-3-Spectroscopie infrarouge	182
3-4-Spectroscopie UV-visible	182
3-5-Spectroscopie RMN.....	182
3-6-Spectrométrie de masse MALDI	183
3-7-Mise en forme des films plastiques (Casting).....	183
3-8-Calcul du degré de substitution en acide laurique par RMN du proton.....	183
3-9-Calcul du degré de substitution en acide chloroacétique par microanalyse	185
3-10-Calcul du degré de substitution en porphyrine par spectroscopie UV-visible.....	187
4-Appareillage.....	188
4-1-Activation micro-onde.....	188
4-2-Appareillage pour la production d'oxygène singulet	189
5-Protocole mis en œuvre pour l'étude de la phototoxicité des esters de celluloses porphyriniques	190
6-Synthèses.....	192
6-1-Dissolution de la cellulose.....	192
6-1-1-Méthode des échanges de solvant	192
6-1-2-Méthode sans échange de solvant	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	209

LISTE DES ABREVIATIONS

- A** bande de Soret : Absorbance de la bande de Soret
- AC** : Acétate de cellulose
- CIS** : Conversion Inter-Système
- DCC** : Dicyclohexylcarbodiimide
- DCI** : N,N'-carbonyldiimidazole
- DHE** : Dihématoporphyrine
- DMA** : N,N-Diméthylacétamide
- DMAP** : N,N-Diméthylaminopyridine
- DMF** : Diméthylformamide
- DMLA** : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DP** : Degré de polymérisation
- DS** acide laurique : Degré de substitution en acide laurique
- DS** chloroacétates : Degré de substitution en chloroacétates
- DS** max : Degré de substitution maximale de la cellulose
- DS** pphine : Degré de substitution en porphyrine **3** ou **5**
- DS** PpIX : Degré de substitution en protoporphyrine IX
- DS** Pypphine : Degré de substitution en pyridylporphyrine
- H₂TTP** : Tétratolylporphyrine
- Hp** : Hématoporphyrine
- HpD** : Hématoporphyrine dérivée
- I_{CH_3} : Intégration des protons méthyléniques des chaînes grasses
- I_g : Intégration des protons des unités glucidiques
- IR** : Infrarouge
- M** U.A.G : Masse molaire d'une unité anhydroglucose
- MALDI** : Désorption/Ionisation Laser Assistées par Matrice
- PDT** : Photothérapie dynamique
- PMNP** : Polymyxine Nanopeptide
- PP** : 4-Pyrrolidinopyridine

PpIX : Protoporphyrine IX

RMN ¹H : Résonance magnétique nucléaire du proton

THF : Tétrahydrofurane

TMPyP : 5,10,15,20-tétra(N-méthylpyridinium-4-yl)porphyrine

TsCl : Chlorure de tosyle (ou chlorure d'acide *para*-toluènesulfonique)

UAG : Unité anhydroglucose

uma : Unité de masse atomique

UV : Ultraviolet

ϵ bande de Soret : Coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret.

Introduction générale

Introduction générale

Composés macrocycliques tétrapyrroliques aromatiques, les porphyrines constituent une classe importante de molécules biologiques ubiquitaires. Leur conjugaison importante leur confère une forte coloration et parfois une photosensibilité. Elles sont entre autre impliquées dans les processus d'oxydo-réduction thermique ou photochimique. En raison de leur vaste domaine d'application, les chimistes se sont intéressés très tôt à leur synthèse. Elles sont utilisées comme catalyseurs régiosélectifs d'époxydation et d'hydroxylation ou encore pour la photodécomposition de l'eau. Ces composés intéressent également les chercheurs pour leurs applications biologiques en raison de leur photosensibilité. La photothérapie dynamique en est une illustration puisqu'elle permet de nos jours le traitement de certains cancers et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Cette technique utilisant l'action combinée de la lumière et de photosensibilisateurs pourrait permettre également de lutter contre la prolifération des microorganismes. En effet, la photothérapie dynamique antimicrobienne est une technique développée au cours de ces dernières années pour lutter contre les phénomènes de biorésistance des bactéries vis à vis des bactéricides classiques. L'agent toxique induit dans ce cas est l'oxygène singulet, espèce particulièrement réactive vis à vis de différents constituants cellulaires. Par ailleurs, des travaux menés dans notre laboratoire ont montré que l'on peut obtenir des matériaux plastiques en estérifiant la cellulose par des acides gras. Nous avons alors été amenés à utiliser cette propriété pour élaborer des films plastiques potentiellement photobactéricides à partir de cellulose, de porphyrines et d'acides gras. Dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation d'une série de laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques obtenus par esterification de la cellulose est présentée. Les photosensibilisateurs greffés de manière covalente au polysaccharide devraient permettre d'obtenir des matériaux photobactéricides. Dans ce but, des laurates de cellulose protoporphyriniques ont également été préparés. Dans ce cas, la présence de deux bras carboxyéthyles sur ce macrocycle d'origine naturelle devrait permettre d'améliorer sa fixation sur la chaîne cellulosique. Enfin, nous présentons également la synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques, obtenus par alkylation de la pyridylporphyrine par les chloroacétates de cellulose. Tous ces composés ont été caractérisés par diverses méthodes spectrales (UV-Visible, RMN ^1H , SM MALDI). Une

étude préliminaire d'activité biologique a également été réalisée sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* afin d'évaluer leur activité photobactéricide.

CHAPITRE I

Porphyrines – Cellulose

Mise au point bibliographique

Chapitre I

Porphyries – Cellulose

Mise au point bibliographique

1-Structure

Constituées de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthine, les porphyries sont des macrocycles fortement conjugués. Ces composés présentent un squelette de base aromatique, l'aromaticité étant due à un système de 18 électrons π (figure I-1). De ce fait, ces macrocycles présentent une grande stabilité ainsi qu'une forte coloration. En outre, les porphyries se comportent en fonction du pH comme des diacides ou des dibases, ce qui entraîne leur métallation par presque tous les métaux.^[1] Sous cette forme, ce sont alors d'excellents agents d'oxydoréduction, thermiques ou photochimiques et sont appelées porphyries métallées. Lorsqu'elles ne sont pas métallées elles portent le nom de porphyries bases libres.

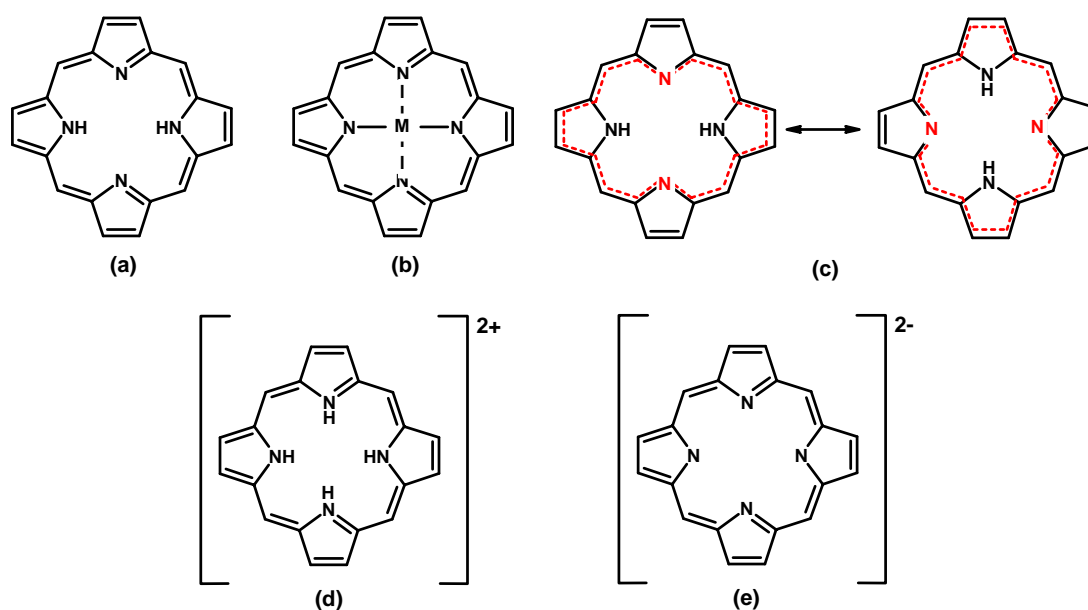


Figure I-1 : (a)- Porphyrine base libre ; (b)- Porphyrine base métallée ; (c)- Représentation du système de 18 électrons π aromatiques des deux formes limites ; (d)- porphyrine dicationique ; (e)- porphyrine dianionique.

Le premier système de nomenclature pour désigner les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques a été présenté par Hans Fischer^[2] dans les années 1930. La complexité des porphyrines synthétisées augmentant, une nouvelle nomenclature fut définitivement adoptée en 1987.^[3] Cette nomenclature reste toujours appliquée de nos jours pour la dénomination systématique de ces composés. Les carbones *meso* portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18. Les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote (figure I-2).

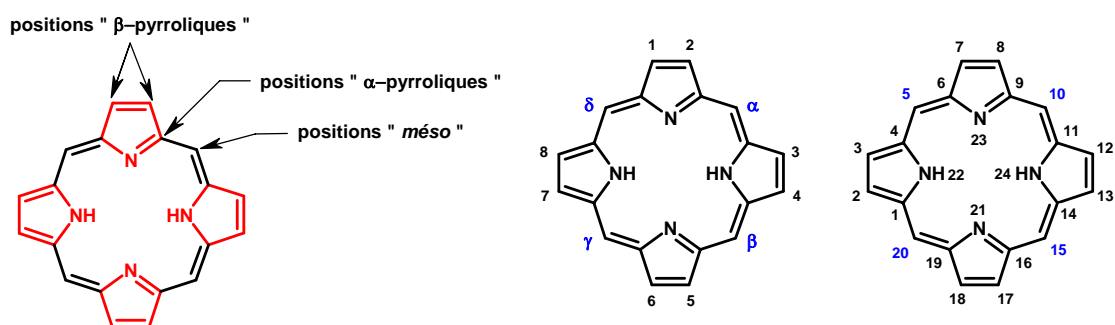


Figure I-2 : Système de nomenclature conventionnel du macrocycle.

Les différents agencements des substituants les uns par rapport aux autres autour du macrocycle des porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, induisent l'existence d'isomères de structure. Fischer les nomma « isomères types » et les numérotés en chiffres romains I, II, III, etc.

Par ailleurs, les substituants portés par les carbones *meso*, comme des groupements phényle par exemple, s'orientent hors du plan du macrocycle de sorte à limiter les interactions stériques avec les hydrogènes β -pyrroliques. Ces interactions, dans le cas des *meso*-arylporphyrines substituées en ortho sont à l'origine de l'existence d'atropoisomères notés $\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\beta\alpha\alpha$, $\alpha\beta\alpha\beta$ et $\alpha\beta\beta\alpha$ (figure I-3).

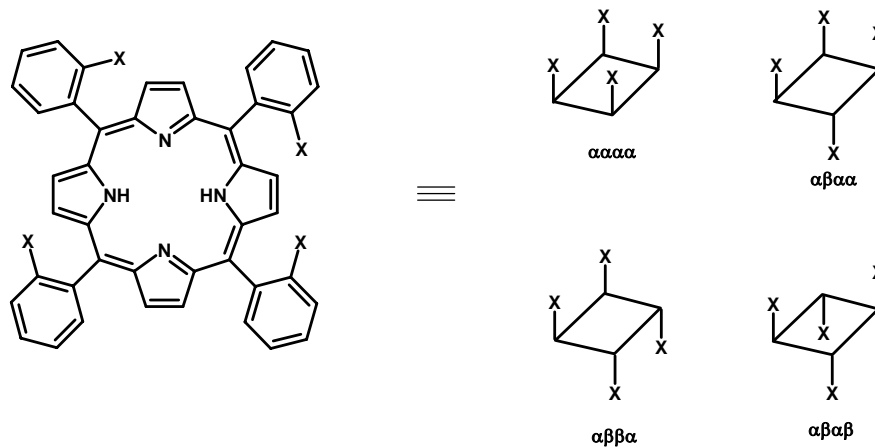


Figure I -3 : Représentation schématique des atropoisomères de *meso*-arylporphyrines.

Les macrocycles tétrapyrroliques sont très largement représentés dans les milieux vivants sous leur forme métallés et généralement associés à des protéines. Sous cette forme, ils participent à divers processus naturels d'oxydoréduction. La figure I-4 présente quelques exemples de tels pigments naturels (porphyrines ou macrocycles dérivés) choisis parmi les plus représentatifs.

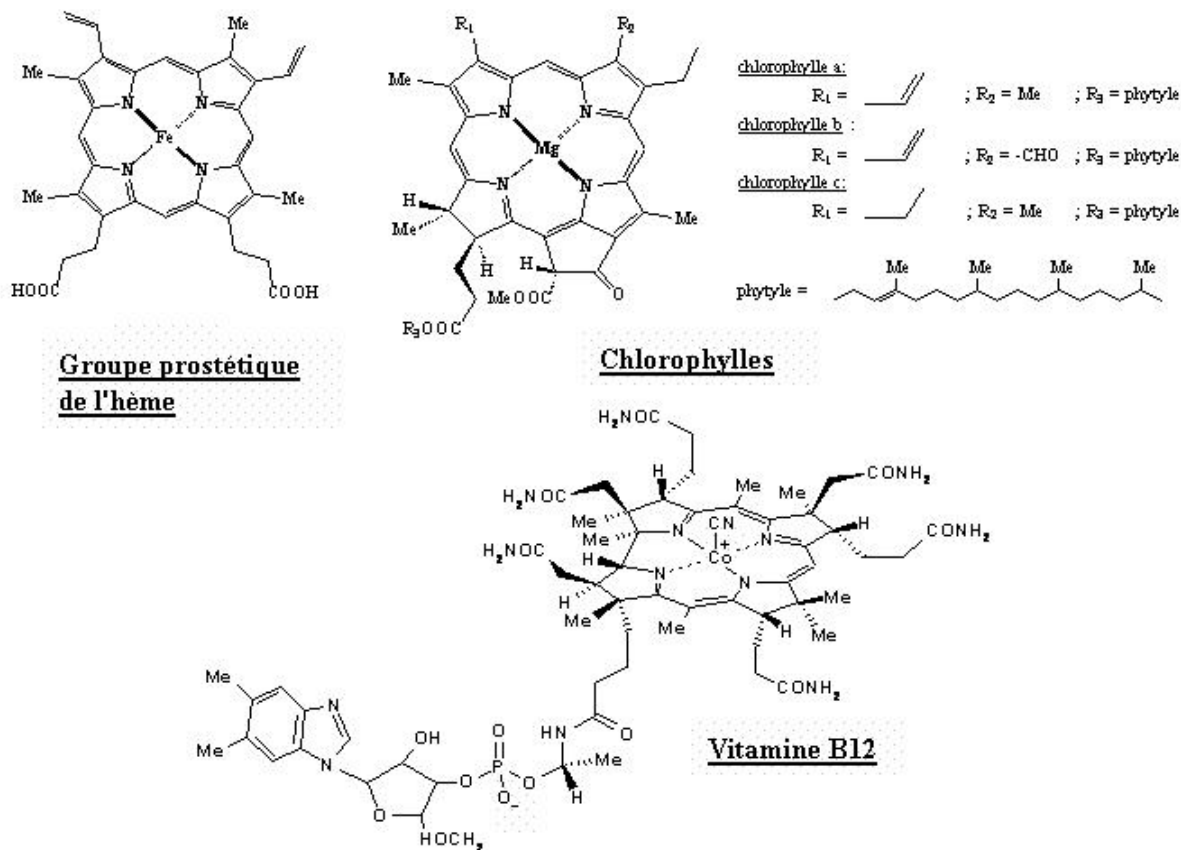


Figure I-4 : Exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les macrocycles tétrapyrroliques naturels sont impliqués dans de nombreux processus d'oxydoréduction thermique ou photochimique des milieux biologiques. Ainsi dans le règne animal, le transport des gaz respiratoires (O_2 , CO_2) est assuré par l'hémoglobine^[4], protéine dont le groupe prosthétique est une porphyrine, la protoporphyrine IX métallée par du fer au degré d'oxydation +II (l'hème).

La myoglobine quant à elle, présente une structure très proche de celle de l'hémoglobine possédant également l'hème comme groupe prosthétique. Elle participe au stockage de l'oxygène dans les tissus musculaires ainsi qu'à son transport vers les mitochondries.

Les cytochromes constituent une autre classe de métalloprotéines construites autour d'un noyau héminique. L'environnement protéique de ces molécules permet à l'atome de fer central de passer réversiblement du degré d'oxydation III au degré d'oxydation II. De ce fait, les cytochromes de la chaîne respiratoire, comme le cytochrome C par exemple, jouent le rôle de transporteurs d'électrons lors du processus de respiration cellulaire. Le cytochrome P450 quant à lui métabolise des composés xénobiotiques en catalysant leur oxydation ou leur réduction.^[5] Nous pouvons également citer comme exemple de macrocycles tétrapyrroliques naturels la vitamine B12 dont la structure est celle d'une corrine métallée par un atome de cobalt pouvant se trouver à divers degrés d'oxydoréduction. Cette molécule est le cofacteur de réactions de transméthylation et de réactions d'isomérisation. Associée à l'acide folique, elle intervient dans la transformation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase. En outre, elle est impliquée dans la formation des globules rouges. Une carence en vitamine B12 se traduit par une anémie, une accumulation d'homocystéine dans le sang responsable de problèmes cérébrovasculaires ainsi que par une raréfaction de la méthionine impliquée dans la production de myéline ce qui altère les transmissions nerveuses.

On rencontre également dans le monde végétal de tels pigments. Les chlorophylles par exemple, sont constituées d'un noyau tétrapyrrolique métallé par du magnésium et portant comme substituant notable un alcool à longue chaîne, le phytol. Ces molécules, par absorption de photons et transfert d'énergie, sont à l'origine de la photosynthèse.

2-Characterisation des porphyrines

2-1-Spectroscopie UV-Visible

Possédant un système d'électrons π fortement conjugué, ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique résultant de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Il se compose d'une bande intense ($\epsilon > 100000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre autres bandes situées entre 480 et 700 nm (Visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées bandes Q. La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible aux variations de structures, renseigne sur la substitution du macrocycle. En effet, les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants.^[6] On distingue ainsi essentiellement quatre types de spectres, appelés : *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo*^[7] (figure I-5).

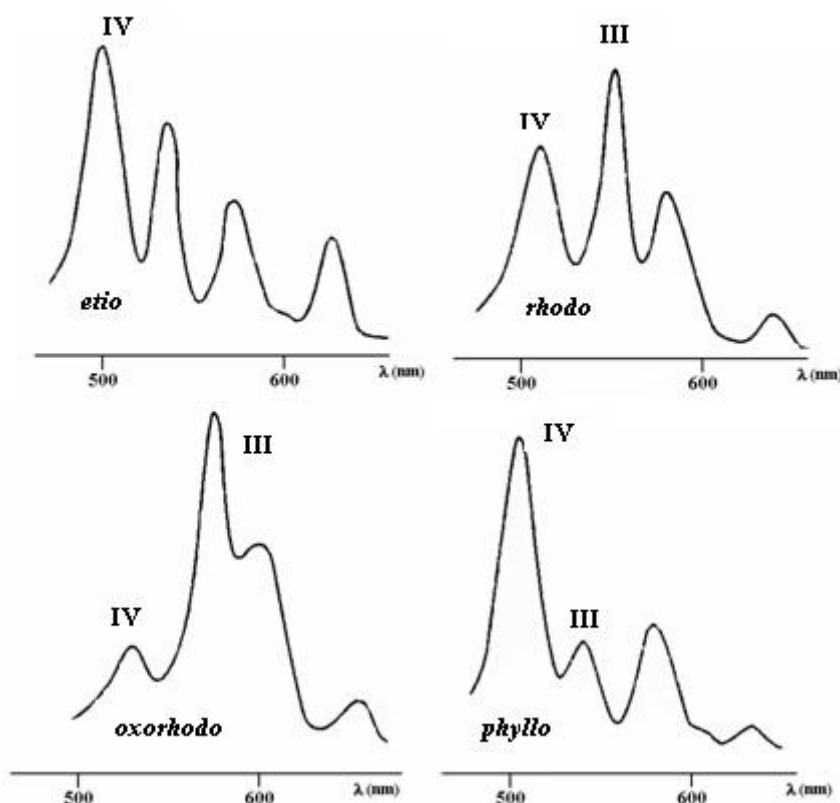


Figure I-5 : Profil des bandes Q pour les 4 principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres.^[7]

Dans les années trente, l'équipe de Hans Fischer^[2] a mis en évidence une série de corrélations empiriques entre les structures de porphyrines et les intensités relatives des bandes Q. Bien qu'il existe d'assez nombreux contre-exemples on rencontre généralement le type *etio* dans le cas de porphyrines β -substituées par au moins 6 groupements ou dans le cas de la plupart des *meso*-arylporphyrines. Les *meso*-porphyrines portant un substituant saturé (par exemple une chaîne alkyle) auront généralement quant à elles un spectre de type *phyllo*. La présence de groupements riches en électrons π (carbonyle...) en position β -pyrrolique génère un profil de spectre de type *rhodo* alors que la présence de deux de ces mêmes groupements en position β -pyrrolique sur deux pyrroles opposés conduit à un spectre de type *oxorhodo*.

Lorsque les porphyrines sont métallées ou protonées, le nombre de bandes d'absorption dans le domaine du visible est réduit à deux, la bande de Soret n'étant pas affectée. Les deux bandes Q sont alors nomées α et β en partant des grandes longueurs d'onde (figure I-6).

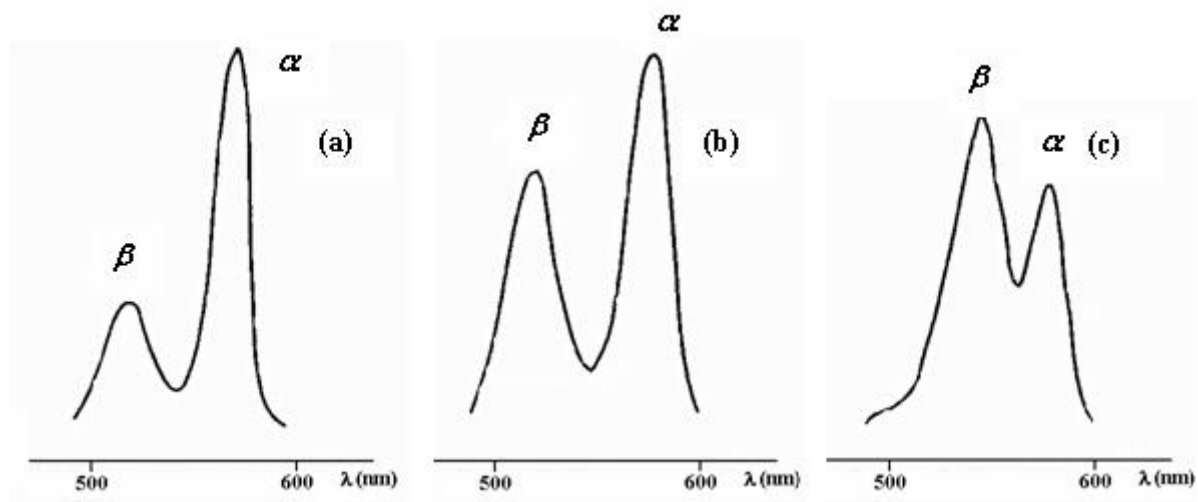


Figure I-6 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par: (a) Ni(II), (b) Zn(II), (c) Cd(II).

La substitution du macrocycle n'a dans ce cas que très peu d'influence sur les intensités relatives des bandes α et β . En revanche, la nature de l'ion métallique fixé, et par conséquent la plus ou moins grande stabilité du complexe porphyrine-métal, engendre d'importantes modifications du rapport des intensités de ces deux bandes. En effet, un rapport $\alpha/\beta > 1$ indique généralement la présence d'un métal impliqué dans un complexe plan, stable avec la

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

2-2-Résonance Magnétique Nucléaire

2-2-1-Spectroscopie RMN du proton

La résonance magnétique nucléaire du proton appliquée aux macrocycles porphyriniques fournit des spectres très caractéristiques. En effet, le courant de cycle induit par le champ magnétique imposé par l'appareil génère un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (figure I-7). De ce fait, les protons situés à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm.^[8]

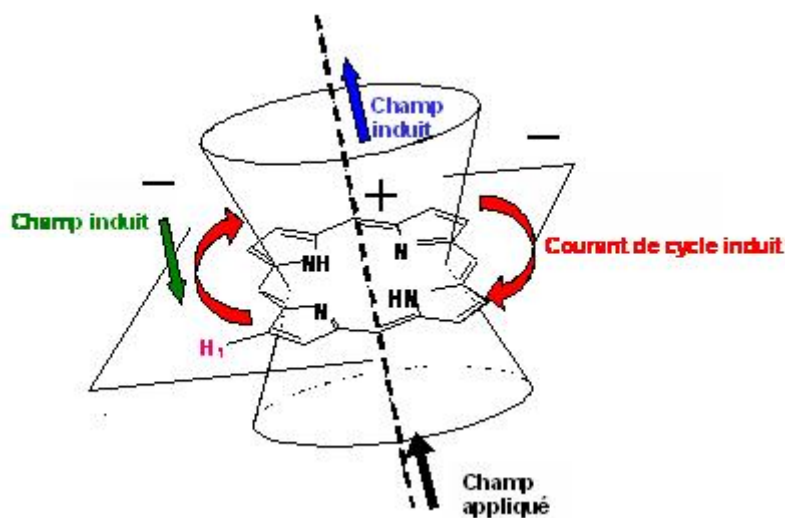


Figure I-7 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine.

Le spectre RMN ^1H de la porphine, porphyrine la plus simple non substituée, est constitué de 3 singulets à -3,76, 9,74 et 10,50 ppm. Ces signaux sont attribués respectivement aux protons liés aux atomes d'azote, aux protons des positions β -pyrroliques et aux protons méthines (position *meso*) (figure I-8).

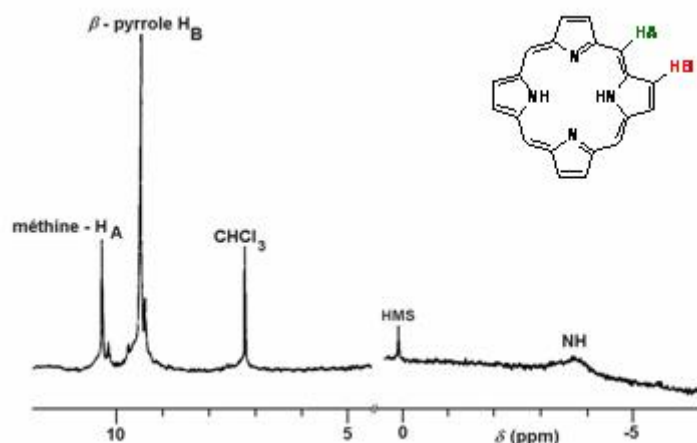


Figure I-8 : Spectre RMN ^1H de la porphine dans CDCl_3 .

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

La protonation du macrocycle tétrapyrrolique ainsi que la métallation affectent sensiblement le spectre RMN. L'augmentation du courant de cycle associée à un gain de symétrie de la molécule induits par la protonation sont responsables, selon Abraham^[9], d'un déblindage des protons périphériques et d'un blindage des protons internes. La métallation se manifeste quant à elle principalement par la disparition des signaux NH pyrroliques et conduit à des variations de déplacements chimiques des protons périphériques en fonction de la nature et du degré d'oxydation du métal ainsi que de la nature du ligand qui lui est associé.

Généralement, les constantes de couplage 3J entre les protons H- β -pyrroliques sont comprises entre 4,0 et 4,5 Hz. En ce qui concerne les constantes de couplage des protons des

substituants portés par le macrocycle, elles ne sont généralement pas remarquables et ne diffèrent pas de celles des substituants isolés.

2-2-2-Spectroscopie RMN du carbone 13

Bien que la résonance des noyaux soit relativement peu affectée par les courants de cycle en RMN du carbone 13, celle-ci demeure néanmoins très sensible aux effets électroniques. Le spectre RMN ^{13}C du macrocycle porphyrinique se compose essentiellement de trois zones :

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

Le signal correspondant aux carbones α -pyrroliques est généralement élargi et assez mal défini. Ceci est la conséquence directe de la tautomérie des protons NH internes. Ce phénomène peut également affecter dans certains cas la forme des signaux des carbones β -pyrroliques. Un abaissement de température (-60°C) permet de ralentir la tautomérie et à cette température on observe pour les carbones α -pyrroliques deux pics correspondant chacun à quatre carbones.^[10]

2-3-Spectrométrie de masse

Les porphyrines se caractérisant par une très faible volatilité, les techniques classiques d'ionisation ne sont généralement pas adaptées à l'étude par spectrométrie de masse de ces composés. Néanmoins, de très bons résultats sont obtenus en appliquant une méthode d'ionisation plus douce, comme les techniques SIMS (Secondary Ion Mass Spectroscopy) et MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization : Désorption/Ionisation Laser Assistées par Matrice). La spectrométrie de masse se révèle être une méthode d'investigation précieuse pour confirmer la structure d'une porphyrine, en permettant d'observer la masse molaire et éventuellement des fragmentations correspondant à la perte de groupements périphériques

La méthode MALDI permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes de haut poids moléculaire (figure I-9). Le composé à analyser, mélangé à un excès de molécules d'un composé servant de matrice, est adsorbé sur un support métallique. Le dépôt

est ensuite irradié par des impulsions laser courtes (quelques nanosecondes) dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. L'énergie délivrée par le laser est absorbée de manière sélective par la matrice conduisant à un phénomène de désorption et d'ionisation. Une faible partie de l'énergie absorbée est alors transmise sous forme d'énergie cinétique et d'énergie interne à la substance analysée provoquant l'éjection d'espèces moléculaires essentiellement intactes. Les ions produits sont généralement $[M+H]^+$, $[M-H]^+$ ou peuvent être issus de processus de cationisation comme $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$.

La nature de la matrice est importante. En effet, afin d'obtenir un dépôt homogène elle doit être soluble dans les mêmes solvants que la substance étudiée. De plus, elle doit présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Si l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) est une matrice couramment utilisée pour l'étude des macrocycles tétrapyrroliques, il existe néanmoins une gamme assez étendue de composés aux propriétés physico-chimiques variées pouvant être utilisés comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées.^[11] Les ions secondaires formés sont accélérés puis analysés en utilisant un système à temps de vol.

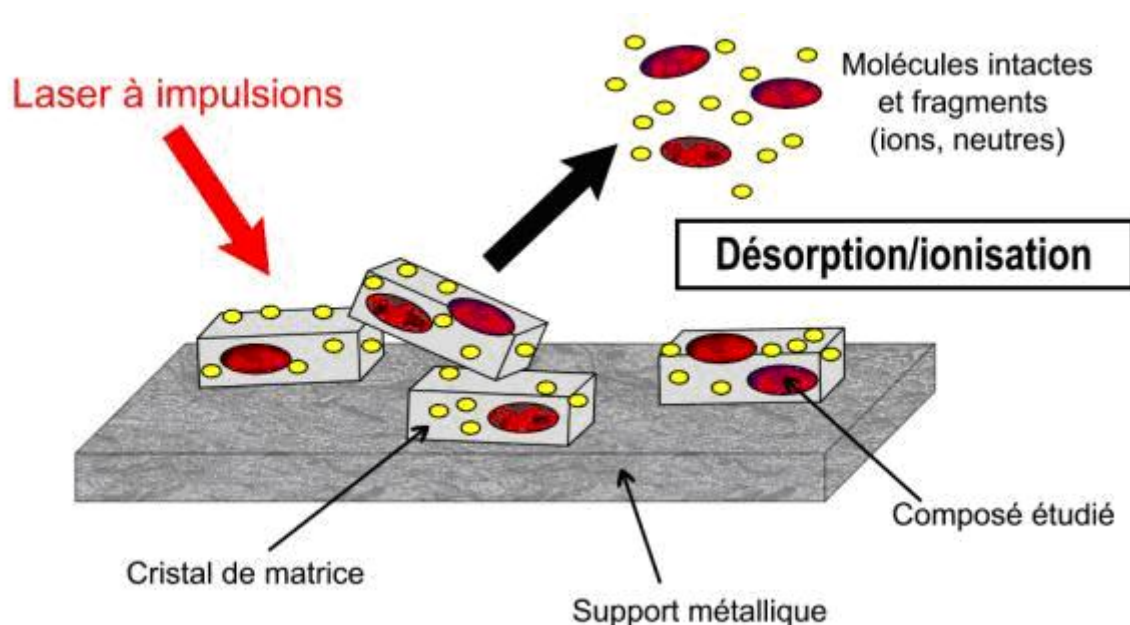


Figure I-9 : Principe de la technique MALDI.^[12]

3-Méthodes d'obtention de porphyrines

De nombreuses méthodes de synthèse ont été développées pour l'obtention des porphyrines. Ces différentes stratégies de synthèse reposent sur la condensation d'aldéhydes sur du pyrrole ou sur la condensation d'unités dipyrrométhane. Deux grands types de porphyrines ont ainsi été obtenus, les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques dont les structures sont proches de celles des porphyrines naturelles, et les porphyrines substituées en position *meso*, qui peuvent être substituées par quatre groupements identiques ou par des groupements différents (figure I-10).

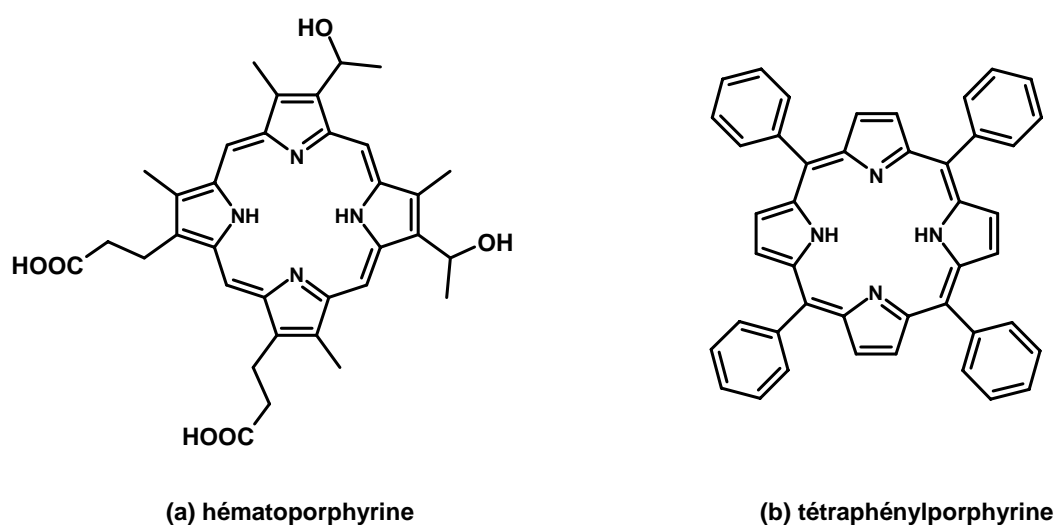


Figure I-10 : Exemples de porphyrines (a) β -substituée ; (b) *meso*-substituée.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la synthèse des *meso*-arylporphyrines.

3-1-Synthèse de *meso*-arylporphyrines

3-1-1-A partir d'aldéhydes et de pyrrole

En 1935 Rothemud^[13] synthétise la première *meso*-porphyrine par action de l'acétaldéhyde sur le pyrrole, dans le méthanol et sous atmosphère d'azote. Ainsi la *meso*-tétraméthylporphyrine, premier macrocycle tétrapyrrolique de synthèse a été obtenu avec de très faibles rendements. D'autres *meso*-porphyrines portant des substituants phényle, butyle ou propyle ont également été synthétisées selon la méthodologie précédemment décrite. Par la

suite, en faisant réagir dans une ampoule scellée, un excès de benzaldéhyde (4,9 moles) avec du pyrrole (3,6 moles) dans la pyridine à 220°C, Rothmund^[14] améliore sensiblement les rendements (5 %) (figure I-11).

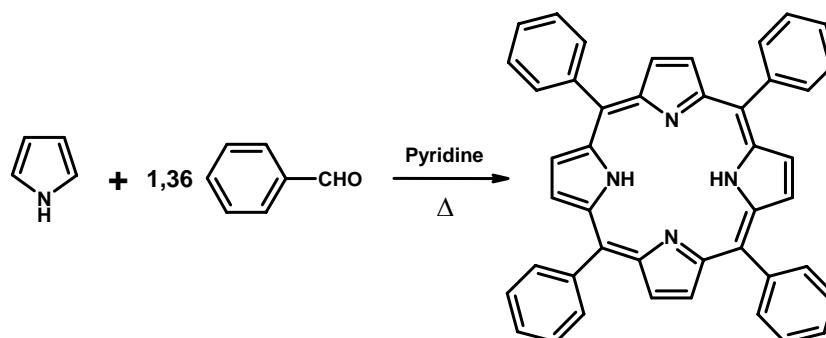


Figure I-11 : Méthode de Rothmund appliquée à la synthèse de la *meso*-tétraphénylporphyrine.

Ces rendements ont été doublés par Calvin et *coll.*^[15] toujours dans les mêmes conditions par ajout d'acétate de zinc au milieu réactionnel. C'est ainsi qu'en 1946, ils synthétisèrent la *meso*-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc avec un rendement de 11%.

Dans les années soixante, la synthèse de porphyrines obtenues par condensation de pyrrole et d'aldéhydes a connu un important progrès. En effet, en condensant cette fois-ci dans un réacteur à l'air libre, le pyrrole et le benzaldéhyde dans l'acide propanoïque à reflux, Alder et Longo^[16] ont obtenu la *meso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement de 20%. Cette méthode plus douce, en permettant l'utilisation d'aldéhydes plus variés et plus fragiles a permis l'obtention d'un large éventail de porphyrines *meso*-substituées symétriques.

Par la suite au cours des années soixante-dix, les chimistes se sont orientés vers la synthèse de *meso*-arylporphyrines asymétriques. Little et *coll.*^[17], par adaptation de la méthodologie d'Alder et Longo, ont réalisé les premières synthèses de *meso*-arylporphyrines asymétriques. Cette méthode dite des aldéhydes mixtes consiste à condenser dans l'acide propanoïque à reflux du pyrrole et deux aldéhydes différents (figure I-12).

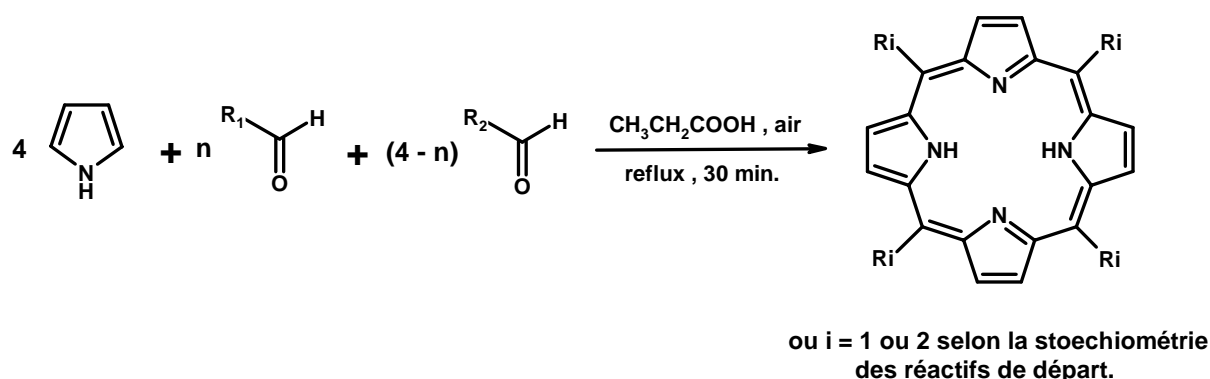


Figure I-12 : Méthode des aldéhydes mixtes.

Cette condensation statistique conduit, en fonction des quantités stœchiométriques de réactifs employés, à la formation d'un mélange de porphyrines préférentiellement substituées par un, deux, trois ou quatre groupements identiques. D'autre part, en utilisant la méthode des aldéhydes mixtes, pour condenser deux aldéhydes A et B de réactivité voisine comme le benzaldéhyde et le tolualdéhyde, sur le pyrrole, dans les proportions 3 : 1, la répartition statistique théorique attendue est la suivante : 31,64% de A_4 (porphyrine formée à partir de quatre molécules de A) ; 42,19% de A_3B ; 14,06% de *cis*- A_2B_2 et 7,03% de *trans*- A_2B_2 ; 4,69% de AB_3 et 0,39% de B_4 . Dans le cas de la synthèse de la monohydroxyphényltritolyldiporphyrine selon cette méthode, la réactivité moindre de l'hydroxybenzaldéhyde par rapport au benzaldéhyde implique que l'on obtient en pratique des pourcentages statistiques égaux de porphyrines A_4 et A_3B , limitant ainsi les rendements à environ 5 – 8 % en monohydroxyphényltritolyldiporphyrine. Toutes ces synthèses impliquent dans bien des cas de fastidieuses étapes de purifications chromatographiques. Cependant, la méthode de Little reste très couramment employée pour la synthèse de *meso*-porphyrines non symétriques, pouvant être facilement isolées par cristallisation.

Même si la méthode d'Alder et Longo, constitue un véritable progrès dans la synthèse de porphyrines, elle demeure cependant limitée. En effet, les conditions réactionnelles restent sévères ce qui empêche l'utilisation d'aldéhydes peu stables comme les aldéhydes glycosylés par exemple. Aussi, les purifications s'avérant particulièrement difficiles à cause entre autres des réactions de polymérisation du pyrrole, des synthèses de porphyrines en phase solide ont été recherchées. C'est ainsi qu'une méthode a été élaborée par Svirskaya et Lesnoff^[18] à la fin

des années soixante-dix afin de limiter les étapes de purification. Cette approche repose dans un premier temps sur l'immobilisation d'un aldéhyde, le 3- (ou 4-) hydroxybenzaldéhyde sur une résine polystyrène portant 1,7 mmol de chlorure d'acide par gramme de polymère puis, dans un second temps, à faire réagir ce support avec le pyrrole et le *para*-tolualdéhyde dans l'acide propionique à reflux (figure I-13).

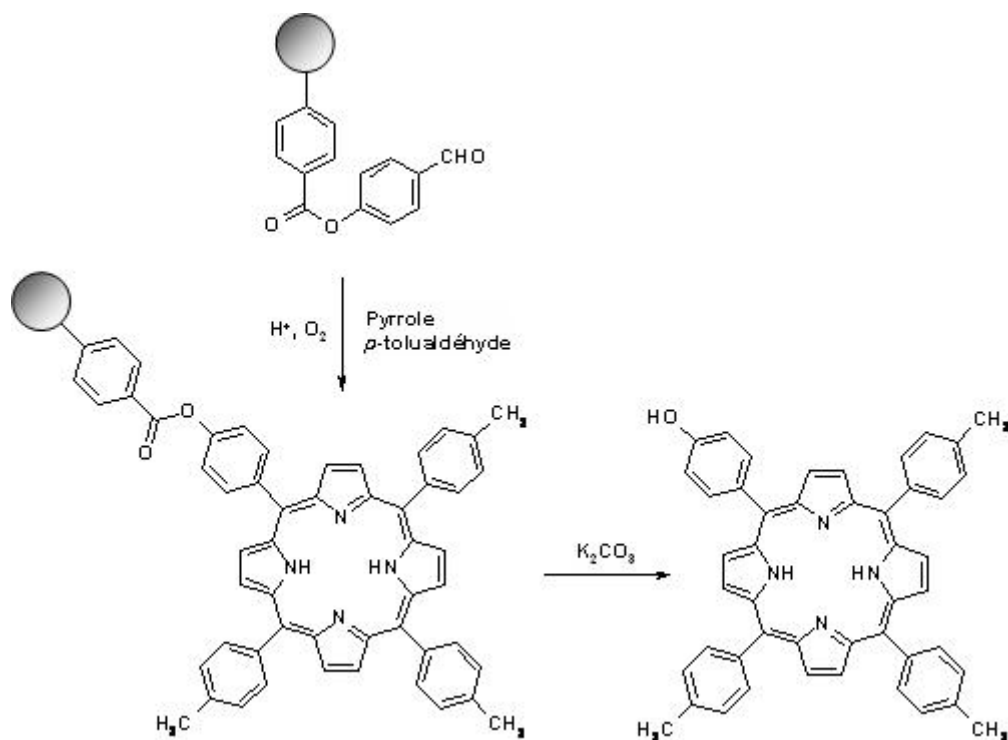


Figure I-13 : Synthèse de porphyrine sur support solide.

Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été à la hauteur de leurs attentes. Bien que la purification soit simplifiée, le rendement en monohydroxyphénylporphyrine reste très faible (de 2 à 4,5%). De plus cette stratégie est limitée car un des aldéhydes employés doit posséder une fonction permettant de le fixer sur la résine ce qui limite son domaine d'application. Plus récemment, d'autres stratégies de synthèse en phase solide ont été développées mais les résultats restent peu concluants.

Par la suite, dans les années 1980, Rocha et Gonsalvès^[19] ont mis au point une méthode de synthèse plus douce. En effet, ils ont démontré qu'un mélange de pyrrole et d'alkylaldéhyde en présence de quantité catalytique d'acide trifluoroacétique conduisait à un porphyrinogène pouvant être oxydé en *meso*-tétraalkylporphyrine correspondante avec un bon rendement. S'inspirant de cette méthode, Lindsey^[20] a préparé un large éventail de *meso*-

tétraarylporphyrines. Ainsi, en condensant dans du dichlorométhane rigoureusement anhydre le pyrrole et le benzaldéhyde, sous courant d'argon, à température ambiante et en présence d'acide de Lewis en quantité catalytique, il a obtenu, après oxydation par une quinone, la tétraphénylporphyrine avec un rendement de 46% (figure I-14). Dans ce cas le rendement est significativement amélioré par rapport aux méthodes précédemment décrites.

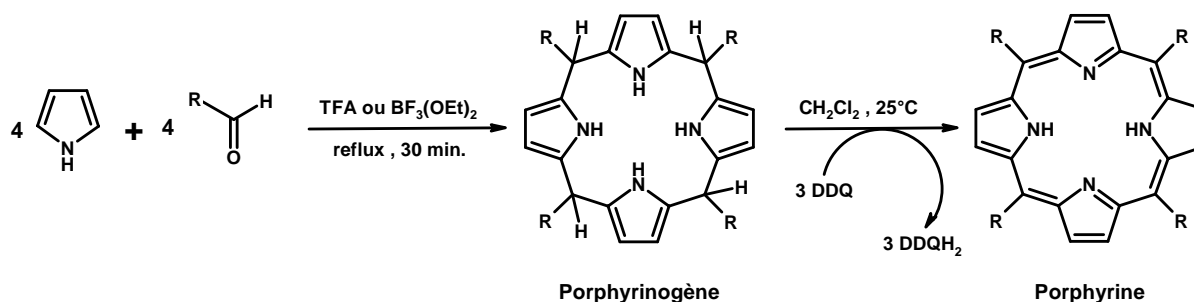


Figure I-14 : Méthode de Lindsey.^[20]

En permettant l'utilisation d'aldéhydes même peu stables, cette méthode a permis de synthétiser un très grand nombre de porphyrines symétriques. Cependant, les rendements se sont avérés très sensibles aux concentrations des réactifs mis en jeu. Les meilleurs rendements sont obtenus pour des concentrations très faibles en réactifs ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), en utilisant comme catalyseur des acides tels que le BF_3 -éthérate ou le TFA. La dilution permet de limiter en partie les réactions concomitantes de polymérisation du pyrrole et la formation d'oligomères comme les oligopyrrométhanés^[21] à partir de pyrrole et d'aldéhydes. Cette limitation dans la concentration des réactifs constitue un premier inconvénient pour cette méthode. Aussi en augmentant la dilution ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) et les temps de réactions, cette méthode peut être avantageusement utilisée pour la synthèse de *meso*-arylporphyrines non symétriques, notamment lorsque des aldéhydes particulièrement fragiles sont utilisés.

Si la synthèse des tétraarylporphyrines substituées par quatre groupements identiques est aujourd'hui bien maîtrisée, celle des *meso*-tétraarylporphyrines non symétriques reste délicate. Ces porphyrines sont encore majoritairement obtenues soit par la méthode des « aldéhydes mixtes » décrite par Little, soit par la méthode de Lindsey. Dans ces conditions, il y a toujours formation d'un mélange de porphyrines, nécessitant un fastidieux travail de purification chromatographique.

3-1-2-A partir d'unités dipyrrométhane

Une autre stratégie de synthèse permet d'obtenir des macrocycles tétrapyrroliques, il s'agit du couplage de deux unités dipyrrométhane. C'est au début des années quarante que Fisher^[22] a mis au point cette méthode, en condensant des unités dipyrrométhane dans l'acide succinique. Ainsi, l'étioporphyrine a pu être préparée avec un rendement de l'ordre de 60%.

Par la suite, cette méthodologie a été rapidement adaptée à la synthèse de *meso*-porphyrines. Ainsi, dans les années soixante, en condensant un 5,5'-bisformyldipyrrométhane avec un dipyrrométhane non substitué sur les positions 5 et 5', Woodward et MacDonald^[23] ont obtenu des porphyrines β -substituées. Cette méthode également connue sous le nom de méthode « 2+2 », passe par un porphyrinogène, oxydé par la suite par une quinone (figure I-15).

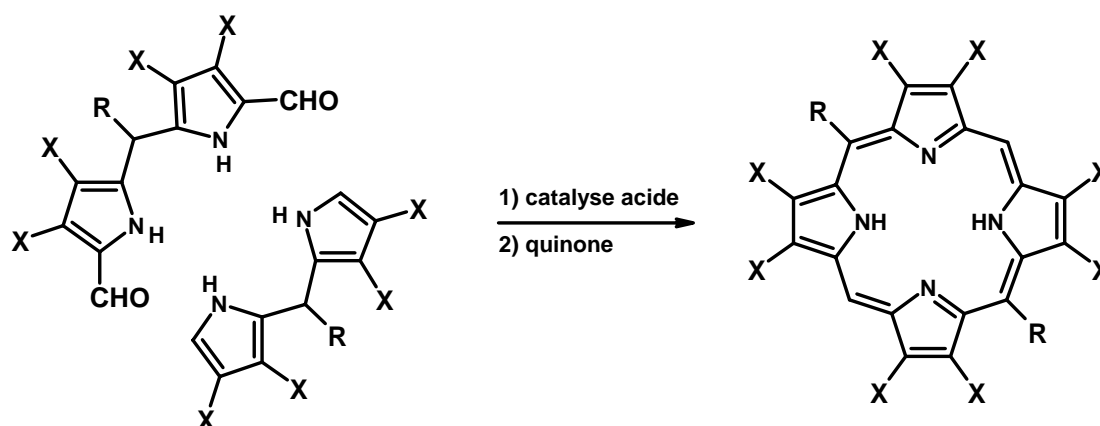


Figure I-15 : Procédure générale de la méthodologie de Woodward-MacDonald.^[23]

De nombreuses *meso*-porphyrines et plus particulièrement des *trans-meso*-porphyrines ont pu être ainsi obtenues. Cependant dans ces conditions, les rendements de synthèse sont très sensibles à la nature des réactifs employés, seules les *meso*-alkylporphyrines sont obtenues avec de bons rendements. Des efforts produits au cours de ces dix dernières années ont permis de développer la méthode de Woodward-MacDonald. En effet, elle s'avère fort intéressante car en imposant la géométrie d'une partie de la molécule, elle permet d'obtenir sélectivement des porphyrines *trans*-substituées. Ainsi Lindsey a récemment démontré qu'il est possible d'obtenir spécifiquement une *trans*-porphyrine en utilisant des dipyrrométhane encombrés comme le mésityldipyrrométhane^[24] (figure I-16). Il a obtenu de cette façon la 5,15-dimésityl-10,20-bis(4-méthylphényl)porphyrine avec un rendement de 48% sans observer la formation de l'isomère *cis*.

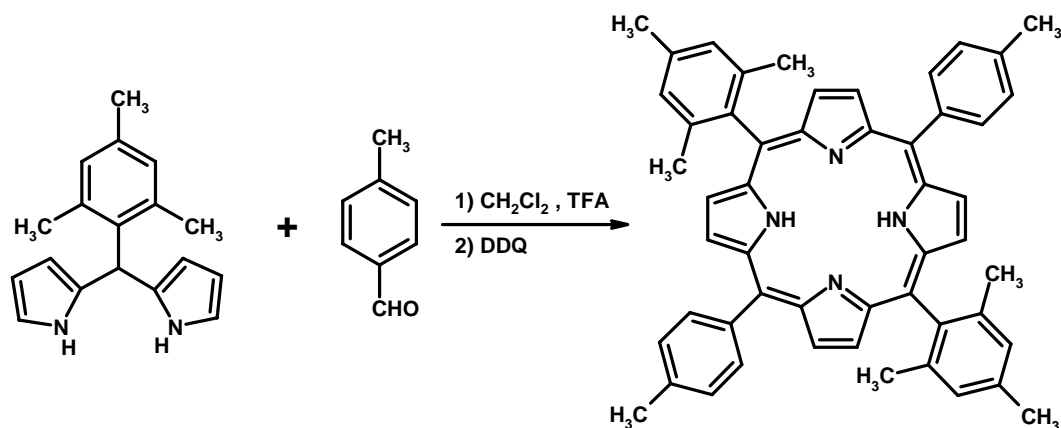


Figure I-16 : Adaptation de la méthode MacDonald « 2+2 » à la synthèse de *trans-meso*-porphyrines.

Plus récemment, en procédant à l'arylation de la porphine selon la méthode de Suzuki ; Wheelhouse et Shi^[25] ont obtenu une série de tétraarylporphyrines symétriques avec des rendements de 70%, permettant ainsi de réduire les pertes et donc les coûts de revient de ces synthèses (figure I-17). Cependant, la limite de cette méthode réside dans l'obtention de la porphine du fait des faibles rendements de synthèse de cette dernière.

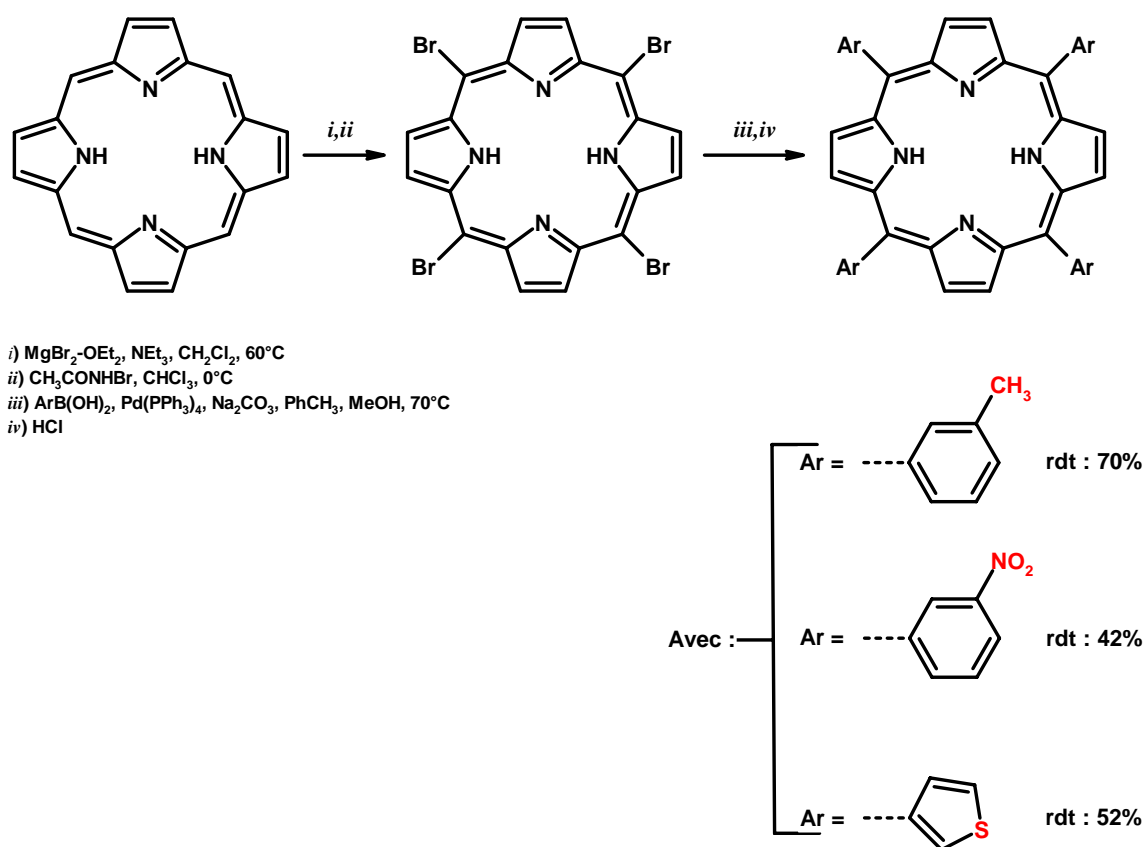


Figure I-17 : Arylation de la porphine selon Wheelhouse et Shi.^[25]

3-2-Obtention de porphyrines β -substituées à partir de pigments naturels

Certains macrocycles tétrapyrroliques naturels peuvent être obtenus à partir du monde vivant. Dans ce cas, ce sont des porphyrines β -substituées. Ainsi, la protohème plus connue sous le nom de chloroporphyrine de fer (III), est le dérivé porphyrinique le plus abondant dans les organismes des animaux. Elle existe en effet dans l'hémoglobine et la myoglobine. Elle est généralement isolée à partir de sang. La protoporphyrine IX est obtenue par simple démetalation de la protohème IX. La *mesoporphyrine IX* et l'*hématoporphyrine IX* sont obtenues par modification des bras vinyliques (figure I-18).

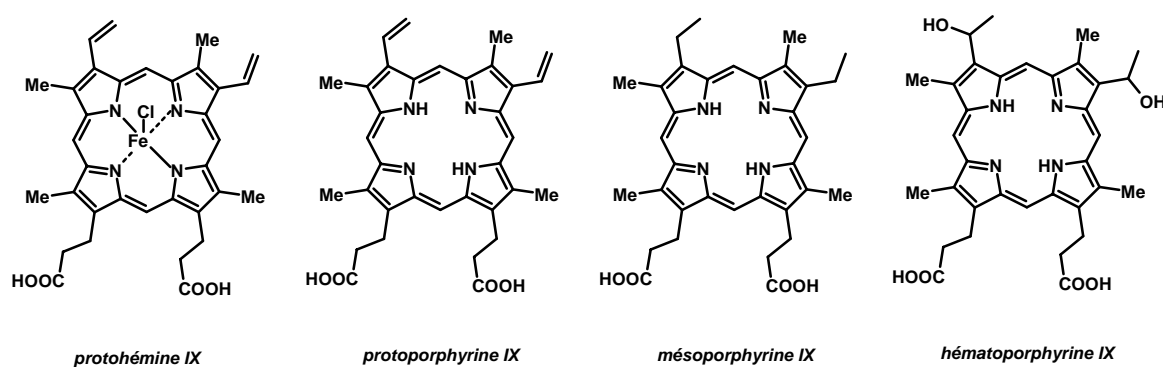


Figure I-18 : Structures de la protohème et dérivés.

D'autres dérivés porphyriniques naturels sont à la base d'un grand nombre de préparation de porphyrines β -substituées et de leurs dérivés. Par exemple les chlorophylles *a* et *b*, sont extraites à partir des feuilles des végétaux. Ainsi la méthanolyse de la chlorophylle *a* fournit la chlorine-e6 triméthylester. D'autres dérivés porphyriniques ont également pu être obtenus par modification chimique de la chlorophylle *a*, notamment la phylloporphyrine XV diméthylester et la pyrroporphyrine XV diméthylester (figure I-19).

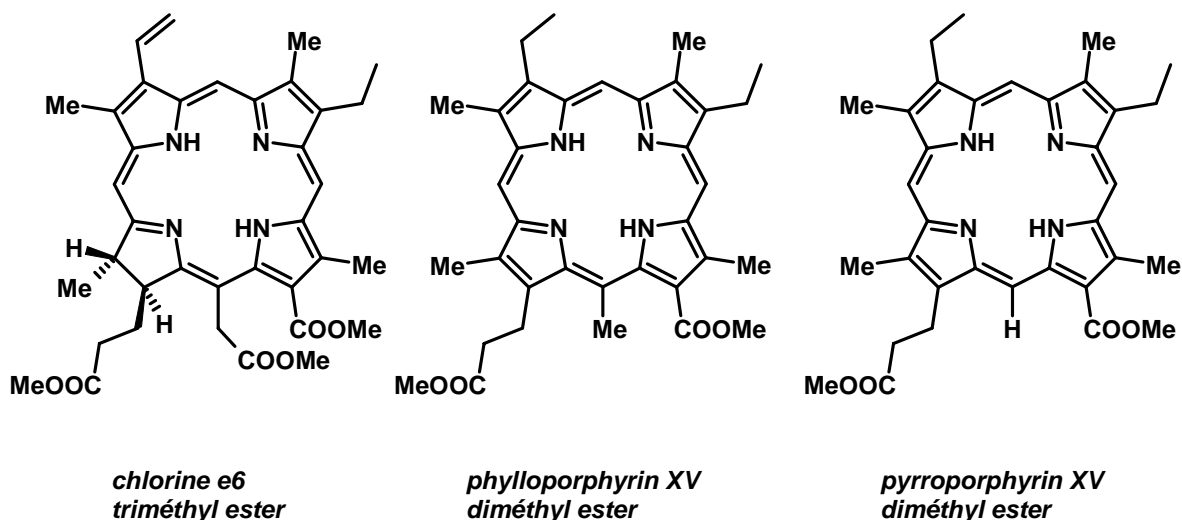


Figure I-19 : Macrocyclus tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a.

4-Domains d'applications des porphyrines

Rappelons qu'en raison de leur structure électronique particulière, les porphyrines présentent souvent une photosensibilité importante. Par ailleurs, elles peuvent se trouver métallées, ce sont alors d'excellents agents d'oxydoréduction thermique ou photochimique. Aussi, leur structure macrocyclique tétrapyrrolique constitue un squelette rigide stable, pouvant être fonctionnalisé par de nombreux groupements fonctionnels. Pour toutes ces raisons les porphyrines ont attiré l'attention des chimistes dans de vastes domaines comme :

- la catalyse d'oxygénation de substrat organique,
- la dégradation de matière organique,
- la photodécomposition de l'eau,
- ou encore les matériaux pour l'optoélectronique.

Ces composés, intéressent également les chercheurs pour leurs propriétés biologiques en raison de leur photosensibilité. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés dans le paragraphe suivant aux applications thérapeutiques.

5-Applications thérapeutiques des porphyrines

5-1-La photothérapie dynamique des cancers

Le principe de la photothérapie dynamique (PDT) repose sur l'utilisation combinée de la lumière et d'un photosensibilisateur. Cette technique originale de par son principe, présente l'avantage de ne provoquer que peu ou pas d'effet secondaire par rapport aux autres thérapies anticancéreuses que sont la chimiothérapie ou la radiothérapie.

5-1-1-Historique de la photothérapie dynamique

Le premier cas de sensibilisation a été décrit par Raab en 1900^[26], lorsqu'il traita des paramécies par de l'acridine en présence de lumière. Raab mit en évidence que ces protozoaires étaient détruits seulement en présence de ces deux facteurs : l'acridine et la lumière.

Tappenier et Jesionek^[27], deux médecins allemands ont introduit le concept de photothérapie dynamique pour la première fois en 1903, en traitant un sujet atteint d'un cancer de la peau par l'action combinée de l'éosine et de la lumière blanche. Par la suite, Hausman^[28] en 1908 et Meyer-Betz^[29] en 1913 ont démontré que le pouvoir photosensibilisant de l'hématoporphyrine (Hp) est fonction de la quantité de Hp et de la quantité de lumière. L'accumulation sélective de porphyrines endogènes a été mise en évidence pour la première fois par Policard^[30] en 1924. En effet, il a observé une fluorescence rouge dans les tumeurs après irradiation par une source lumineuse ultraviolette qu'il attribua à l'accumulation de porphyrines endogènes dans les cellules cancéreuses. Puis, en mettant en évidence une fluorescence émise au niveau des tumeurs après une excitation par une lampe à ultraviolet, Figge et Weiland^[31] en 1948 ont confirmé l'affinité de l'Hp pour les tissus néoplasiques. Ces travaux ont donc démontré le potentiel des porphyrines, notamment l'Hp pour le traitement de certains types de cancer. Cependant, le manque de sélectivité du phototosensibilisateur pour les tissus cancéreux^[32] peut induire des lésions graves des tissus sains environnants lors de la PDT.

En traitant l'Hp commerciale par un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique suivi d'une hydrolyse alcaline, Lipson et coll.^[32] ont obtenu un dérivé de l'Hp appelé

« hématorporphyrine dérivée » (ou HpD). Ce dernier s'est avéré plus apte à optimiser la sélectivité des porphyrines vis à vis des tumeurs.

Ce n'est que dans les années 70 que la PDT prend son véritable essor avec les travaux de Dougherty^[33]. En effet, l'éradication totale de tumeurs transplantées chez la souris sans effets secondaires cutanées par action de l'HpD et de lumière rouge émise par une lampe à arc à Xénon est à mettre à son actif. C'est en 1978 que Dougherty^[34] publie les résultats des premiers essais cliniques. Weishaupt^[35] montre parallèlement que la formation d'oxygène singulet est provoquée par l'absorption d'énergie lumineuse par la HpD permettant ainsi la destruction de tissus. Enfin, Dougherty^[36] identifie en 1983 la fraction active de l'HpD responsable des propriétés photosensibilisantes de ce mélange initial. Il s'agit de l'éther de dihématoporphyrine (DHE) (figure I-20).

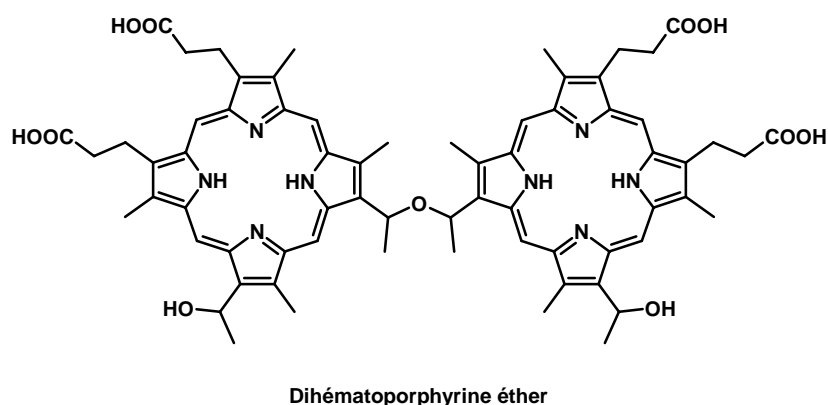


Figure I-20 : Structures de la dihématoporphyrine éther.

Actuellement, la fraction purifiée de l'HpD est commercialisée sous le nom de Photofrin II[®] et est utilisée cliniquement pour soigner différents types de cancers tel que le cancer de la peau, du poumon, de l'œsophage, de la vessie, de l'estomac, ou encore du col de l'utérus. Traitement peu traumatisant et peu agressif, la PDT connaît de ce fait un engouement croissant de la part de nombreuses équipes scientifiques.

5-1-2-Principe de la photothérapie dynamique

Technique thérapeutique originale et innovante basée sur la destruction sélective des cellules tumorales au sein d'un tissu par l'action combinée d'un photosensibilisateur et de lumière, la PDT peut être utilisée pour deux applications : une application thérapeutique mais aussi une application diagnostique.

Rappelons que sur la plan thérapeutique, l'illumination d'un tissu présentant une tumeur enrichie en porphyrine induit des réactions chimiques oxydatives entraînant des altérations cellulaires irréversibles aboutissant à la destruction du tissu tout en préservant les tissus sains dépourvus de photosensibilisateur.

Par ailleurs, les porphyrines peuvent également être utilisées pour les diagnostics ou photodiagnostiques. Dans ce cas le photosensibilisateur excité par une lumière de longueur d'onde appropriée émet une fluorescence. L'analyse de cette émission de fluorescence permet de cibler avec précision les lésions néoplasiques avec une grande sensibilité.

Le principe de ces deux applications est représenté sur la figure figure I-21.

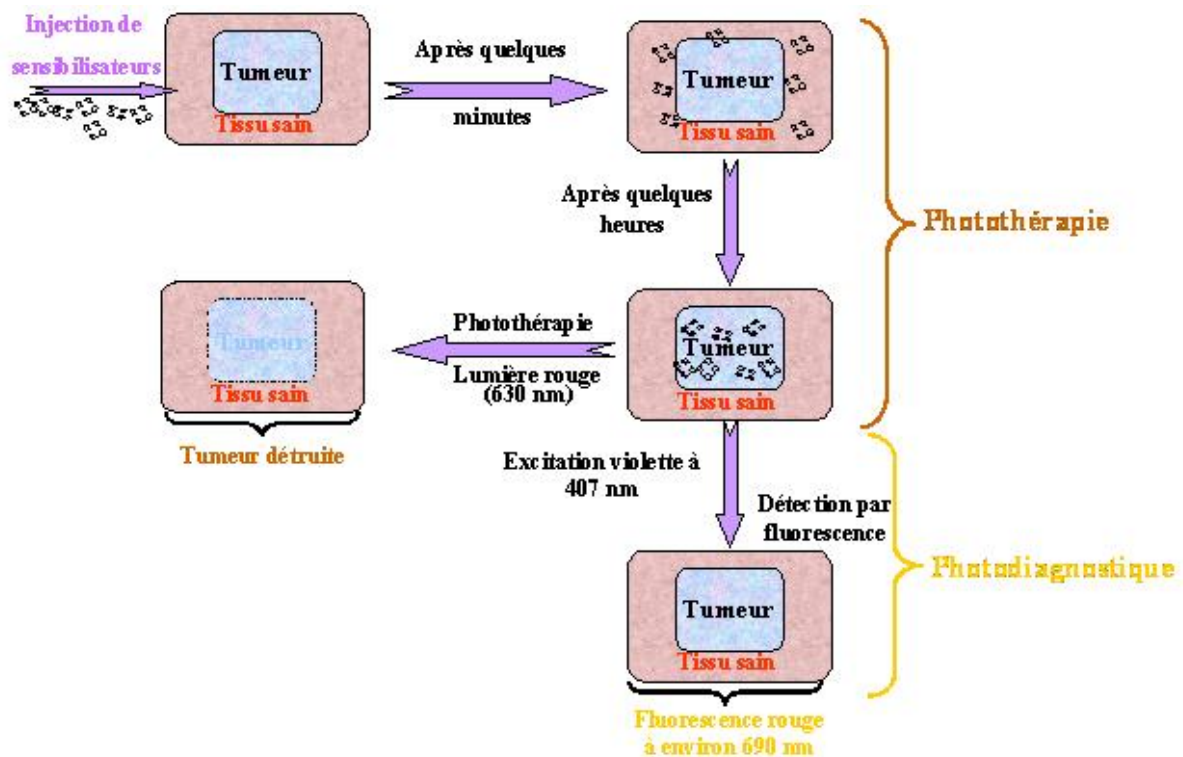


Figure I-21 : Principe de la photothérapie dynamique avec ses deux composantes thérapeutique et photodiagnostique.

Dans un premier temps, le photosensibilisateur est injecté par voie intraveineuse chez le patient. Puis par le biais de la circulation sanguine il est réparti dans l'organisme. Il est par la suite incorporé préférentiellement dans les tissus tumoraux. L'exposition à la lumière rouge (environ 630 nm) aboutit après une succession de processus photochimiques à la mort des cellules tumorales par apoptose ou par nécrose. L'illumination par une lumière violette à 407

nm, entraîne quand à elle, la fluorescence rouge (à 690 nm environ) permettant ainsi un diagnostic topographique. Cependant, si ce principe semble séduisant, il se heurte à de nombreuses contraintes. De plus, le processus réactionnel aboutissant à la destruction tumorale est encore mal connu.

5-1-3-Les processus photochimiques

Le processus photochimique commence par l'illumination du photosensibilisateur par une lumière visible (figure I-22). Cette irradiation induit l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ par le photosensibilisateur puis entraîne son passage du niveau d'énergie fondamentale S_0 à un état singulet excité noté S_1 . A partir, de là deux possibilités s'offrent au photosensibilisateur : retour à l'état fondamental S_0 avec émission de fluorescence ou bien, si la durée de vie de l'état singulet excité est suffisamment longue (ce qui est souvent le cas pour les porphyrines) passer dans un état excité triplet (noté T_1) par inversion de spin électronique au cours d'un processus appelé conversion intersystème (C.I.S). Dans ce cas, le retour à l'état fondamental transition théoriquement impossible est très lent. La porphyrine peut se désactiver par phosphorescence ou en réagissant avec son environnement selon deux mécanismes différents et de ce fait revenir à son état fondamental :

Mécanisme de type I :

Au cours du mécanisme de type **I**, le photosensibilisateur dans son état excité triplet est impliqué dans un processus de transfert d'électron avec des substrats biologiques pour former des radicaux et des ions radicaux qui, après interaction avec l'oxygène fournissent des espèces réactives de l'oxygène comme les ions superoxydes $O_2^{\cdot-}$.

Mécanisme de type II :

Au cours du mécanisme de type **II**, le transfert d'énergie d'excitation a lieu vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour former une espèce d'oxygène excité de courte durée de vie mais extrêmement réactive appelée oxygène singulet.^[37] Ce dernier peut diffuser sur de courtes distances et réagir avec des substrats environnants comme par exemple certains acides aminés, conduisant à l'altération de bon nombre de protéines membranaires mais également à la *peroxydation* des lipides insaturés. Ces processus photochimiques sont présentés sur la figure suivante.

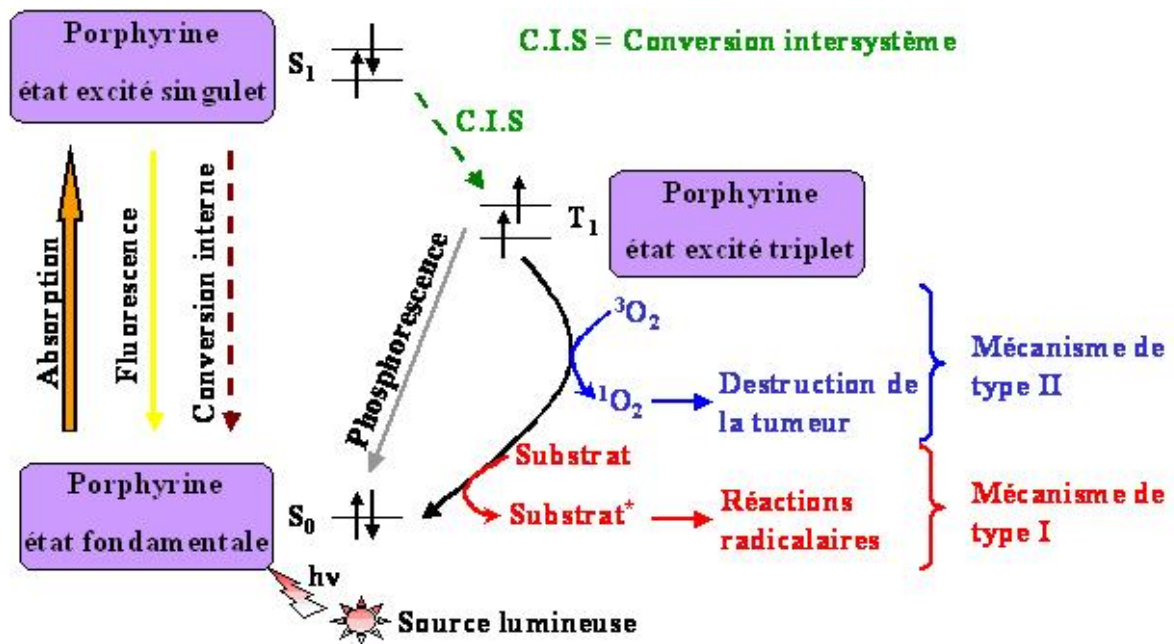


Figure I-22 : Mécanisme photochimique de la PDT.^[38]

L'ensemble de ces processus provoquant l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, d'un point de vue structural mais aussi métabolique entraîne la mort cellulaire. Les mitochondries ainsi que les membranes, les lysosomes ou encore le noyau ont été identifiés comme étant des cibles majeures.^[39] Aussi la PDT peut se traduire par de sérieux dommages à l'ADN. Il est maintenant couramment admis que l'oxygène singulet est l'agent toxique principal en PDT bien que sa production soit extrêmement difficile à quantifier dans les milieux biologiques.

5-1-4-Les photosensibilisateurs utilisés en PDT

Les photosensibilisateurs ainsi que leur développement doivent respecter plusieurs critères :

- ne présenter aucune toxicité en absence de lumière,
- avoir une grande sélectivité vis à vis des cellules cancéreuses afin de ne pas endommager les tissus sains voisins,
- une forte absorption dans le domaine du visible,
- une durée de vie plasmatique suffisante,

- avoir un rendement quantique en oxygène singulet élevé afin d'induire des réactions photochimiques...

Parmi les photosensibilisateurs commercialisés, citons le Photofrin II[®] et le Foscan[®]. Le photofrin est un mélange de mono et d'oligomères formés de ponts éthers, esters et carbone-carbone, obtenu par purification partielle par chromatographie de la HpD. Dougherty et *coll.*^[40] ont démontré que seuls les dimères et trimères pont éther présentent une activité anti-tumorale significative.

Contrairement au Photofrin, le Foscan[®] ou tétra-(méta-hydroxyphényl)chlorine est un composé pur, ce qui limite ainsi les incertitudes des résultats souvent liés à la composition des médicaments. D'autres sensibilisateurs dits de seconde génération sont en cours de développement clinique. Nous citerons comme exemple, le Levulan[®] ou acide 5-aminolévulinique, précurseur de la protoporphyrine ; le Lutrin[®], téxaphyrine de lutétium. Plus récemment il a été montré dans notre laboratoire que les porphyrines pouvaient être vectorisées vers les cellules cancéreuses en utilisant des polyamines comme la spermine et la spermidine.^[41] Ces photosensibilisateurs sont utilisés au cours du traitement photodynamique de nombreux types de cancers comme les tumeurs du cou, de la tête, du sein et des systèmes respiratoire et gastrique. Nous présentons à titre d'exemple, la structure de quelques photosensibilisateurs sur la figure suivante (figure I-23).

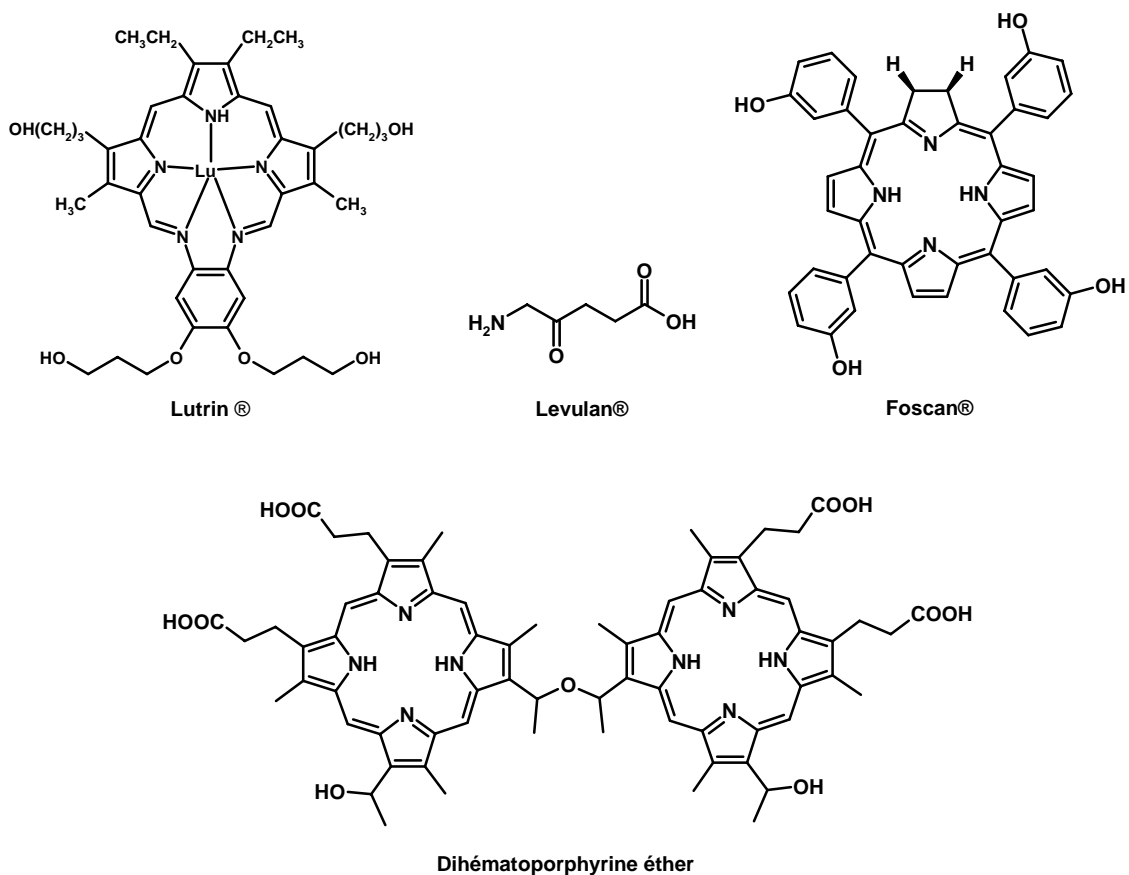


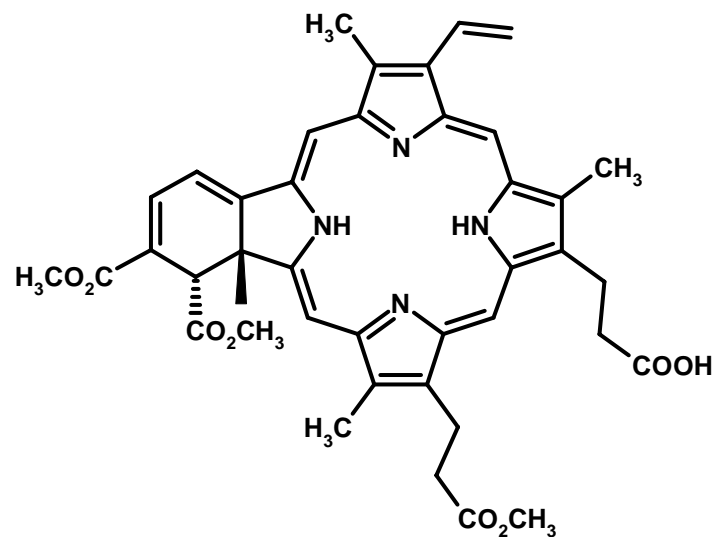
Figure I-23 : Structure de quelques photosensibilisateurs.

5-2-Utilisation en tant qu'agents antiviraux

L'ADN peut être endommagé par les porphyrines. En effet, les porphyrines cationiques présentant une forte affinité pour l'ADN sont capables de causer par voie chimique ou photochimique des coupures simple ou double brin. Ainsi la photosensibilisation de virus par les macrocycles porphyriniques conduit à leur inactivation. Ainsi en traitant *in vivo* des virus par des doses d'hématoporphyrine très peu toxique pour les cellules saines, Perlin et *coll.*^[42] ont montré que certains virus peuvent être inhibés. Les résultats les plus encourageants ont été observés avec le virus influenza A et le virus de l'herpès simplex de type 1. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut également être inhibé par certains dérivés d'amino- ou d'hydroxyphénylporphyrine. L'activité n'est dans ce cas pas photochimique mais semble être liée à l'inhibition de la rétrotranscriptase virale.^[43]

5-3-Utilisation dans le traitement de la cécité

Maladie dégénérative de la rétine, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie atteignant les vaisseaux sanguins proliférant sous la rétine. Cette pathologie atteint 2 % des 50-60 ans et jusqu'à 25 % des personnes âgées de plus de 80 ans. Dans les cas les plus graves, les vaisseaux anormaux non étanches prolifèrent sous la rétine altérant ainsi la vision centrale. Seule la photocoagulation des néovaisseaux par un laser thermique permet de la traiter, brûlant malheureusement une partie de la rétine. Depuis avril 2000, une vertéporfine nommée Visudyne[®], est utilisée pour soigner cette maladie (figure I-24). En effet, la vertéporfine en s'accumulant naturellement et rapidement dans les vaisseaux rétinien permet après son activation par un laser optique, l'obstruction des vaisseaux tout en épargnant la rétine. Ce type de traitement peut être renouvelé plusieurs fois jusqu'à ce que le patient soit guéri.^[44]



Vertéporfine

Figure I-24 : Structure de la vertéporfine.

5-4-La thérapie photodynamique antimicrobienne

Si l'effet photodynamique des porphyrines est largement reconnu en cancérologie ; un autre effet a été mis en évidence ces dernières années : l'effet anti-microbien. L'activité photobactéricide des porphyrines a été en outre démontrée par Merchat^[45], Nitzan^[46] et également dans notre laboratoire.^[47,48] En effet une étude réalisée au L.C.S.N a montré l'effet

antibactérien de porphyrines base libre nitroglucosylées et polyaminées (figure I-25) sur des bactéries Gram⁺ et Gram⁻. Les bactéries Gram⁻ sont souvent inhibées en utilisant de manière combinée un photosensibilisateur et un nonapeptide (PMNP).^[49] Ce PMNP en désorganisant la membrane bactérienne permet à la porphyrine de pénétrer à l'intérieur de la bactérie. Ce principe basé comme la P.D.T sur l'utilisation combinée de sensibilisateur et de lumière visible, semble être une approche prometteuse pour l'inactivation de certains microorganismes^[50-53] dont certains sont multirésistants.^[48,53-54]

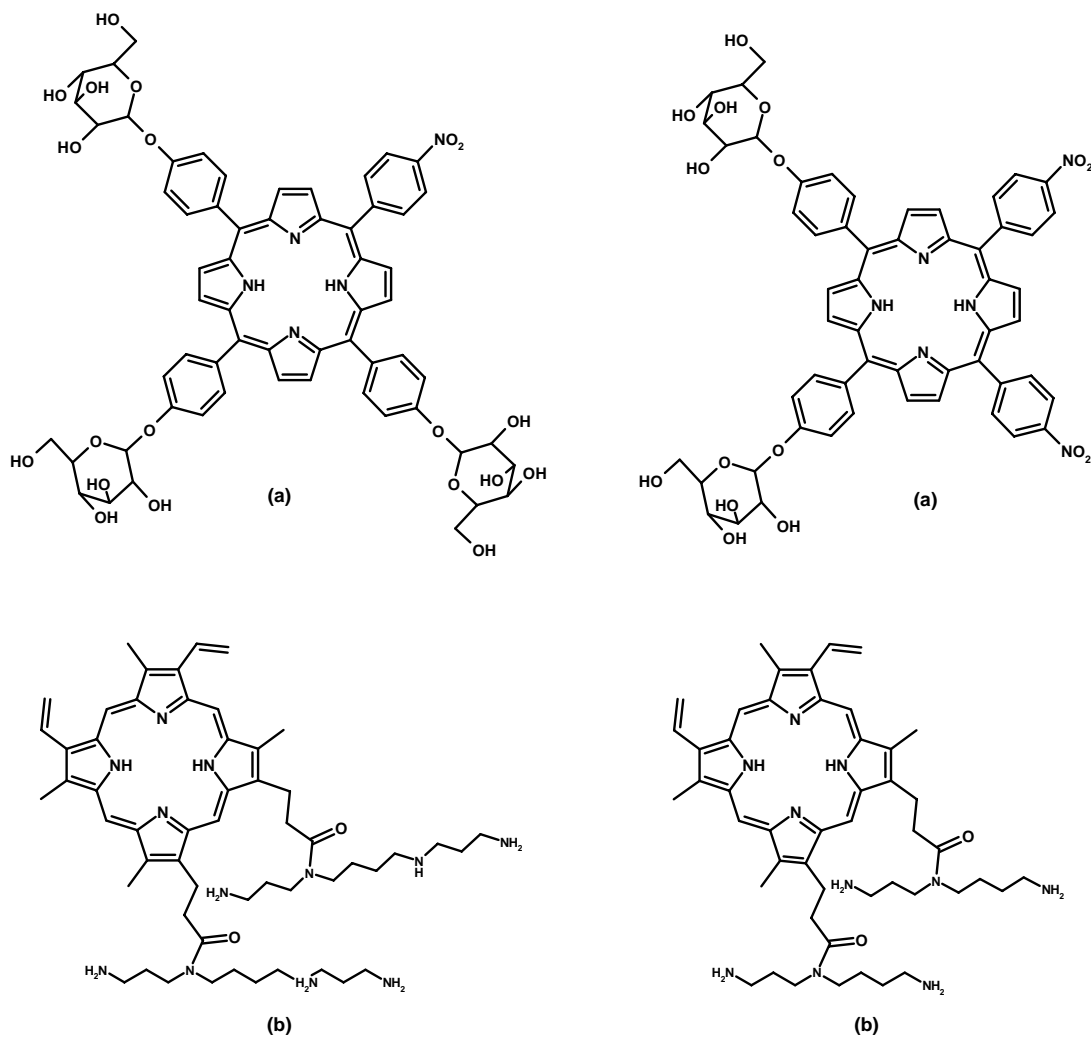


Figure I-25 : Structure de porphyrines synthétisées dans notre laboratoire présentant une activité antimicrobienne ; a – porphyrines nitroglucosylées, b- porphyrines polyaminées.

5-4-1-Inactivation photodynamique des cellules microbiennes

La complexité hiérarchique et organisationnelle des cellules microbiennes procaryotes et eucaryotes étant moindres, celles-ci ont été utilisées en tant que modèles simplifiés des cellules cancéreuses plus complexes, pour l'étude des mécanismes de photosensibilisation par les porphyrines. Ainsi Nitzan et Malik^[55-56], puis Jori et coll.^[57] ont montré que les bactéries traitées par de faibles doses de porphyrines et de lumière sont inhibées. Alors que plus de 99 % des bactéries sont mortes en présence de porphyrines et de lumière, aucun effet significatif n'a pu être observé lorsque les cellules furent placées à l'obscurité. Ainsi la combinaison des deux facteurs lumière et porphyrine est nécessaire. Il a été également démontré que les bactéries anaérobies sont sensibilisées en absence d'oxygène présent dans le système, ce qui permet de démontrer l'importance des radicaux libres impliqués au cours du processus photodynamique.^[58]

Nitzan et coll.^[59] ont démontré par spectroscopie de fluorescence que l'activité photodynamique antimicrobienne requiert la fixation des porphyrines sur les bactéries.^[60] En effet, les bandes observées à 613 nm et 677 nm pour l'HpD en solution aqueuse, sont déplacées respectivement à 631 nm et 692 nm lorsque celle-ci se trouve dans des vésicules de lécithine c'est à dire en milieu lipidique. Aussi l'incubation de *Staphylococcus aureus* dans un milieu enrichi en HpD, montre une rapide fixation des porphyrines à la membrane cellulaire. Dans ces mêmes conditions, beaucoup moins de porphyrines se fixent sur les membranes cellulaires d'*Escherichia coli*. Ainsi à partir de cette expérience, Nitzan et coll.^[61] ont conclu que le glycocalix des bactéries Gram⁻ empêche la fixation des porphyrines sur ce type de bactérie. Ceci est confirmé par le fait que les sphéropastes, obtenus en enlevant le glycocalix de bactéries Gram⁻ fixent les porphyrines.

5-4-2-Mécanisme de la photoinactivation des cellules bactériennes

Nitzan et Malik ont proposé un mécanisme en 1990 décrivant la photoinactivation des cellules bactériennes^[61], comportant cinq étapes qui sont :

- 1 - L'absorption de la porphyrine dans le glycocalix de la bactérie,
- 2 - la fixation de la porphyrine à la membrane interne (membrane cellulaire),

- 3 - cette fixation peut être réalisée à l'obscurité et n'est pas toxique pour les bactéries,
- 4 - la porphyrine par la suite subit une translocation dans le cytoplasme,
- 5 - ensuite la photoinactivation des bactéries est réalisée par les porphyrines liées à la membrane internes ou par celles présentes dans le cytoplasme.

Le premier effet noté dans les cultures traitées par les porphyrines et illuminées est une baisse du taux de propagation des cellules, suivie d'une rapide mort cellulaire et d'une baisse notable de la formation de colonies.^[56] Cette inhibition des bactéries s'accompagne également d'une baisse rapide de la consommation de glucose marquée au ¹⁴C.^[56] Des études par microscopie de transmission électronique ont révélé que la plupart des cellules traitées sont incapables d'accomplir la synthèse de leur glycocalyx et leur division cellulaire.^[55-57] D'autre part, durant le processus de mort cellulaire, la synthèse d'ADN est immédiatement stoppée au début de l'interaction des porphyrines avec les bactéries.^[55] Cette inhibition affecte également la synthèse d'ARN et donc des protéines.

Un autre site affecté par le traitement photodynamique est la membrane. En effet, il a été démontré que les réactions oxygène-dépendantes^[55] accrues par la photosensibilisation due aux porphyrines induit des désordres dans la synthèse de la membrane et dans la synthèse du glycocalyx ainsi que la *peroxydation* des lipides insaturés membranaires.

Bien que sa détection directe par les techniques spectroscopiques dans les cellules photosensibilisées nécessite la résolution de plusieurs problèmes techniques, il est maintenant admis que l'oxygène singulet est l'agent oxydant principal impliqué dans la photosensibilisation de nombreux systèmes biologiques.^[62] De ce fait, une autre approche de la photothérapie dynamique antimicrobienne est apparue sous la forme d'un nouveau concept : les surfaces photobactéricides.

5-4-3-Les surfaces photobactéricides : un autre concept de la photothérapie dynamique antimicrobienne

En 1978 Bezman et *coll.*^[63] ont démontré que des suspensions de culture bactériennes d'*Escherichia coli* sont tuées en présence de billes de polystyrène imprégnées par un sensibilisateur : le rose Bengale, lorsque celles-ci sont illuminées par de la lumière visible.

Une approche nouvelle de l'étude de la photothérapie dynamique antimicrobienne a été par la suite introduite par Midden et Wang^[64] en 1983 avec le concept de surfaces photobactéricides. Ce concept permet d'obtenir une surface ou un matériau photobactéricide présentant l'avantage de pouvoir récupérer et donc de recycler le photosensibilisateur. Il repose sur la diffusion de l'oxygène singulet dans l'air, mise en évidence par Kautsky^[65] en 1939. Depuis, Midden et coll.^[64] ont démontré que l'oxygène singulet peut diffuser jusqu'à 200 nm dans l'eau et jusqu'à 1 mm dans l'air, ce qui les a mené à élaborer le concept de surfaces photobactéricides. Le principe est de produire des surfaces possédant une activité photobactéricide de la manière suivante. Si un photosensibilisateur du type porphyrine par exemple, est incorporé dans une surface solide, alors en présence de lumière visible, de l'oxygène singulet devrait être généré à sa superficie. L'oxygène singulet qui rappelons le est une espèce réactive toxique pour les cellules vivantes, réagit avec un grand nombre de biomolécules et dans ce cas, il endommage ou détruit les cellules et les microorganismes présents à la surface. Si l'oxygène singulet ne réagit pas avec une biomolécule environnante, il retourne à son état fondamental et ce de manière inoffensive. Ce concept permettrait de réduire la population des bactéries au contact de telle surface comme le montre le schéma ci-dessous (figure I-26).

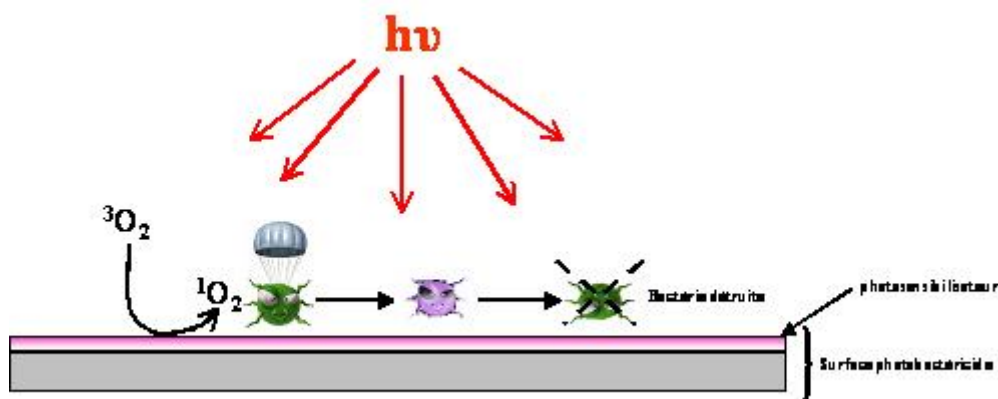
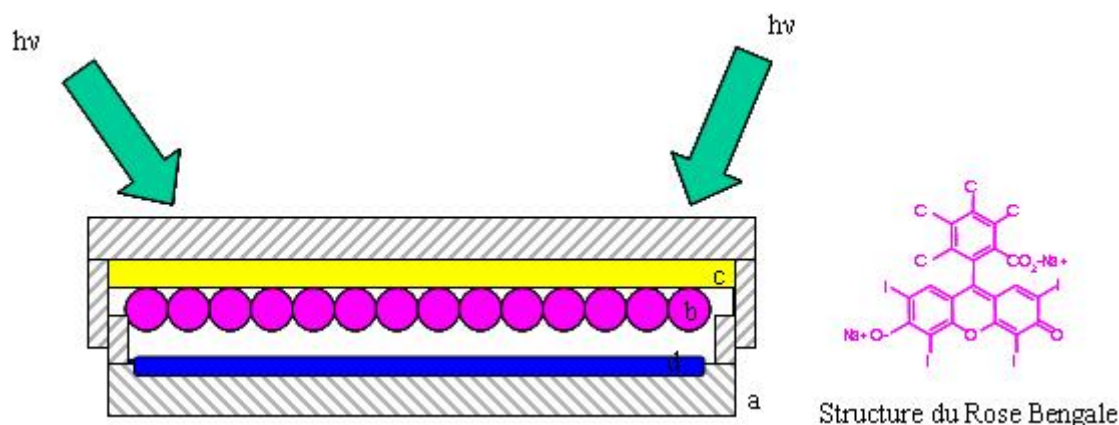


Figure I-26 : Concept des surfaces photobactéricides.

Ainsi, Dahl et coll.^[66] ont démontré que des bactéries de type *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*, déposées sur des membranes filtrantes sont détruites par un photosensibilisateur, le rose Bengale immobilisé sur des billes de verre, donc n'étant pas physiquement en contact avec les membranes (figure I-27). De ce fait la séparation physique du photosensibilisateur et des bactéries, implique qu'aucune interaction entre les

sensibilisateurs excités et les bactéries ne peut avoir lieu, et donc élimine toutes les réactions de photooxydation aboutissant à une photobactéricidie selon un mécanisme de type I.



a- Boîte de Pétri, b- Bille de verre recouverte de Rose Bengale , c- Adhésif double face , d- Milieu de culture inoculé avec la souche bactérienne étudiée.

Figure I-27 : Schéma expérimental de Dahl et coll.^[66]

De ce fait, un polymère ne réagissant pas avec l'oxygène singulet, offre la possibilité d'obtenir des surfaces ayant des propriétés photobactéricides à long terme et ne produisant pas de produit secondaire toxique pour l'environnement comme les produits chlorés par exemple. Ce concept, où le photosensibilisateur n'est pas lié de manière covalente à un polymère pour former une surface ou bien un matériau photobactéricide peut être repensé.

Actuellement, on dispose de très peu de photobactéricides déposés sur support. Les travaux antérieurs menés dans notre laboratoire ont montré que la cellulose est un bon candidat pour l'obtention de films plastiques, obtenus par une modification simple de sa structure.^[67] Nous nous sommes alors demandé si un tel polysaccharide sur lequel seraient fixées des unités porphyriniques ne pourrait pas mener à une telle finalité. Nous nous proposons dans la suite de cette partie bibliographique de faire un bref rappel sur la chimie de ce polysaccharide.

6-La cellulose

6-1-Généralités et structure

Constituée d'unités glucopyranosiques reliées entre elles par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$, la cellulose est la molécule organique la plus répandue sur terre. Ce polymère est une macromolécule appartenant à la famille des β -D-glucanes et possède de très longues chaînes stéréorégulières. Il entre dans la constitution principale de nombreux végétaux, les teneurs variant de 20% (en pourcentage de matière sèche) pour le maïs à 95% pour le coton.

Le maillon, également appelé unité répétitive, résulte de l'association de deux glucoses. Il porte le nom de cellobiose (figure I-28).

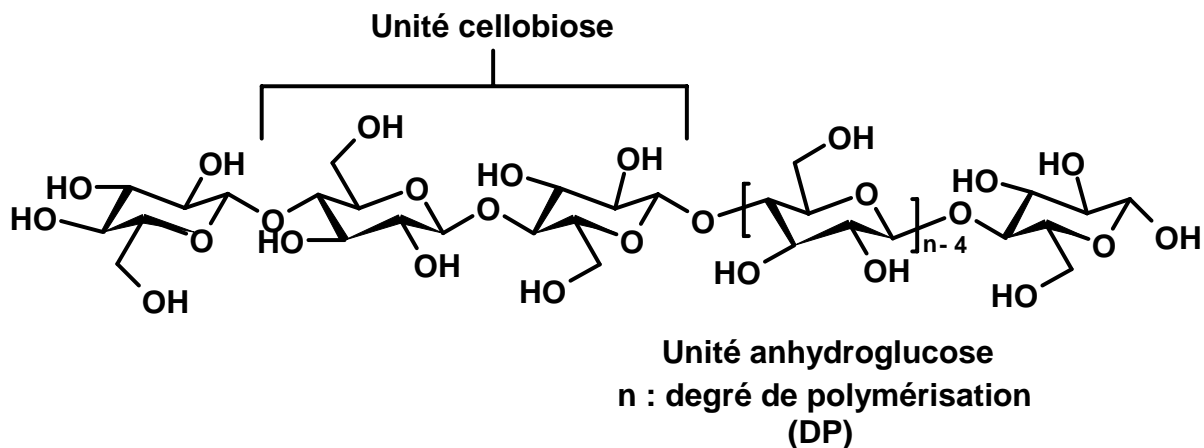


Figure I-28 : Représentation de la chaîne de cellulose.

En bout de chaîne se trouvent 2 extrémités chimiquement différentes. L'une appelée extrémité réductrice du polymère correspond à l'unité glucose dont l'hydroxyle anomérique est libre. De ce fait, la forme hémiacétal est en équilibre avec la forme aldéhyde réductrice minoritaire. Quand à l'extrémité non réductrice elle correspond à une unité glucose dont l'hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison osidique. De ce fait, il ne peut y avoir d'équilibre entre la forme hémiacétal et la forme aldéhyde. La cellulose est entre autre caractérisée par son degré de polymérisation ou DP qui correspond au nombre de maillons glucose. La valeur du DP varie selon l'espèce végétale (tableau I-1).

Tableau I-1 : Degré de polymérisation (DP) de cellulose provenant de différentes espèces végétales.

Espèce végétale	Degré de polymérisation ou DP
Epicéa	8 000
Lin, ramie, chanvre	9 000
Coton	10 000
Algue valonia	26 500

Il existe dans la cellulose des liaisons hydrogène intramoléculeaires entre l'oxygène hétérocyclique et l'hydrogène du groupement hydroxyle en position 3' (figure I-29). D'autres liaisons hydrogène mettant en jeu des molécules d'eau intimement liées à la cellulose ont également été observées. Ces nombreuses liaisons hydrogène rendent insoluble la cellulose dans l'eau.

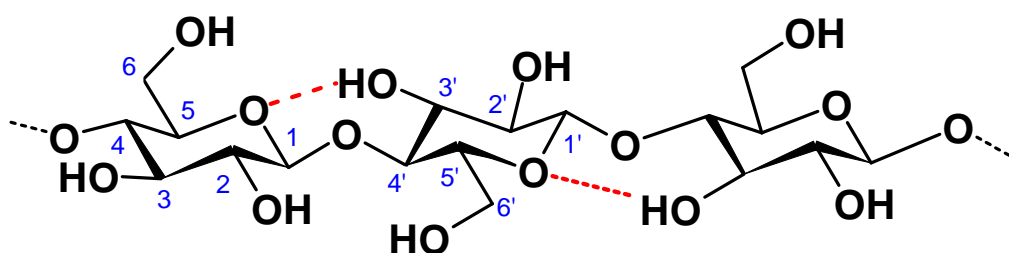


Figure I-29 : Liaisons hydrogène O - H_{3'} intramoléculeaires.

La cellulose possède une structure fibrillaire et partiellement cristalline. Ainsi, des zones cristallines parfaitement ordonnées et des zones amorphes au contraire totalement désordonnées constituent les microfibrilles de cellulose. A l'état natif la cellulose se présente sous la forme dite I, la cellulose de type II étant quand à elle obtenue à partir de la cellulose native (cellulose I). Intéressons nous à ces deux états polymorphiques.

La cellulose I

La cellulose dite I est comme nous l'avons précédemment précisé la cellulose existant dans son état naturel. Elle est formée de micro-cristaux à chaînes parallèles.

La cellulose II

C'est en 1844 que Mercer^[68] obtient pour la première fois de la cellulose II, en immergeant de la cellulose I dans une solution aqueuse de soude à 18%. Ce procédé porte depuis son nom : « la mercerisation ». Bien que la structure de la cellulose II ne soit toujours pas clairement définie, des études par rayons X ont démontré que si la cellulose I résulte d'enchaînements parallèles, la cellulose II consiste en un enchaînement antiparallèle des chaînes glycosidiques. Il en résulte alors une modification des liaisons hydrogènes intermoléculaires puisque celles-ci dépendent du positionnement des chaînes les unes par rapport aux autres.

En effet, la cellulose I est caractérisée par le fait que les chaînes de cellulose dans un même plan moyen sont reliées entre elles par des liaisons hydrogène intermoléculaires de type : $\text{OH}_6\text{---O}_3$. Ainsi les différentes chaînes cellulosiques d'un même plan moyen forme des feuillets. Dans ce cas la cohésion des différents feuillets n'est assurée que par des interactions de type Van der Waals.

Dans la cellulose II ce sont des liaisons hydrogène de type : $\text{OH}_6\text{---O}_2$ qui relient les chaînes glycosidiques d'un même feuillet. Or comme dans ce cas les feuillets sont constitués de chaînes antiparallèles, il en résulte que la cohésion entre les différents feuillets est assurée par des liaisons hydrogène intermoléculaires (inter-feuillets) de type : $\text{OH}_2\text{---O}_2$ ^[69] (figure I-30).

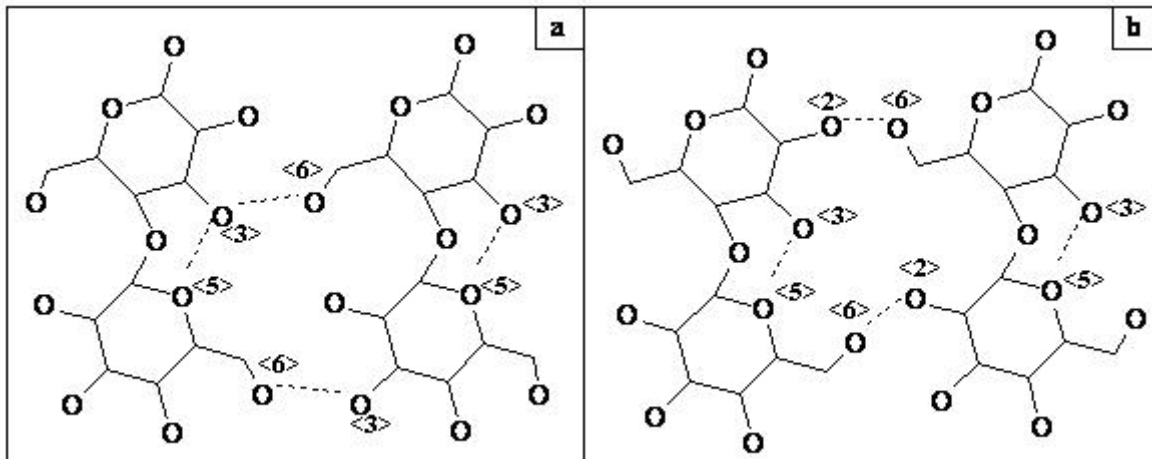


Figure I-30 : Position des liaisons hydrogène dans la cellulose I (a) et dans la cellulose II (b).^[69]

6-2-Obtention de la cellulose

La cellulose étant présente dans la plupart des végétaux, plusieurs méthodes d'obtention de celle-ci à partir de la biomasse ont été décrites. Toutes ces méthodes consistent en une série d'extractions successives, aboutissant à une matière enrichie en cellulose mais rarement à une cellulose pure. Suivant la nature des méthodes d'enrichissement utilisées, celles-ci conduisent à une cellulose de type I ou de type II. Ainsi l'extraction en milieu fortement basique conduira comme nous l'avons déjà indiqué à une cellulose composée de chaînes antiparallèles c'est-à-dire la cellulose II, tandis qu'une extraction en milieu neutre ou acide en conservant la structure parallèle des chaînes conduira à la cellulose I.

En outre, il existe une méthode non chimique permettant d'obtenir de la cellulose à partir d'échantillons végétaux : le vapocraquage.^[70] Il s'agit dans ce cas de solubiliser par de la vapeur d'eau sous forte pression et à très haute température les différents constituants non désirés contenus dans les échantillons.

6-3-Chimie de la cellulose

La cellulose peut être considérée comme un polyol où bon nombre des groupements hydroxyles sont engagés dans des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires, comportant des régions plus ou moins cristallines. Compte tenu de cette structure assez particulière, la cellulose s'avère peu modifiable chimiquement. Pour toutes ces raisons il est nécessaire de procéder à un traitement préalable à sa transformation mais également à sa dissolution, la cellulose étant en effet peu ou pas soluble dans les solvants organiques usuels.

6-3-1-Activation de la cellulose

Si actuellement il existe plusieurs méthodes pour activer la cellulose, tous ces traitements ont pour but de rompre les liaisons hydrogène et/ou diminuer sa cristallinité. L'activation de la cellulose la plus connue, introduite en 1881 par Girard^[71] conduit à une cellulose partiellement hydrolysée par rupture des liaisons osidiques. Ce traitement consiste en une immersion du polymère pendant une minute dans une solution acide sulfurique suivie d'une filtration et du séchage du résidu. Le polymère ainsi partiellement hydrolysé est alors

appelé « hydrocellulose de Girard ». On remarque également un gonflement des fibres de cellulose par rupture des liaisons hydrogène.

La mercerisation qui rappelons le consiste en l'immersion de la cellulose native dans une solution de soude est également utilisée pour activer la cellulose, ce qui dans ce cas se traduit également par un gonflement des fibres. Une immersion dans une solution d'ammoniac pendant une heure peut également être utilisée.^[72] Ces différents traitements sont ensuite suivis d'abondants lavages utilisant des solvants déshydratants tels l'acétone, le méthanol, ou encore l'hexane. Enfin un stockage au dessiccateur évite la réhydratation de la cellulose activée.

D'autres méthodes reposant sur des échanges de solvants, et des séchages à haute température ont également été décrites.^[73] Si ces traitements s'avèrent efficaces, on ne sait toujours pas si toutes ces méthodes d'activation conduisent à un seul et même type de cellulose.

6-3-2-Dissolution de la cellulose

Comme il n'est pas possible de faire fondre la cellulose, celle-ci se dégradant avant d'atteindre son point de fusion, il s'avère nécessaire de la dissoudre pour l'étudier ou bien pour la modifier chimiquement. Rappelons que la présence des nombreuses liaisons hydrogène rendent la cellulose insoluble dans l'eau ainsi que dans la plupart des solvants organiques, de ce fait la rupture des liaisons hydrogène est indispensable à sa dissolution. De plus, une activation s'avère nécessaire pour la rendre plus réactive. La recherche de solvants capables de dissoudre la cellulose, afin notamment de caractériser les matériaux cellulosiques a stimulé la découverte de nouveaux solvants. Cependant l'analyse de la littérature révèle un nombre restreint de solvants ou de systèmes de solvants pour ce polymère. Ceux-ci peuvent être classés en deux familles suivant qu'ils modifient ou non la structure et/ou la composition même de la cellulose.

6-3-2-1-Solvants dérivatisants de la cellulose

La cellulose étant peu ou pas soluble dans les solvants organiques usuels, des méthodes employant des solvants dits dérivatisants ont été développées. Ces solvants sont ainsi appelés car ils conduisent à une cellulose dérivatisée. Dans ce cas, la cellulose réagit

avec le solvant pour former des intermédiaires celluloses organosolubles et hydrolytiquement instables. Ceci permet de résoudre le problème de solubilisation du polymère. Parmi les plus rencontrés on peut citer le solvant DMF/N₂O₄ ou DMSO/NOCl et le mélange DMSO/Formaldéhyde. L'inconvénient majeur de ces solvants dérivatisants est l'existence de réactions parasites secondaires durant la dissolution, ce qui aboutit à la formation de structures celluloses non définies. La toxicité de ces solvants ainsi que l'existence de réactions secondaires a motivé la recherche de nouveaux solvants dits non-dérivatisants.

6-3-2-2-Solvants non-dérivatisants de la cellulose

Les solvants dits non-dérivatisants permettent de solubiliser la cellulose sans la modifier chimiquement, c'est-à-dire sans fonctionnaliser les hydroxyles. Bien qu'une grande variété de ces solvants ait été développée et étudiée durant les dernières années, seuls quelques uns ont montré une application potentielle pour la fonctionnalisation contrôlée et homogène de polysaccharides, les limites étant souvent dues à leur grande toxicité. Malgré tout, certains solvants se sont montrés efficaces pour la dissolution de la cellulose. Parmi les solvants non-dérivatisants aqueux, les plus connus sont l'hydroxyde de cuprammonium (Cuam) et l'hydroxyde de Cupriéthylénediamine (Cuen). Isogai et Atalla^[74] ont montré qu'il est également possible de solubiliser la cellulose dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 10%. Cependant cette méthode est réservée aux polymères de faibles DP. Si ces solvants permettent de solubiliser la cellulose, leur intérêt reste faible dans la mesure où les conditions aqueuses et basiques hydrolysent la plupart des réactifs destinés à fonctionnaliser la cellulose. C'est pour cette raison que des solvants non-dérivatisants et non aqueux ont été recherchés. Cette classe de solvants a été découverte au cours des deux dernières décennies. Parmi ceux-ci, le système de solvant DMA/LiCl s'est avéré être un solvant de choix.

C'est en 1979 que le système de solvant N,N-diméthylacétamide / chlorure de lithium (DMA/LiCl) a permis à McCormick et *coll.*^[75] d'obtenir pour la première fois une solution homogène et limpide de cellulose. Ce système est en fait un solvant-complexant. En effet, par complexation des groupements hydroxyles, le lithium permet de rompre les liaisons hydrogène rigidifiant la structure cellulose, qui de ce fait empêche sa dissolution (figure I-31).

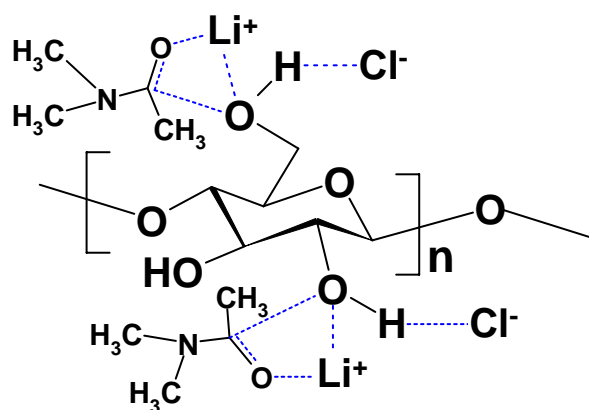


Figure I-31 : Schéma représentant le complexe $[\text{Li-DMA}]^+\text{Cl}^-/\text{cellulose}$.

Ce solvant en permettant la dissolution de la plupart des polymères, même de hauts poids moléculaires, a largement contribué à l'étude de la cellulose dissoute. Il est à noter que ce solvant n'altère que peu ou pas la structure de la cellulose. Cependant, afin d'être dissoute, la cellulose doit être préalablement traitée. Une des méthodes d'activation les plus utilisées consiste en une série d'échanges de solvant eau/méthanol/DMA, permettant ainsi une dissolution rapide de la cellulose dans des conditions douces. Une autre méthode d'activation utilisée consiste à porter la cellulose en suspension dans une solution de DMA/LiCl à 150°C et plus.^[76] Enfin, après refroidissement sous agitation, une solution de cellulose limpide est obtenue.

D'autres solvants où le DMA a été remplacé peuvent être utilisés. En effet, le DMA peut être remplacé par la N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP), le N,N-diméthylformamide (DMF), le N,N-diméthylsulfoxyde (DMSO), ou encore la N-méthylpyridine. Cependant seule la NMP c'est-à-dire l'analogue cyclique du DMA permet de dissoudre la cellulose sans dégradation majeure. Le LiCl peut lui aussi être substitué, le plus souvent par le bromure de lithium (LiBr), notamment au cours de la préparation de bromodéoxycellulose par exemple.

Un autre solvant permet également de dissoudre la cellulose sans la dégrader, il s'agit d'un mélange de 1,3-diméthyl-2-imidazolidinone et de LiCl. L'avantage de ce système réside dans sa moindre toxicité. Enfin Heinze et *coll.*^[77] ont récemment montré que l'on peut dissoudre la cellulose sans activation préalable en utilisant le mélange de solvant fluorure de tétrabutylammonium trihydrate/DMSO. Néanmoins, le système DMA/LiCl précédemment évoqué reste le solvant le plus utilisé aussi bien pour l'analyse quantitative de la cellulose que pour sa modification chimique. C'est ainsi que des esters de cellulose, des sulfonates mais

aussi des dérivés déoxycellulosiques ainsi que des éthers cellulosiques ont été synthétisés en phase homogène. Le paragraphe suivant sera consacré à l'étude des modifications chimiques applicables à la cellulose et plus particulièrement à son estérification.

6-4-Modifications chimiques de la cellulose

Les dérivés cellulosiques sont présents dans bons nombres de domaines. Au niveau industriel, ils sont utilisés dans les domaines du textile, des peintures, des explosifs... Ils sont également utilisés en recherche, notamment en chimie organique en tant que phase stationnaire chirale, échangeur cationique, ou encore en tant que base de Schiff. Ces dérivés cellulosiques sont obtenus en modifiant chimiquement la cellulose. En effet, la cellulose étant un polyol, il est donc possible d'effectuer sur celle-ci toutes les modifications applicables aux alcools primaires (C-6), aux alcools secondaires (C-2, C-3) et aux diols vicinaux (C-2–C-3). Aussi, à un moindre niveau, il est possible de modifier les fonctions aldéhydes de l'extrémité réductrice du polymère.

Ainsi, notamment par estérification et par éthérification de la cellulose, il est possible d'obtenir de nombreux dérivés cellulosiques hydro ou organosolubles. L'oxydation et la déoxyhalogénéation peuvent également être réalisées. En conséquence, en fonction des modifications apportées au polymère, ces réactions sont classées en deux catégories :

- les modifications des groupements hydroxyles qui conservent ainsi la structure squelettique de la cellulose,
- les modifications du squelette cellulosique.

Les différents types de modification sont représentés sur la figure I-32.

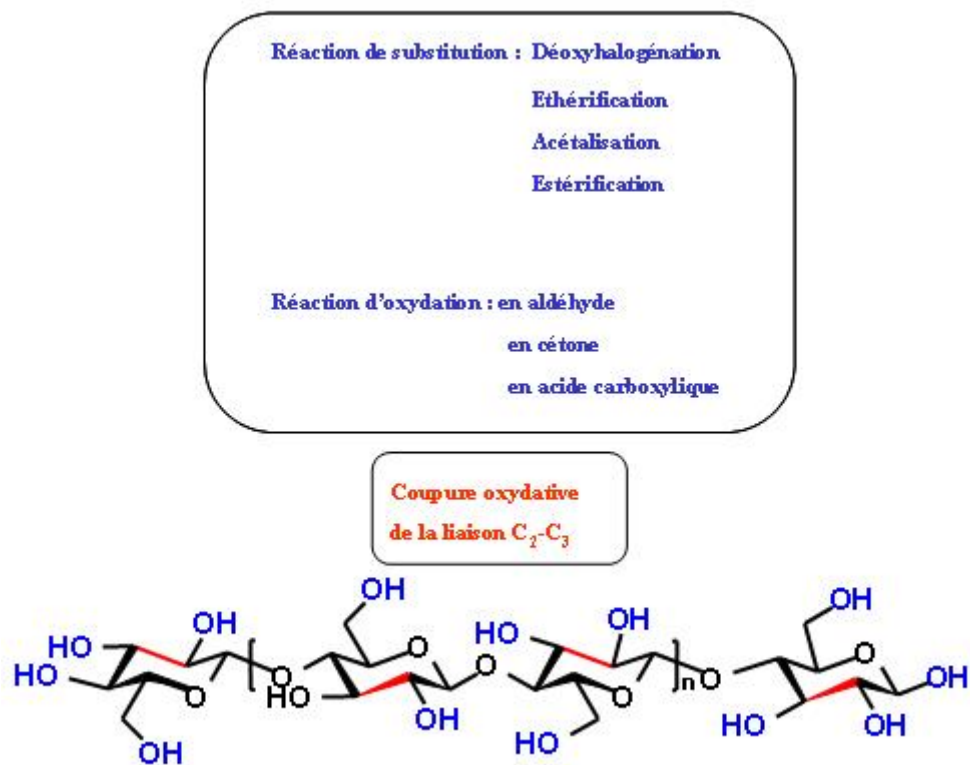


Figure I-32 : Modifications cellulosiques les plus rencontrées.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'estérification de la cellulose.

6-4-1-Acylation de la cellulose

6-4-1-1-Rappels

Rappelons que l'estérification est une réaction au cours de laquelle un groupe OH est condensé à un groupe acide carboxylique (RCOOH) avec élimination d'une molécule d'eau, ce qui forme une liaison ester (figure I-33).



Figure I-33 : Schéma général de la réaction d'estérification.

Cette définition de l'estérification est en fait un cas particulier d'une autre réaction : l'acylation, qui consiste formellement à substituer l'atome d'hydrogène d'un groupe OH par un groupement acyle RCO-. On peut y parvenir en effectuant la réaction entre l'alcool et l'acide carboxylique ou l'un de ses dérivés : halogénure d'acyle, anhydride ou encore ester (figure I-34). Avec les halogénures d'acyle ou les anhydrides, la réaction est à la fois totale et rapide. Avec l'acide, elle conduit à un équilibre que l'on peut déplacer dans le sens de la formation de l'ester. De plus elle nécessite un catalyseur. Rajoutons également que la réaction entre un alcool et un ester est appelée transestérification.

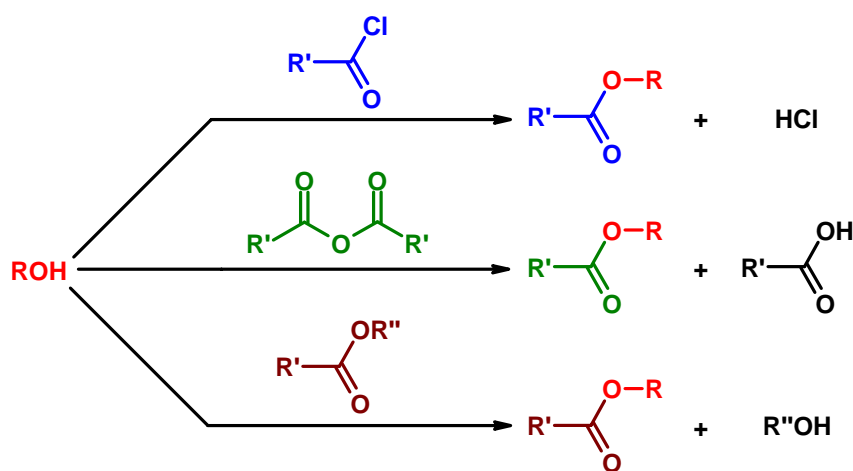


Figure I-34 : Synthèse d'esters à partir de dérivés d'acide.

Les hydroxyacides quand à eux conduisent aux lactones par estérification intramoléculaire. Dans ce paragraphe, nous nous sommes particulièrement intéressés à la synthèse d'esters carboxyliques de la cellulose.

Les esters de cellulose, notamment les acétates, sont connus depuis longtemps. La première synthèse d'acétate de cellulose (AC) a été réalisée par Schützenberger^[78] en 1865. Ces AC ont par la suite été industriellement produits dès les années 1900. Les AC sont conventionnellement préparés par réaction de la cellulose avec un excès d'anhydride acétique en présence d'acide sulfurique ou d'acide perchlorique en tant que catalyseur. De nos jours, la majorité des AC soit environ 900 000 tonnes par an est produite en utilisant d'autres procédés consistant à réaliser l'acétylation des fibres de cellulose sans solvant. Ce procédé est appelé « acétylation fibrillaire ». Les AC peuvent être obtenus avec une fonctionnalisation totale, c'est-à-dire des DS élevés, de l'ordre de 3.

Les premières synthèses d'esters de cellulose en phase homogène dans le système DMA/LiCl ont été réalisées par Mac Cormick^[79] au début des années 1980. Pour cela, il utilisa des anhydrides et des chlorures d'acides. Les principaux avantages de l'acylation en phase homogène dans le système DMA/LiCl sont un excellent contrôle du DS et une distribution uniforme des groupements fonctionnels le long des chaînes du polymère. De plus, une sélectivité dans les réactions peut être obtenue. Par exemple, la réaction de la cellulose avec le chlorure d'acétyle en présence de pyridine donne des AC totalement fonctionnalisés au niveau des alcools primaires à partir de DS de l'ordre de 1,6.

6-4-1-2-Acylation de la cellulose à partir d'anhydrides carboxyliques

Le mécanisme de l'acétylation a récemment été décrit par Tosh et Saikia^[80] en 2000 (figure I-35). Cette réaction est souvent réalisée en présence d'un catalyseur basique comme la pyridine ou la triéthylamine. De nombreux esters de cellulose ont pu être préparés selon cette méthode. La synthèse d'esters de cellulose mixtes est également possible en utilisant par exemple l'anhydride acétique et un autre acide carboxylique^[81] ce qui permet de former in situ l'anhydride mixte correspondant, en présence de catalyseur du type HClO₄.

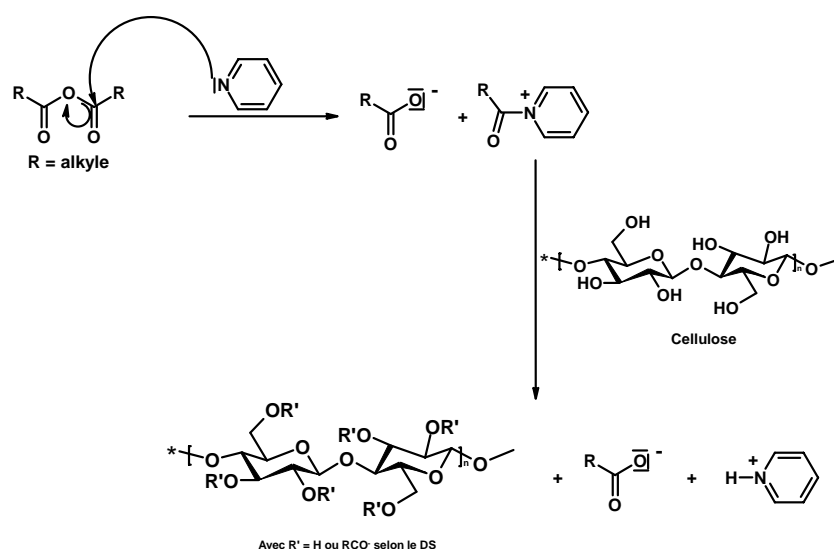


Figure I-35 : Mécanisme partiel de l'acylation de la cellulose par des anhydrides d'acides carboxyliques en présence de pyridine selon Tosh et Saikia.^[80]

6-4-1-3-Acylation de la cellulose par un chlorure d'acide carboxylique

L'acylation de la cellulose par un chlorure d'acide carboxylique peut être réalisée aussi bien en phase homogène qu'en phase hétérogène. Au cours de cette réaction, l'acide chlorhydrique libéré est piégé par la base présente dans le milieu. Le plus souvent, la base utilisée est la pyridine ou la N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) qui, en formant un chlorure de pyridinium maintiennent le pH du milieu réactionnel. Dans notre laboratoire^[67], des plastiques potentiellement biodégradables ont été obtenus par acylation de la cellulose par des dérivés de l'acide laurique sous activation micro-onde, permettant ainsi de diminuer les temps de réaction (figure I-36).

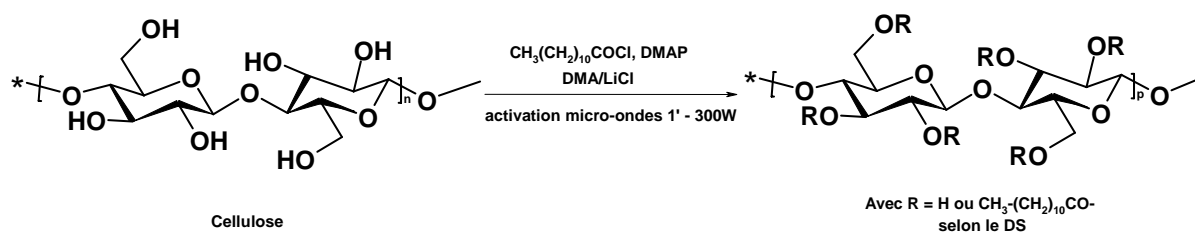


Figure I-36 : Acylation de la cellulose par le chlorure d'acide laurique sous activation micro-onde.^[67]

L'utilisation des chlorures d'acide s'avère être une méthode particulièrement efficace dans le cas d'esters aromatiques. Des groupements adamantoyls ont également pu être introduits en tant que groupements protecteurs en utilisant le chlorure d'acide correspondant.

6-4-1-4-Acylation de la cellulose par transestérification

Parmi les différentes méthodes utilisées, celle de la transestérification qui rappelle le consiste à faire réagir un alcool avec un ester est la moins employée. Bien que cette réaction soit équilibrée, elle peut être déplacée vers la formation de l'ester en procédant à l'élimination d'un des produits obtenus.

6-4-1-5-Acylation directe de la cellulose par les acides gras

L'acylation de la cellulose peut être réalisée directement à partir des acides carboxyliques, on parle alors d'estérification. Dans ce cas, la réaction a lieu en présence

d'agents activants en présence d'une base. Un puissant agent de condensation utilisé est le N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Cet agent couplant est bien connu et extrêmement utilisé dans la chimie des peptides et des protéines. Il permet en effet de former les liaisons peptidiques en couplant les fonctions amines aux fonctions acides carboxyliques. Son utilisation appliquée à la synthèse d'esters cellulosiques à partir d'acides carboxyliques est à mettre à l'actif de Samaranayake et Glasser^[82,83] en présence de 4-pyrrolidinopyridine (PP). L'intérêt de cette méthode est la grande réactivité de l'anhydride mixte formé avec la 4-pyrrolidinopyridine qui permet également dans ce cas l'obtention de cellulose hautement estérifiée (figure I-37). Un analogue pouvant également être utilisé est le N,N-carbonyldiimidazole (DIC).

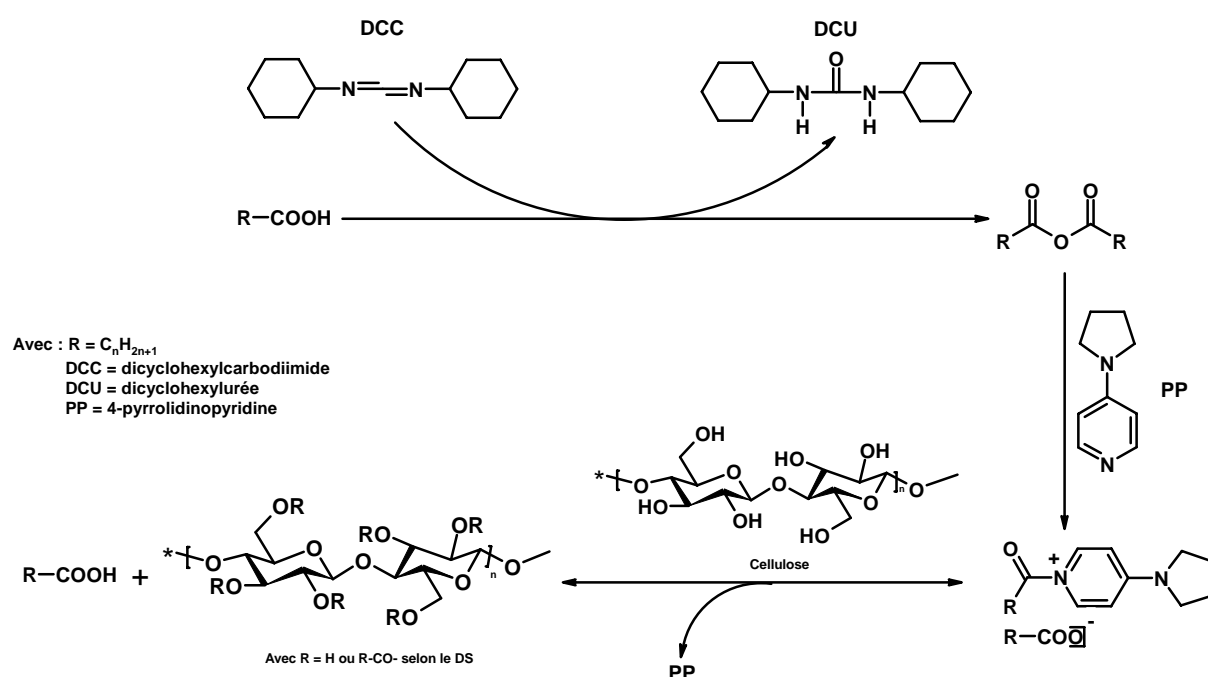
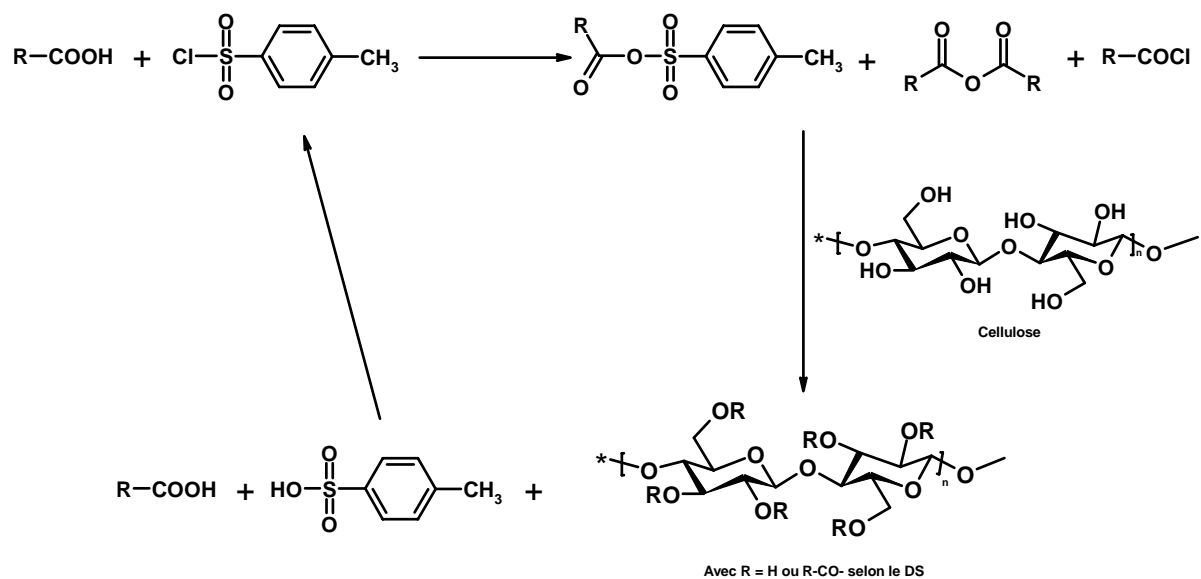


Figure I-37 : Acylation de la cellulose selon Samaranayake et Glasser.^[82]

Des esters de cellulose aromatiques ont également été synthétisés en utilisant le N,N-diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur.

L'activation *in situ* d'acides carboxyliques est également possible en utilisant le chlorure de tosylo (TsCl). Le TsCl a été pour la première fois utilisé pour la synthèse d'acétates de cellulose par Shimizu et coll.^[84] en 1988, puis plus récemment par Heinze et coll.^[76] L'espèce réactive au cours de la réaction est l'anhydride mixte *p*-toluènesulfonique/acide carboxylique (figure I-38).



Avec $\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ et $n = 1$ à 22 .

Figure I-38 : Acylation de la cellulose en présence de TsCl selon Heinze et coll.^[76]

Cette méthode a ensuite été utilisée pour la synthèse d'esters mixtes. En 1996, Glasser et coll.^[85] ont synthétisé des esters de cellulose à partir d'acide carboxylique à longue chaînes variant de 12 à 20 atomes de carbone et ce avec des DS élevé de l'ordre de 2,8 à 2,9.

7-But du travail

Comme nous l'avons précisé précédemment, Dahl et *coll.*^[65] ont introduits la notion de surface photobactéricide en séparant physiquement le sensibilisateur des bactéries. Par la suite, ce concept a été modifié avec les travaux de Bonnett et *coll.*^[86] au cours des années 1990. Leur approche a consisté à préparer des films porphyriniques selon deux procédés.

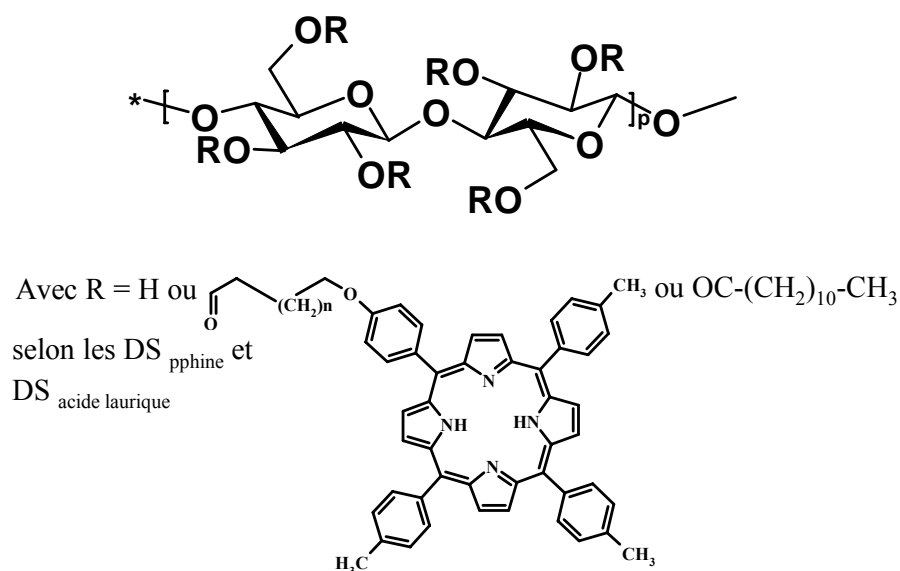
Le premier est la pigmentation ou dyeing. Dans ce procédé, le photosensibilisateur est immobilisé à la surface du matériau par adsorption. Par exemple, la 5,10,15,20-tétra(N-méthylpyridinium-4-yl)porphyrine tétrasulfonate (TMPyP) est adsorbé sur des films de cellophane (cellulose régénérée) en trempant ceux-ci dans des solutions méthanoliques de TMPyP à 50°C. Après un abondant rinçage pour éliminer la porphyrine non adsorbée, des films porphyriniques de cellophane sont obtenus. Il faut noter que seules les porphyrines cationiques sont adsorbées de la sorte.

Le second est la co-dissolution ou le casting. Cette technique facile à mettre en œuvre est bien maîtrisée pour la pigmentation des films. Par exemple, un photosensibilisateur et le diacétate de cellulose sont dissous dans l'acétone contenant des traces d'eau et de diéthylphtalate. Puis cette solution est évaporée dans un moule et un film coloré est ainsi obtenu.

Ce concept permet donc d'obtenir une surface ou un matériau potentiellement photobactéricide par contact, présentant l'avantage de pouvoir récupérer et donc de recycler le photosensibilisateur. De plus aucun produit toxique secondaire n'est libéré dans l'environnement, comme cela est le cas avec les composés chlorés par exemple. Cependant, ce concept reste limité en l'état. En effet, le photosensibilisateur n'étant pas lié de façon covalente au polymère, certaines porphyrines peuvent diffuser dans les milieux de culture (agar des boîtes de Pétri) utilisés pour mettre en évidence la photobactéricide de ce système. De ce fait, de tels procédés en permettant la libération du sensibilisateur rendent la surface bactéricide aussi bien en présence de lumière visible qu'à l'obscurité, pouvant également induire des phénomènes secondaires non désirés. De plus, une telle surface possède une activité photobactéricide à court terme puisqu'une fois le sensibilisateur libéré la surface perd son activité. Pour remédier à ces inconvénients, le photosensibilisateur doit être lié de manière covalente à la surface du matériau. Ainsi, en greffant des photosensibilisateurs de type porphyrine, sur un polymère nous devrions obtenir un nouveau matériau présentant une activité photobactéricide potentielle.

En outre, au cours de travaux de valorisation de co-produits agricoles menés dans notre laboratoire^[67], nous avons démontré qu'il était possible d'obtenir des matériaux plastiques en estérifiant un polymère naturel, la cellulose, par des acides gras. Nous avons donc pensé utiliser cette propriété pour élaborer des plastiques porphyriniques où le sensibilisateur est lié de manière covalente au polymère. Ce type de matériaux potentiellement photobactéricides trouverait des applications dans des domaines tels que l'emballage stérile, la photodécontamination de l'eau, ou encore le milieu hospitalier.

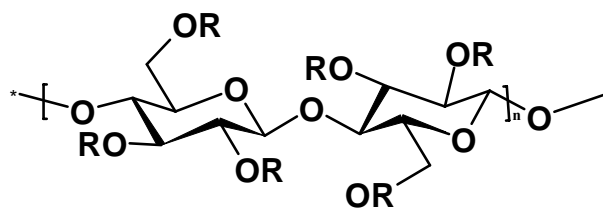
Nous basant sur ces résultats, nous avons développé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles la synthèse d'esters de cellulose porphyriniques. Nous avons ainsi dans un premier temps synthétisé une série de laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques où la porphyrine est greffée au polysaccharide par un bras possédant 4 ou 11 carbones (figure I-39). Ce travail a alors été poursuivi travail par la synthèse d'une série de laurates de cellulose protoporphyriniques, obtenus à partir d'un macrocycle d'origine naturelle, la protoporphyrine IX (figure I-40). Pour compléter ce travail, nous avons préparé toute une gamme de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques (figure I-41). Enfin, nous présentons les résultats d'une étude préliminaire d'activité biologique réalisée sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Gram⁺) et *Escherichia coli* (Gram⁻).



Avec **n = 1** dans le cas des **Laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique**

Avec **n = 8** dans le cas des **Laurates de cellulose *meso*-carboxydécanyloxyphénylporphyrinique**

Figure I-39 : Structure des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques synthétisés.



Laurate de cellulose protoporphyrinique

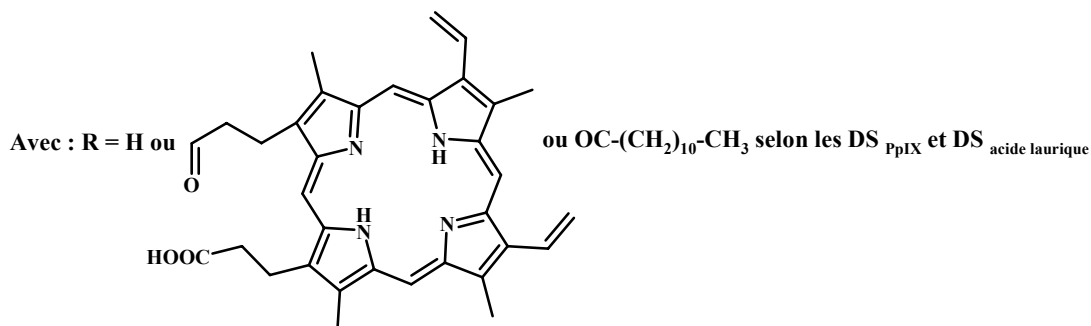
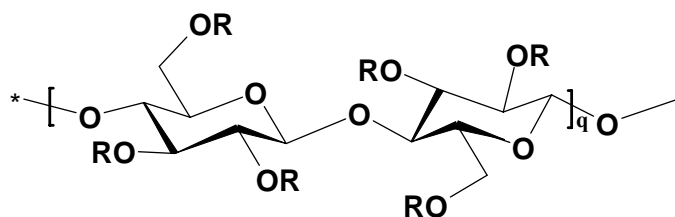


Figure I-40 : Structure des laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés.



Chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique

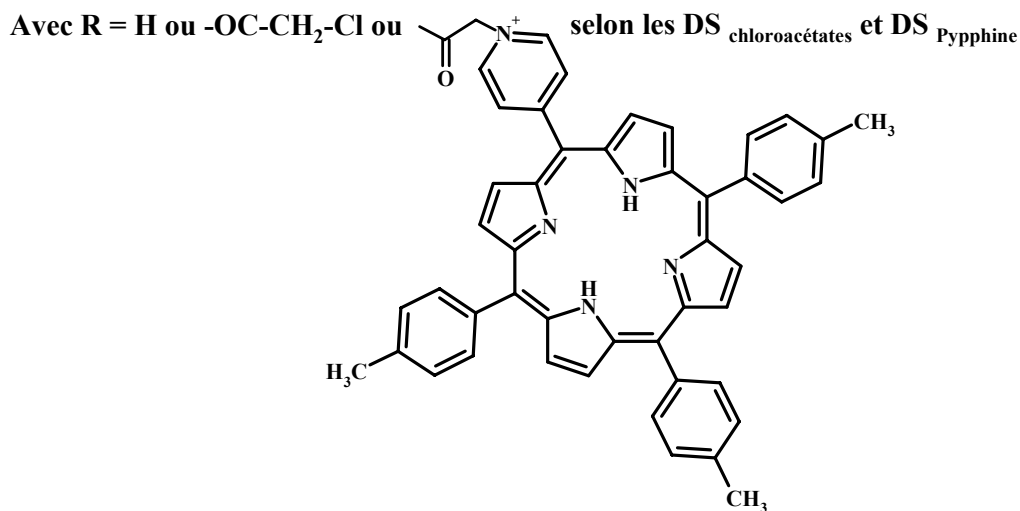


Figure I-41 : Structure des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques synthétisés.

CHAPITRE II

Synthèse de laurates de cellulose

***meso*-arylporphyriniques**

Chapitre II

Synthèse de laurates de cellulose

meso-arylporphyriniques

1-Introduction

Comme nous l'avons indiqué à la fin du chapitre précédent, le premier objectif de notre travail est de préparer de nouveaux matériaux plastiques potentiellement photobactéricides à partir de cellulose, de porphyrines et d'acide gras. Pour cela, nous avons dans un premier temps procédé à la synthèse puis à la caractérisation de tritolyles porphyrines *para*-substituées par un bras espaceur comportant quatre ou onze atomes de carbones portant une fonction acide ; ce qui devrait permettre de tester l'influence de l'encombrement stérique lors de la fixation des macrocycles sur le polysaccharide. Par la suite, ces photosensibilisateurs ont été greffés de manière covalente sur la cellulose. La dernière étape, l'estérification de la cellulose *meso*-arylporphyrinique par l'acide laurique, permet d'obtenir les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques, matériaux plastiques photobactéricides (figure II-1). La liaison covalente formée entre les macrocycles et le polymère devrait permettre d'obtenir des surfaces photobactéricides d'un genre nouveau, présentant un certain caractère écologique puisqu'aucun produit secondaire toxique n'est libéré dans l'environnement.

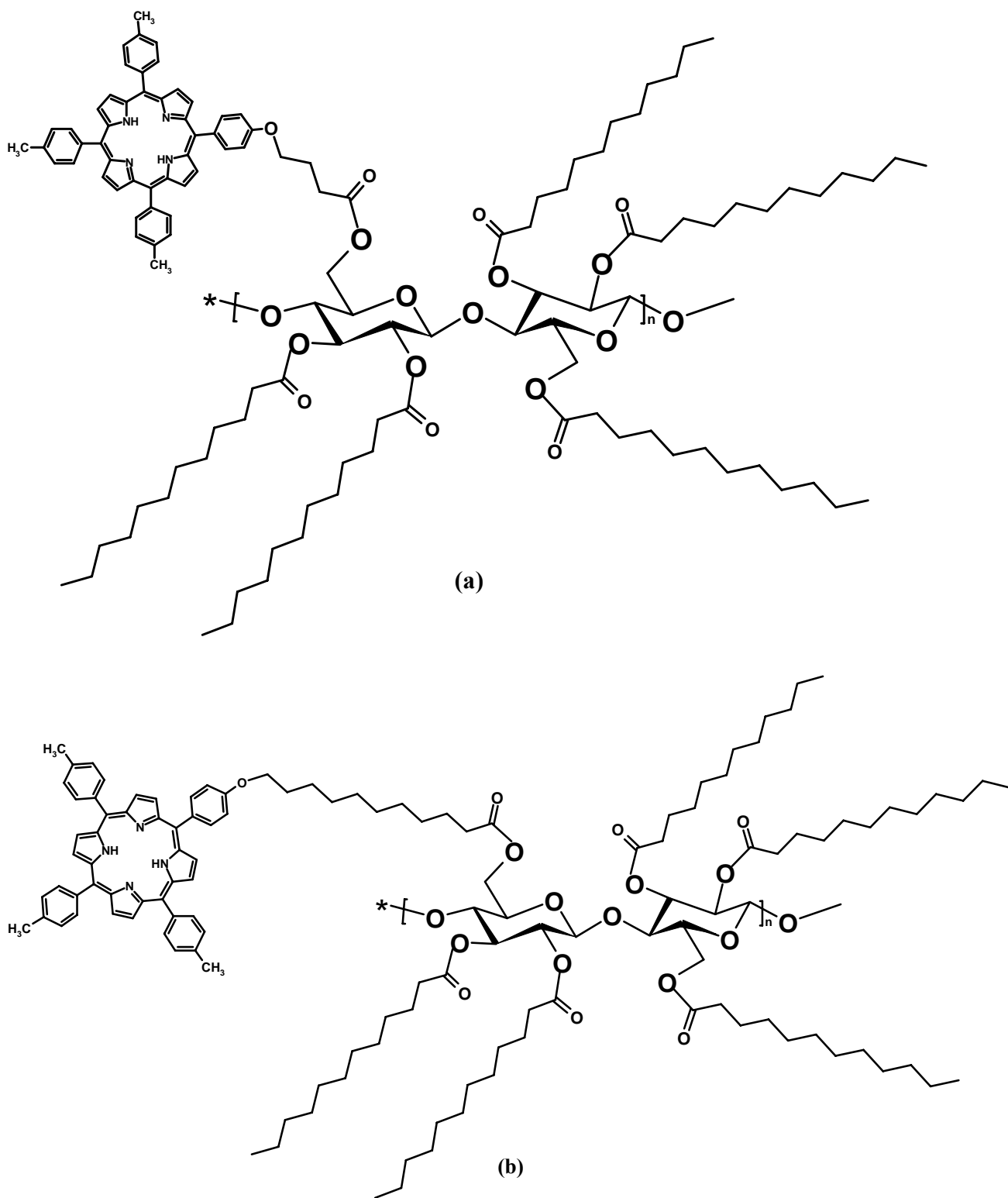


Figure II-1 : Structures représentatives des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques synthétisés

(a) - Laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique ; (b) - Laurate de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrinique.

2-Stratégie de synthèse

Les étapes de la synthèse des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques sont représentées sur les figures II-2 et II-3. La *para*-monohydroxyphényltritolylporphyrine (**1**), synthon de départ, est obtenue selon la méthode de Little (chapitre I), par condensation de *para*-hydroxybenzaldéhyde et de *para*-tolualdéhyde sur le pyrrole. Par la suite, les bras espaceurs possédant 4 et 11 carbones sont introduits par une O-alkylation pour obtenir les porphyrines portant une fonction ester **2** et **4**. Les porphyrines **3** et **5** sont alors obtenues par saponification des composés **2** et **4**. Les macrocycles **3** et **5** sont ensuite greffés par estérification sur la cellulose conduisant ainsi à la cellulose *meso*-arylporphyrinique. Enfin, une seconde estérification, celle de la cellulose *meso*-arylporphyrinique par l'acide laurique conduit aux laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques souhaités.

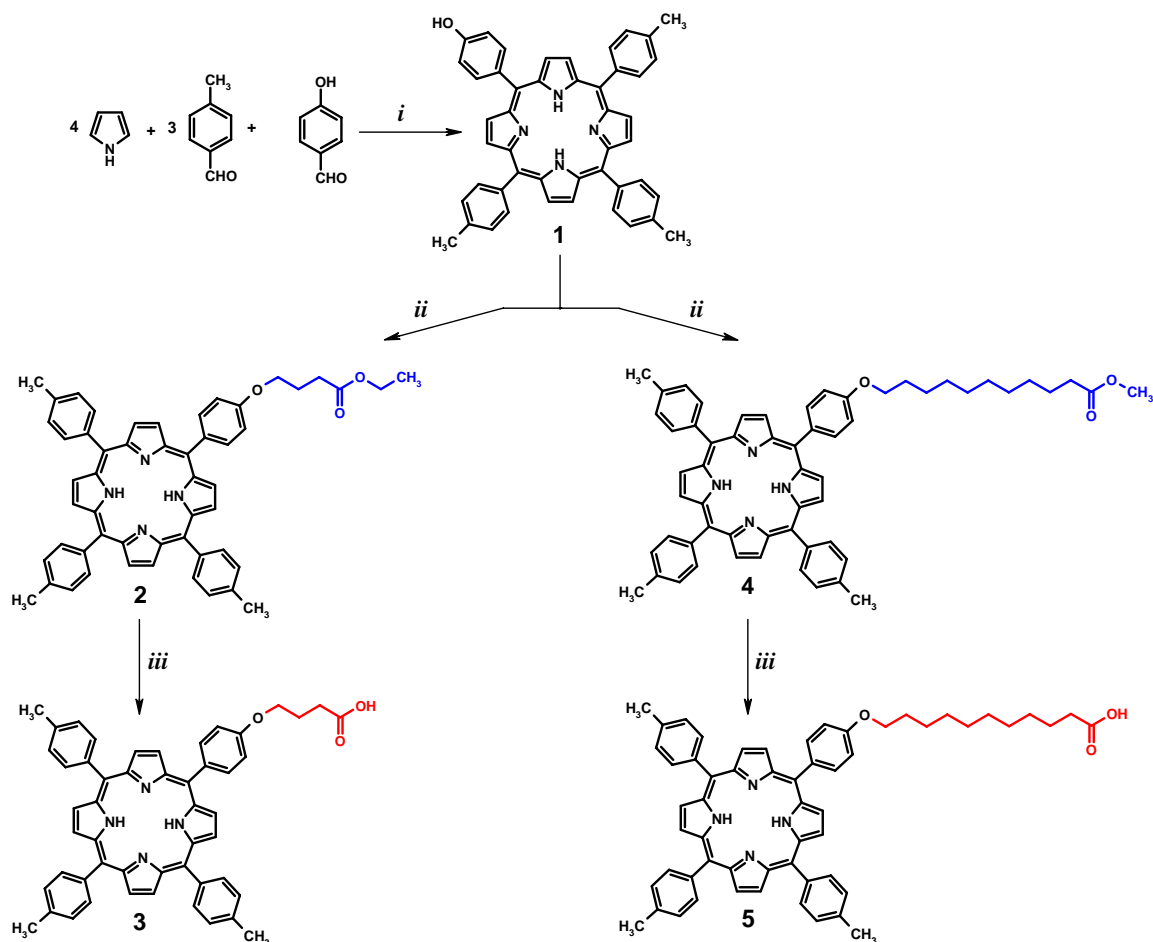


Figure II-2 : Schéma synthétique des tritolylporphyrines.

(i) C_2H_5COOH , reflux ; (ii) $Br-(CH_2)_3-COOEt$ (10 éq.), K_2CO_3 (20 éq.), ou $Br-(CH_2)_{10}-COOMe$ (10 éq.), K_2CO_3 (20 éq.), DMF, t° ambiante ; (iii) $KOH/EtOH$ (1 M), DMF, $100^\circ C$.

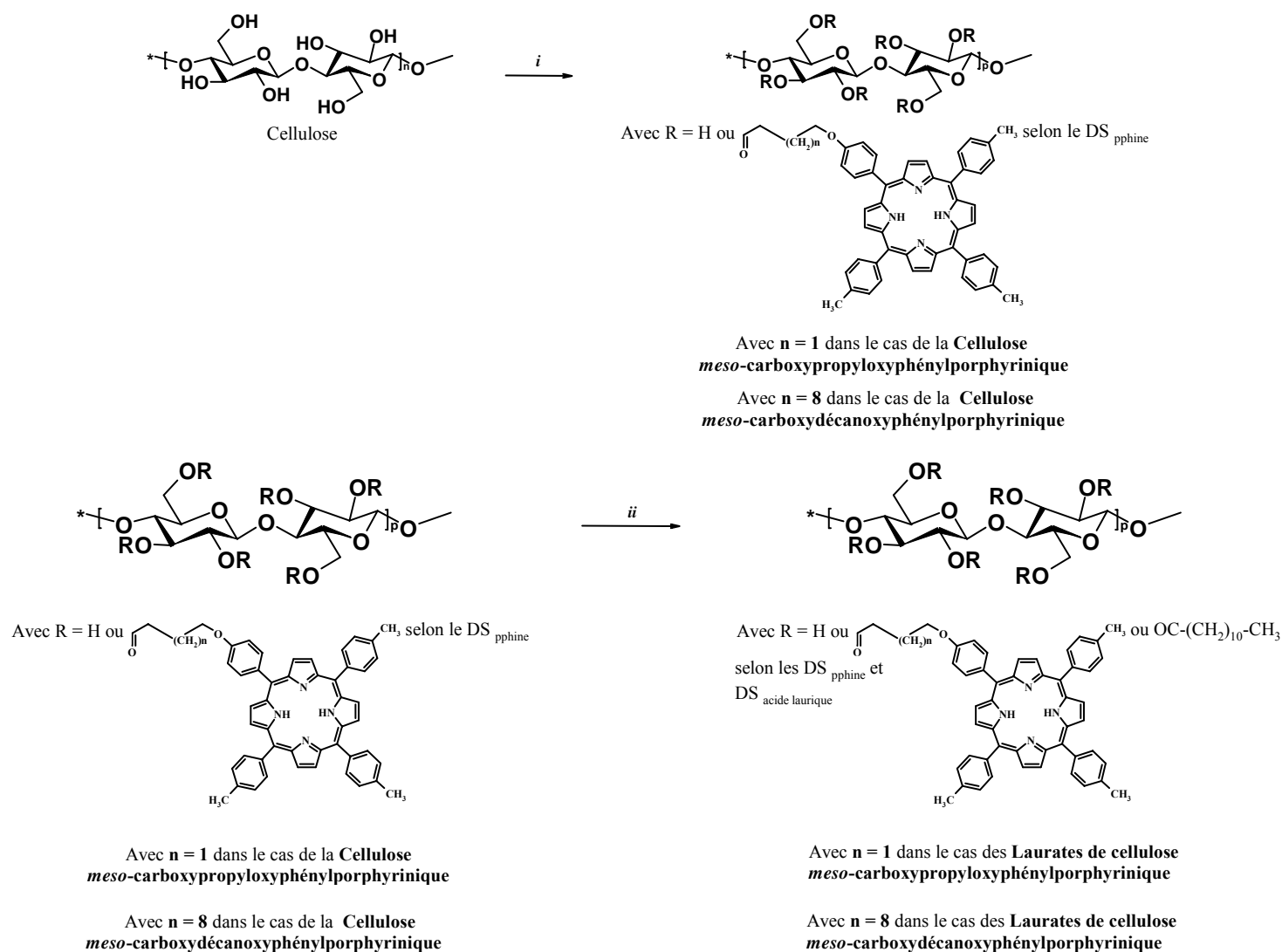


Figure II-3 : Schéma synthétique des laurates de cellulose meso-arylporphyriniques.

(i) **3** ou **5**, TsCl/Pyridine, DMA/LiCl, 80°C ; (ii) acide laurique, TsCl/Pyridine, DMA/LiCl, 80°C.

3-Synthèse des porphyrines

3-1-Synthèse de la *para*-hydroxyphényltritolylporphyrine selon la méthode de Little

La *mono*-hydroxyphényltritolylporphyrine a été synthétisée selon la méthode des "aldéhydes mixtes" (figure II-4).

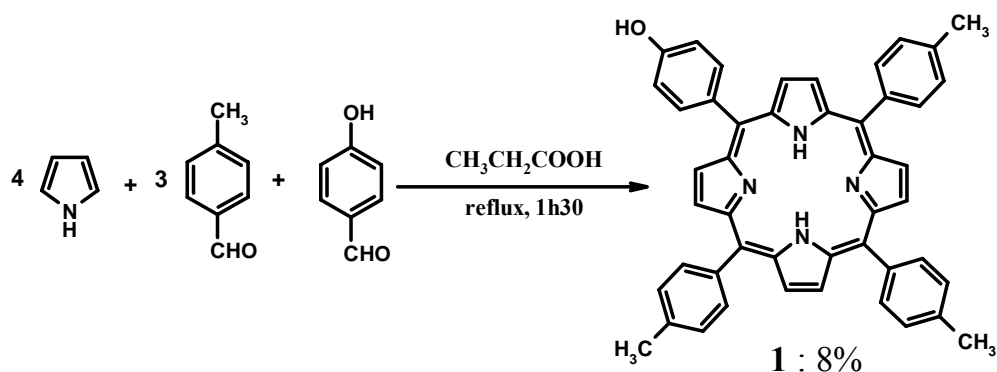


Figure II-4: Synthèse de la *para*-hydroxyphényltritolylporphyrine selon la méthode de Little.

Le produit attendu est obtenu par la condensation du pyrrole (4 éq.), du *para*-tolualdéhyde (3 éq.) fraîchement distillés et du 4-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.), dans l'acide propionique à reflux qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. La porphyrine *mono*-hydroxylée cristallise après 18 heures à 4°C, en même temps que d'autres produits qui sont essentiellement la tétratolylporphyrine (H_2TTP) et des porphyrines di et trihydroxylées. Ce mélange est ensuite purifié par chromatographie. On obtient ainsi le composé **1** avec un rendement de 8%. Ce rendement, certes modeste, reste néanmoins conforme à ce type de réaction et résulte en partie de la polymérisation concomitante du pyrrole.

3-2-Synthèse de la *para*-hydroxyphényltritolylporphyrine selon la méthode de Lindsey

A des fins de comparaison, la *mono*-hydroxyphényltritolylporphyrine a également été obtenue par la méthode de Lindsey^[18] (figure II-5).

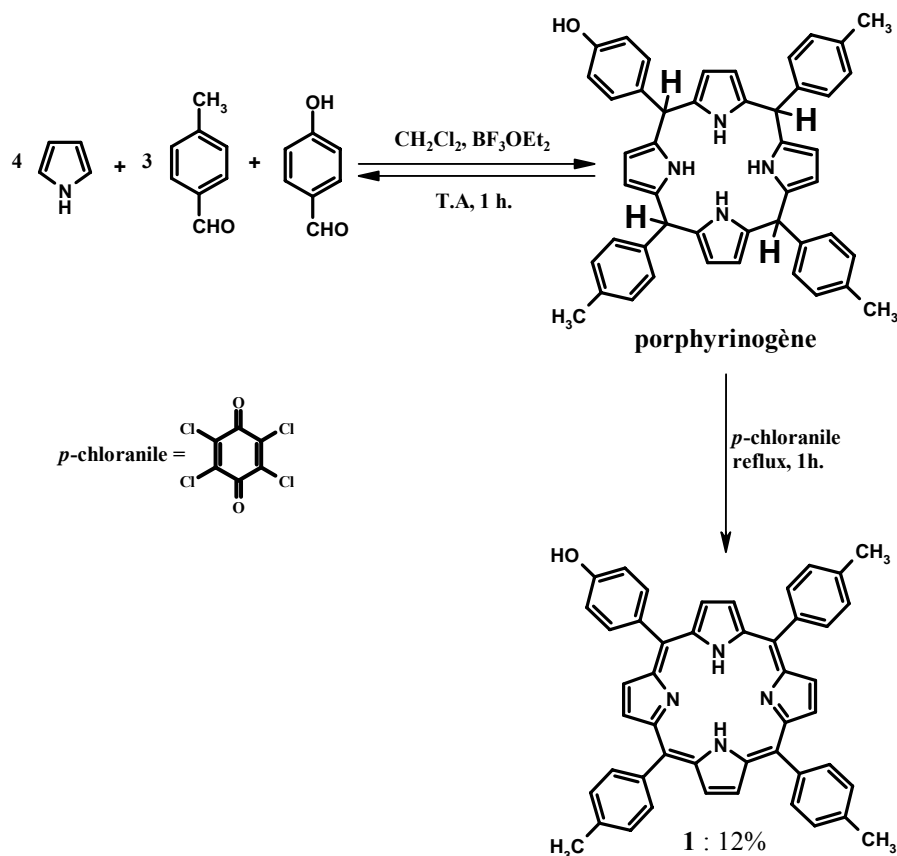


Figure II-5 : Synthèse de la *para*-hydroxyphényltritolylporphyrine selon Lindsey.

Dans un premier temps, des quantités stoechiométriques de pyrrole et d'aldéhydes en présence d'acide de Lewis sont mis à réagir dans le dichlorométhane. Au bout d'une heure, les porphyrinogènes formés sont dans un second temps oxydés par addition de *para*-chloranile. Après purification, la porphyrine attendue est isolée avec un rendement (12%) légèrement supérieur à celui obtenu par la méthode de Little. Cependant, avec ce dernier procédé la quantité de réactifs employée est environ vingt fois supérieure à celle utilisée avec la méthode de Lindsey.

3-3-Synthèse des carboxyporphyrines 3 et 5

Ce programme a été poursuivi par la synthèse de la *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine et de la *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrine. Ces composés ont été obtenus en deux étapes. La première étape a consisté en la fixation de

chaînes alkyles portant une fonction ester qui par la suite a été saponifiée au cours de la seconde étape pour libérer la fonction acide carboxylique.

3-3-1-Alkylation de la *p*-hydroxyphényltritolylporphyrine

Les porphyrines **2** et **4** ont été obtenues par une O-alkylation de la fonction phénol par la réaction de Williamson (figure II-6).

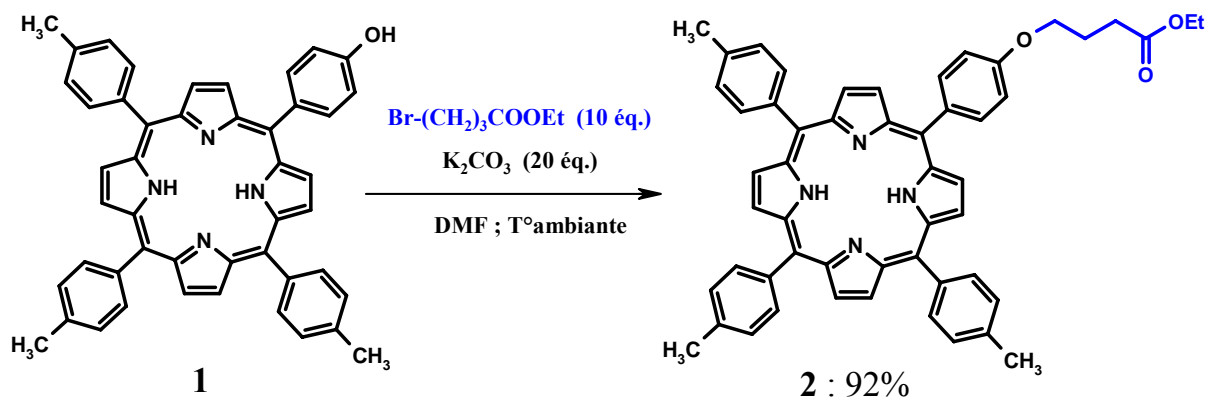


Figure II-6 : O-Alkylation de la mono-hydroxyphényltritolylporphyrine.

Dans le diméthylformamide rigoureusement anhydre, le 4-bromobutanoate d'éthyle ou le 11-bromoundécanoate de méthyle sont mis à réagir sur le groupement hydroxyle de la *para*-monohydroxyphényltritolylporphyrine en présence d'un large excès de carbonate de potassium durant 24 heures à température ambiante. Après un traitement classique et purification par chromatographie, la *meso*-éthoxycarbonylpropyloxyphénylporphyrine (**2**) et la *meso*-méthoxycarbonyldécanoxyphénylporphyrine (**4**) sont obtenues avec des rendements respectifs de 92% et 90%. Nous avons constaté qu'une élévation de la température entraîne une augmentation de la vitesse de réaction mais également une dégradation partielle du produit formé, les rendements n'excédant pas dans ce cas 70%.

3-3-2-Déprotection des porphyrines ester 2 et 4

Les fonctions acides des composés **2** et **4** ont été déprotégées en milieu basique dans des conditions classiques (KOH/EtOH) en deux heures (figure II-7). Les produits attendus **3** et **5** sont obtenus après traitement avec des rendements quasi quantitatifs.

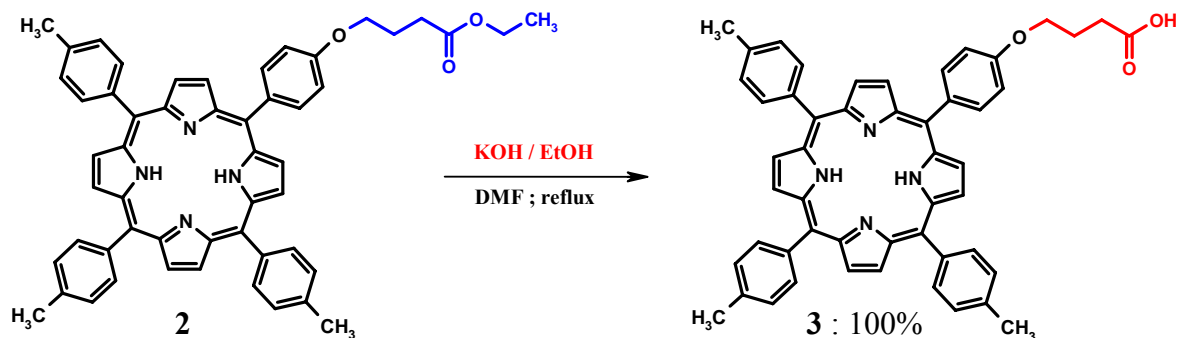


Figure II-7 : Saponification de la porphyrine ester **2**.

3-4-Characterisation

Les porphyrines isolées ont été caractérisées par spectroscopie UV-visible, spectrométrie de masse et par spectroscopie RMN ^1H .

3-4-1-Spectroscopie UV-visible

Les spectres de tous les composés ont été mesurés dans le chloroforme (Tableau II-1). Ils correspondent tous aux spectres généralement attendus pour les porphyrines bases libres de type *meso*. On retrouve ainsi une forte bande d'absorption vers 420 nm, la bande de Soret et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 590, 550 et 520 nm notées respectivement I, II, III et IV.

Tableau II-1 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visibles des *meso*-arylporphyrines **1** – **5** (CHCl₃).

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

Composés	Soret	IV	III	II	I	ϵ_{II}/ϵ_I
1	418 (363,0)	516 (13,5)	552 (7,4)	592 (4,0)	648 (4,3)	0,93
2	420 (354,0)	516 (14,3)	552 (7,2)	592 (4,7)	648 (4,2)	1,12
3	420 (355,7)	517 (13,4)	553 (7,2)	592 (4,0)	648 (3,8)	1,05
4	419 (444,0)	518 (13,3)	553 (8,3)	593 (5,6)	648 (4,8)	1,17
5	419 (445,7)	518 (12,3)	554 (8,5)	593 (5,0)	648 (4,4)	1,14

La plupart de ces spectres appartiennent au type *etio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des petites aux grandes longueurs d'onde (IV>III>II>I). Le composé **1**, présente de légères modifications dans l'intensité relative des bandes I et II conduisant à des spectres atypiques avec un coefficient ϵ_I supérieur à ϵ_{II} . A titre d'exemple, nous présentons le spectre des composés **3** et **5** sur la figure II-8.

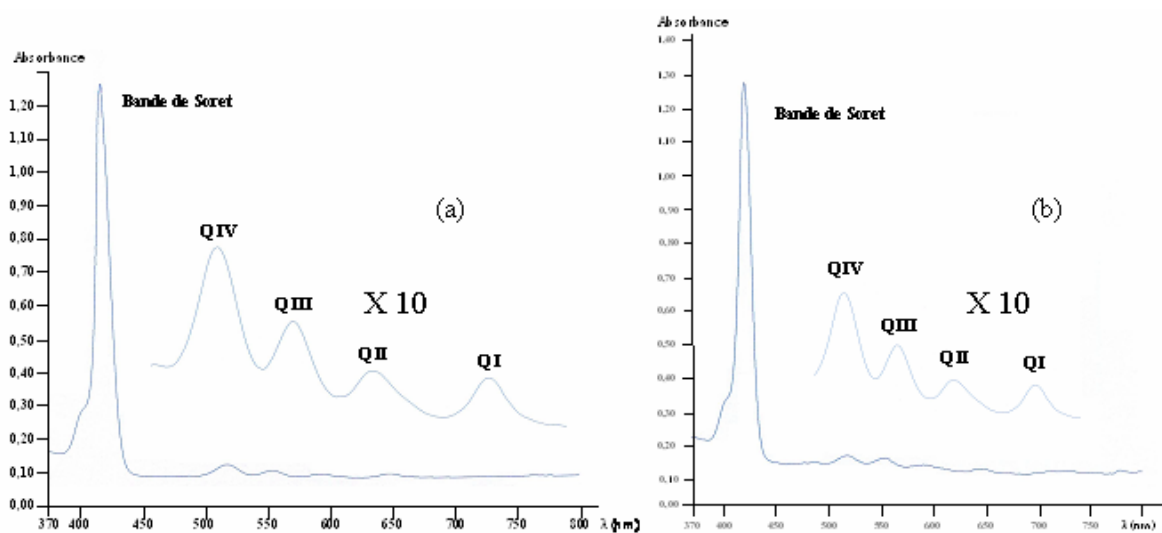


Figure II-8 : (a) Spectre UV-visible de la *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine **3** (CHCl₃, C=6,9.10⁻⁶ mol.L⁻¹) ; (b) spectre UV-visible la *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrine **5** (CHCl₃, C=7,5.10⁻⁶ mol.L⁻¹).

3-4-2-Spectrométrie de masse

L'analyse structurale des porphyrines a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse. Comme nous l'avons mentionné précédemment, ces composés, non volatils ne se prêtent pas aux techniques classiques d'ionisation chimique ou d'ionisation par impact électronique. Pour cette raison, nous nous sommes tournés vers une technique particulière utilisant la désorption laser assistée par effet de matrice : le MALDI. Cette méthode permet l'observation de l'ion quasi-moléculaire généralement sans fragmentation. Le tableau II-2 présente les résultats obtenus pour les porphyrines **1** – **5**. Tous les spectres présentent, comme attendu, uniquement le pic de l'ion quasi moléculaire $[M+H]^+$. A titre d'exemple nous présentons sur la figure II-9 le spectre obtenu pour le composé **5**.

Tableau II-2 : Spectrométrie de masse MALDI des composés **1** - **5**.

<i>Composés</i>	<i>Masse molaire calculée (uma)</i>	<i>Masse de l'ion quasi- moléculaire observé (uma)</i>
1	672,29	673,60
2	786,36	787,90
3	758,33	759,90
4	870,45	871,50
5	856,44	857,58

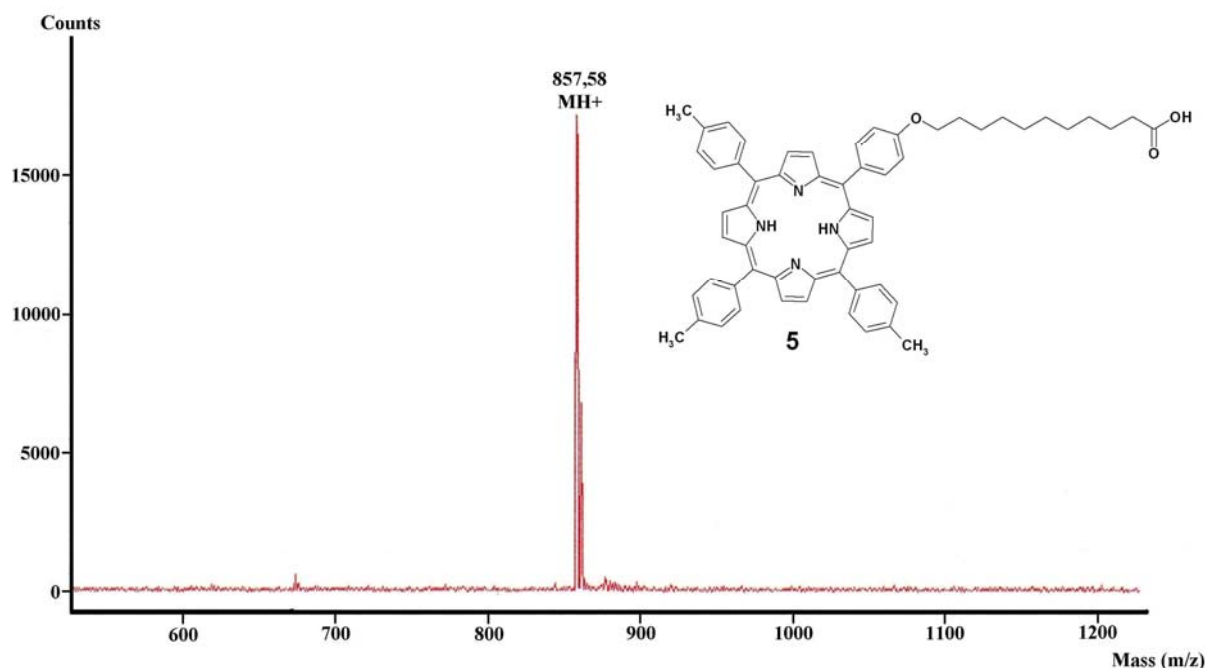


Figure II-9 : Spectre de masse MALDI du composé **5**.

3-4-3-Spectroscopie RMN ^1H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des *meso*-tritolylporphyrines **1–5** ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutérié. Le tableau II-3 présente les attributions détaillées des signaux observés. D'une manière générale, le spectre RMN ^1H d'un composé de ce type se compose des groupes de signaux suivants :

- Les protons β -pyrroliques vers 8,8 ppm,
- Les protons phényliques entre 8,3 et 7 ppm,
- Les protons de la chaîne carbonée entre 4,5 et 1,2 ppm,
- Les protons méthyliques des groupements tolyles vers 2,6 ppm,
- Les protons méthyliques du groupement acétyle vers 2,2 ppm,
- Les protons NH pyrroliques vers -2,7 ppm.

Tableau II-3 : RMN 1H des tritolylporphyrines *para*-substituées 1-5 (CDCl₃), δ en ppm (J en Hertz).

<i>H</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<u>Pyroles</u>					
2,8	8,93 d (4,4)	8,88 s	8,83 s	8,86 d (4,9)	8,86 d (4,4)
3,7	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s	8,85 d (4,9)	8,85 d (4,4)
12	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s	8,87 s ap.	8,94 s ap.
13	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s	8,87 s ap.	8,94 s ap.
17	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s	8,87 s ap.	8,94 s ap.
18	8,84 s ap.	8,88 s	8,83 s	8,87 s ap.	8,94 s ap.
NH	-2,76 s él.	-2,71 s él.	-2,76 s él.	-2,76 s él.	-2,76 s él.
<u>Phényle</u>					
2,6	8,03 d (8,2)	8,11 d (8,4)	8,07 d (7,7)	8,10 d (7,7)	8,09 d (7,8)
3,5	7,15 d (8,2)	7,26 d (8,4)	7,23 d él. (7,7)	7,26 d (7,7)	7,25 d (7,8)
<u>Tolyles</u>					
2,6	8,08 d (7,7)	8,12 d (7,7)	8,09 d (7,7)	8,10 d (7,7)	8,09 d (7,8)
3,5	7,53 d (7,7)	7,56 d (7,7)	7,52 d (7,7)	7,55 d (7,7)	7,54 d (7,8)
CH ₃	2,69 s	2,69 s	2,68 s	2,70 s	2,69 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)	-	-
CH ₂ -éthyle	-	4,25 quad. (7,2)	-	-	-
CH ₃ -éthyle	-	1,36 t (7,2)	-	-	-
2	-	-	-	3,49 m	3,38 m (6,7)
3,10	-	-	-	2,32 m	2,32 m
4,5,6,7,8	-	-	-	1,63 m	1,62 m
9	-	-	-	1,97 m	1,96 m
11	-	-	-	4,24 t (6,4)	4,22 t
CH ₃	-	-	-	3,34	-

A titre d'exemple, nous présentons l'étude détaillée du spectre RMN ^1H de la 5-[4-(3-éthoxycarbonylpropyloxy)phényl]-10,15,20-tris(4-méthylphényl)porphyrine (**2**). Cette tritolylporphyrine est donc substituée en position para du groupement *meso*-aryle par un bras 3-éthoxycarbonylpropyloxy (figure II-10).

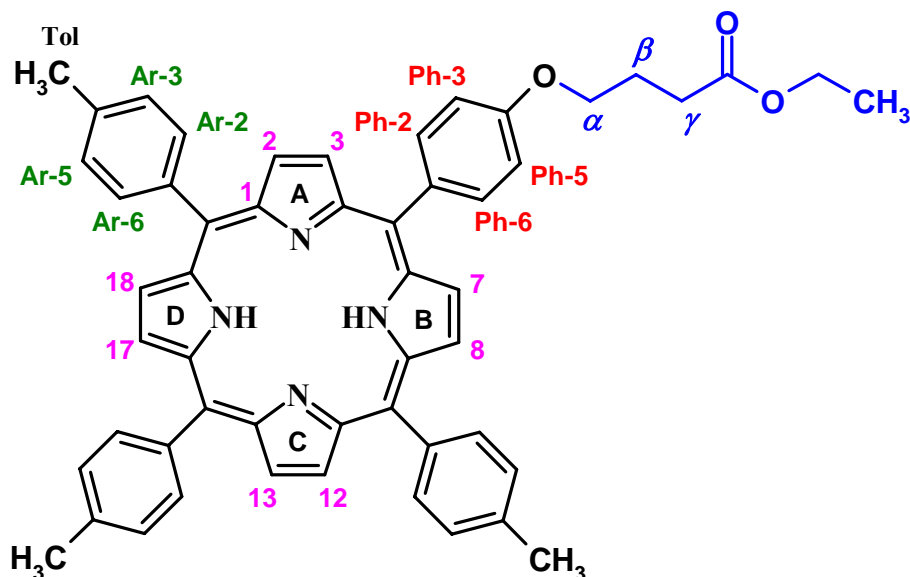


Figure II-10 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN.

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 (H-Ph-2,6) ($J = 8,4$ Hz) et à 7,26 ppm (H-Ph-3,5) ($J = 8,4$ Hz). 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 (H-Ar-2,6) ($J = 7,7$ Hz) et 7,56 ppm (H-Ar-3,5) ($J = 7,7$ Hz). Concernant les protons de la chaîne alkyle H- α , H- β et H- γ , nous observons qu'ils résonnent respectivement sous la forme d'un triplet à 4,30 ppm ($J = 6,0$ Hz), d'un quintuplet à 2,31 ppm ($J = 6,0$ Hz) et d'un triplet élargi à 2,66 ppm ($J = 6,0$ Hz). Les protons de la chaîne éthyloxy résonnent sous la forme d'un quadruplet à 4,25 ppm ($J = 7,2$ Hz) (CH_2) et d'un triplet à 1,36 ppm ($J = 7,2$ Hz) (CH_3). Les protons méthyliques des tolyles résonnent sous la forme d'un singulet à 2,71 ppm. Enfin, les protons NH pyrroliques fortement blindés, se situent à -2,79 ppm sous la forme d'un singulet élargi.

Si l'on compare les spectres des composés **2** et **4**, aucun blindage des protons des chaînes hydrocarbonées suggérant que les protons du composé **4** se trouvent dans le cône de blindage du macrocycle porphyrinique n'a été observé (tableau II-3). De plus, il est à noter qu'aucune

perte de symétrie de la molécule provoquant la multiplication des signaux β -pyrroliques ainsi qu'un élargissement des signaux des protons aromatiques n'a été constatée. Ces résultats suggèrent que ni le bras court (4 carbones) et ni le bras long (11 carbones), ne se replient sur le macrocycle, contrairement aux porphyrines substituées en position *meso* par un éthoxycarbonylpropyloxyphényl *ortho*-substitué comme cela a déjà été démontré dans notre laboratoire.^[87] Ces résultats montrent donc que les bras portés par les *meso*-arylporphyrines **3** et **5** sont donc dans le plan moyen de la porphyrine. De ce fait, ils jouent parfaitement leur rôle de bras espaceur en permettant d'éloigner le macrocycle du squelette cellulosique lors de sa fixation.

4-Synthèse de matériaux plastiques *meso*-arylporphyriniques

4-1-Généralités

L'étape suivante a été la synthèse des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques. Le processus général adopté pour la synthèse de ces esters de cellulose par estérification est présenté sur la figure II-11. Cette synthèse s'effectue "one pot" en deux étapes. Dans un premier temps, la cellulose préalablement dissoute dans le système de solvant DMA/LiCl, est estérifiée soit par la *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine **3** soit par la *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrine **5**, puis dans un second temps par l'acide laurique. Les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques sont alors purifiés et un casting est effectué par dissolution de l'ester dans un minimum de chloroforme suivie de l'évaporation de celui-ci à pression et température ambiante. Le film est enfin récupéré sur les parois du récipient.

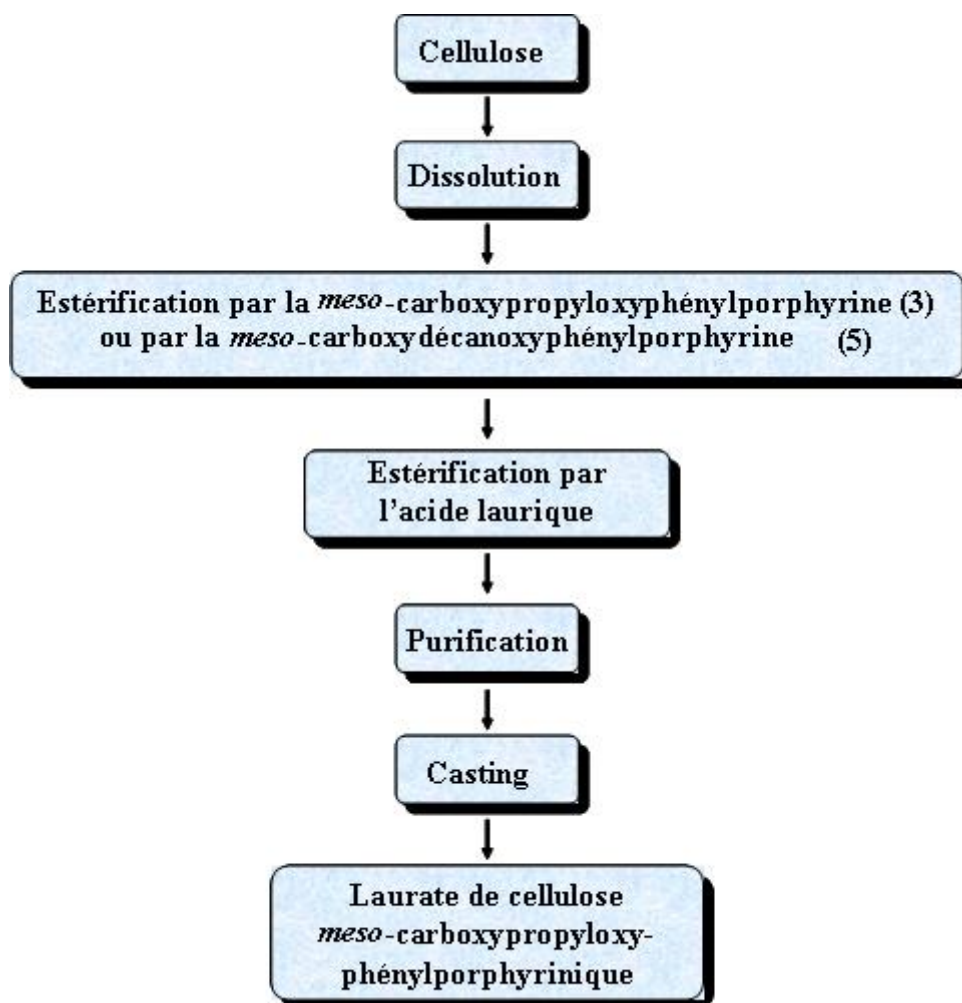


Figure II-11 : Processus adopté pour l'obtention des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques.

Nous avons dans un premier temps décrit la nature de l'agent activant utilisé pour la réaction d'estérification, puis dans un second temps, nous avons caractérisé les esters synthétisés. Par la suite, l'influence des différents paramètres réactionnels sur la réaction a été appréhendée au cours de la synthèse de laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques notamment à travers les variations du rendement massique et des DS_{pphine} et $DS_{acide\ laurique}$. Nous avons alors finalisé notre travail par la synthèse de laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques possédant des teneurs en porphyrines variées, afin de tester l'influence de la teneur en porphyrine des films plastiques sur l'activité antibactérienne.

4-2-Résultats et discussion

4-2-1-Dissolution de la cellulose

La cellulose utilisée se présente sous la forme d'une poudre possédant un diamètre de particules de 20 μm et un degré de polymérisation moyen de 200. Parmi les différents systèmes de solvants permettant la dissolution de la cellulose cités au chapitre I, nous avons utilisé le système de solvant DMA/LiCl car il présente l'avantage de ne pas dégrader la cellulose. La méthode employée est basée sur des échanges de solvants eau/méthanol/DMA réalisés par trois mises en suspension successives du polysaccharide dans chaque solvant. Après une nuit d'agitation à 80°C dans une solution de DMA contenant 8 % de chlorure de lithium, une solution limpide de cellulose est obtenue. Nous avons par la suite essayé d'éliminer les échanges de solvants eau/méthanol/DMA. Nous avons dans ce but adapté la méthode de Heinze^[76] en portant à 120°C pendant 2 heures une suspension de cellulose dans le DMA contenant 8 % de chlorure de lithium, suivi d'une nuit d'agitation à température ambiante. Dans ce cas, nous avons également obtenu une solution limpide de cellulose possédant la même concentration que celle précédemment obtenue par la méthode des échanges de solvants.

4-2-2-Présentation des synthèses

Pour estérifier la cellulose, il nous a semblé adéquat d'utiliser une activation préalable des fonctions acides portées par les *meso*-arylporphyrines **3** et **5** et l'acide laurique par le chlorure de tosylo^[84] en raison de la facilité de mise en œuvre de ce procédé permettant d'obtenir des celluloses de hauts degrés de substitution (chapitre I).

4-2-2-1-Estérification de la cellulose par les *meso*-arylporphyrines

L'estérification du polysaccharide a été réalisée en phase homogène dans le solvant DMA/LiCl. La cellulose est mise à réagir sous atmosphère inerte soit avec la *meso*-carboxypropyloxyphényl-10,15,20-tritolylporphyrine (**3**) ou la *meso*-carboxydécanoxyphényltritolylporphyrine (**5**) en présence de quantité stoechiométrique de TsCl et de pyridine, à 80°C durant 24 heures (figure II-12).

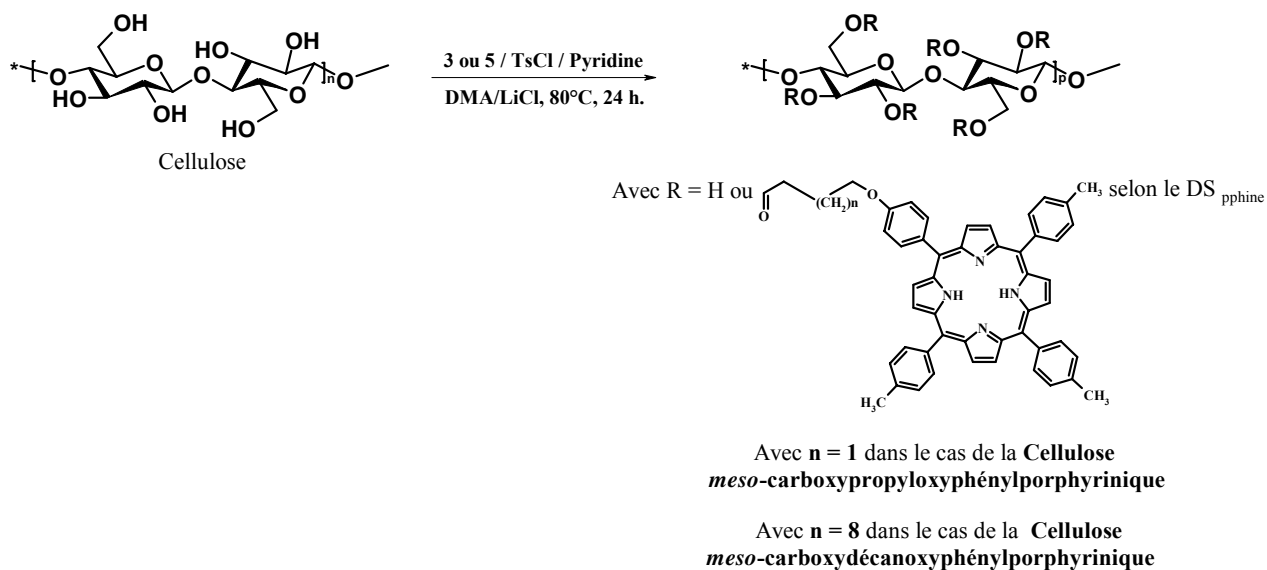


Figure II-12 : Estérification de la cellulose par les *meso*-arylporphyrines 3 et 5.

4-2-2-2-Estérification des celluloses porphyriniques par l'acide laurique

Les celluloses porphyriniques synthétisées précédemment ont ensuite été estérifiées in situ par l'acide laurique dans les mêmes conditions, toujours en présence de quantité équimolaire de TsCl et de pyridine, constituant ainsi la deuxième étape de la réaction « one pot » (figure II-13).

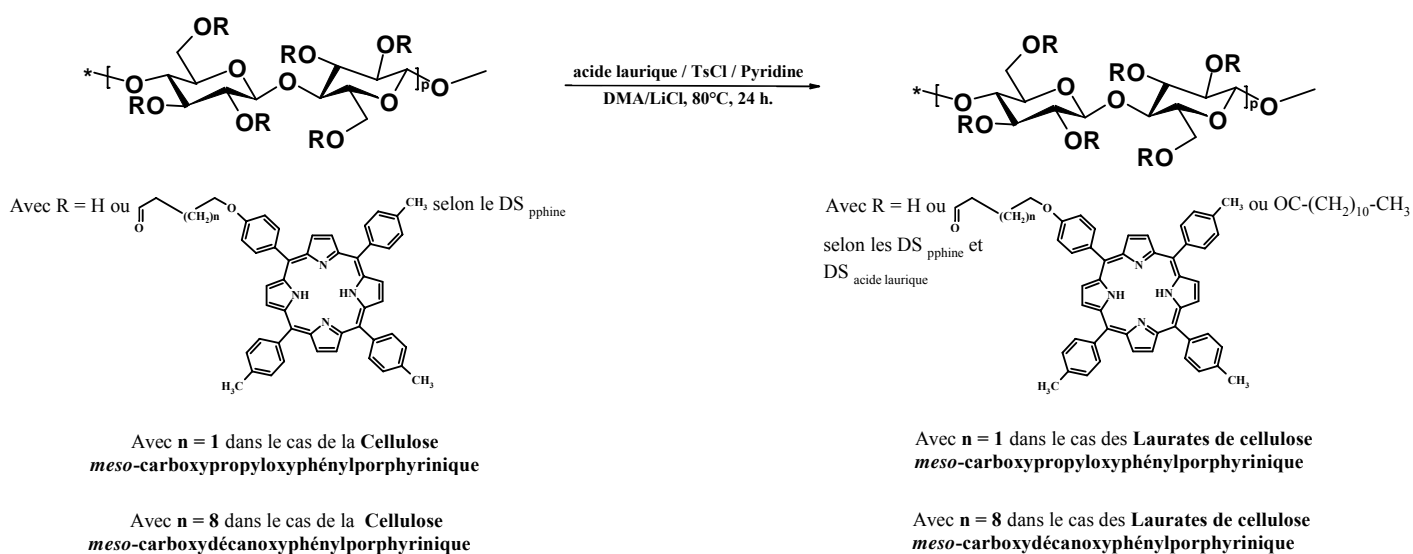


Figure II-13 : Estérification des intermédiaires celluloses porphyriniques par l'acide laurique.

Les laurates de cellulose porphyriniques ainsi synthétisés sont purifiés par la méthode des précipitation-dissolution avec du méthanol et du chloroforme respectivement. Après une simple filtration sur laine de verre pour éliminer les chaînes celluloses insolubles, la mise en forme est réalisée par casting, cette étape correspondant à la dissolution de l'ester dans du chloroforme suivie de l'évaporation de celui-ci à l'air libre et à température ambiante. La figure II-14 montre un laurate de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrinique ainsi obtenu.



Figure II-14 : Photographie d'un laurate de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyrinique.

4-2-3- Caractérisation des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques synthétisés

Tous les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie Infra-rouge et UV-visible. Aussi, nous avons réalisé une étude détaillée par spectroscopie RMN ^1H de tous ces esters.

4-2-3-1-Spectroscopie IR

L'analyse infra-rouge a été réalisée sur des esters de cellulose par transmission directe du faisceau à travers un film plastique très fin. Les spectres obtenus sont comparés par rapport à l'empreinte IR de la cellulose de départ (figure II-15). Les spectres IR obtenus à partir de laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques et *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques sont identiques. A titre d'exemple nous présentons sur la figure II-15 le spectre d'un ester de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique.

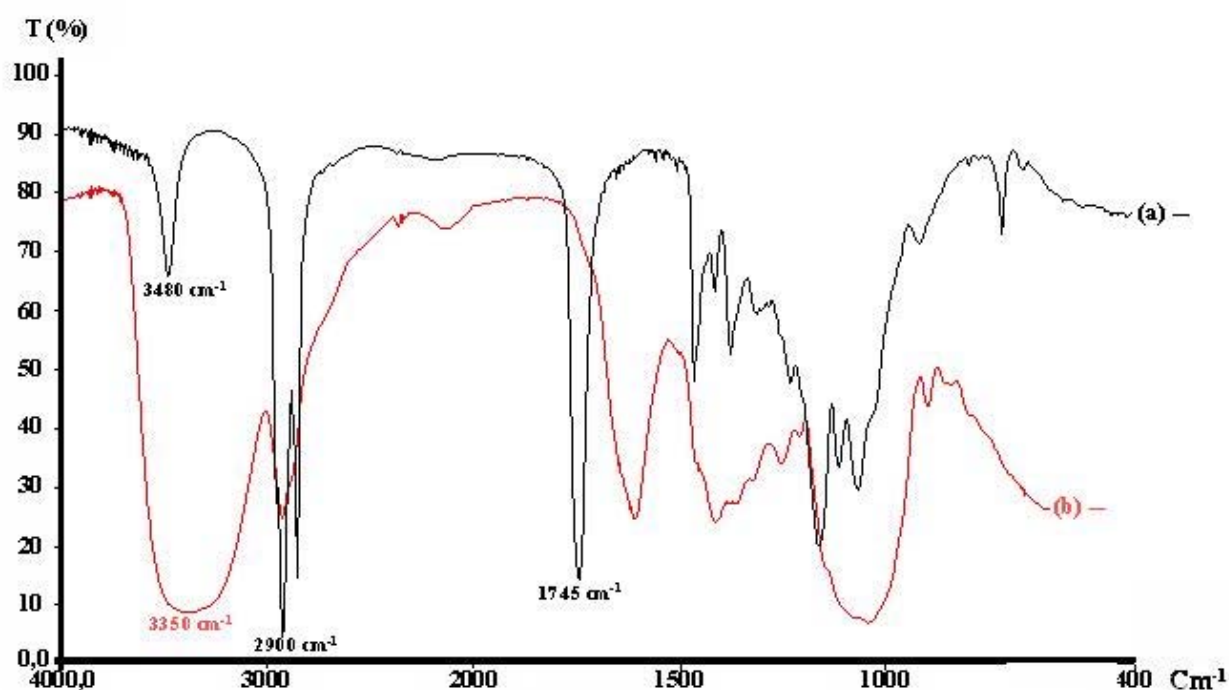


Figure II-15 : (a – courbe noire) Spectre infra-rouge d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique de $\text{DS}_{\text{pphine}}$ égal à 0,01 et de $\text{DS}_{\text{acide laurique}}$ égal à 2,61 ; (b – courbe rouge) spectre infra-rouge de la cellulose de départ.

L'utilisation de la spectroscopie IR permet en analysant l'apparition et la disparition de certaines bandes caractéristiques de mettre en évidence l'aspect qualitatif de l'estérification de la cellulose. L'estérification se traduit sur les spectres IR des films plastiques par une diminution de l'intensité de la bande située à 3350 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de valence des groupements hydroxyles, ainsi qu'un déplacement de celle-ci vers 3480 cm^{-1} s'expliquant par la disparition des fonctions alcools et donc des liaisons hydrogène de la cellulose de départ. Aussi on remarque que cette baisse d'intensité est corrélée d'une part avec

l'apparition d'une bande vers 1745 cm^{-1} caractéristique des fonctions esters et d'autre part avec une augmentation de l'intensité des bandes vers 2900 cm^{-1} caractéristiques de la vibration de valence des liaisons C-H des groupements alkyles des chaînes grasses. Aussi compte tenu des faibles valeurs de DS_{pphine} (0,01) aucun signal correspondant au noyau porphyrinique n'a été observé sur les spectres IR. D'autre part, l'absence de bandes vers 1364 cm^{-1} et 1177 cm^{-1} correspondant au respectivement aux bandes de vibration asymétrique et symétrique de la fonction SO_2 montre que la cellulose n'a pas été tosylée au cours de l'estérification.

4-2-3-2-Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visibles de tous les polymères estérifiés ont été mesurés dans le chloroforme. Ils correspondent tous au spectre de la *meso*-arylporphyrine correspondante en solution dans le CHCl_3 . On retrouve ainsi sur les spectres des deux types de laurates de cellulose porphyriniques une forte bande d'absorption vers 420 nm, la bande de Soret et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 595, 537 et 517 nm notées respectivement I, II, III et IV. Tous les spectres appartiennent au type *etio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des petites aux grandes longueurs d'onde ($\text{IV} > \text{III} > \text{II} > \text{I}$). De plus, aucune modification particulière relative à l'intensité ou à la position des bandes n'a été observée, ce qui traduit l'absence d'interaction particulière entre les macrocycles greffés sur le squelette cellulosique. Ceci s'explique par la faible valeur des DS_{pphine} des esters synthétisés. A titre d'exemple, nous présentons sur la figure II-16 le spectre UV-visible d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique ayant un DS_{pphine} égale à 0,01 et un $DS_{\text{acide laurique}}$ égale à 2,61.

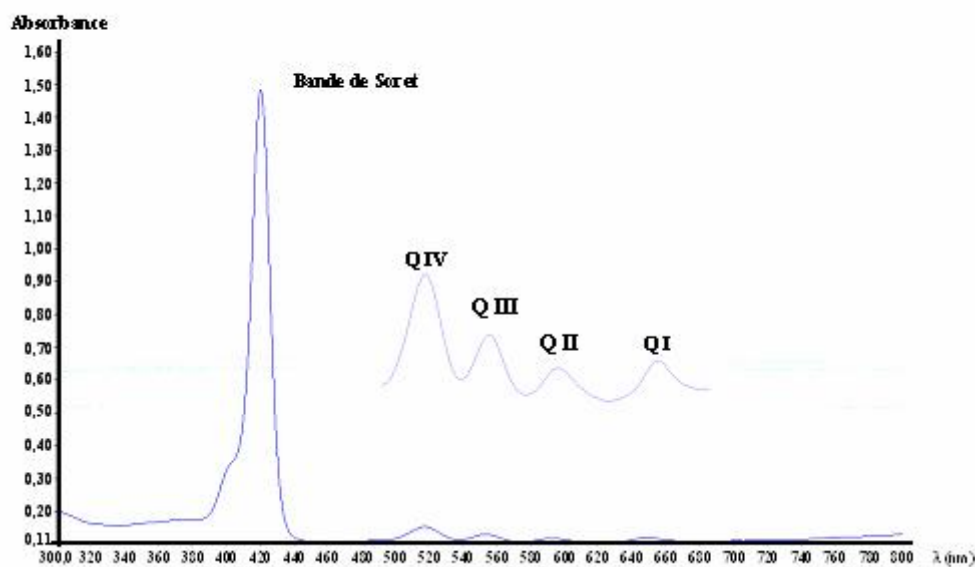


Figure II-16 : Spectre UV-visible d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique

de DS_{pphine} 0,01 et DS_{acide laurique} de 2,61.

4-2-3-3-Spectroscopie RMN ¹H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des laurates de cellulose porphyriniques ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutérié. D'une manière générale on retrouve sur le spectre RMN ¹H les signaux des protons β-pyrroliques vers 8,8 ppm, les protons phényliques entre 8,3 et 7 ppm, les protons des unités glucidiques entre 5,2 et 3 ppm, les protons de la chaîne carbonée et des chaînes grasses entre 4,5 et 0,8 ppm, les protons méthyliques des groupements tolyles vers 2,6 ppm et les protons NH pyrroliques vers -2,7 ppm (figure II-17).

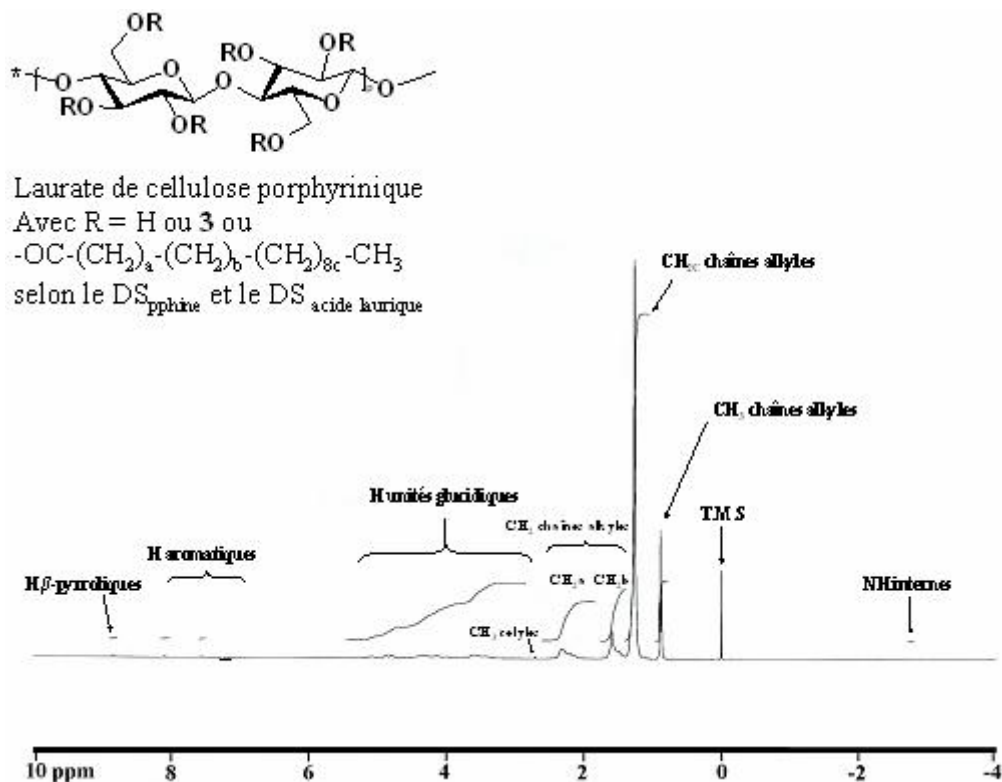


Figure II-17 : Spectre RMN ^1H d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique de $\text{DS}_{\text{pphine}}$ de 0,01 et $\text{DS}_{\text{acide laurique}}$ de 2,61.

Cependant, bien que les figures et les déplacements chimiques des signaux des protons des macrocycles porphyriniques soient identiques à ceux des porphyrines libres correspondantes, on remarque que l'intégration de ces signaux est très faible par rapport aux protons des chaînes alkyloxy, de l'ordre de 0,024 H pour les protons β -pyrroliques et 0,025 H pour les protons phényles. Ces faibles valeurs d'intégration pour les protons des macrocycles s'expliquent par les faibles quantités de porphyrine greffée sur le polymère. Lorsqu'un agrandissement est réalisé on observe bien la présence sur le spectre de tous les signaux et figures correspondants aux protons de la porphyrine greffée sur le polymère (figure II-18). Si les signaux des macrocycles ne sont pas modifiés par la présence des nombreuses chaînes grasses greffées sur les unités anhydroglucoses, les signaux correspondants aux protons des bras espaceurs portés par les porphyrines sont masqués par les signaux des protons des chaînes grasses. De ce fait on ne peut voir leur présence sur le spectre. Les signaux des protons des chaînes grasses sont comparables à ceux observés pour des laurates de cellulose simples (sans porphyrine) et ne sont pas affectés par la présence sur le squelette cellulosique des porphyrines.

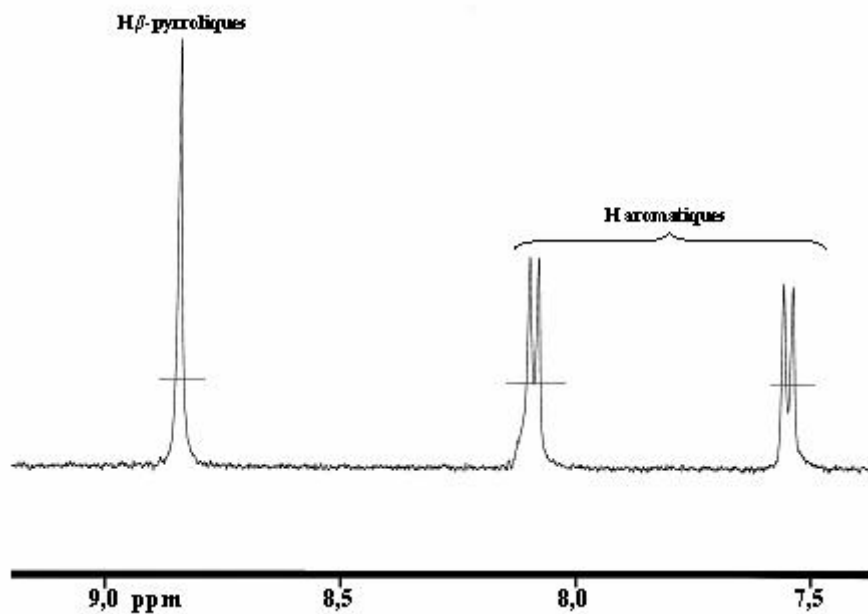


Figure II-18 : Agrandissement de la zone comprise 9 et 7,5 ppm du spectre RMN ^1H d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique de $\text{DS}_{\text{pphine}}$ 0,01 et $\text{DS}_{\text{acide laurique}}$ de 2,61.

A titre d'exemple, nous présentons l'étude détaillée du spectre RMN ^1H d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique possédant un degré de substitution en porphyrine égal à 0,01 et un degré de substitution en acide laurique égal à 2,61 (figure II-19).

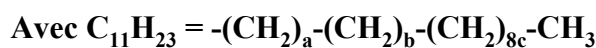
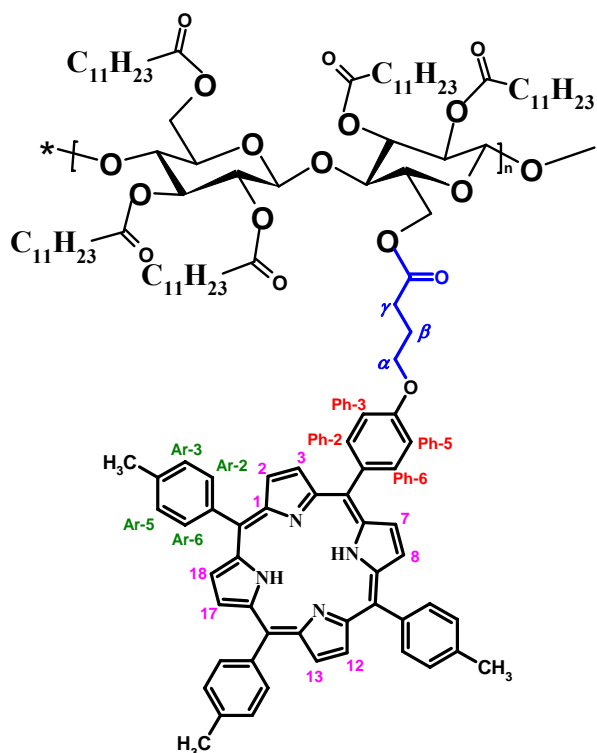


Figure II-19 : Numérotation adoptée pour la description du spectre RMN 1H du laurate de cellulose porphyrinique.

Les protons β -pyrroliques résonnent sous la forme d'un singulet à 8,84 ppm. Les protons aromatiques du phényle portant la chaîne hydrocarbonée en position para résonnent sous la forme de deux doublets à 8,10 ppm (H-Ph-2,6) ($J = 8,4$ Hz) et à 7,26 ppm (H-Ph-3,5) ($J = 8,4$ Hz). Compte tenu de la symétrie de la molécule, les protons aromatiques des trois groupements toyles, résonnent sous la forme de deux doublets, à 8,10 ppm ($J = 7,7$ Hz) et 7,56 ppm ($J = 7,7$ Hz). Les protons des unités glucidiques résonnent sous la forme d'un multiplet s'étendant de 5,20 à 3,04 ppm. Les protons méthyliques des toyles résonnent sous la forme d'un singulet à 2,71 ppm. Les protons des chaînes lauriques résonnent sous la forme d'un multiplet à 2,21 ppm (CH_2)_a, d'un multiplet à 1,59 ppm (CH_2)_b, d'un singulet élargi à 1,26 ppm (CH_2)_c et d'un triplet à 0,88 ppm ($J = 6,9$ Hz) pour le CH_3 terminal. Enfin, les protons NH pyrroliques fortement blindés, se situent à -2,77 ppm sous la forme d'un singulet élargi.

4-2-3-4-Le rendement massique

Le rendement massique est défini comme étant le rapport entre la masse du film plastique obtenu par la masse théorique maximale de plastique qu'il est possible d'obtenir (cellulose totalement estérifiée). Compte tenu des valeurs de DS_{pphine} qui sont relativement faibles par rapport aux valeurs de $DS_{acide\ laurique}$, la masse théorique maximale a été calculée en négligeant la masse des porphyrines greffées, à partir de 1 gramme de cellulose. Elle est obtenue en appliquant la formule suivante dont le calcul détaillé est présenté dans la partie expérimentale :

$$R_{massique} = \frac{m_{plastique\ obtenu}}{m_{maximale\ théorique}} = \frac{m_{plastique\ obtenu}}{4,37}$$

4-2-3-5-Les degrés de substitution

Les laurates de cellulose porphyriniques sont caractérisés par les valeurs des degrés de substitution DS_{pphine} et $DS_{acide\ laurique}$ qui rappellent le définissent respectivement le nombre moyen d'unités porphyriniques et le nombre moyen de chaînes alkyles greffées par unité anhydroglucose. Le degré de substitution en porphyrine est déterminé par dosage spectroscopique UV-visible en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre (porphyrine non fixée). Le nombre de mole de porphyrine contenu dans un échantillon de laurate de cellulose porphyrinique de masse m est donné après dosage UV-visible par la formule suivante :

$$DS_{pphine} = \frac{A \times V \times (162,14 + DS_{acide\ laurique} \times 182,32)}{\epsilon \times m}$$

Où A désigne l'absorbance de la bande de Soret, V le volume de solvant utilisé pour la dissolution de l'échantillon de plastique (en L), $DS_{acide\ laurique}$ le degré de substitution en acide laurique de l'échantillon, ϵ le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) et m la masse de l'échantillon analysé. Compte tenu des faibles valeurs du degré de substitution en porphyrine, celui-ci sera exprimé sur les graphiques suivants en pourcentage.

Le DS_{acide laurique} est déterminé par spectroscopie RMN ¹H. Les spectres RMN ¹H des laurates de cellulose porphyriniques (figure II-17) présentent trois types de signaux : les signaux des macrocycles porphyriniques, les signaux des unités glucidiques et les signaux des chaînes grasses. Les deux zones distinctes situées d'une part entre 3 et 5,2 ppm et d'autre part entre 0,5 et 2,5 ppm correspondent respectivement aux protons glucidiques et aux protons des chaînes alkyles. Le DS_{acide laurique} est alors obtenu par le rapport des intégrations des protons méthyliques des chaînes grasses et des protons glucidiques en appliquant la formule suivante :

$$DS_{acide\ laurique} = \frac{10 \times I_{CH_3}}{3 \times I_g + I_{CH_3}}$$

où I_{CH_3} et I_g désignent respectivement l'intégration des protons méthyliques des chaînes grasses et des protons des unités glucidiques des laurates de cellulose porphyriniques.

4-2-4-Optimisation des paramètres réactionnels

Nous avons dans un premier temps analysé l'influence des paramètres réactionnels sur la réaction d'estérification pour préparer dans un second temps toute une gamme de plastiques *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques et *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques possédant des degrés de substitution en porphyrine variés. La réaction a été étudiée avec la *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine (**3**). La méthodologie retenue consiste à faire varier les paramètres un à un que sont la température, le temps de réaction, la quantité d'acide laurique, la présence ou non de la base afin de déterminer les grandeurs les plus influentes sur les rendements et les DS. Dans un souci de normalisation toutes les synthèses ont été réalisées en partant de 1 g. de cellulose soit 50 ml de solution mère. Sauf précision, l'estérification de la cellulose a toujours été réalisée en faisant réagir 14 méq. de *meso*-carboxypropyloxyphényltritolylporphyrine (**3**) par UAG, activés par une quantité équivalente de TsCl et de pyridine. La seconde étape a été réalisée en utilisant 4 éq. d'acide laurique par UAG activé par une quantité équimolaire de TsCl et de pyridine. La durée de chaque étape a été fixée à 24 heures soit 48 heures de réaction au total.

4-2-4-1-Effet de la température

L'influence de la température sur le rendement massique et sur les DS a été évaluée en faisant varier la température de réaction entre 25 et 100°C. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

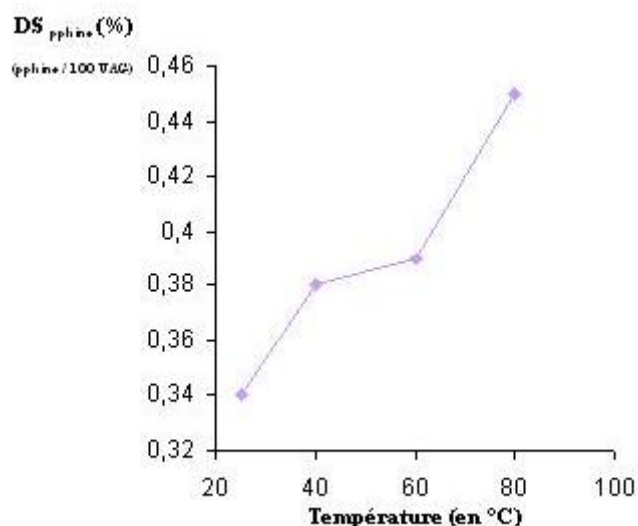


Figure II-20: Influence de la température sur le degré de substitution en porphyrine.

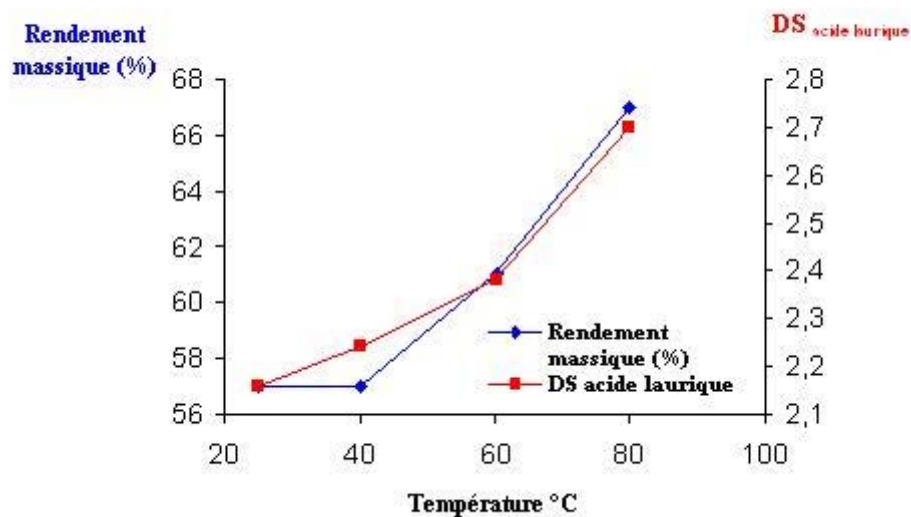


Figure II-21 : Influence de la température sur le rendement massique et sur le degré de substitution en acide laurique.

Les degrés de substitution et le rendement massique augmentent avec la température. Le degré de substitution en porphyrine augmente de 0,34 à 0,45% lorsque la température est élevée de 25 à 80°C (figure II-20).

Les courbes de rendement massique et de degré de substitution en acide laurique possèdent la même allure (figure II-21), ce qui montre que l'influence de la température sur ces deux paramètres est la même. A 25°C, c'est à dire à température ambiante, la valeur du degré de substitution en acide laurique est déjà élevée puisqu'elle atteint 2,16. Elle augmente ensuite avec la température pour atteindre la valeur de 2,70 à 80°C. Concernant le rendement massique, il est insensible à l'activation thermique pour des températures de réaction inférieures à 40°C. Il augmente ensuite au delà de 40°C pour passer de 57 % à la valeur de 67 % pour une température de 80°C. Soulignons qu'à 100°C aucun ester n'a été obtenu lors de la phase de précipitation, celui-ci devant se dégrader à cette température en chaînes plus courtes non récupérables. En conclusion, les laurates de cellulose de plus hauts DS ont été obtenus avec les meilleurs rendements massiques à 80°C.

4-2-4-2-Cinétique de la réaction

L'étude de l'influence du temps de réaction a été menée à 80°C, la durée de chaque étape ayant été fixée à 1 ; 2 ; 5 ; 7 et 24 heures. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

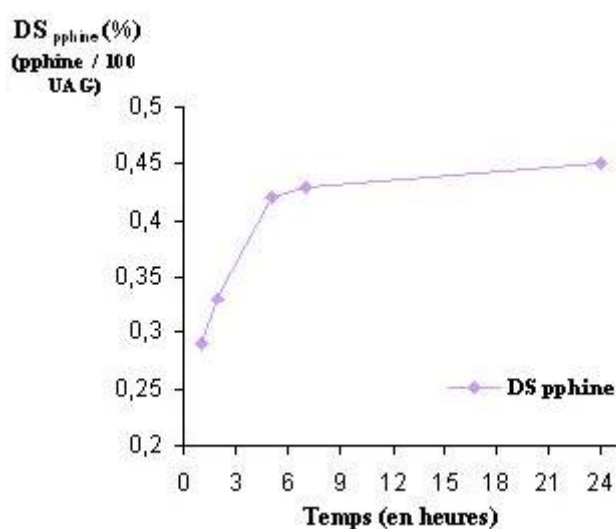


Figure II-22 : Influence du temps de réaction sur le degré de substitution en porphyrine.

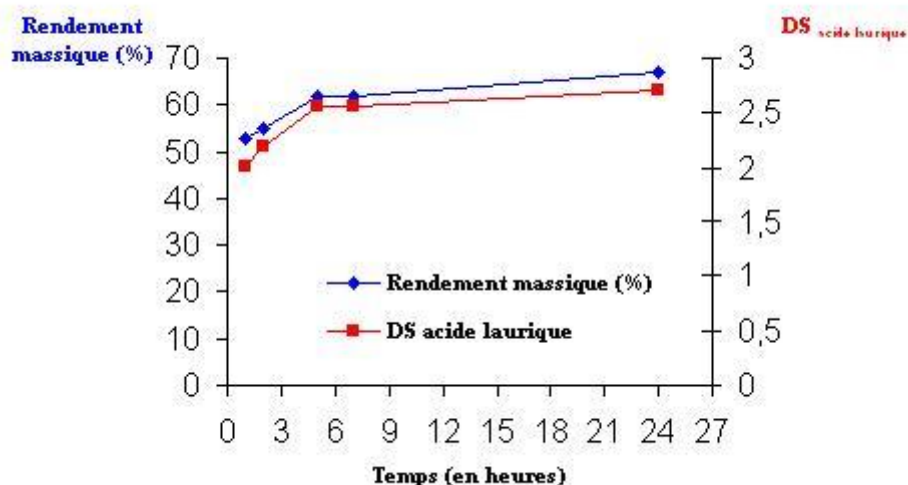


Figure II-23 : Influence du temps de réaction sur le rendement massique et sur le degré de substitution en acide laurique.

Les valeurs du degré de substitution en porphyrine augmentent avec le temps de réaction pour atteindre un palier après 7 heures de réaction (figure II-22). Au bout de seulement une heure de réaction un laurate de cellulose porphyrinique est obtenu avec un DS_{pphine} de 0,29%. Pour des temps de réaction courts, compris entre 1 et 7 heures, le degré de substitution en porphyrine augmente avec le temps de réaction pour atteindre un palier situé vers 0,45% pour des temps de réaction supérieurs à 7 heures. Ce phénomène peut s'expliquer par l'encombrement stérique de la porphyrine d'une part, mais aussi par le fait que la *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine est introduite dans le milieu réactionnel en défaut d'autre part. La valeur maximale du degré de substitution en porphyrine atteint 0,45% pour un temps de réaction de 24 heures.

Le degré de substitution en acide laurique et le rendement massique possèdent des cinétiques similaires (figure II-23). Les valeurs de degré de substitution en acide laurique sont élevées et égales à 2,02 après seulement une heure de réaction, puis elles augmentent pour atteindre la valeur de 2,7 après 24 heures de réaction. Les rendements massiques augmentent également, leurs valeurs passant de 53 à 67 % pour des temps de réaction respectifs de 1 et 24 heures. Pour des temps de réaction supérieurs à 7 heures, les valeurs de degré de substitution en acide laurique et de rendement massique sont constantes aux alentours de 2,7 et de 67 % respectivement.

4-2-4-3-Effet de la stoechiométrie en acide laurique

Pour évaluer l'influence de la stoechiométrie en acide laurique sur les degrés de substitution en acide laurique ($DS_{\text{acide laurique}}$) et les rendements massiques, nous avons fait varier la quantité d'acide laurique de 4 à 8 équivalents par unité anhydroglucose, en présence d'une quantité équivalente de TsCl et de pyridine, à 80°C, la durée de chaque étape étant fixée à 24 heures. Les résultats sont présentés sur la figure II-24.

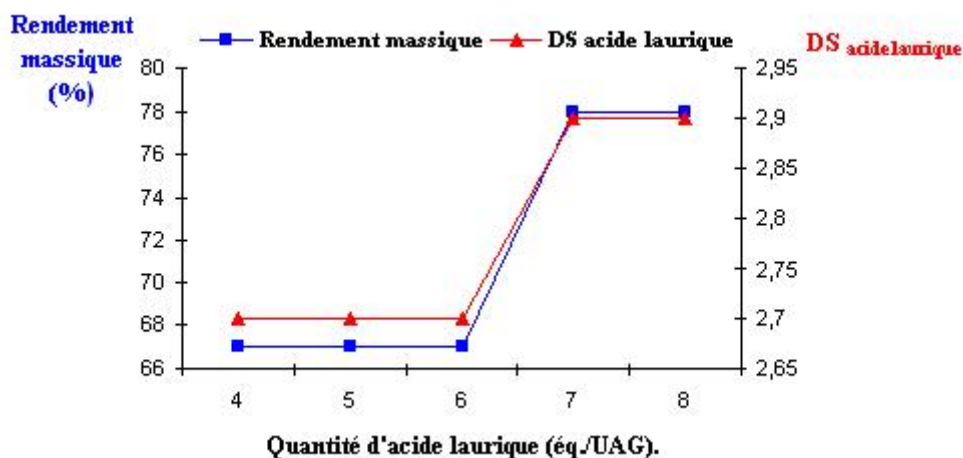


Figure II-24 : Influence de la stoechiométrie en acide laurique sur le $DS_{\text{acide laurique}}$ et le rendement massique.

La courbe montre que le $DS_{\text{acide laurique}}$ et le rendement massique sont influencés par la stoechiométrie en d'acide laurique (figure II-24). En effet, pour des quantités d'acide laurique comprises entre 4 et 6 équ. par UAG, les valeurs de $DS_{\text{acide laurique}}$ et de rendement massique sont constantes avec pour valeurs respectives 2,7 et 67 %. Les degrés de substitution en acide laurique et les rendements massiques augmentent ensuite lorsque 7 équivalents d'acide laurique sont utilisés pour atteindre les valeurs respectives de 2,9 et 78 %. Pour des quantités d'acide laurique utilisées supérieures à 7 équivalents, les valeurs de $DS_{\text{acide laurique}}$ et de rendement massique restent constantes avec pour valeurs respectives 2,9 et 78 %. L'évolution des $DS_{\text{acide laurique}}$ et des rendements va dans le même sens que celle observé pour la synthèse de laurates de cellulose simple.^[88] Cependant, l'utilisation de TsCl s'avère plus efficace que l'acylation directe à partir de chlorure d'acide. En effet, l'emploi de 4 équ./UAG d'acide laurique activé par une quantité équivalente de TsCl et de pyridine permet d'obtenir des laurates de cellulose simples de degré de substitution en acide laurique égale à 2,70. A titre de comparaison, l'obtention d'un laurate de cellulose par acylation à partir de chlorure d'acide laurique, ayant un degré de substitution de 2,66 ; nécessite l'emploi de 10 équ./UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,25 équivalents (par fonction OH) de DMAP.^[89]

Des essais employant 2 et 3 équivalents de TsCl ont également été effectués. Dans ce cas aucun produit n'a pu être isolé au cours de la phase de précipitation au méthanol. Cela ne signifie pas que la réaction d'estérification n'a pas eu lieu, au contraire. La cellulose de départ n'ayant pas précipité, cela signifie que les laurates de cellulose porphyriniques de faibles DS acide laurique, restent solubles dans le mélange DMA/LiCl/MeOH.^[90] Ces composés n'ont donc pas pu être récupérés et analysés.

4-2-4-4-Influence de la pyridine

Nous avons par la suite essayé de déterminer si la pyridine était indispensable au bon déroulement de la réaction. Dans ce but, plusieurs laurates de cellulose porphyriniques ont été synthétisés en utilisant 14 méq. de *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrine (**3**) par UAG, activés par une quantité équivalente de TsCl lors de la première étape. L'estérification de la cellulose porphyrinique a été ensuite réalisée en utilisant 4 éq. d'acide laurique par UAG, activé par une quantité équimolaire de TsCl, aucune base n'ayant été ajoutée. La durée de réaction de chaque étape a été fixée à 1 ; 6 et 24 heures. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

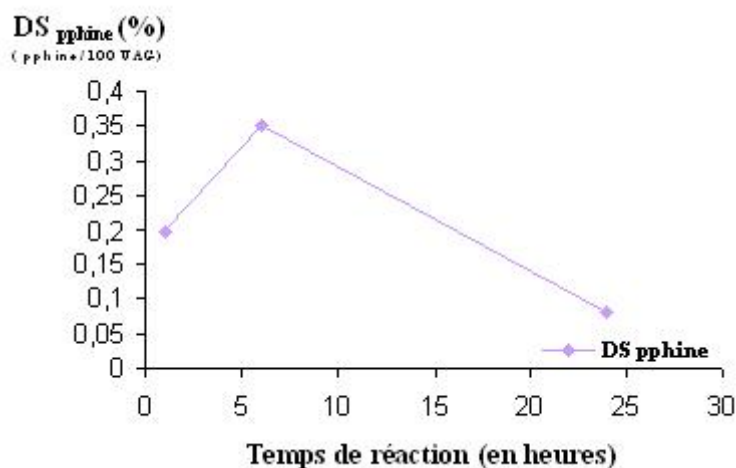


Figure II-25 : Evolution du degré de substitution en porphyrine en fonction du temps en absence de pyridine.

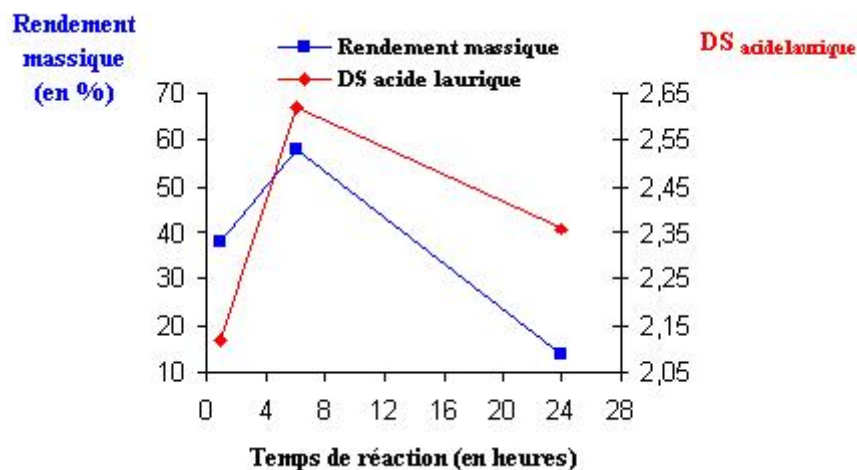


Figure II-26 : Evolution du rendement massique et du degré de substitution en acide laurique en fonction du temps en absence de pyridine.

Les résultats montrent que les valeurs de degré de substitution en porphyrine sont moins élevées en absence de base (figure II-25). Ce phénomène est particulièrement accentué pour des temps de réaction longs. En effet, lorsque la synthèse est réalisée sans base, on obtient un plastique avec un degré de substitution en porphyrine de seulement 0,08% après 24 heures de réaction. La valeur du degré de substitution en porphyrine passe à 0,45% lorsque la synthèse est réalisée en présence de pyridine (figure II-22).

Les résultats montrent clairement que si la pyridine n'est pas indispensable pour que la réaction d'estérification ait lieu, son absence influe directement sur les rendements massiques (figure II-26). En effet, ceux-ci décroissent rapidement en absence de base et ce d'autant plus que le temps de réaction s'allonge. Un rendement massique de seulement 14 % est obtenu après 24 heures de réaction en absence de pyridine tandis qu'un rendement de 67 % (figure II-23) est obtenu en présence de la base pour le même temps de réaction, soit une différence de 53 %. Cette différence de rendement est moins importante lorsque le temps de réaction est court. Par exemple, au bout de 6 heures de réaction l'influence de la base se fait moins ressentir sur la réaction puisque le rendement massique atteint 58 %. Si les valeurs de DS acide laurique sont moins élevées que lorsque la base est présente dans le milieu réactionnel, elles restent tout de même élevées puisqu'elles sont supérieures à 2. Ces résultats traduisent la dégradation du polymère. En effet, une des conséquences de la réaction d'estérification en présence de chlorure d'acide para-toluènesulfonique est la libération de deux moles d'acide. Une mole d'acide chlorhydrique et une mole d'acide para-toluènesulfonique pour chaque

mole de fonctions acides carboxyliques activées sont produites. Ces acides en présence de pyridine sont neutralisés, tandis qu'en absence de la base ces acides hydrolysent les liaisons glycosidiques du polymère (figure II-27), avec pour conséquence la dégradation partielle de la cellulose en chaînes plus courtes ne précipitant pas lors de l'étape de purification. Elles sont alors éliminées au cours de la phase de filtration.

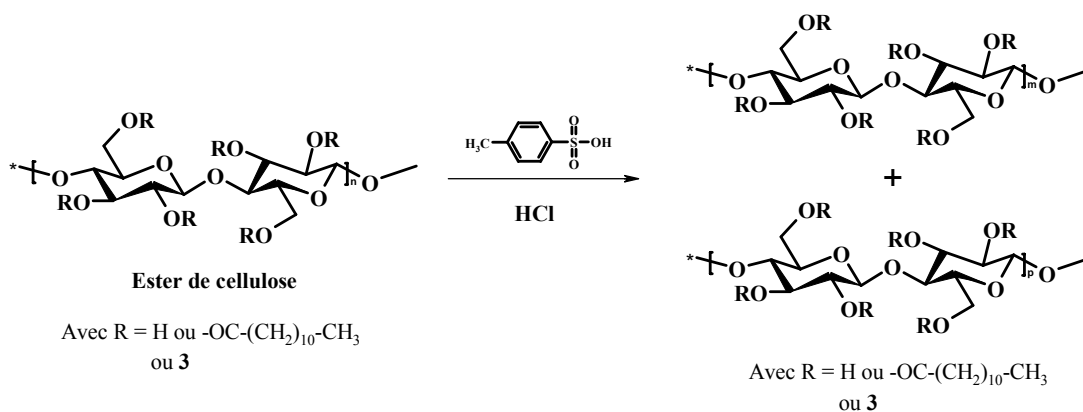


Figure II-27 : Dégradation de la chaîne cellulosique lors de la réaction d'estérification en absence de pyridine.

Les plastiques obtenus en absence de base sont moins ductiles et plus cassants. Ce phénomène mécanique est également une conséquence de la dépolymérisation de la chaîne cellulosique. Nous présentons la photographie d'un laurate de cellulose meso-carboxypropyloxyphénylporphyrinique obtenu en absence de pyridine sur la figure II-28.

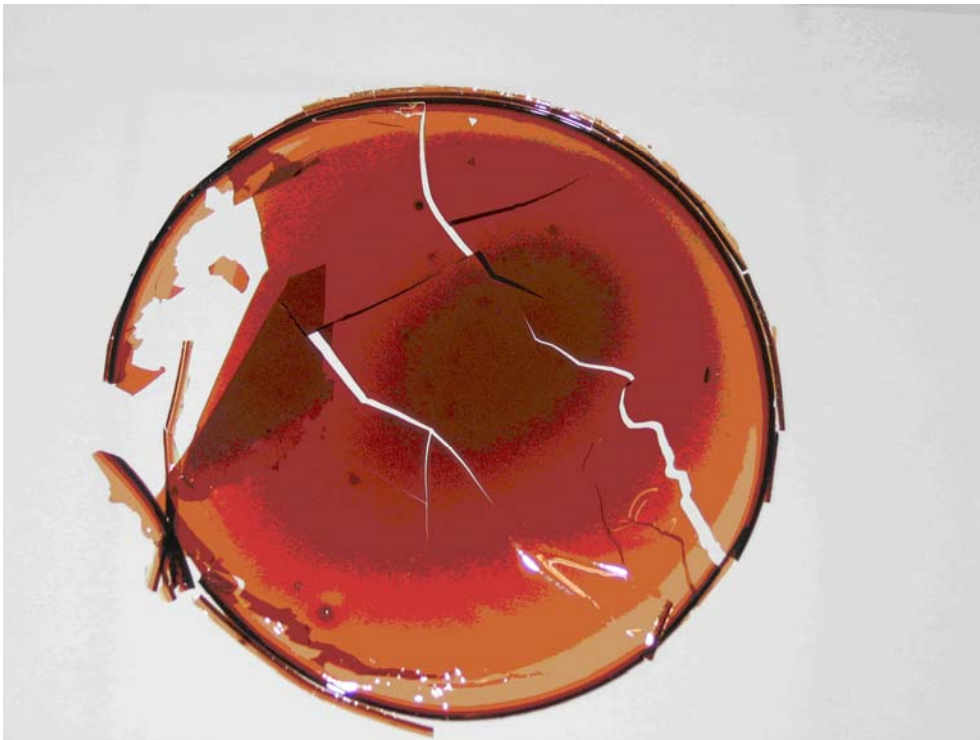


Figure II-28 : Photographie d'un laurate de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyrinique obtenu en absence de pyridine.

En conclusion, si la présence de pyridine n'est pas indispensable au déroulement de la réaction, son activité neutralisante contribue fortement à l'obtention des matériaux plastiques avec de bons rendements, mais également avec une ductilité plus importante.

4-2-4-5-Effet de la stoechiométrie en porphyrine

Après avoir analysé l'influence des différents paramètres réactionnels sur les rendements et les DS, nous avons poursuivi notre travail par la synthèse d'une large gamme de laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques ayant des teneurs en porphyrine variées. L'influence de la longueur du bras porté par la porphyrine sur le DS_{pphine} a également été évaluée en synthétisant des laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques de DS_{pphine} variés. Dans ce cas, la longueur du bras porté par la porphyrine passant de 4 à 11 carbones devrait permettre de limiter l'encombrement stérique en éloignant davantage le macrocycle des fonctions alcools de la cellulose ; et de ce fait permettre de fixer davantage de porphyrine. Les conditions réactionnelles suivantes ont été retenues pour chaque étape : 24 heures de réaction à la

température de 80°C. Les valeurs de DS_{pphine} ont été contrôlées par la quantité de porphyrine mise à réagir en présence d'une quantité équimolaire de TsCl et de pyridine. La seconde étape a été menée en présence de 4 éq. d'acide laurique en présence d'une quantité équivalente de TsCl et de pyridine. Les résultats obtenus lors de la synthèse des laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques sont présentés sur les courbes suivantes (courbes rouges) et sont comparés à ceux obtenus lors de la synthèse des laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques (courbes bleues).

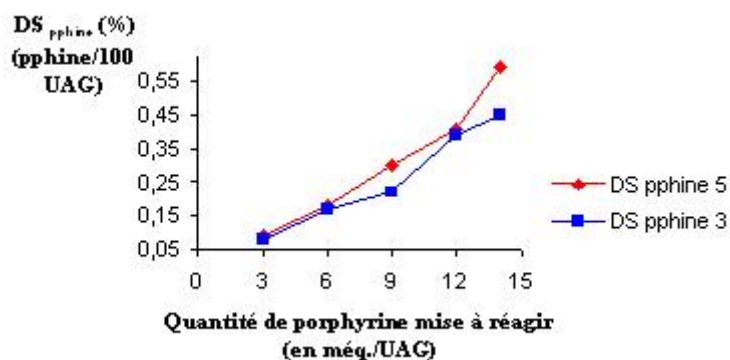


Figure II-29 : Comparaison des degrés de substitution en porphyrine en fonction de la stoechiométrie en porphyrine.

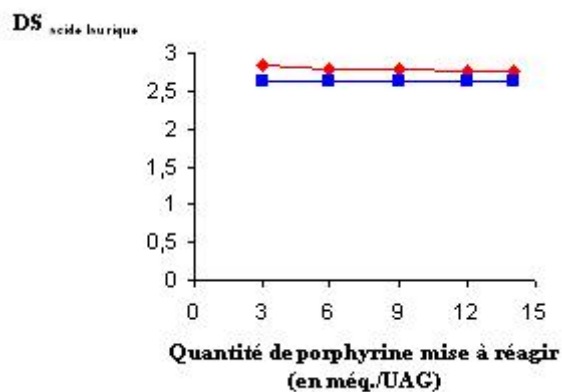


Figure II-30 : Comparaison des degrés de substitution en acide laurique en fonction de la stoechiométrie en porphyrine.

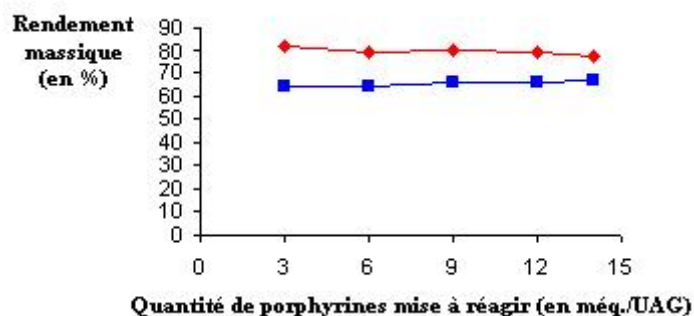


Figure II-31 : Comparaison des rendements massiques en fonction de la stoechiométrie en porphyrine.

Les degrés de substitution en porphyrine varient de 0,09 % à 0,58 % pour les laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques (courbe rouge) et de 0,08 % à 0,45 % pour les laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques (courbe bleue) (figure II-29). Ils augmentent dans les deux cas de façon quasi linéaire avec la quantité de porphyrine mise à réagir. Les degrés de substitution en porphyrine des laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques sont plus légèrement plus élevés que ceux des laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques avec des rendements de fixation moyens respectifs de 33 et 21%. Ceci s'explique par la longueur du bras. En effet, dans le cas des laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques l'encombrement stérique est moindre du fait que le nombre de carbone du bras porté par le macrocycle passe de 4 à 11 carbones. De plus, Heinze et *al.*^[76] ont démontré que lors de la synthèse d'esters de cellulose, les DS augmentent avec la longueur de la chaîne grasse greffée pour une même quantité d'acide gras mise à réagir.

Les valeurs de degré de substitution en acide laurique des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques sont élevées et constantes et ne semblent pas être influencées par la quantité de porphyrine mise à réagir (figure II-30). Aussi les valeurs de DS_{acide laurique} sont légèrement plus élevées (de l'ordre de 8%) dans les laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques (courbe rouge) que dans les laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques (courbe bleue), en moyenne 2,80 et 2,63 respectivement. Sans doute l'éloignement des macrocycles greffés dans le cas des esters *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques doit d'une part limiter l'encombrement stérique et d'autre part modifier la conformation de la chaîne cellulosique rendant un peu plus accessibles les groupements hydroxyles pour l'estérification de la cellulose porphyrinique par l'acide laurique.

La figure II-31 montre que les rendements massiques des esters de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques (courbe rouge) et *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques (courbe bleue) ne semblent pas être influencés par la quantité de porphyrine mise à réagir puisqu'ils sont constants. Cependant, cette courbe montre également l'effet de la longueur du bras espaceur porté par le photosensibilisateur sur les rendements massiques qui sont plus élevés dans le cas des laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques (courbe rouge) avec en moyenne un rendement massique de 79 % tandis que les esters *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques sont obtenus avec un rendement de seulement 65 %.

Conclusion

Nous avons pour la première fois synthétisé une large gamme de laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques possédant des teneurs en porphyrine variées. Ces matériaux plastiques ont été obtenus par une réaction « one pot » composée de deux estérifications successives de la cellulose. Le chlorure de tosyloxy s'est révélé être un excellent agent d'activation. L'étude de l'influence des paramètres réactionnels nous a permis de déterminer les conditions optimales pour chaque étape de la synthèse des esters : 24 heures de réaction à 80°C, en présence de pyridine. De plus, nous avons montré que la longueur du bras porté par les macrocycles influence les degrés de substitution en porphyrine. En effet, en éloignant d'avantage le photosensibilisateur du polysaccharide, le bras possédant 11 carbones permet de réduire l'encombrement stérique du macrocycle. De ce fait, les laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques ont été obtenus avec des degrés de substitution en porphyrine légèrement plus élevés que ceux des laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques. Cependant, les rendements de fixation restent faibles pour ces deux types d'esters, avec pour valeurs maximales respectives 42 et 32% lorsque 15 méq/UAG de porphyrine sont mis à réagir. Ces résultats s'expliquent par la faible stoechiométrie en porphyrine mise à réagir.

CHAPITRE III

Synthèse de laurates de cellulose protoporphyriniques

Chapitre III

Synthèse de laurates de cellulose

protoporphyriniques

1-Introduction

Après avoir présenté la synthèse de laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques, nous avons dans la suite de ce travail entrepris la synthèse de laurates de cellulose porphyriniques en greffant une porphyrine β -substituée sur le polysaccharide. Parmi les nombreux photosensibilisateurs d'origine naturelle, nous nous sommes intéressés à un dérivé de la protohème obtenu par modification chimique de celle-ci : la protoporphyrine IX (PpIX). Cette porphyrine (figure III-1) se compose d'un macrocycle substitué sur les positions β -pyrroliques par des groupements méthyles, vinyles et carboxyéthyles.

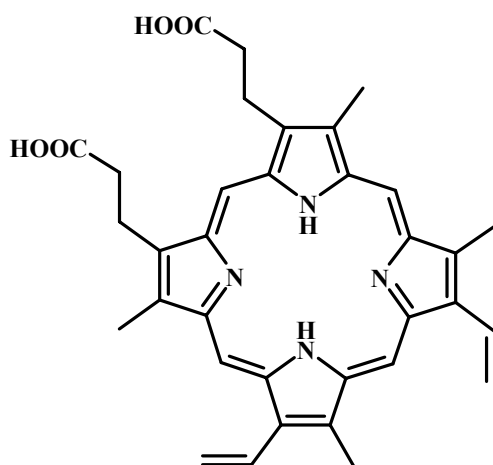


Figure III-1 : Structure de la protoporphyrine IX.

En raison de l'intérêt de la protoporphyrine IX pour la photothérapie dynamique antimicrobienne^[91] et de la présence de fonctions acides, nous nous sommes proposés de préparer des surfaces photobactéricides protoporphyriniques en greffant ce photosensibilisateur sur la cellulose par l'intermédiaire des deux bras carboxyéthyles, ce qui devrait permettre

d'améliorer sa fixation sur la cellulose par rapport aux *meso*-arylporphyrines de synthèse monosubstituées. Nous avons donc poursuivi notre travail par la synthèse de laurates de cellulose protoporphyriniques, matériaux plastiques potentiellement photobactéricides. La structure des esters de cellulose protoporphyriniques synthétisés est représentée sur la figure III-2.

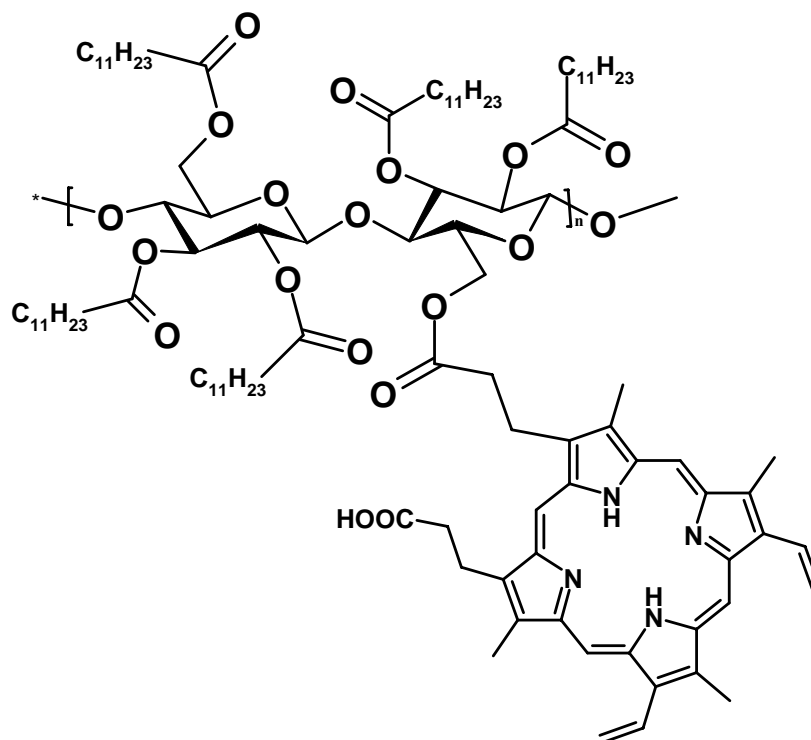


Figure III-2 : Une des structures représentatives des laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés.

2-Stratégie de synthèse

Les laurates de cellulose protoporphyriniques ont été préparés selon deux voies de synthèse impliquant chacune une réaction « one pot » en deux étapes (figures III-3). La première stratégie est l'estérification (voie A). La méthode utilisée pour cette synthèse est la même que celle utilisée pour la synthèse des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques (chapitre II). Rappelons qu'elle consiste dans un premier temps à greffer la protoporphyrine IX commerciale sur la cellulose en présence du système chlorure de tosyle / pyridine. Puis l'intermédiaire cellulose protoporphyrinique ainsi obtenu, est alors estérifié *in situ* par l'acide laurique en présence du même système activant, pour donner les laurates de cellulose protoporphyriniques souhaités.

La seconde voie utilisée est l'acylation de la cellulose sous activation micro-onde (voie B). En effet, des travaux menés dans notre laboratoire^[67] ont montré que l'utilisation de chlorures d'acide en présence de bases telles que la triéthylamine, la pyridine ou la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) sous activation micro-onde est une méthode efficace pour l'obtention d'esters de cellulose. L'acylation de la cellulose par les *meso*-arylporphyrines s'est avérée peu satisfaisante par induction micro-onde. Nous nous sommes alors demandé si une telle stratégie pouvait être adéquate avec la protoporphyrine IX. Compte tenu de ces résultats, nous avons synthétisé des laurates de cellulose protoporphyriniques par acylation de la cellulose sous activation micro-onde. Cette stratégie implique donc dans un premier temps, de transformer la protoporphyrine IX commerciale en son chlorure d'acide. Par la suite, le chlorure d'acide de protoporphyrine IX est fixé sur la cellulose par acylation sous activation micro-onde pour conduire à l'intermédiaire cellulose protoporphyrinique. Les laurates de celluloses protoporphyriniques sont alors obtenus par acylation *in situ* de la cellulose protoporphyrinique par le chlorure d'acide laurique également sous irradiation micro-onde (figure III-3).

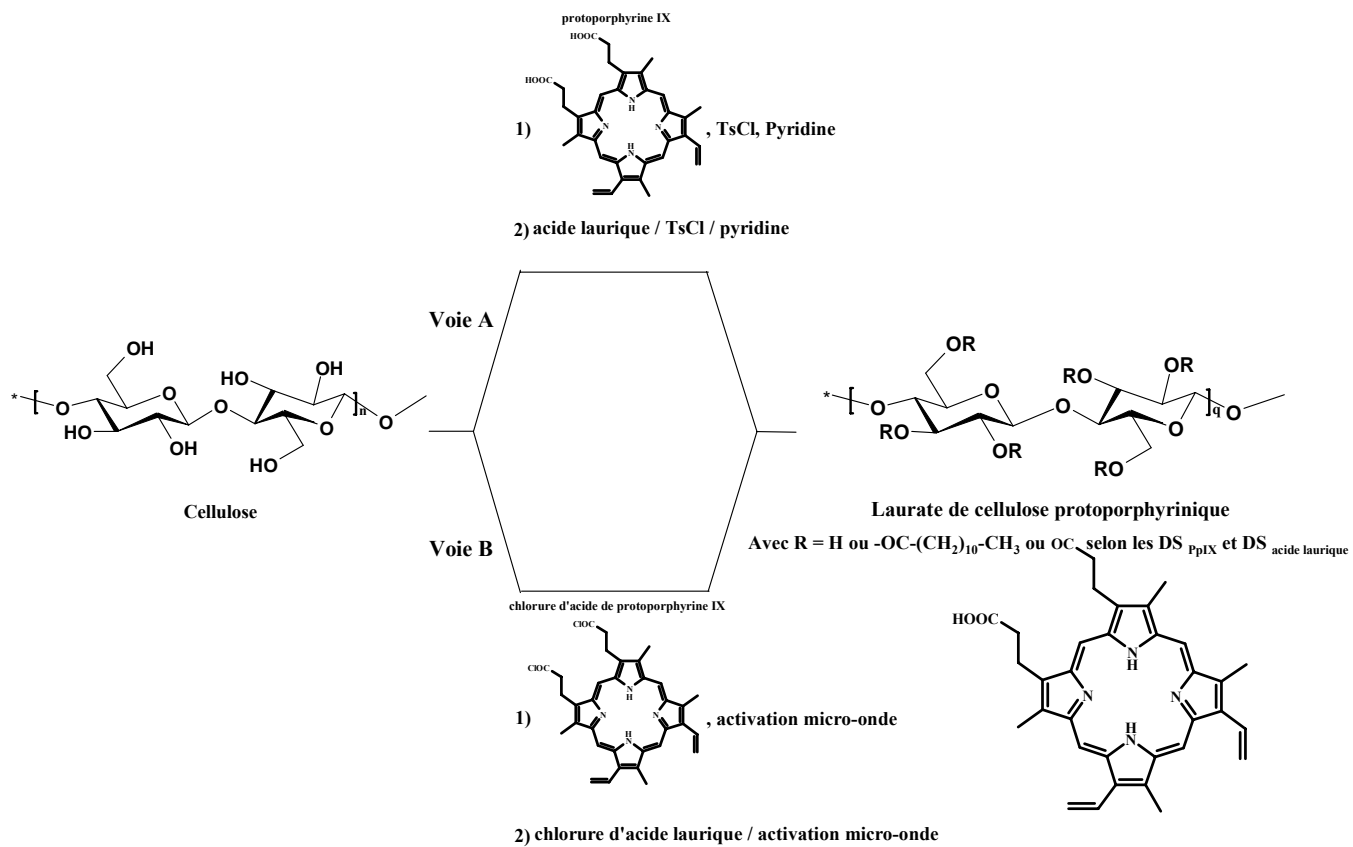


Figure III-3 : Schéma synthétique des laurates de cellulose protoporphyriniques par estérification (voie A) ou acylation (voie B) de la cellulose. Voie A : (1) PpIX , TsCl/Pyridine, DMA/LiCl, 80°C ; (2) acide laurique, TsCl/Pyridine, DMA/LiCl, 80°C.

Voie B : (1) Chlorure d'acide de PpIX, DMA/LiCl, activation micro-onde ; (2) Chlorure d'acide laurique, DMA/LiCl, activation micro-onde.

3-Résultats et discussion

3-1-Synthèse de matériaux plastiques protoporphyriniques par estérification de la cellulose (voie A)

Les laurates de cellulose protoporphyriniques ont été obtenus par deux estérifications successives de la cellulose. Le polymère préalablement dissous dans le système de solvant DMA/LiCl, est estérifié dans un premier temps par la protoporphyrine IX, puis dans un second temps par l'acide laurique. Après un total de 48 heures de réaction, les laurates de cellulose protoporphyriniques ainsi synthétisés sont purifiés par la méthode des précipitation-dissolution successives avec du méthanol et du chloroforme respectivement. Après une simple filtration sur laine de verre permettant d'éliminer les chaînes cellulosiques insolubles, la mise en forme est réalisée par casting. Les films plastiques protoporphyriniques sont alors récupérés sur les parois du récipient. Nous présentons sur la figure III-4 un laurate de cellulose protoporphyrinique ainsi obtenu.



Figure III-4 : Photographie d'un laurate de cellulose protoporphyrinique.

3-1-1-Caractérisation des laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés

Les laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie Infra-Rouge, UV-visible ainsi que par spectroscopie RMN ^1H .

3-1-1-1-Spectroscopie IR

Les spectres infra-rouges des esters de cellulose réalisés par transmission directe du faisceau à travers le film plastique sont tout à fait comparables à ceux obtenus pour les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques présentés dans le chapitre précédent (figure II-15). En effet, on retrouve une baisse d'intensité de la bande située à 3350 cm^{-1} caractéristique des vibrations de valence des groupements hydroxyles, ainsi qu'un déplacement de celle-ci vers 3480 cm^{-1} , traduisant également dans ce cas la disparition des fonctions alcools et donc des liaisons hydrogène de la cellulose de départ. On note également que cette baisse est corrélée avec l'apparition de la bande caractéristique des fonctions esters vers 1745 cm^{-1} d'une part et avec l'augmentation de l'intensité des bandes vers 2900 cm^{-1} caractéristiques de la vibration de valence des liaisons C-H des groupements alkyles des chaînes grasses. Enfin, il est à noter qu'aucun signal correspondant au noyau protoporphyrinique n'a été observé sur les spectres IR bien que les valeurs de degré de substitution en protoporphyrine IX soient en nette augmentation par rapport à celles des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques.

3-1-1-2-Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visibles de tous les polymères estérifiés ont été mesurés dans le THF. Ils sont comparables au spectre de la protoporphyrine IX libre en solution dans ce même solvant. On retrouve ainsi une forte bande d'absorption vers 407 nm correspondant à la bande de Soret. Les bandes Q_{IV} , Q_{III} , Q_{II} et Q_I sont également présentes aux longueurs d'ondes respectives suivantes 504, 538, 577 et 633 nm. D'autre part, l'absence de modification particulière relative à l'intensité ou à la position relative des bandes sur les spectres traduit l'absence d'interaction particulière entre les macrocycles greffés sur le squelette cellulosique. A titre d'exemple, nous présentons sur la figure III-5 le spectre UV-visible d'un laurate de cellulose protoporphyrinique possédant un DS_{PpIX} égal à 0,01 et un $DS_{\text{acide laurique}}$ égal à 2,61.

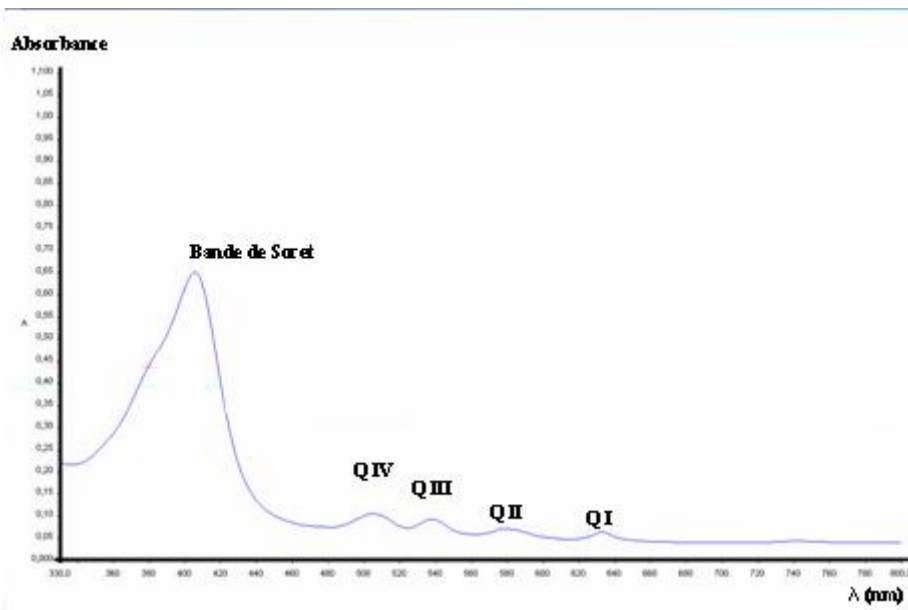


Figure III-5 : Spectre UV-visible d'un laurate de cellulose protoporphyrinique

de DS_{PpIX} 0,01 et $DS_{acide\ laurique}$ de 2,61.

3-1-1-3-Spectroscopie RMN 1H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des laurates de cellulose protoporphyriniques ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutérié. D'une manière générale on retrouve sur le spectre RMN 1H les signaux des protons des unités glucidiques entre 5,2 et 3 ppm, les protons des chaînes grasses entre 4,5 et 0,8 ppm. Il est à noter que contrairement aux spectres des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques (figure II-17), les spectres RMN 1H des laurates de cellulose protoporphyriniques ne présentent aucun signal correspondant au noyau protoporphyrinique bien que les valeurs du degré de substitution en protoporphyrine IX de ces esters soient plus élevées que celles obtenues dans le cas des esters de cellulose *meso*-arylporphyriniques (chapitre II). La structure de la protoporphyrine IX est à l'origine de ce phénomène. En effet, l'absence de plan ou d'axe de symétrie et donc la faible multiplicité des protons qui en découle, expliquent cette absence de signaux protoporphyriniques sur les spectres RMN 1H . Dans la suite de ce travail, nous avons sommes intéressés à la synthèse de laurates de cellulose possédant des teneurs en protoporphyrine IX (DS_{PpIX}) variés.

3-1-2-Effet de la stoechiométrie en protoporphyrine IX sur les degrés de substitution et sur le rendement massique

Les différentes valeurs de degrés de substitution en protoporphyrine IX (DS_{PpIX}) ont été contrôlées en faisant varier la quantité de PpIX mise à réagir au cours de la première étape de 3 à 30 méq/UAG. Les résultats sont présentés sur les figures suivantes.

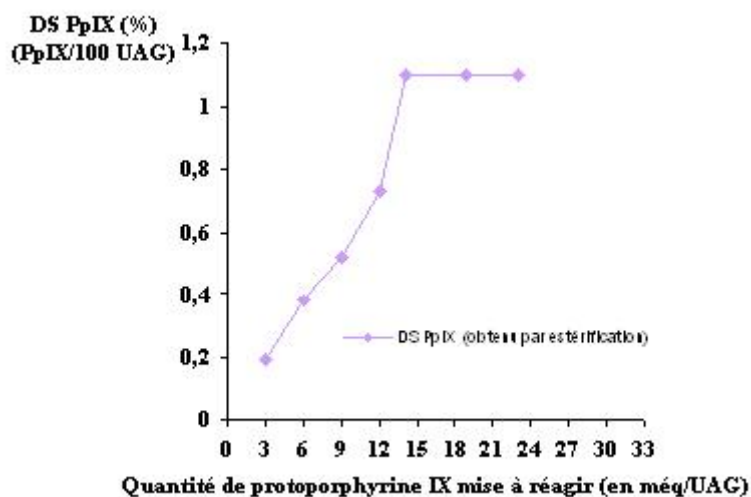


Figure III-6 : Influence de la stoechiométrie en PpIX sur le degré de substitution en protoporphyrine IX.

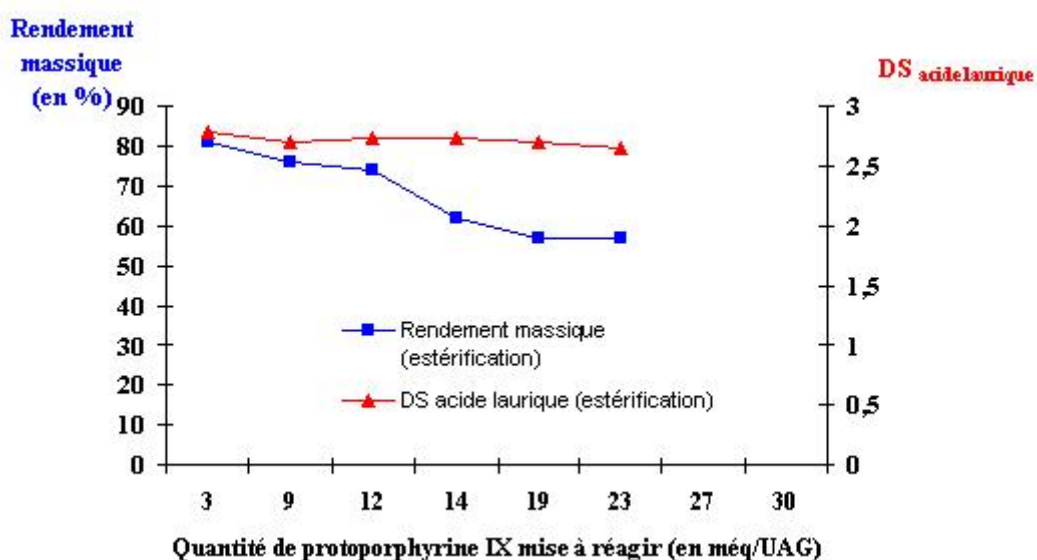


Figure III-7 : Influence de la stoechiométrie en Pp IX sur le rendement massique et le DS acide laurique.

La première courbe (figure III-6) montre que les matériaux plastiques ont été obtenus avec des degrés de substitution en protoporphyrine IX variant de 0,19 à 1,1 %. Ces valeurs augmentent linéairement jusqu'à une valeur limite de 1,1%. La valeur moyenne du rendement de fixation est plus élevée que celle obtenue pour les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques (chapitre II). Elle atteint dans ce cas 79% lorsque 14 méq/UAG de protoporphyrine IX sont utilisés. Lorsque les quantités de protoporphyrine IX mises à réagir sont supérieures à 14 méq./UAG, le DS_{PpIX} reste constant même lorsque la quantité de protoporphyrine IX mise à réagir est presque doublée (23 méq./UAG). Aussi, on note que les valeurs de degré de substitution en protoporphyrine IX des laurates de cellulose sont toujours supérieures aux valeurs de degré de substitution en porphyrine des laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques et *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques synthétisés au chapitre précédent (chapitre II). Par exemple, lorsque 14 méq/UAG de photosensibilisateur sont utilisés, les plastiques *meso*-arylporphyriniques sont obtenus avec des DS_{pphine} respectifs de 0,45 % et 0,59 % (chapitre II) alors que le laurate de cellulose protoporphyrinique obtenu dans les mêmes conditions possède un DS_{PpIX} de 1,1 % soit près du double. La présence de deux bras carboxyéthyles sur la PpIX, en augmentant les possibilités de greffage peut expliquer ces résultats.

Les laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés par estérification sont obtenus avec des degrés de substitution en acide laurique élevés, en moyenne 2,70 (figure III-7). De plus, le DS_{acide laurique} n'est pas influencé par la quantité de PpIX mise à réagir. Cependant, bien que l'on observe une constance des valeurs de DS_{acide laurique}, les rendements massiques diminuent sensiblement. En effet, les rendements massiques chutent de 81 à 57 % lorsque respectivement 3 et 19 méq/UAG de PpIX sont utilisés sont mis à réagir. Pour des quantités de PpIX supérieures à 19 méq/UAG, les rendements massiques sont constants, en moyenne 57%. Ces résultats s'expliquent par un problème rencontré lors de la phase de purification des esters de cellulose. En effet, nous avons observé que les laurates de cellulose protoporphyriniques possédant un degré de substitution en protoporphyrine IX supérieur ou égale à 1,1% sont partiellement insolubles. La conséquence de ce phénomène est une perte de masse au cours de l'étape suivante de filtration pour éliminer les chaînes cellulosiques insolubles (peu ou pas estérifiées).

Ces résultats suggèrent qu'il se produit une réticulation du polymère au cours de l'estérification de la cellulose par la PpIX. La PpIX possédant deux bras carboxyéthyles, le macrocycle peut donc se greffer sur le polysaccharide par l'un ou l'autre des bras ou encore

par les deux. Dans ce dernier cas, il se produit alors une réticulation intra- ou inter-chaîne de la cellulose entraînant de ce fait son insolubilité partielle. La figure III-8 illustre ce phénomène.

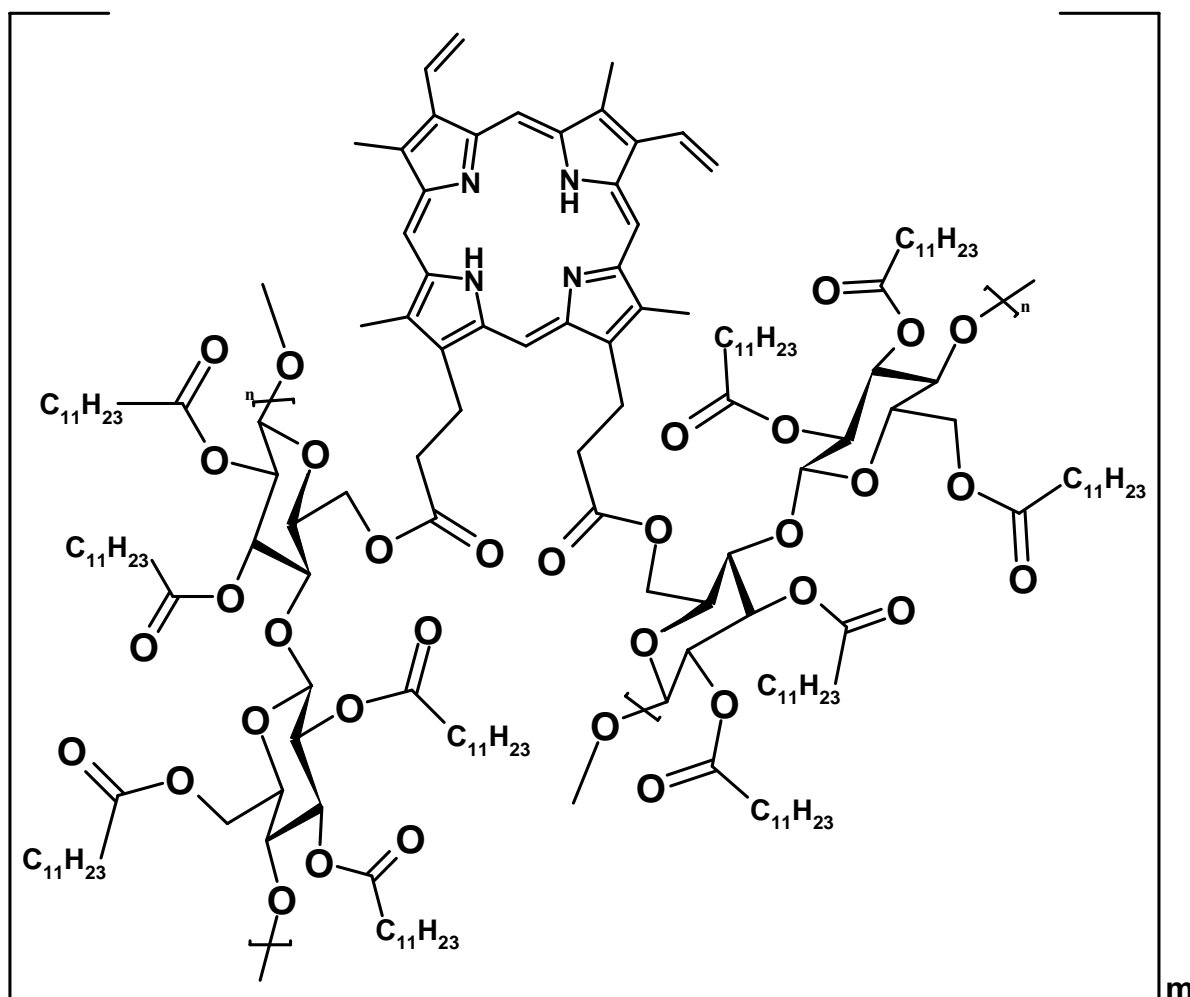


Figure III-8 : Représentation de la cellulose réticulée par la PpIX (réticulation inter-chaîne).

Des essais utilisant des quantités de PpIX supérieures à 23 méq./UAG ont également été réalisés. On obtient bien des esters de cellulose mais ceux-ci sont entièrement insolubles. De ce fait ces esters n'ont pas pu être analysés.

3-2-Synthèse de matériaux plastiques protoporphyriniques par acylation de la cellulose sous activation micro-onde (voie B)

La synthèse des laurates de cellulose protoporphyriniques par acylation consiste à acyler la cellulose successivement deux fois sous activation micro-onde. Dans ce but, la PpIX est préalablement convertie en son chlorure d'acide. Puis la cellulose en solution dans le système DMA/LiCl, est alors acylée dans un premier temps par le chlorure d'acide de PpIX, puis dans un second temps par le chlorure d'acide laurique. Ces deux acylations sont réalisées sous activation micro-onde en présence ou non de DMAP. Nous nous proposons dans un premier temps d'effectuer un rappel sur cette méthode d'activation non conventionnelle que constitue l'activation micro-onde.

3-2-1-Rappel sur l'activation micro-onde

3-2-1-1-Généralités

Rappelons que les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, dont la longueur d'onde se situe dans le spectre électromagnétique entre l'IR (1 cm) et les ondes radio (1m). L'utilisation des micro-ondes pour l'activation des réactions chimiques est depuis une vingtaine d'années en pleine essor. L'activation micro-onde s'est révélée être un mode d'activation de choix puisque dans ce cas, les réactions ne nécessitent pas toujours l'emploi de solvant, et la consommation d'énergie est faible comparée à l'activation thermique par chauffage classique.

3-2-1-2-Phénomène physique

L'application d'un champ électromagnétique continu à des molécules polaires, entraîne par un phénomène de polarisation dipolaire, l'alignement de celles-ci selon le sens du champ appliqué. Si le champ électromagnétique imposé est alternatif et de haute fréquence, il s'en suit à chaque alternance de champ une agitation interne du milieu dû au changement d'orientation des molécules dipolaires (figure III-9). Les frictions intermoléculaires ainsi créées entraînent alors un échauffement interne intense et homogène du milieu réactionnel sans aucun gradient de température contrairement à un chauffage classique.

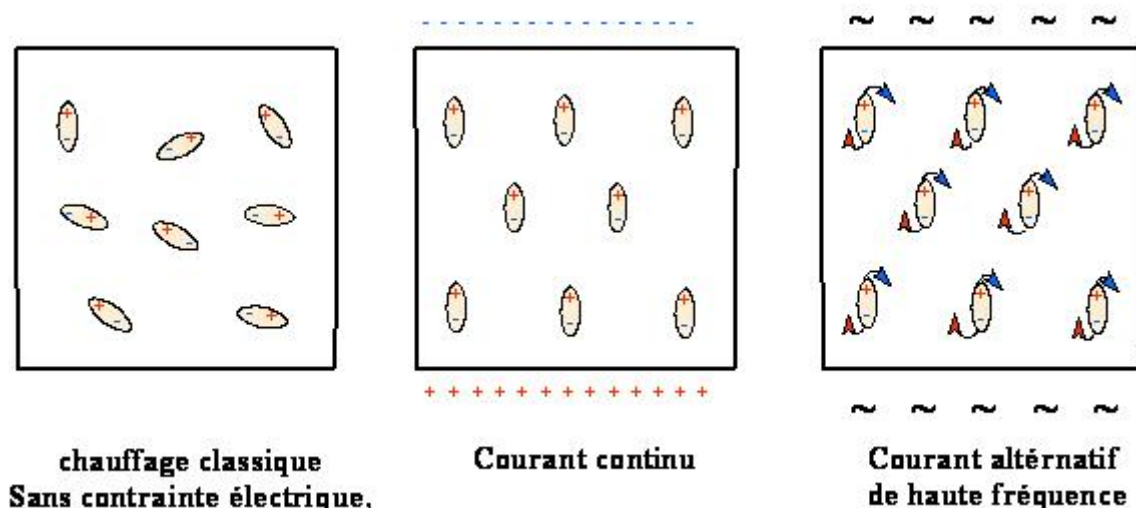


Figure III-9 : Influence de l'application d'un champ électrique sur le comportement de molécules polaires.

Le moment dipolaire caractéristique de la polarité des composés est un indicateur du comportement des solvants sous irradiation micro-onde. Ainsi, en soumettant par exemple le DMF ($\mu = 10,8 \text{ D}$) à une irradiation micro-onde de 600 Watts durant une minute, on observe une forte hausse de la température jusqu'à $130 \text{ }^\circ\text{C}$. Au contraire les hydrocarbures comme l'hexane ou l'heptane sont insensibles à l'activation puisque dans les mêmes conditions que précédemment, leur température reste constante.

3-2-1-3-Effets de solvant

Il existe trois possibilités lors de l'utilisation de l'activation micro-onde. Les réactions peuvent se dérouler dans un solvant polaire, dans un solvant apolaire ou sans aucun solvant.

Réaction en solvant polaire :

Lorsque l'on effectue des réactions dans un solvant polaire, le solvant absorbe les micro-ondes ce qui induit une augmentation de sa température. L'activation thermique est donc due au transfert d'énergie du solvant vers les réactifs. De ce fait, l'effet des micro-ondes sur les réactifs est masqué par l'absorption du rayonnement par le solvant. En conséquence, les rendements de réaction seront dans ce cas proches de ceux obtenus par chauffage classique. On parle alors d'effet de solvant.

Réaction en solvant apolaire :

Dans le cas d'un solvant apolaire, les molécules de solvant n'absorbent pas ou très peu les micro-ondes. En conséquence, ce sont les réactifs polaires qui absorbent le rayonnement et qui dans ce cas transfèrent leur énergie au solvant. Le résultat de la réaction peut alors être totalement différent de celui obtenu par chauffage classique. Toutefois, les effets de l'activation micro-onde sont variables et sont dépendants de chaque réaction, si bien qu'il est impossible d'établir une règle générale.

Réaction sans solvant :

Dans le cas de réactions réalisées sans solvant, l'effet des micro-ondes est plus facilement observé puisque le rayonnement est entièrement absorbé par les réactifs. Il s'en suit donc un intérêt économique et écologique important.

3-2-1-4-Interprétations

L'effet micro-onde dépendant de la polarité du système (solvant et réactifs), une variation de l'effet micro-onde peut-être observée au cours d'une réaction à cause d'une évolution de la polarité du système due au mécanisme réactionnel.^[92] Au cours d'un mécanisme polaire, on peut s'attendre à observer un effet micro-onde si la polarité du milieu augmente entre l'état initial et l'état de transition. Aussi une augmentation de la réactivité peut être observée si au cours de la réaction l'état de transition est d'avantage stabilisé par les micro-ondes que ne l'est l'état initial (figure III-10).

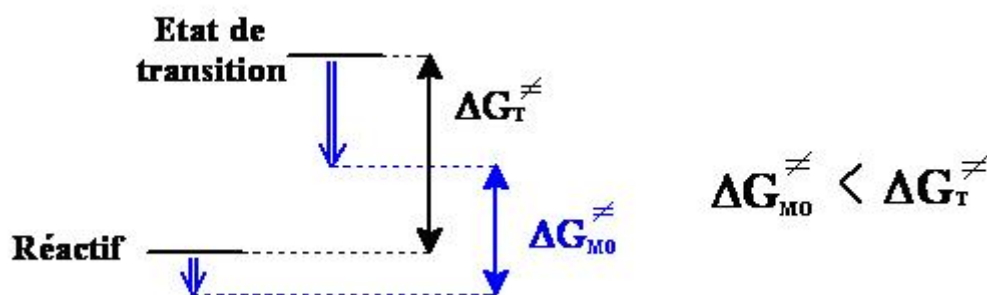


Figure III-10 : Stabilisation relative des états de transition polaires par rapport à l'état initial pour un mécanisme polaire.^[92] (ΔG_T^{\ddagger} : énergie d'activation par voie thermique ; ΔG_{MO}^{\ddagger} : énergie d'activation par micro-onde).

De plus, lorsque l'énergie d'activation est faible (état initial et état de transition sont similaires) l'effet micro-onde est moins important. Inversement, lorsque l'énergie d'activation est élevée (état initial et état de transition sont différents) l'effet micro-onde est élevé (figure III-11).

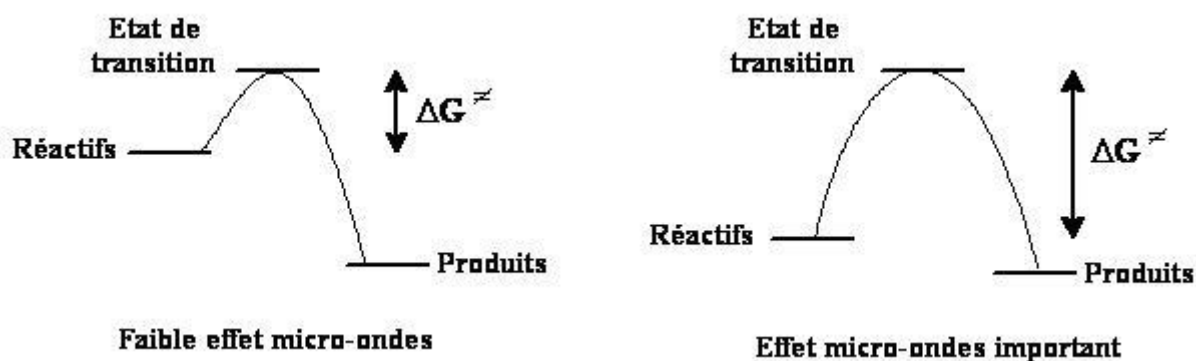


Figure III-11 : Différence d'effet micro-onde selon l'énergie d'activation.^[92] (ΔG^\ddagger : énergie d'activation).

3-2-1-5-Applications des micro-ondes

En chimie, les micro-ondes sont employées pour quatre avantages qui sont :

- la rapidité,
- l'absence d'inertie,
- la facilité d'utilisation,
- le transfert rapide de l'énergie dans toute sa masse.

3-2-2-Synthèse du chlorure d'acide de protoporphyrine IX

Parmi les différentes méthodes de chloration couramment rencontrées, l'utilisation du chlorure de thionyle (SOCl_2) a retenu notre attention. En effet, au cours de la préparation des chlorures d'acide en présence de chlorure de thionyle, les deux sous-produits formés sont l'acide chlorhydrique et le dioxyde de soufre (figure III-12).

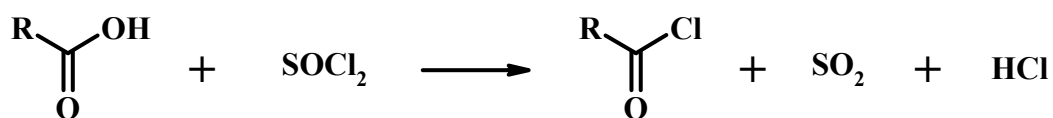


Figure III-12 : Réaction de chloration en présence de chlorure de thionyle.

Ces deux composés sont gazeux et de ce fait peuvent être éliminés par une simple évaporation sous pression réduite, simplifiant ainsi la purification. Pour cette facilité de mise en œuvre, nous avons choisi d'utiliser le chlorure de thionyle pour synthétiser le chlorure d'acide de protoporphyrine IX (figure III-13).

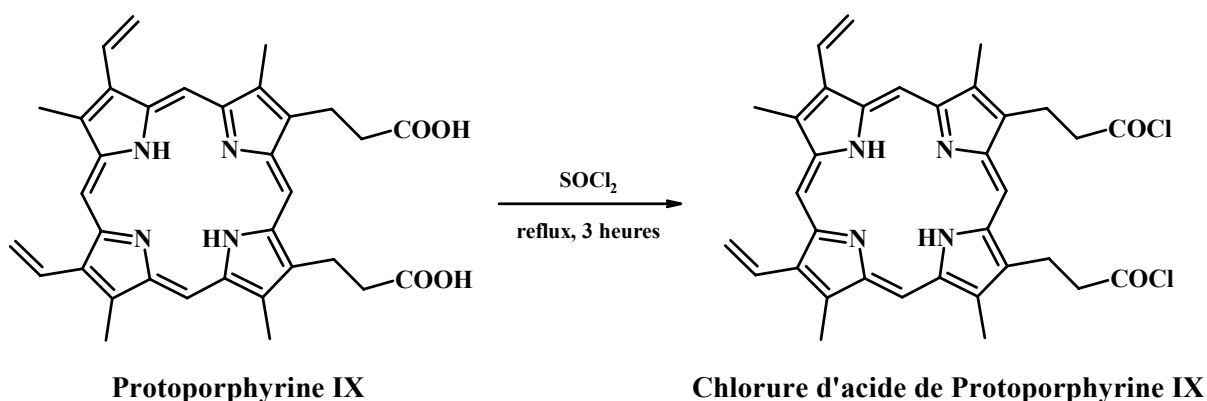


Figure III-13 : Synthèse du chlorure d'acide de protoporphyrine IX par solvolysé dans le chlorure de thionyle.

Le chlorure d'acide de protoporphyrine IX a été obtenu par solvolysé dans le chlorure de thionyle à reflux pendant 3 heures. L'acide chlorhydrique, le dioxyde de soufre ainsi que le réactif en excès ont été ensuite éliminés par une simple évaporation sous vide. Ce composé a ensuite été utilisé tel quel pour l'acylation de la cellulose.

3-2-3-Acylation de la cellulose par les chlorures d'acide sous activation micro-onde

Compte tenu de l'expérience de notre laboratoire dans le domaine de la synthèse d'esters de cellulose sous activation micro-onde^[67,93], nous avons retenu les conditions réactionnelles suivantes : un asservissement en puissance de 300 W pendant une minute, avec une température de sécurité de 150°C (température au-delà de laquelle l'irradiation micro-

onde est stoppée). La température finale observée dans le cas des manipulations qui suivront est comprise entre 110 et 140°C.

L'acylation de la cellulose par la PpIX a été réalisée en phase homogène dans le système DMA/LiCl. Nous rappelons que cette synthèse est effectuée « one pot » en deux étapes. La cellulose dissoute est mise à réagir avec des quantités de chlorure d'acide de PpIX variant de 3 à 30 méq/UAG ; en présence ou non de DMAP. Ce mélange réactionnel est alors soumis à l'activation micro-onde dans les conditions précédemment décrites (figure III-14).

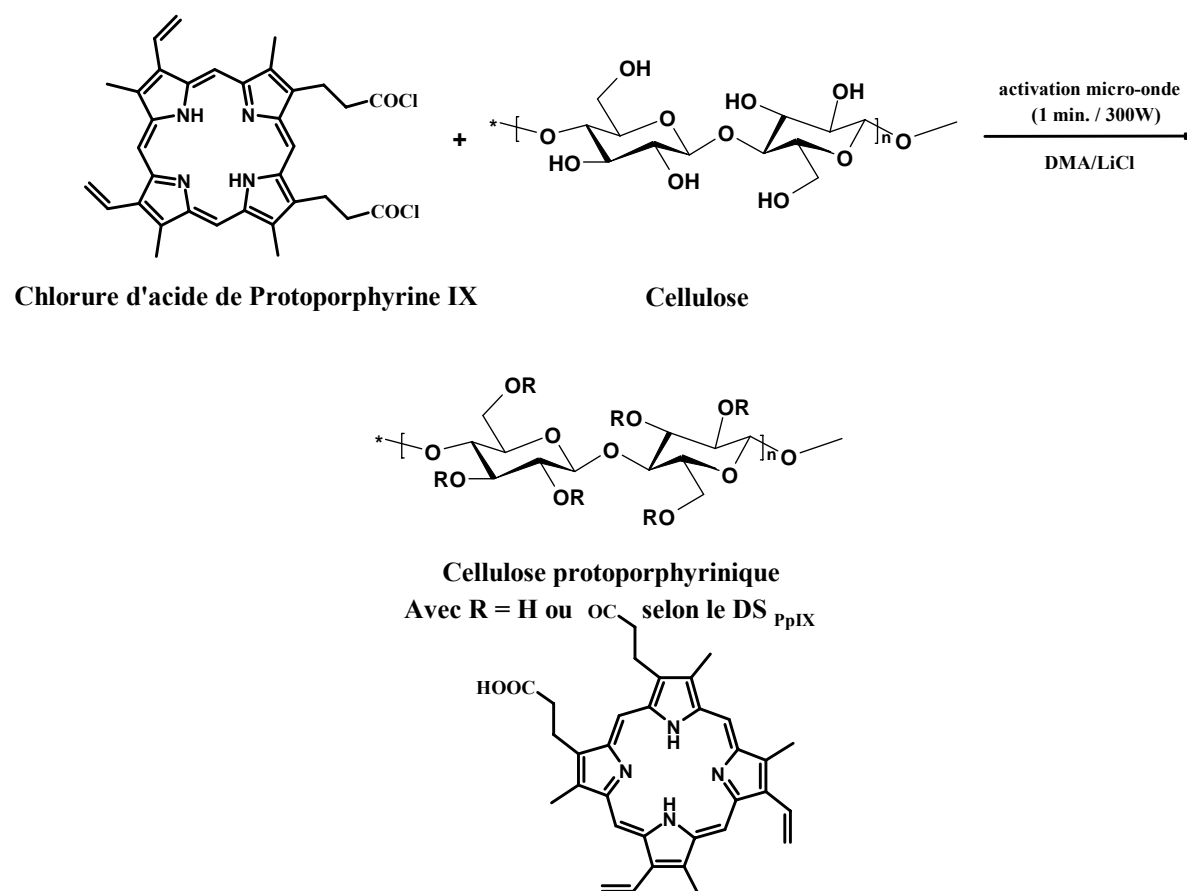


Figure III-14 : Acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX sous activation micro-onde.

Le rôle du DMAP est double puisque en tant que catalyseur, il forme avec les chlorures d'acide un sel d'acétylpyridinium. Ce sel d'acétylpyridinium formé est supposé plus réactif que le chlorure d'acide ce qui favorise la formation de l'ester (figure III-15). Le second rôle du DMAP est un rôle de base puisqu'il neutralise l'acide chlorhydrique formé *in situ* au cours de la réaction.

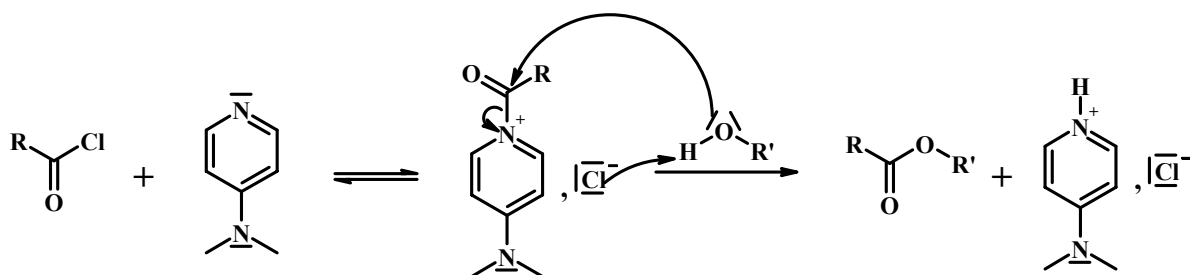


Figure III-15 : Rôles du DMAP au cours de la réaction d'acylation.^[94]

La seconde étape, l'acylation de la cellulose protoporphyrinique par le chlorure d'acide laurique a également été réalisée sous activation micro-onde. Une mise au point de la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide laurique réalisée dans notre laboratoire[67] a montré que l'utilisation d'un large excès de chlorure d'acide sous activation micro-onde, permet d'obtenir des esters de cellulose avec des degrés de substitution élevés. Nous avons donc acylé in situ la cellulose protoporphyrinique précédemment obtenue par 9 éq./UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,5 éq/UAG de DMAP (figure III-16).

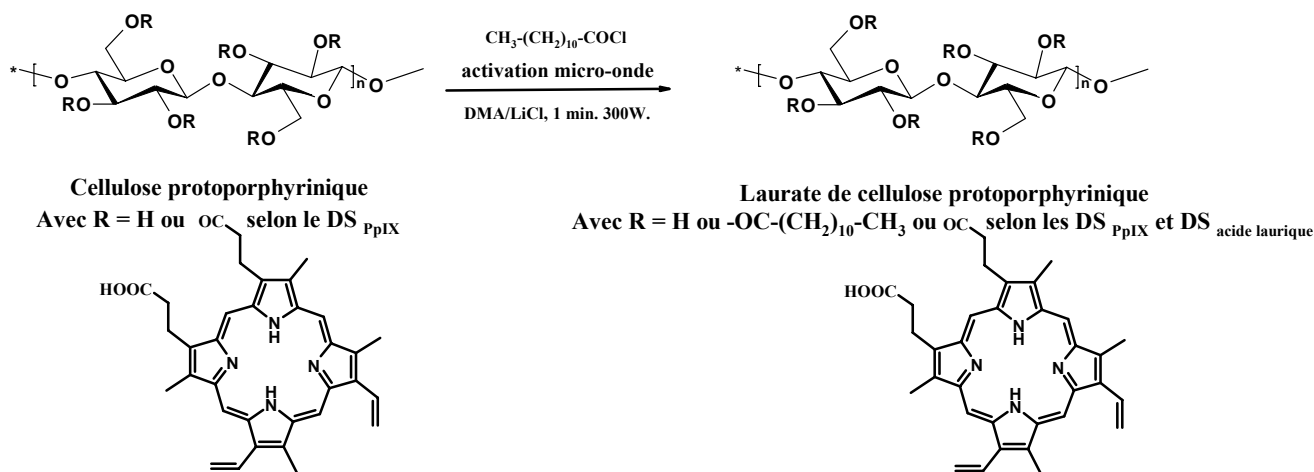


Figure III-16 : Acylation de l'intermédiaire cellulose protoporphyrinique par le chlorure d'acide laurique.

Par la suite, les laurates de cellulose protoporphyriniques ainsi synthétisés sont purifiés en utilisant la même méthode que celle employée lors de la synthèse de laurates de cellulose protoporphyriniques par estérification. La mise en forme est ensuite réalisée par casting. Les films plastiques protoporphyriniques sont alors récupérés sur les parois du récipient.

3-2-3-1-Mise au point de la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX sous irradiation micro-onde

Nous avons dans un premier temps étudié l'influence de la durée de l'activation micro-onde sur la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX. Puis dans un second temps, nous avons évalué l'influence de la quantité de DMAP employée sur la réaction.

a-Effet de la durée de l'activation micro-onde sur la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX

Pour cette étude, la cellulose est mise à réagir avec 14 méq/UAG de chlorure d'acide de protoporphyrine IX en présence ou non de 1,5 méq/UAG de DMAP (soit 108 méq/chlorure d'acide de PpIX). Afin de déterminer l'influence de la durée de l'activation micro-onde sur la réaction, nous avons fait varier la durée de l'activation micro-onde de cette première étape de 1 à 5 minutes et maintenue constante la durée de l'activation micro-onde de la seconde étape à 1 minute. La seconde acylation, celle de la cellulose protoporphyrinique a toujours été réalisée in situ en employant 9 éq/UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,5 éq/UAG de DMAP (soit 54 méq/chlorure d'acide laurique) pendant une minute d'activation micro-onde. Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes.

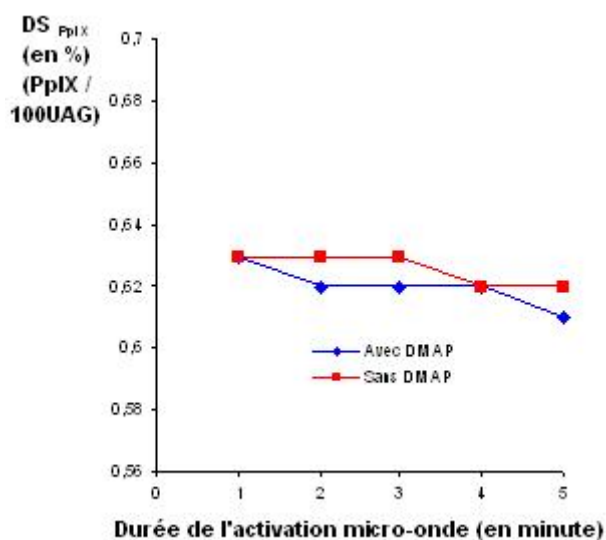


Figure III-17 : Influence de la durée d'irradiation micro-onde de la première étape sur le degré de substitution en protoporphyrine IX.

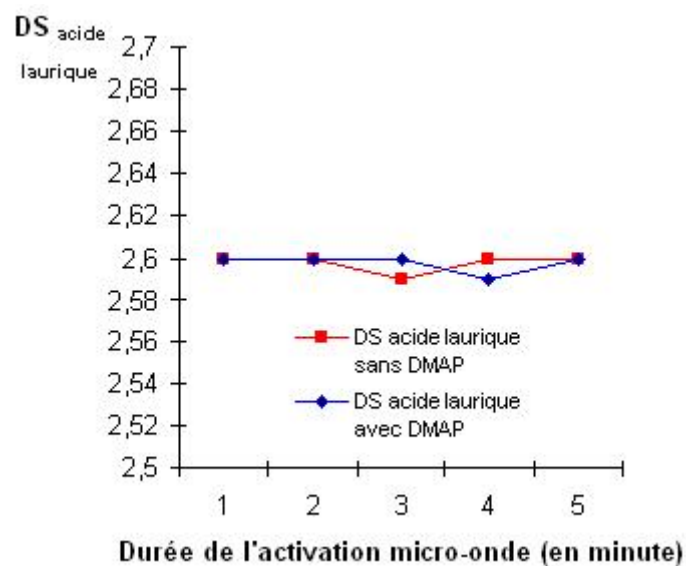


Figure III-18 : Influence de la durée d'irradiation micro-onde de la première étape sur le DS acide laurique.

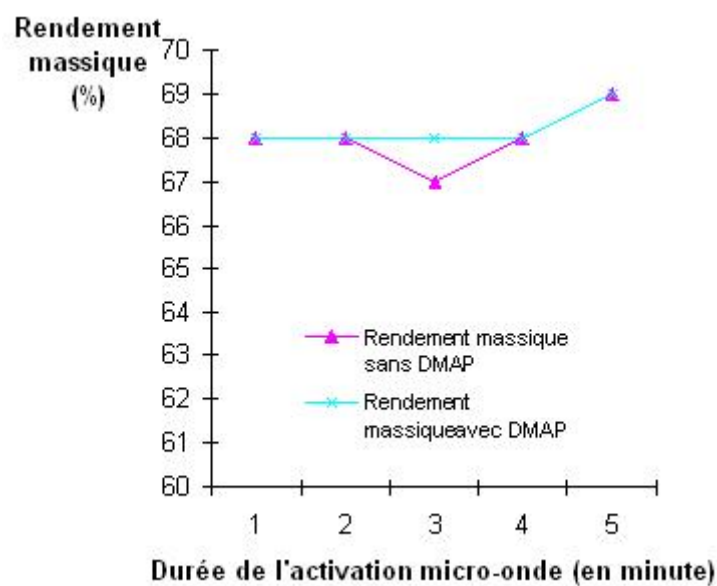


Figure III-19 : Influence de la durée d'irradiation micro-onde de la première étape sur le rendement massique.

La figure III-17 montre que les valeurs de degré de substitution en protoporphyrine IX ne sont pas influencées par l'augmentation de la durée de l'activation micro-onde. En effet, les résultats montrent que la valeur du degré de substitution en protoporphyrine IX reste

constante quelque soit la durée de l'activation, avec pour valeur moyenne 0,63 %. Aussi, il n'y pas de différences significatives lorsque la réaction d'acylation est réalisée en présence ou non de DMAP.

L'allongement de la durée de l'activation micro-onde de la première étape n'influence pas le degré de substitution en acide laurique et le rendement massique (figure III-18 et III-19). En effet, les valeurs de degré substitution en acide laurique et de rendement massique restent bonnes et constantes avec pour valeur moyenne respectives 2,6 et 68 %. On note également dans ce cas que la présence de DMAP lors de la première acylation n'a pas d'influence sur le degré de substitution en acide laurique et sur les rendements massiques, aucune différence significative n'ayant été observée lorsque l'acylation est réalisée en présence ou non de DMAP.

En conclusion, l'allongement de la durée de l'activation micro-onde de la première étape, n'a visiblement aucun effet sur les DS et les rendements massiques. De plus, les résultats obtenus en présence de 14 méq/UAG de chlorure d'acide de protoporphyrine IX sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors de la synthèse de laurates de cellulose simple (sans porphyrine). A titre d'exemple, un laurate de cellulose simple obtenu par acylation de la cellulose utilisant 9 éq/UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,5 éq/UAG de DMAP soumis à une minute d'irradiation micro-onde à 300 W présente un degré de substitution en acide laurique de 2,49 ; un rendement massique de 70 % et un rendement molaire de 80 %. Un laurate de cellulose protoporphyrinique possédant un degré de substitution en protoporphyrine IX de 0,63 % présente un degré de substitution en acide laurique de 2,60 ; un rendement massique de 68 % et un rendement molaire de 76 %.

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée lorsque les essais ont été réalisés en présence ou non de DMAP. Peut-être la quantité de DMAP utilisée (108 méq/UAG) au cours de la première acylation n'est pas suffisante pour avoir un impact significatif sur les grandeurs mesurées. Nous nous sommes donc proposés dans la suite de notre travail d'évaluer l'influence de la quantité de DMAP employée.

b-Effet de la stœchiométrie en DMAP sur la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX

Nous avons évalué l'influence de la stœchiométrie en DMAP sur l'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX en faisant réagir la cellulose avec 14 méq. de chlorure d'acide de protoporphyrine IX, en présence de quantités de DMAP variant de 1,5 à 9 méq/UAG. Ce mélange réactionnel est alors soumis à une minute d'activation micro-onde à 300 Watts. L'acylation de la cellulose protoporphyrinique par le chlorure d'acide laurique a ensuite été réalisée en utilisant 9 éq./UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,5 éq/UAG de DMAP toujours sous activation micro-onde (une minute à 300 Watts). Les résultats sont présentés sur les figures III-20 et III-21.

Les valeurs du degré de substitution en protoporphyrine IX ne sont pas influencées par la stœchiométrie en DMAP (figure III-20). La valeur moyenne obtenue pour le degré de substitution en protoporphyrine IX est 0,63 %.

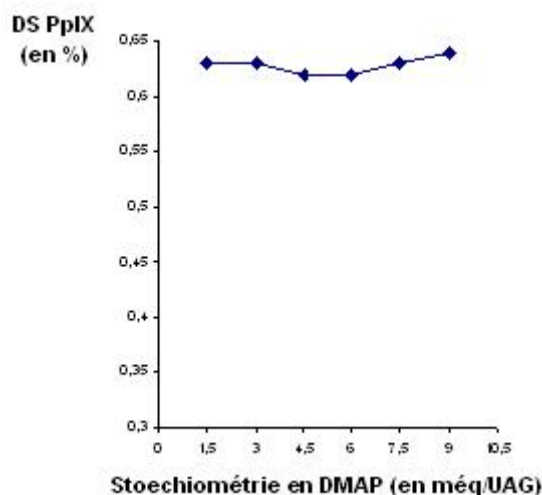


Figure III-20 : Influence de la stœchiométrie en DMAP sur le degré de substitution en protoporphyrine IX.

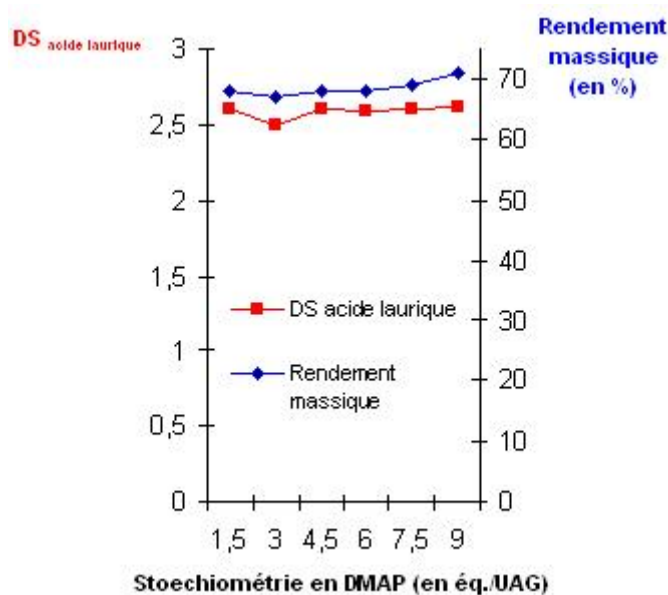


Figure III-21 : Influence de la stoechiométrie en DMAP sur le rendement massique et le DS_{acide laurique}.

Les valeurs de rendement massique et de degré de substitution en acide laurique ne sont pas sensibles à l'augmentation de la quantité de DMAP employée (figure III-21). Ces valeurs de rendements massiques et de DS_{acide laurique} sont bonnes et constantes avec pour valeur moyenne respective 68 % et 2,6. Aucune différence significative n'a été observée lorsque l'acylation est réalisée en présence d'un excès de DMAP/chlorure d'acide de protoporphyrine IX.

En conclusion, le DMAP n'a visiblement aucun effet sur la réaction d'acylation de la cellulose par le chlorure d'acide de protoporphyrine IX. En effet, les grandeurs caractéristiques (DS, rendements massique et molaire) restent constantes pour des quantités de DMAP variant de 1,5 à 9 méq/UAG. Ces résultats suggèrent que la différence de réactivité entre le chlorure d'acide de protoporphyrine IX et le complexe formé par celui-ci avec le DMAP (acétylpyridinium de protoporphyrine IX) est trop faible pour que ce promoteur influence la première étape. Donc l'activité catalytique du DMAP n'est pas indispensable pour le bon déroulement la réaction. Nous avons donc retenu les conditions suivantes pour la synthèse de laurates de cellulose protoporphyriniques de DS_{PpIX} variés : 1 minute d'activation micro-onde à 300 W, sans DMAP lors de la première étape et 1 minute d'activation micro-onde à 300 W, en présence de 9 équ/UAG de chlorure d'acide laurique et de 0,5 équ./UAG de DMAP.

3-2-4-Effet de la stoechiométrie en chlorure d'acide de protoporphyrine IX

La synthèse des laurates de cellulose protoporphyriniques possédant des degrés de substitution en protoporphyrine IX variés a été réalisée dans les conditions suivantes : une minute d'activation à 300 W, sans DMAP pour la fixation de la protoporphyrine IX. Puis 9 éq/UAG de chlorure d'acide laurique en présence de 0,5 éq. de DMAP/UAG ; activés par une minute d'irradiation micro-onde à 300 W. Les différentes valeurs de degrés de substitution en protoporphyrine IX (DS PpIX) ont été contrôlées en faisant varier la quantité de chlorure d'acide de protoporphyrine IX mise à réagir au cours de la première étape de 3 à 30 méq/UAG. Les résultats sont présentés sur les figures III-22 et III-23.

Les plastiques ont été obtenus avec des degrés de substitution en protoporphyrine IX variant de 0,14 à 1,1 % (figure III-22). Ces valeurs augmentent de façon linéaire pour atteindre la valeur limite de 1,1% lorsque 23 méq/UAG de protoporphyrine IX sont mis à réagir. La valeur moyenne du rendement de fixation est dans ce cas également plus élevée que celle obtenue pour les laurates de cellulose meso-arylporphyriniques (chapitre II) mais elle est inférieure à celle obtenue lors de l'estérification. Elle atteint dans ce cas 48% lorsque 23 méq/UAG de protoporphyrine IX sont utilisés. Lorsque les quantités de chlorure d'acide de protoporphyrine IX mises à réagir sont supérieures à 23 méq./UAG, le DS PpIX reste invariable.

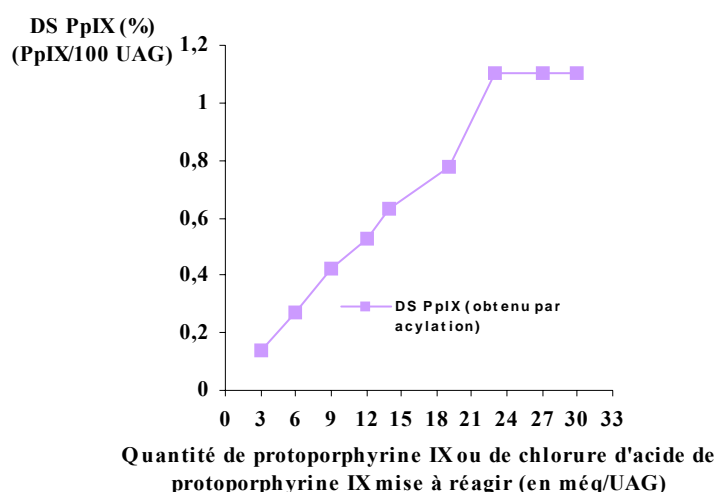


Figure III-22 : Influence de la quantité de PpIX mise à réagir sur le DS PpIX.

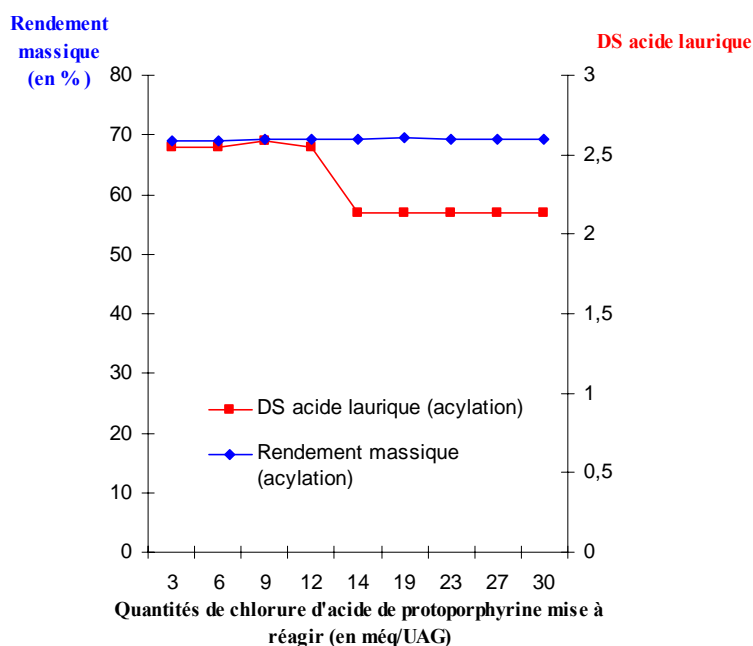


Figure III-23 : Influence de la quantité de protoporphyrine IX mise à réagir sur le rendement massique et le DS_{acide laurique}.

Les degrés de substitution en acide laurique des laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés par acylation sont obtenus élevés, en moyenne 2,60 (figure III-23). Aussi, le DS acide laurique n'est pas influencé par la stoechiométrie en chlorure d'acide de protoporphyrine IX. On observe également une baisse des rendements massiques bien que les valeurs de DS acide laurique soient constantes. En effet, les rendements massiques chutent de 68 à 57 % lorsque 3 et 23 méq/UAG de chlorure d'acide de protoporphyrine IX sont mis à réagir. Pour des quantités de chlorure d'acide de protoporphyrine IX supérieures à 23 méq/UAG, les rendements massiques sont constants, en moyenne 57%. Ces résultats s'expliquent comme pour les esters de cellulose obtenus par estérification par une réticulation du polymère au cours de l'acylation de la cellulose par la protoporphyrine IX.

3-3-Comparaison des deux voies de synthèse des laurates de cellulose protoporphyriniques

A des fins de comparaison, nous avons reporté sur la figure III-24 les courbes du degré de substitution en protoporphyrine IX des esters de cellulose obtenus par estérification et acylation. Dans les deux cas, les valeurs restent relativement faibles mais supérieures à celles des laurates de cellulose meso-arylporphyrines. L'évolution générale du degré de substitution en protoporphyrine IX est similaire pour les deux voies de synthèse. Cependant, on note que le degré de substitution en protoporphyrine IX évolue plus rapidement dans le cas des esters de cellulose obtenus par estérification. En effet, lorsque 14 méq./UAG de protoporphyrine IX sont utilisés, le rendement de fixation est de 79% pour l'estérification. Dans le cas de l'acylation, le rendement de fixation chute à 45%, soit près de la moitié.

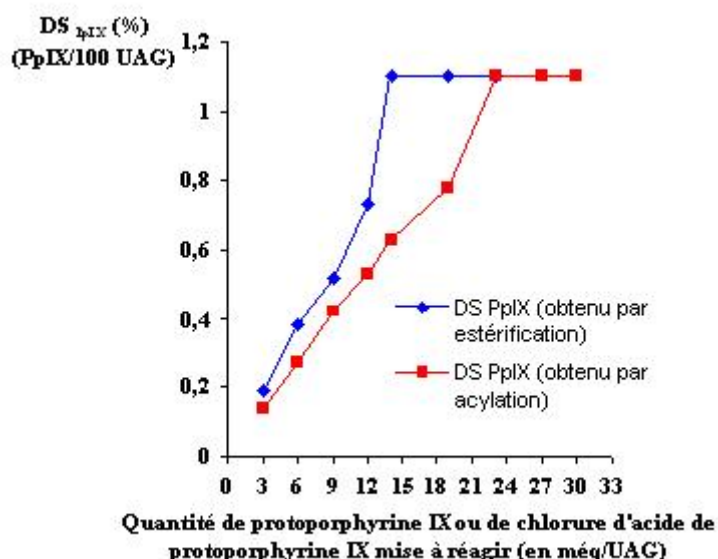


Figure III-24 : Comparaison des DS_{PpIX} des esters de cellulose obtenus par estérification et acylation.

Les laurates de cellulose protoporphyriniques synthétisés par estérification et par acylation sont obtenus avec des DS acide laurique élevés, en moyenne 2,70 et 2,60 respectivement (figure III-25). Ces valeurs de DS acide laurique sont du même ordre de grandeur. De plus, le DS acide laurique n'est pas influencé par la stoechiométrie en protoporphyrine IX.

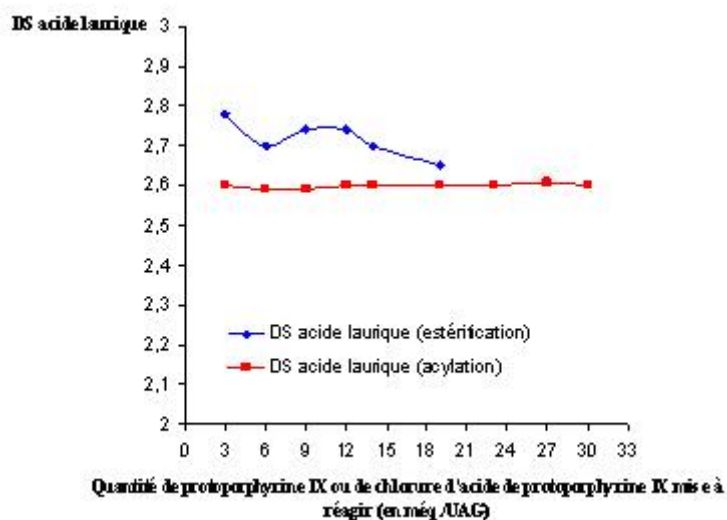


Figure III-25 : Influence de la quantité de protoporphyrine IX mise à réagir sur le DS_{acide laurique}.

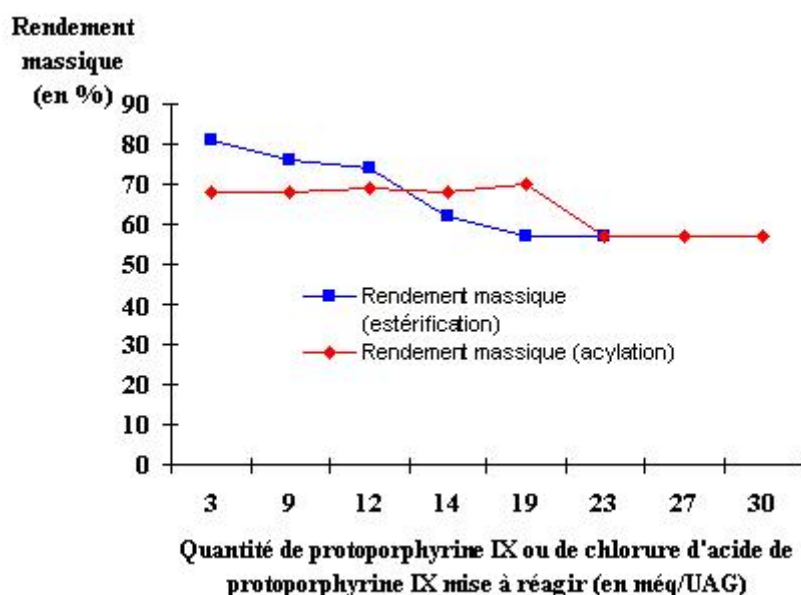


Figure III-26 : Influence de la quantité de protoporphyrine IX mise à réagir sur le rendement massique.

Les valeurs de DS acide laurique des laurates de cellulose protoporphyriniques sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les laurates de cellulose meso-arylporphyriniques synthétisés au chapitre II. Cependant, bien que l'on observe une constance des valeurs du degré de substitution en acide laurique, les rendements massiques diminuent sensiblement pour les deux voies de synthèse lorsque le degré de substitution en porphyrine atteint la valeur de 1,1% (figure III-26). Ces résultats s'expliquent dans les deux cas par l'insolubilité des esters de cellulose, probablement due à la réticulation du polysaccharide.

Conclusion

Nous avons synthétisé pour la première fois une large gamme de laurates de cellulose protoporphyriniques possédant des teneurs en protoporphyrine IX variées, en utilisant deux voies de synthèse. L'estérification a été réalisée dans les mêmes conditions que celles retenues au chapitre II. L'autre voie de synthèse est l'acylation de la cellulose sous activation micro-onde, ce qui a permis de diminuer les temps de réaction. L'optimisation de la réaction d'acylation du polysaccharide a montré que le DMAP n'a aucune influence sur cette réaction de fixation du photosensibilisateur. La présence des deux bras carboxyéthyles sur la protoporphyrine IX a permis d'obtenir des esters de cellulose possédant des degrés de substitution en porphyrine plus élevés que ceux des laurates de cellulose meso-arylporphyriniques. Ces valeurs ont été doublées. Les rendements de fixation moyens sont de 65% pour l'estérification et de seulement 45% pour l'acylation. Cependant, la réticulation de la cellulose par le photosensibilisateur empêche l'obtention de plastiques de plus haut degrés de substitution en protoporphyrine IX. La valeur maximale de 1,1% obtenue pour le degré de substitution en protoporphyrine est identique dans les deux cas.

CHAPITRE IV

Synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques

Chapitre IV

Synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques

1-Introduction

L'analyse des résultats de la littérature montre que les porphyrines cationiques peuvent présenter une activité photobactéricide efficace.^[95] En effet, alors que les porphyrines neutres ou anioniques se sont montrées être inactives vis à vis des bactéries du type Gram- ; les porphyrines portant une ou plusieurs charges positives montrent une activité photobactéricide aussi bien vis à vis des souches bactériennes Gram- que Gram+.^[96] Comme exemple, nous pouvons citer les porphyrines cationiques meso-substituées comme le tétraiodure de tétra-(4N-méthylpyridiniumyl)porphine dont la structure est présentée sur la figure suivante (figure IV-1).^[97]

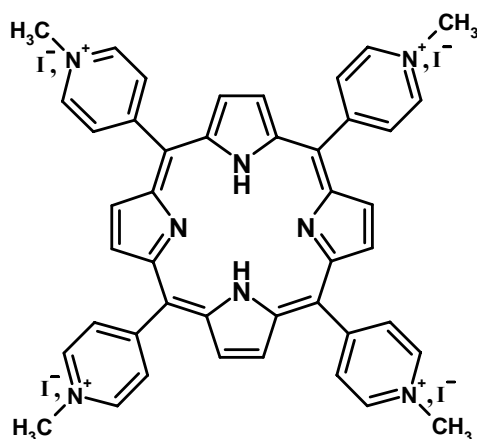


Figure IV-1 : Représentation de la tétraiodure de tétra-(4N-méthylpyridiniumyl)porphine.

Compte tenu de ces résultats, nous nous sommes demandé si l'on pouvait obtenir des matériaux photobactéricides porphyriniques cationiques originaux en greffant des porphyrines sur la cellulose. Nous avons ainsi poursuivi notre travail par la synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques obtenus par alkylation de chloroacétates de cellulose par la mono-p-pyridyltritylporphyrine. Nous présentons sur la figure IV-2 la structure de ces polymères.

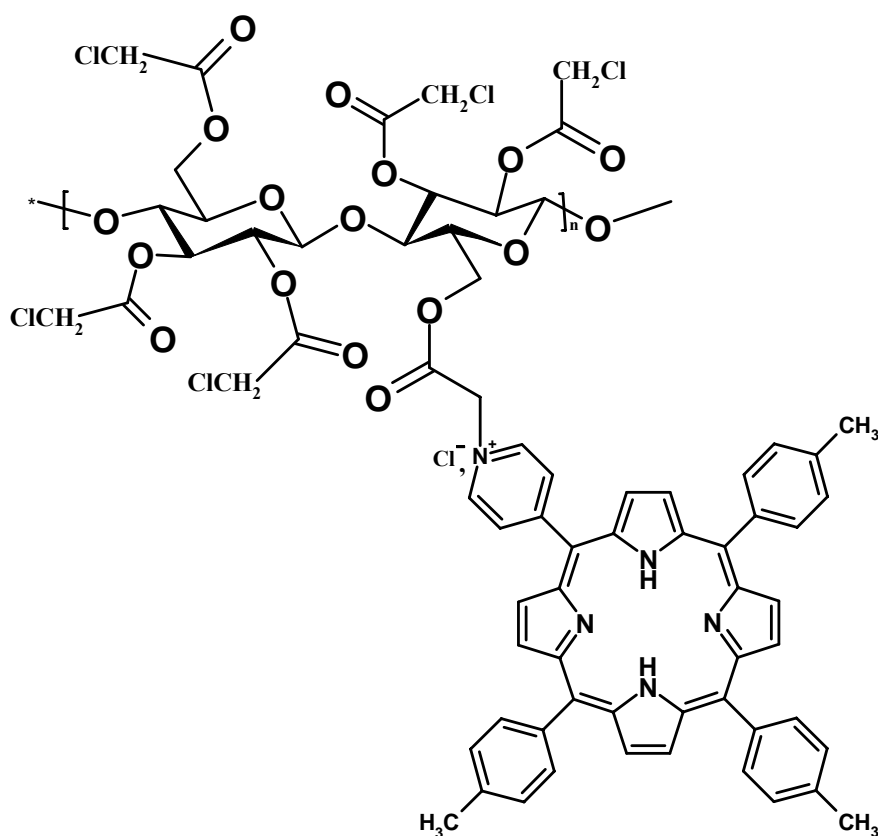


Figure IV-2 : Structure représentative des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques synthétisés.

2-Stratégie de synthèse

La synthèse des acétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques comporte trois étapes. Dans un premier temps, la para-monopyridyltritylporphyrine est obtenue selon la méthode de Little, par condensation de para-pyridinecarboxaldéhyde et de para-tolualdéhyde sur le pyrrole (figure IV-3). Par ailleurs, les chloroacétates de cellulose sont obtenus par acylation du polysaccharide par le chlorure d'acide chloroacétique. La dernière étape, la fixation de la pyridylporphyrine sur les chloroacétates de cellulose est réalisée par alkylation du photosensibilisateur et conduit aux chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques souhaités. Nous présentons ces étapes sur le schéma suivant (figure IV-3).

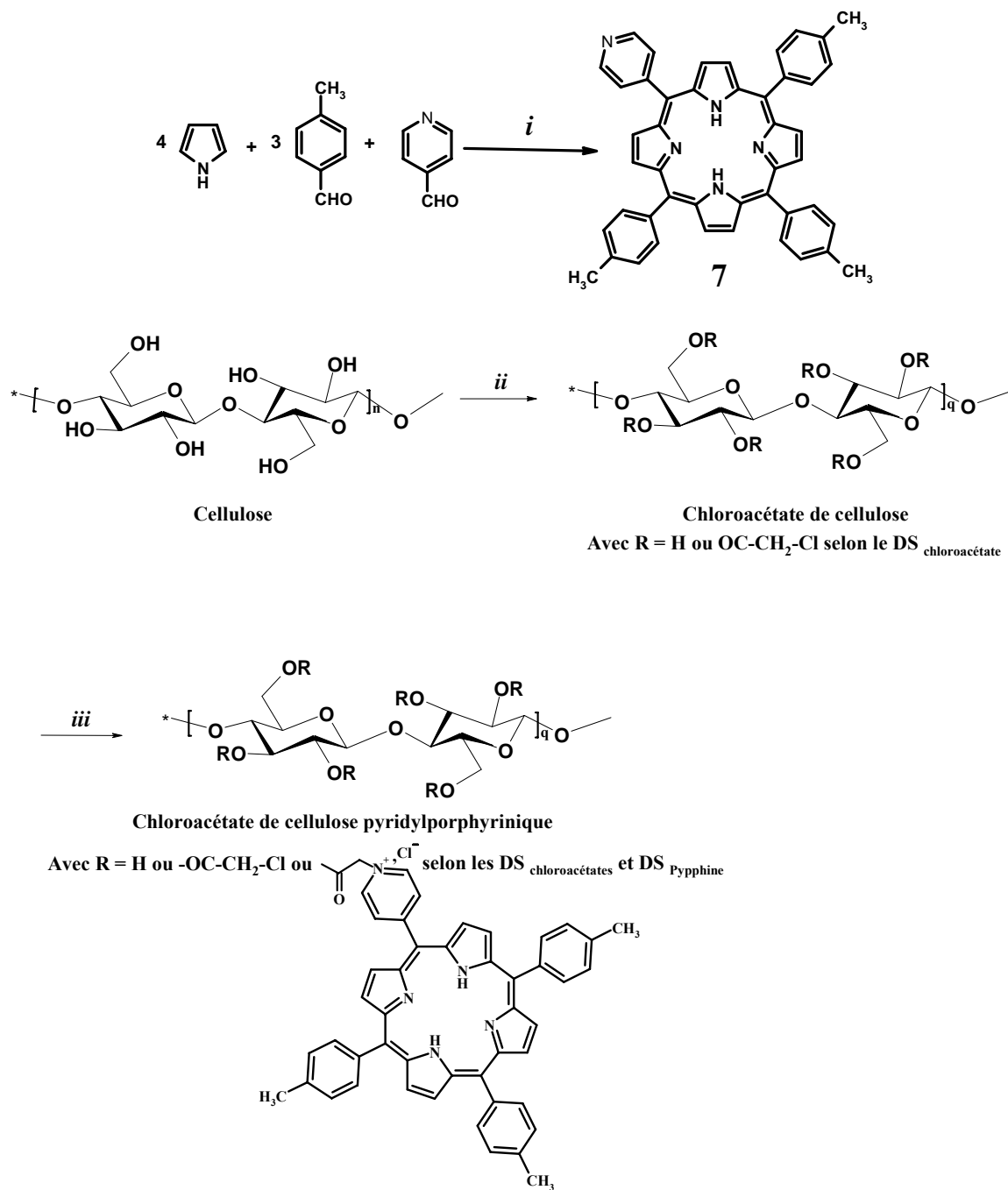


Figure IV-3 : Schéma synthétique des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques.

(i) Acide propionique, reflux ; (ii) ClCH₂COCl, DMA/LiCl, T.A ; (iii) *para*-monopyridyltritolylporphyrine, DMF_{anhydre}.

3-Synthèse de la *para*-pyridyltritolylporphyrine

3-1-Synthèse de la *para*-pyridyltritolylporphyrine selon la méthode de Little

Nous avons commencé ce travail par la synthèse de la *para*-5-pyridyl-10,15,20-tritolylporphyrine. Cette *meso*-arylporphyrine non symétrique a été synthétisée selon la méthode de Little (figure IV-4).

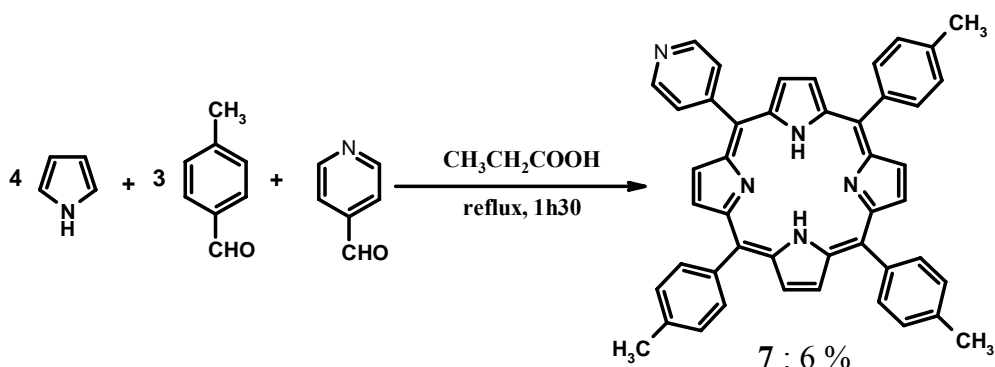


Figure IV-4 : Synthèse de la *para*-pyridyltritolylporphyrine selon Little.

La *para*-pyridyltritolylporphyrine est obtenue par condensation de la *para*-pyridinecarboxaldéhyde (1 éq.), du *para*-tolualdéhyde (3 éq.) avec le pyrrole (4 éq.) fraîchement distillés dans l'acide propionique à reflux. La porphyrine souhaitée cristallise après 18 heures à 4°C, en même temps que la tétratolylporphyrine (H_2TTP) et les porphyrines di et trisubstituées par un noyau pyridylique. Après purification sur colonne de silice, la monopyridyltritolylporphyrine est obtenue avec un rendement de 6%.

3-2-Synthèse de la *para*-pyridyltritolylporphyrine selon la méthode de Lindsey

Le pyrrole (4 éq.), le *para*-tolualdéhyde (3 éq.) et la *para*-pyridinecarboxaldéhyde (1 éq.) fraîchement distillés sont mis à réagir dans le dichlorométhane rigoureusement anhydre, sous courant d'argon, en présence de BF_3OEt_2 . Au bout d'une heure, les porphyrinogènes formés sont alors oxydés par addition de *para*-chloranile.

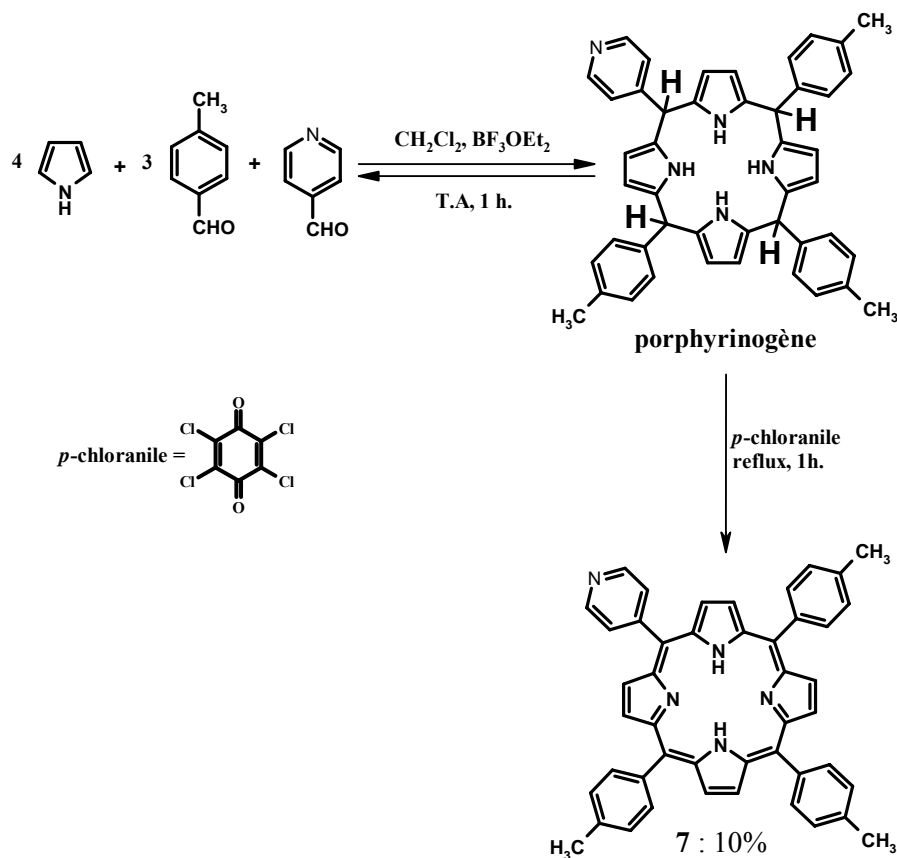


Figure IV-5 : Synthèse de la *para*-pyridyltritolyloporphyrine selon Lindsey.

Après purification, le rendement en monopyridyltritolyloporphyrine est de 10%. Comme dans le cas de la synthèse de la monohydroxyphényloporphyrine (synthétisée au chapitre II), le rendement est meilleur lorsque le protocole de Lindsey est utilisé.

3-3-Caractérisation

La monopyridylporphyrine a été caractérisée par spectroscopie UV-visible et spectrométrie de masse. Aussi, nous avons réalisé une étude détaillée par spectroscopie RMN ^1H de ce macrocycle.

3-3-1-Spectroscopie UV-visible

Le spectre de ce composé a été réalisé dans le THF (figure IV-6). Il correspond au spectre généralement attendu pour les porphyrines bases libres de type *meso*. On retrouve ainsi une forte bande d'absorption vers 420 nm, la bande de Soret et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 590, 550 et 520 nm notées respectivement I, II, III et IV. Ce spectre appartient au type *etio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des petites aux grandes longueurs d'onde (IV>III>II>I).

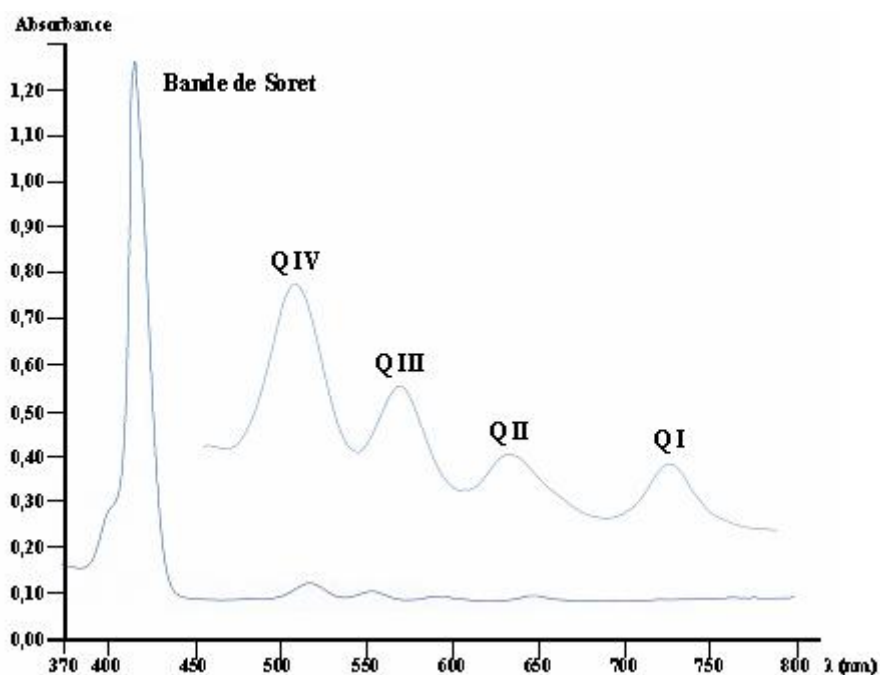


Figure IV-6 : Spectre UV-visible de la *para*-pyridyltritylporphyrine (7) (CHCl₃, C = 7,2.10⁻⁶ mol.L⁻¹)

3-3-2-Spectrométrie de masse

Nous avons poursuivi l'analyse structurale de ce macrocycle par l'étude de son spectre de masse. Le spectre MALDI obtenu, présente comme attendu, uniquement le pic de l'ion quasi moléculaire [M+H]⁺ situé à 658,32 uma ; la masse molaire calculée étant de 657,30 uma.

3-3-3-Spectroscopie RMN ^1H

L'étude détaillée du spectre RMN ^1H de la 5-*p*-pyridyl-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine a permis de confirmer la structure de ce macrocycle (figure IV-7).

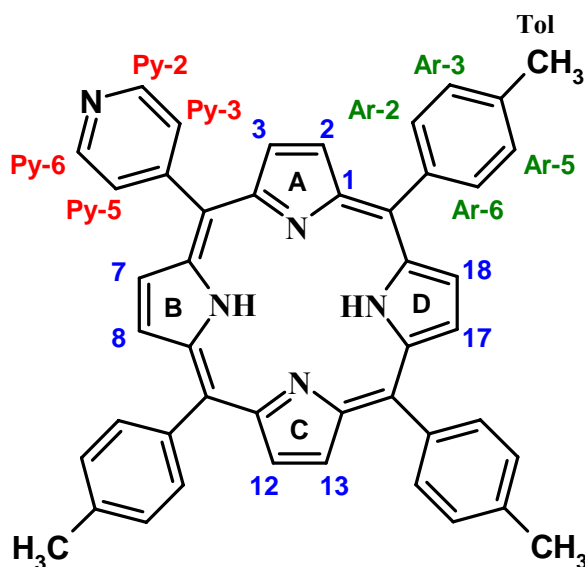


Figure IV-7 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN.

Les protons pyridyliques résonnent sous la forme de deux doublets à 9,01 ppm (H-Py-2,6) et 8,16 ppm (H-Py-3,5) avec une constante de couplage de 5,8 Hz. Les protons β -pyrroliques résonnent quand à eux sous la forme de deux doublets situés respectivement à 8,90 ppm (H-2,8) et 8,76 ppm (H-3,7) avec une constante de couplage de 4,8 Hz et d'un singulet situé à 8,87 ppm (H-12, 13, 17 et 18). Le nombre et la multiplicité des signaux des protons β -pyrroliques est en accord avec la symétrie de la molécule. Compte tenu de cette symétrie, les protons aromatiques des trois tolyles résonnent sous la forme de deux doublets, à 8,08 ppm (H-Ar-2,6) ($J = 7,8$ Hz) et 7,55 ppm (H-Ar-3,5) ($J = 7,8$ Hz). Les protons méthyliques des tolyles résonnent sous la forme d'un singulet à 2,70 ppm. Enfin, les protons NH pyrroliques fortement blindés, se situent à -2,79 ppm sous la forme d'un singulet élargi.

4-Résultats et discussion

4-1-Synthèse des chloroacétates de cellulose

Nous avons poursuivi ce travail par la synthèse de chloroacétates de cellulose. La stratégie adoptée est l'acylation du polysaccharide en phase homogène par le chlorure d'acide chloroacétique. Les chloroacétates de cellulose ainsi obtenus sont alors purifiés et un casting est effectué par dissolution des esters chlorés dans un minimum de THF suivie de l'évaporation de celui-ci. Enfin, les films plastiques sont récupérés sur le fond du récipient.

Dans un premier temps, nous présentons la réaction d'acylation, puis les grandeurs caractéristiques des esters synthétisés. Par la suite, l'influence des différents paramètres réactionnels sur la réaction a été appréhendée au cours de la synthèse des chloroacétates de cellulose notamment à travers les variations du rendement massique, du degré de substitution et du rendement molaire.

4-1-1-Acylation de la cellulose par le chlorure d'acide chloroacétique

L'acylation du polysaccharide a été réalisée dans le système de solvant DMA/LiCl. Le chlorure d'acide chloroacétique est ajouté à la cellulose dissoute, puis ce mélange est placé sous agitation, à température ambiante pendant 2 heures (figure IV-8).

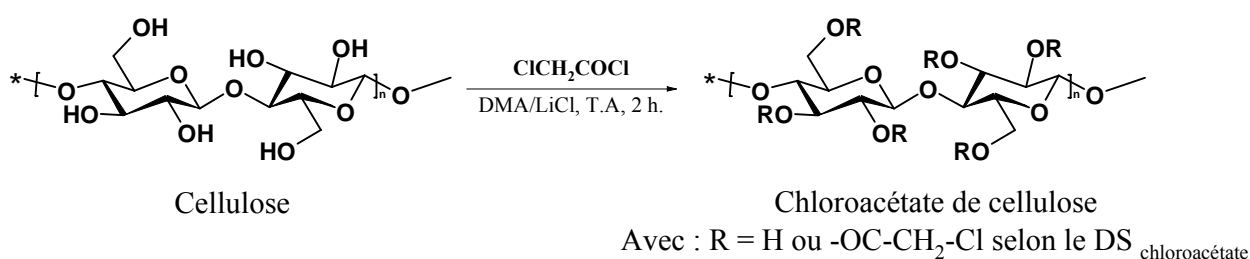


Figure IV-8 : Acylation de la cellulose par le chlorure d'acide chloroacétique.

Les chloroacétates de cellulose ainsi synthétisés sont alors purifiés par la méthode des précipitation-dissolution successives avec de l'eau et du THF respectivement. Après une simple filtration sur laine de verre pour éliminer les chaînes cellulosiques insolubles, la mise en forme est réalisée par casting. Ces films sont homogènes et présentent une bonne ductilité. Nous présentons sur la figure IV-9 un chloroacétate de cellulose ainsi obtenu.

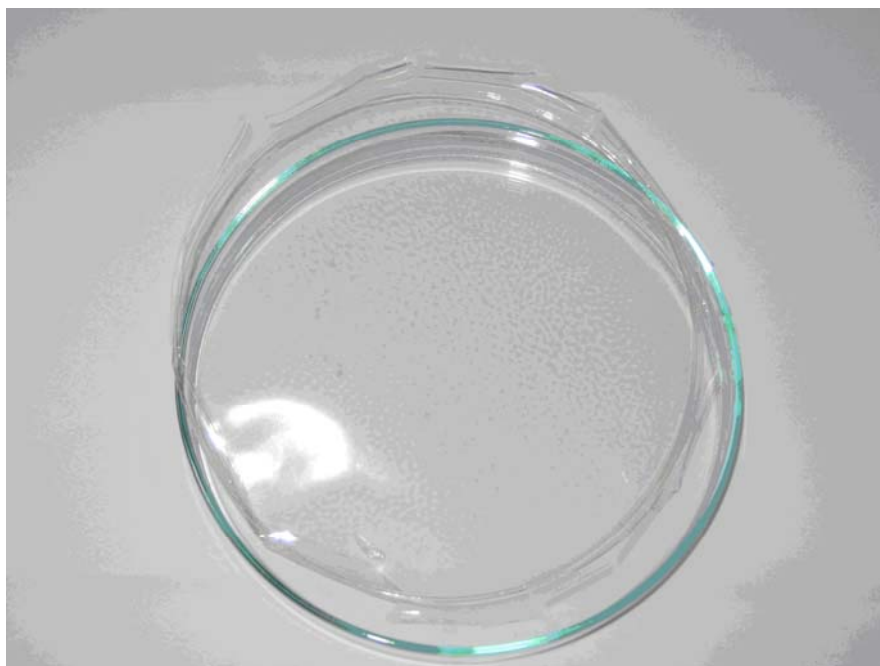


Figure IV-9 : Photographie d'un chloroacétate de cellulose.

4-1-2- Caractérisation structurale des chloroacétates de cellulose synthétisés

Les chloroacétates de cellulose synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie infra-rouge et par spectroscopie RMN ^1H .

4-1-2-1- Spectroscopie Infra-rouge

Les spectres infra-rouge (IR) ont été réalisés sur des esters de cellulose par transmission directe du faisceau à travers le film plastique. Les spectres obtenus sont comparés par rapport à l'empreinte IR de la cellulose de départ (figure IV-10).

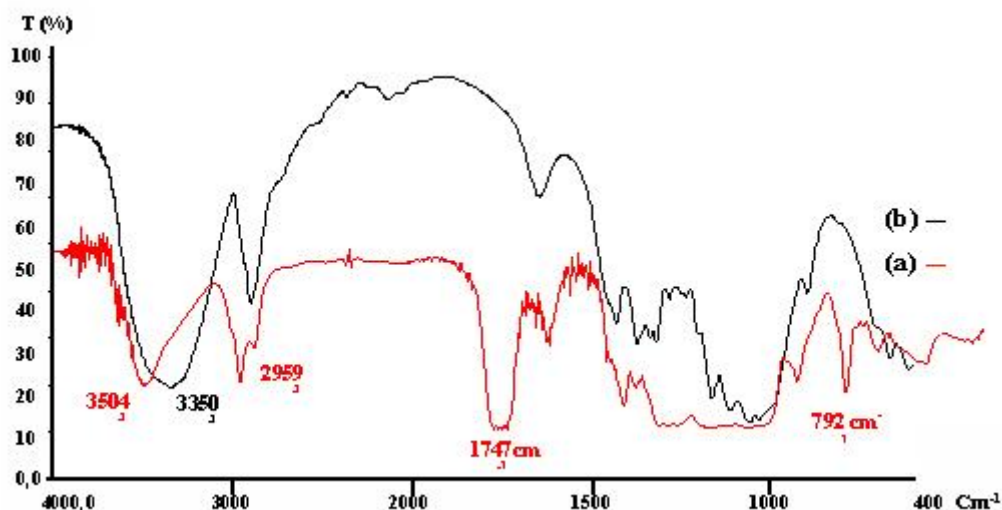


Figure IV-10 : (a – courbe rouge) Spectre infra-rouge d'un chloroacétate de cellulose ; (b – courbe noire) Spectre infra-rouge de la cellulose de départ.

La spectroscopie IR confirme l'acylation de la cellulose. Comme dans le cas des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques et protoporphyriniques synthétisés aux chapitres précédents (chapitre II et III), l'acylation du polysaccharide se traduit sur les spectres IR des films plastiques par une diminution de l'intensité de la bande située à 3350 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de valence des groupements hydroxyles. Aussi, on remarque également que cette baisse d'intensité est corrélée d'une part avec l'apparition d'une bande vers 1747 cm^{-1} caractéristique des fonctions esters et d'autre part avec une augmentation de l'intensité des bandes vers 2900 cm^{-1} caractéristiques de la vibration de valence des liaisons C-H des groupements alkyles des groupements chloroacétates. D'autre part, on note aussi la présence à 792 cm^{-1} de la bande correspondant à la liaison carbone-chlore des substituants chloroacétates.

4-1-2-2-Spectroscopie RMN ^1H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des esters de cellulose ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le diméthylsulfoxyde deutérié. D'une manière générale on retrouve sur le spectre RMN ^1H les signaux des unités glucidiques sous la forme d'un multiplet entre 5,2 et 3 ppm, ainsi que les protons méthyléniques des chloroacétates vers 4,3 ppm sous la forme d'un singulet. Du fait de la superposition de ces deux types de signaux, nous n'avons pas pu déterminer les degrés de substitution en chloroacétate par RMN ^1H .

Les esters de cellulose synthétisés sont caractérisés par le rendement massique et le degré de substitution en chloroacétate ($DS_{\text{chloroacétate}}$).

4-1-2-3-Le rendement massique

Nous rappelons que le rendement massique est défini comme étant le rapport entre la masse du film plastique obtenu et la masse théorique maximale de plastique qu'il est possible d'obtenir (cellulose totalement estérifiée). Le rendement massique est donc obtenu en appliquant la formule suivante dont le calcul détaillé est présenté dans la partie expérimentale:

$$R_{\text{massique}} = \frac{m_{\text{plastique obtenu}}}{m_{\text{maximale théorique}}} = \frac{m_{\text{plastique obtenu}}}{2,42}$$

4-1-2-4-Le degré de substitution

Les chloroacétates de cellulose sont également caractérisés par les valeurs du degré de substitution en chloroacétate ($DS_{\text{chloroacétate}}$) qui rappelons le définit le nombre moyen de substituants chloroacétates greffés par unité anhydroglucose. Les degrés de substitution en chloroacétate ont été déterminés par microanalyse à partir du pourcentage de carbone (%C) de l'échantillon analysé en appliquant la formule suivante dont le calcul est détaillé dans la partie expérimentale :

$$DS_{\text{chloroacétate}} = \frac{72,066 - 162,1424 \times \% C}{76,4820 \times \% C - 24,0220}$$

Nous avons étudié la réaction d'acylation de la cellulose en évaluant l'influence de la cinétique et de la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique sur les rendements massiques et les degrés de substitution pour préparer dans un second temps un ester de cellulose de plus haut degré de substitution en chloroacétate possible. Dans un souci de normalisation toutes les synthèses ont été réalisées en partant de 1 g. de cellulose soit 50 ml de solution mère.

4-1-3-Etude cinétique de la réaction d'acylation

Nous avons réalisé une étude cinétique de la réaction d'acylation de la cellulose à température ambiante en présence de 6 équivalents par unité anhydroglucose de chlorure d'acide chloroacétique pour un temps de réaction variant de 30 minutes à 6 heures. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante (figure IV-11).

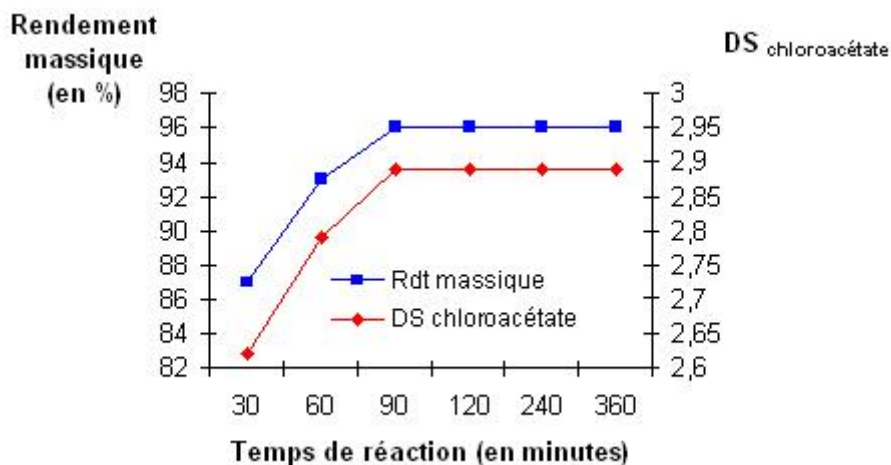


Figure IV-11 : Etude cinétique de la réaction d'acylation de la cellulose.

Les chloroacétates de cellulose sont obtenus avec de bons rendements et des degrés de substitution en chloroacétate élevés dès 30 minutes de réaction. Ces deux paramètres augmentent avec la même vitesse pour atteindre un plateau à partir de 90 minutes. L'allongement de la durée de la réaction au delà de 90 minutes ne permet pas d'améliorer les valeurs qui restent constantes et élevées avec pour valeurs respectives 2,9 et 96 % pour le degré de substitution et le rendement massique. Cette évolution suggère que bien qu'aucune base n'ait été ajoutée, il ne se produit aucune dépolymérisation du polysaccharide pour des temps de réaction longs contrairement aux acylations ou estérification réalisées avec chauffage. Sans doute, l'absence d'activation thermique explique ces résultats.

4-1-4-Etude de l'effet de la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique sur la réaction d'acylation

L'influence de la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique sur l'acylation de la cellulose a été étudiée à température ambiante pour un temps de réaction fixé à 2 heures. La quantité de chlorure d'acide a été fixée entre 4 et 9 équivalents par UAG (figure IV-12).

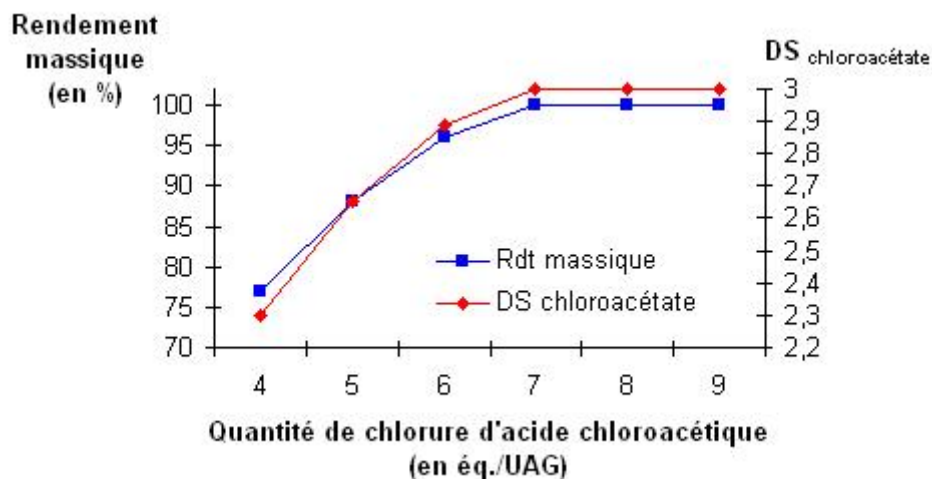


Figure IV-12 : Etude de l'effet de la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique.

Ce graphique montre que le degré de substitution et le rendement massique sont influencés par la stœchiométrie en chlorure d'acide chloroacétique (figure IV-12). En effet, pour des quantités de chlorure d'acide comprises entre 4 et 7 éq./UAG, les valeurs de degré de substitution et de rendement massique augmentent de manière identique. Cette évolution va dans le même sens que celle observée pour la synthèse d'acétates de cellulose non chlorés.^[88] Aussi la présence de l'atome de chlore sur le groupement méthylène situé en position α du carbonyle augmente la réactivité de ce chlorure d'acide du fait de l'effet inductif attracteur exercé par l'halogène sur le carbonyle. Ce phénomène explique que les valeurs maximales de DS et de rendement massique soient atteintes lorsque seulement 7 éq./UAG de chlorure d'acide sont utilisés à température ambiante pour un temps de réaction de 2 heures. Des essais employant 2 et 3 équivalents de chlorure d'acide ont également été réalisés. Dans ce cas, les esters ont pu être isolés au cours de la phase de précipitation à l'eau mais ceux-ci se sont avérés être insolubles au cours de la phase de redissolution. Ceci s'explique par les faibles valeurs de leur degré de substitution.^[90] En effet, il est généralement admis dans la littérature que les esters de cellulose possédant des degrés de substitution inférieur à 1,4 sont insolubles.^[90]

En conclusion, ces essais montrent l'efficacité de l'acylation du polysaccharide en phase homogène pour l'obtention de chloroacétates de cellulose. La présence de l'halogène en α du carbonyle du chlorure d'acide chloroacétique augmente sa réactivité. De ce fait, la réaction d'acylation ne nécessite pas d'activation thermique et 2 heures de réaction sont suffisantes pour obtenir un chloroacétate de cellulose possédant un degré de substitution élevé et avec un bon rendement massique. De plus, nous n'avons observé aucun phénomène de dégradation ou de dépolymérisation du polymère, ce qui rend l'emploi d'une base inutile. De ce fait, l'utilisation de 7éq./UAG de chlorure d'acide chloroacétique permet l'obtention d'un ester de cellulose possédant un degré de substitution en chloroacétate égal à 3 avec un rendement massique voisin de 100%. Les matériaux plastiques ainsi obtenus se présentent sous la forme de films plastiques résistants et ductiles. Nous avons donc synthétisé dans ces conditions un chloroacétate de cellulose possédant un degré de substitution en chloroacétate égal à 3, à partir de 5 grammes de cellulose. Dans un souci d'homogénéité et de reproductibilité, nous avons toujours utilisé ce même ester chloré de cellulose pour la préparation de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques présentée dans le paragraphe suivant.

4-2-Synthèse des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques

L'étape suivante de notre travail a été le greffage de la pyridylporphyrine sur les chloroacétates de cellulose. Cette étape a été réalisée par alkylation. Le polysaccharide estérifié est dissous dans le DMF anhydre en présence de la porphyrine. Les acétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques obtenus sont alors purifiés et un casting est effectué par dissolution des polysaccharides alkylés dans un minimum de THF suivie de l'évaporation de celui-ci. Les films plastiques sont alors récupérés sur les parois du récipient. L'influence des différents paramètres réactionnels sur la réaction a été évaluée au cours de la synthèse des acétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques notamment à travers les variations du degré de substitution en pyridylporphyrine (DS_{Pypphine}) et du rendement molaire.

4-2-1-Alkylation de la *para*-monopyridyltritolylporphyrine par les chloroacétates de cellulose

L'alkylation de la pyridylporphyrine a été réalisée dans le DMF anhydre. Le polysaccharide estérifié est dissous dans le DMF anhydre en présence de la pyridylporphyrine, puis ce mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 24 heures (figure IV-13).

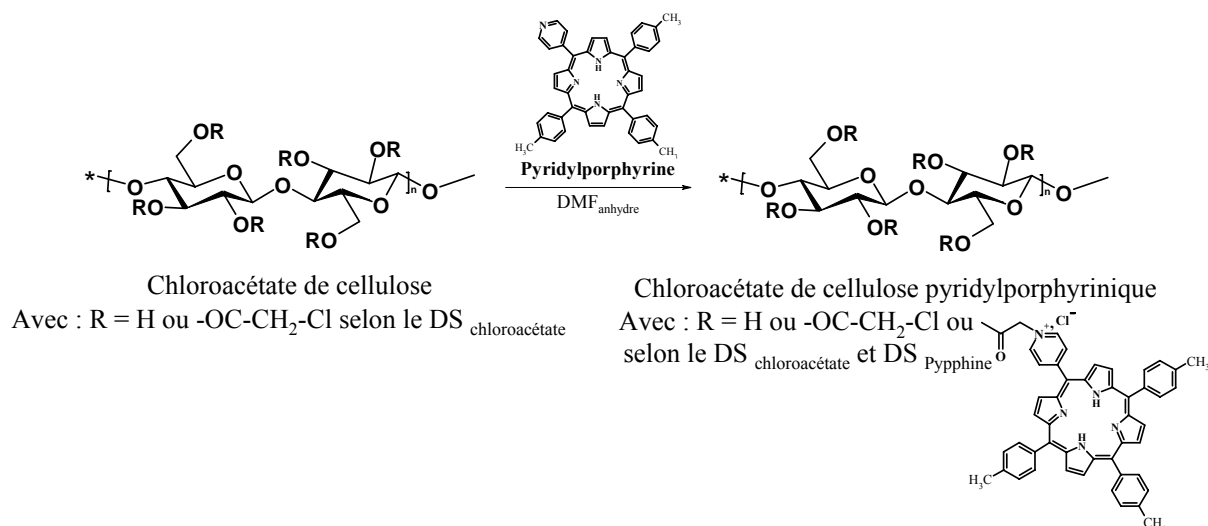


Figure IV-13 : Alkylation de la pyridylporphyrine par les chloroacétates de cellulose.

Les acétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques ainsi synthétisés sont alors purifiés par la méthode des précipitation-dissolution successives avec du chloroforme et du THF respectivement. Après une filtration sur laine de verre pour éliminer les chaînes cellulosiques insolubles, la mise en forme est réalisée par casting. Nous présentons sur la figure IV-14 un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique ainsi obtenu.



Figure IV-14 : Photographie d'un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique.

4-2-2- Caractérisation des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques synthétisés

Tous les chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et UV-visible. Aussi, nous avons réalisé une étude détaillée par spectroscopie RMN ^1H de ces polymères.

4-2-2-1- Spectroscopie Infrarouge

L'analyse infrarouge des esters de cellulose a été réalisée par transmission directe du faisceau à travers le film plastique. Les spectres obtenus sont comparés par rapport aux empreintes IR de la cellulose de départ (courbe noire) et d'un chloroacétate de cellulose non alkylé (courbe rouge) (figure IV-15). Les spectres IR obtenus à partir des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques (courbe bleue) sont identiques à ceux des chloroacétates de cellulose non alkylés. A titre d'exemple nous présentons sur la figure IV-15 le spectre d'un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique.

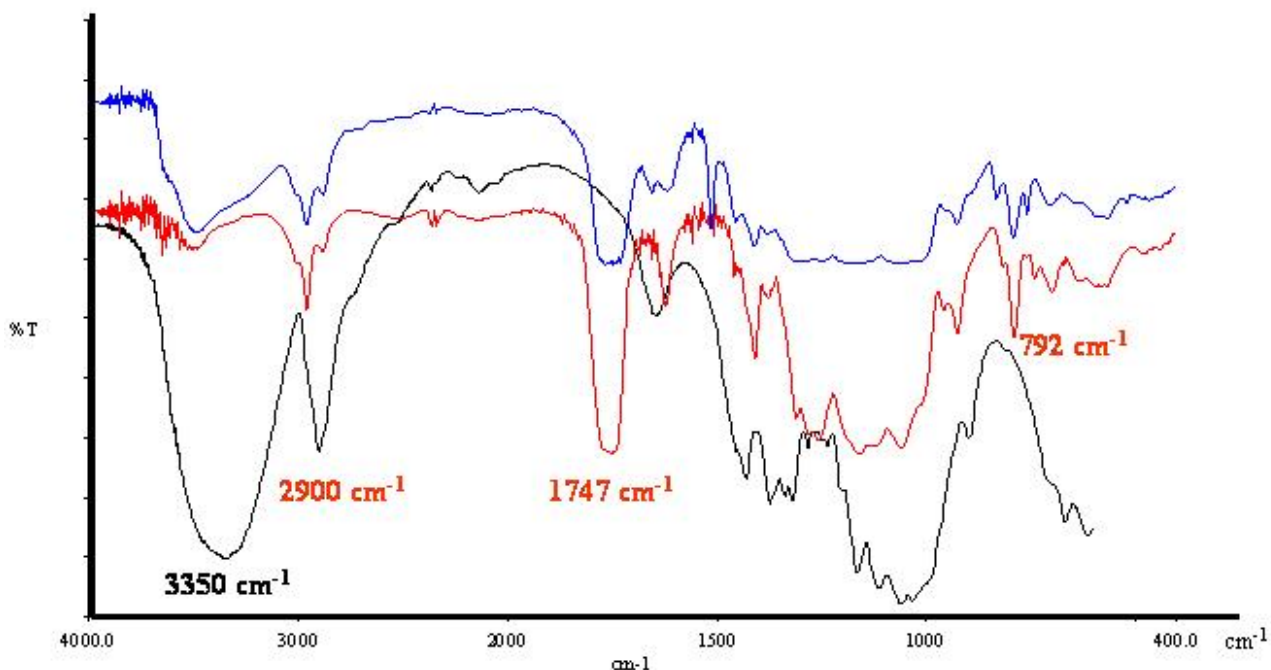


Figure IV-15: Courbe noire - spectre infra-rouge de la cellulose de départ,

courbe rouge - spectre infra-rouge d'un chloroacétate de cellulose, courbe bleue - spectre infra-rouge d'un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique.

Aucune modification du spectre infrarouge des chloroacétates de cellulose pyridyliques cationiques par rapport à ceux des chloroacétates de cellulose non alkylés n'a été observée, compte tenu de la faible quantité de porphyrine greffée. On retrouve donc sur le spectre des esters alkylés une diminution de l'intensité de la bande située à 3350 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de valence des groupements hydroxyles, ainsi qu'une baisse d'intensité corrélée d'une part avec l'apparition d'une bande vers 1747 cm^{-1} caractéristique des fonctions esters et d'autre part avec une augmentation de l'intensité des bandes vers 2900 cm^{-1} caractéristiques de la vibration de valence des liaisons C-H des groupements alkyles des groupements chloroacétates. D'autre part, on note toujours la présence à 792 cm^{-1} de la bande correspondant à la liaison carbone - chlore des chloroacétates, confirmant que la cellulose est toujours chloroacétylée.

4-2-2-2-Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visibles de tous les polymères alkylés ont été mesurés dans le THF. Ils correspondent tous au spectre de la pyridylporphyrine solution dans le même solvant. On retrouve ainsi sur les spectres une forte bande d'absorption vers 420 nm, la bande de Soret et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 595, 537 et 517 nm notées respectivement I, II, III et IV. Tous les spectres appartiennent au type *etio* pour lequel l'intensité des quatre bandes Q diminue des petites aux grandes longueurs d'onde ($IV > III > II > I$). Nous n'avons observé aucune modification particulière relative à l'intensité ou à la position des bandes, ce qui traduit l'absence d'interaction particulière entre les macrocycles greffés sur le squelette cellulosique. Ceci s'explique par la faible valeur des degrés de substitution en pyridylporphyrine. A titre d'exemple, nous présentons sur la figure IV-16 le spectre UV-visible d'un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique.

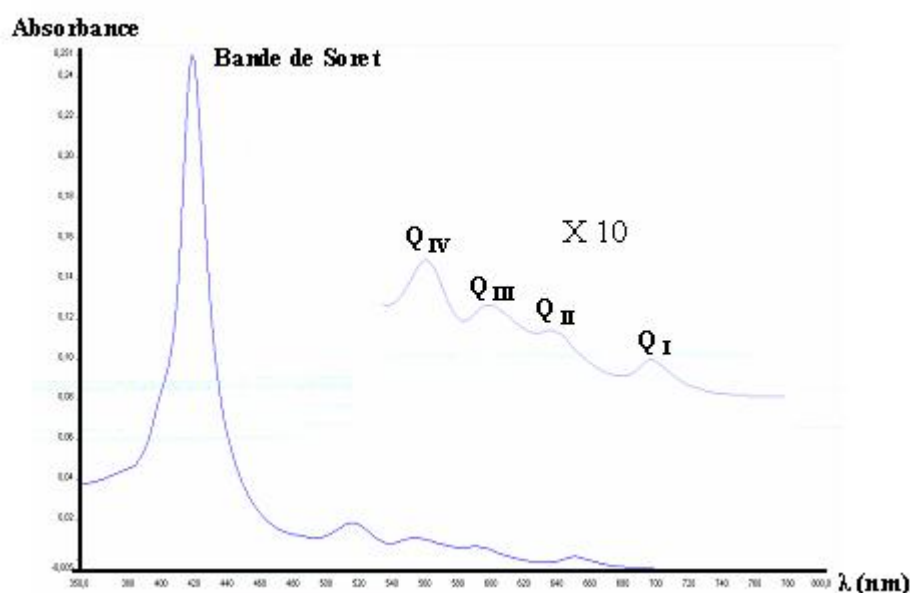


Figure IV-16 : Spectre UV-visible d'un chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique

de $DS_{Pypphine}$ 0,005 et $DS_{chloroacétate}$ de 3.

4-2-2-3-Spectroscopie RMN 1H

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le diméthylsulfoxyde deutérié. Nous présentons sur la figure IV-17 la numérotation adoptée pour la description des spectres RMN 1H des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques.

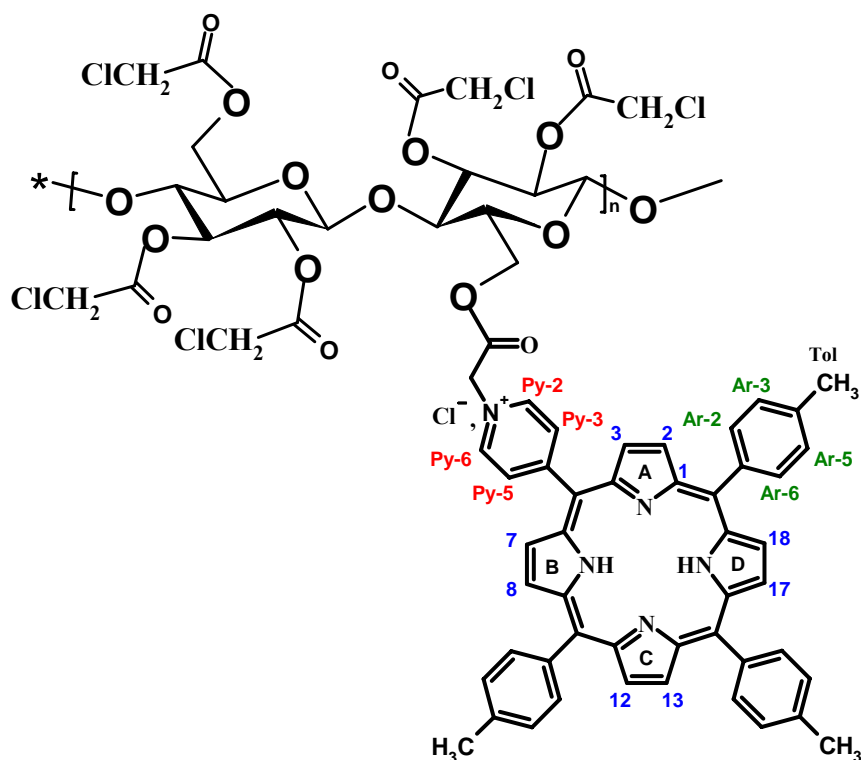


Figure IV-17: Numérotation adoptée pour la description du spectre RMN ^1H des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques.

La comparaison des spectres RMN ^1H entre la pyridylporphyrine libre qui est donc neutre et le polymère alkylé cationique montre que la quaternarisation des azotes pyridyliques n'affecte pas les déplacements chimiques des protons aryles. Par contre, les protons β -pyrroliques et surtout les protons pyridyliques subissent des variations magnétiques caractérisées par un déplacement chimique vers les champs faibles. On retrouve donc les mêmes familles de signaux rencontrés chez la pyridylporphyrine, auxquels s'ajoutent ceux du squelette cellulosique et du groupement méthylène des substituants chloroacétates.

Ainsi, les protons pyridyliques résonnent sous la forme de deux doublets à 9,51 ppm (H-Py-2,6) et 8,90 ppm (H-Py-3,5) avec une constante de couplage de 5,6 Hz. Les protons β -pyrroliques résonnent quand à eux sous la forme de deux doublets situés respectivement à 8,96 ppm (H-2,8) et 8,82 ppm (H-3,7) avec une constante de couplage de 4,4 Hz et d'un singulet situé à 8,90 ppm (H-12,13,17 et 18). On constate que les protons β -pyrroliques tout comme les protons pyridyliques subissent un net déblindage (Tableau IV-1).

Tableau IV-1 : Déplacements chimiques (δ ppm) et variation des déplacements chimiques ($\Delta\delta$ ppm) des protons β -pyrroliques et pyridyliques de la pyridylporphyrine (7) et des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques.

H	Pyridylporphyrine	Chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique	$\Delta\delta$ (chloroacétate de cellulose pyridylporphyrinique cationique - pyridylporphyrine)
<u>Pyrroles</u>			
2,8	8,90 d (5,8)	8,96 d (4,4)	+ 0,06
3,7	8,76 d (5,8)	8,82 d (4,4)	+ 0,06
12	8,87 s	8,90 s	+ 0,03
13	8,87 s	8,90 s	+ 0,03
17	8,87 s	8,90 s	+ 0,03
18	8,87 s	8,90 s	+ 0,03
<u>Pyridinyle</u>			
2,6	9,01 d (5,8)	9,51 d (5,6)	+ 0,50
3,5	8,16 d (5,8)	8,90d (5,6)	+ 0,74

La comparaison du déblindage par effet de quaternarisation entre les protons pyridyliques H-2,6 et celui des protons H-3,5 montre que ces derniers sont plus affectés. Les protons H-2,6 pyridiniums sont en effet proches de la densité électronique apportée par le contre-ion iodure. Ces résultats sont conformes à ceux rencontrés dans la littérature.^[98]

Compte tenu de la symétrie du macrocycle, les protons aromatiques des trois toyles résonnent sous la forme de deux doublets, à 8,07 ppm (H-Ar-2,6) ($J = 7,7$ Hz) et 7,50 ppm (H-Ar-3,5) ($J = 7,7$ Hz). Les protons méthyliques des toyles résonnent sous la forme d'un singulet à 2,65 ppm. Enfin, les protons NH pyrroliques fortement blindés, se situent à -2,70 ppm sous la forme d'un singulet élargi. Les protons du squelette osidique résonnent sous la forme d'un multiplet situé entre 5,20 et 2,60. Enfin, les protons méthyléniques résonnent sous la forme d'un singulet situé à 4,23 ppm.

Si les figures et les déplacements chimiques observés pour les signaux des protons des macrocycles greffés correspondent à ceux obtenus pour la pyridylporphyrine libre correspondante, on remarque également (comme dans le cas des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques synthétisés au chapitre II) que l'intégration de ces signaux reste faible. Ainsi à titre d'exemple les protons β -pyrroliques présentent une intégration de 0,020 H par rapport aux protons méthyliques des substituants chloroacétates.

4-2-2-4-Le degré de substitution en pyridylporphyrine

Les chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques sont caractérisés par les valeurs du degré de substitution en pyridylporphyrine (DS_{Pypphine}) qui rappelons le définit le nombre moyen d'unités porphyriniques par unité anhydroglucose. La méthode utilisée pour déterminer le degré de substitution en porphyrine est la même que celle utilisée précédemment au cours des chapitres II et III. Nous rappelons que cette méthode est basée sur un dosage spectroscopique UV-visible utilisant le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre mesuré dans ce même solvant. Les valeurs sont obtenues en appliquant la formule suivante :

$$DS_{\text{Pypphine}} = \frac{A \times V \times (162,14 + 76,48 \times DS_{\text{chloroacétate}})}{\mathcal{E} \times m}$$

où A désigne l'absorbance de la bande de Soret, V le volume de solvant utilisé pour la dissolution de l'échantillon de plastique (en L), \mathcal{E} le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) et m la masse de l'échantillon analysé.

4-2-2-5-Le rendement molaire de la réaction d'alkylation

Le rendement molaire de la réaction d'alkylation est obtenu en faisant le rapport entre le nombre de mole de porphyrine greffée sur le polysaccharide par le nombre de mole de porphyrine mis à réagir.

$$R_{\text{alkylation}} = \frac{\text{nombre de mole de porphyrine fixée}}{\text{nombre de mole de porphyrine mise à réagir}}$$

En remplaçant le nombre de mole de porphyrine fixée par son expression on obtient la formule suivante :

$$R_{\text{alkylation}} = \frac{\frac{A \times V \times \text{Masse totale de plastique obtenue}}{\mathcal{E} \times m}}{\text{nombre de mole de porphyrine mise à réagir}}$$

Nous avons dans un premier temps déterminé les conditions de température, puis la durée de réaction optimale de la réaction d'alkylation pour dans un second temps, préparer tout une gamme de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques possédant des degrés de substitution en porphyrines variés. Dans un souci de normalisation, toutes les synthèses suivantes

ont été réalisées en partant de 500 mg de chloroacétate de cellulose prélevés dans un film plastique unique possédant un degré de substitution en chloroacétate égal à 3, obtenu à partir de 5 grammes de cellulose.

4-2-3-Influence de la température sur la réaction d'alkylation

L'influence de l'activation thermique sur la réaction d'alkylation a été évaluée en faisant réagir 14 méq. de pyridylporphyrine par unité anhydroglucose pour un temps de réaction fixé à 24 heures, la température variant de 25 à 80°C. Les résultats sont présentés sur le graphique suivant (figure IV-18).

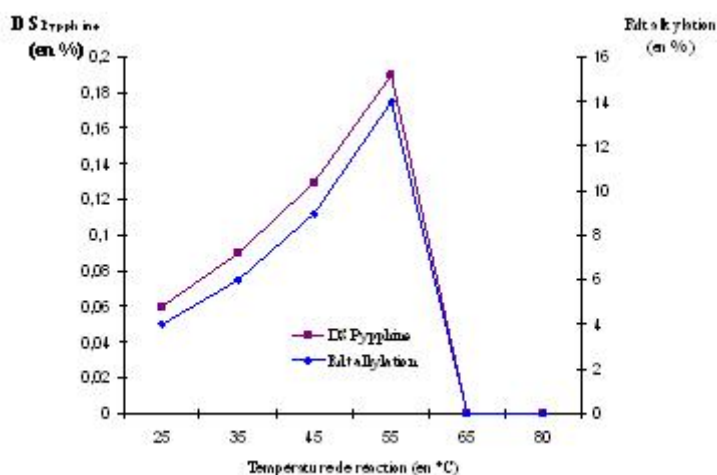


Figure IV-18 : Influence de la température de réaction sur le DS_{Pypphine}.

Les chloroacétates de cellulose pyridyliques sont obtenus avec des degrés de substitution en porphyrine variant de 0,06 à 0,19% pour des rendements molaires allant de 4 à 14 %. Ces faibles valeurs de DS_{Pypphine} et de rendement peuvent s'expliquer d'une part par l'encombrement stérique des macrocycles et d'autre part, par la faible quantité de porphyrines mises à réagir (14 méq./UAG). Les valeurs du degré de substitution augmentent avec la température pour atteindre la valeur maximale de 0,19% à 55°C. Pour des températures de réaction supérieures, on obtient bien des chloroacétates mais ceux-ci sont insolubles. Sans doute, ces polymères chlorés étant moins stables que les esters gras de cellulose, une désacétylation partielle a pu se produire pour des températures supérieures à 55°C.

En conclusion, les chloroacétates de cellulose pyridyliques de plus hauts DS_{Pypphine} ont été obtenus avec un rendement massique maximal à 55°C. Nous avons donc retenu cette température pour l'étude cinétique de la réaction d'alkylation.

4-2-4-Etude cinétique de la réaction d'alkylation

La cinétique de la réaction d'alkylation a été étudiée à 55°C en faisant réagir 14 méq. de pyridylporphyrine par unité anhydroglucose pour des temps de réaction compris entre 6 et 48 heures. Les résultats sont présentés sur la figure suivante (figure IV-19).

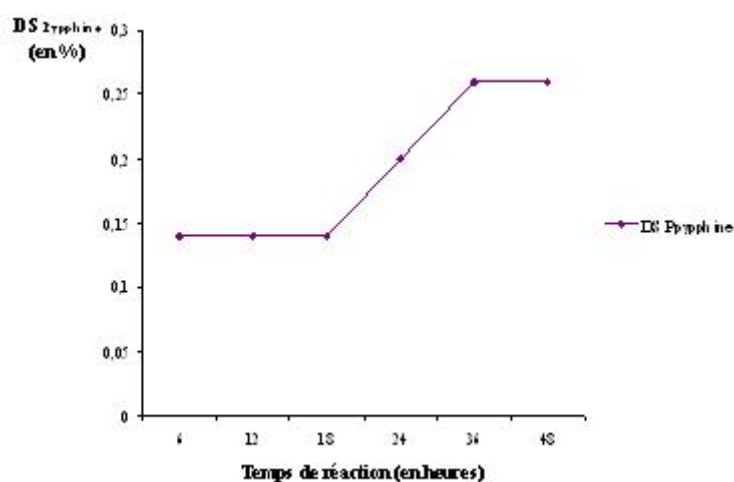


Figure IV-19 : Influence du temps de réaction sur le DS_{Pypphine}.

Ce graphique montre que le degré de substitution en pyridylporphyrine augmente pour des temps de réaction compris entre 18 et 36 heures, les valeurs de DS_{Pypphine} passant de 0,14% à la valeur maximale de 0,26 %. Pour des temps de réaction inférieurs à 18 heures et supérieurs à 36 heures, le degré de substitution en porphyrine ne varie pas. Des essais ont été réalisés avec des temps de réaction supérieurs à 48 heures, les plastiques obtenus sont insolubles. Sans doute ceux-ci subissent une désacétylation pour des temps de réaction supérieurs à 48 heures. Pour la suite de notre travail, nous avons donc retenu les conditions suivantes : 36 heures de réaction à 55°C pour l'alkylation de la pyridylporphyrine par les chloroacétates de cellulose.

4-2-5-Synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques possédant divers degrés de substitution en pyridylporphyrine

Nous avons finalisé notre travail par la synthèse de toute une gamme de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques possédant des degrés de substitution en porphyrine variés. Nous avons fixé la quantité de porphyrine mise à réagir entre 3 et 119 méq. par unité anhydroglucose. Les esters de cellulose porphyriniques ont été synthétisés à 55°C pour un temps de réaction fixé à 36 heures. Les résultats sont présentés sur la figure suivante (figure IV-20).

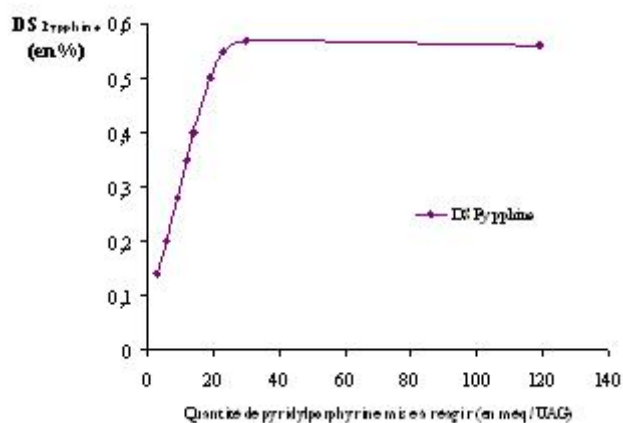


Figure IV-20 : Influence de la quantité de pyridylporphyrine mise à réagir sur le DS_{Pypphine}.

Les résultats montrent que les degrés de substitution en porphyrine varient de 0,14 à 0,57%. Ils augmentent pour des quantités de porphyrine mises à réagir comprises entre 3 et 30 méq./UAG, un pallier est alors atteint. Pour des quantités supérieures à 30 méq./UAG, la quantité de porphyrine greffée reste constante avec pour valeur 0,57% même lorsque 119 méq./UAG de porphyrine sont employés. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour les laurates de cellulose *meso*-carboxypropyloxyphénylporphyriniques synthétisés au chapitre II et inférieures à celles obtenues pour les laurates de cellulose *meso*-carboxydécanoxyphénylporphyriniques (chapitre II) et protoporphyriniques (chapitre III). Les valeurs de DS_{Pypphine} restent faibles du fait que les porphyrines sont introduites en large défaut par rapport au nombre de mole d'unité anhydroglucose. De plus, la pyridylporphyrine greffée ne portant pas de bras espaceur contrairement aux *meso*-arylporphyrines et à la protoporphyrine IX, le problème de gêne stérique est de ce fait plus important. Aussi, la faible réactivité du *meso*-substituant pyridyle explique ces valeurs modestes de degré de substitution en pyridylporphyrine dans le cas chloroacétates de cellulose alkylés.

Conclusion

Nous avons pour la première fois obtenus des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques. La synthèse des chloroacétates de cellulose a été réalisée par une acylation en phase homogène du polysaccharide par le chlorure d'acide chloroacétique. La grande réactivité de ce chlorure, du fait de la présence de l'halogène en α du carbonyle, a permis d'obtenir les chloroacétates de cellulose avec des degrés de substitution en chloroacétates et des rendements massiques maximums. La réaction réalisée à température ambiante n'a pas nécessité l'emploi de pyridine contrairement à la synthèse des laurates de cellulose porphyriniques (chapitres II et III). Les chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques ont été obtenus par alkylation de la monopyridylporphyrine par les esters chlorés de cellulose. Ces polymères ont été isolés avec des valeurs de degrés de substitution en pyridylporphyrine du même ordre de grandeur que celle des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques (chapitre II). La valeur maximale obtenue pour le degré de substitution en pyridylporphyrine est 0,57%. Elle reste cependant faible comparée à celle obtenue pour les laurates de cellulose protoporphyriniques. L'absence de bras espaceur sur le photosensibilisateur explique en partie ce résultat.

CHAPITRE V

Etude préliminaire d'activité biologique

Chapitre V

Etude préliminaire d'activité biologique

Les esters de cellulose précédemment synthétisés ont fait l'objet d'une étude préliminaire de leur activité photobactéricide. L'agent toxique induit par les photosensibilisateurs est l'oxygène singlet. Nous avons donc dans un premier temps évalué l'aptitude des polymères porphyriniques à induire sa formation. Puis, des essais *in vitro* nous ont permis de tester leur activité antimicrobienne sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Gram⁺) et *Escherichia coli* (Gram⁻).

1-Evaluation de la production d'oxygène singlet

Nous avons contrôlé la formation d'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol à partir d'acétate d'ergostérol en présence d'esters de cellulose en solution, sous bullage d'air comprimé et sous irradiation lumineuse^[99], par CCM (le protocole est détaillé dans la partie expérimentale). Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'hématoporphyrine (Hp) qui est un inducteur d'oxygène singlet connu. Ces tests ont mis en évidence qualitativement, pour tous les polymères étudiés, la formation d'oxygène singlet (figure V-1).

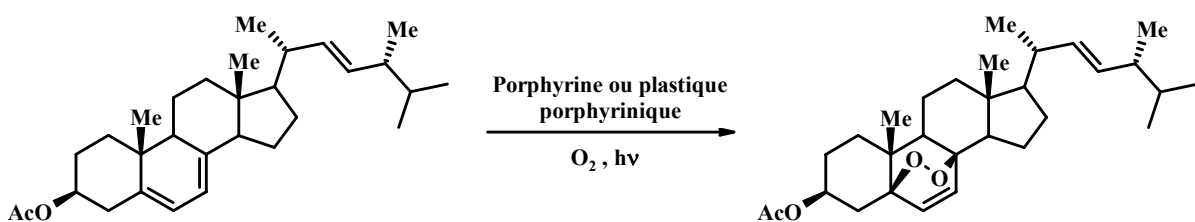


Figure V-1 : Formation d'endoperoxyde.

2-Evaluation de l'activité photobactéricide des esters de cellulose porphyriniques

Par la suite, nous avons évalué l'activité photobactéricide de ces mêmes composés sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Gram⁺) et *Escherichia coli* (Gram⁻). Nous avons développé une technique dérivant de celle des halos d'inhibition généralement utilisée en microbiologie. Ce test basé sur l'observation de la présence ou non de colonies sous les disques d'esters de cellulose déposés à la surface des boîtes de Pétri inoculées avec la souche bactérienne adéquate. Le protocole est décrit en détail dans la partie expérimentale. Les tableaux suivants présentent les résultats obtenus après 24 heures d'irradiation à 37°C ; en terme de réponse positive (présence de colonies sous les disques) ou négative (absence de colonies sous les disques).

Tableau V-1 : Photoabactéricidie des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques en fonction de leur teneur en porphyrine 3.

(-) aucune colonies n'est observé sous le disque, (+) présence de colonies sous le disque.

Degré de substitution en porphyrine 3	0,08	0,17	0,22	0,39	0,45	0,00
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+

Tableau V-2 : Photoabactéricidie des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques en fonction de leur teneur en porphyrine 5.

(-) aucune colonies n'est observé sous le disque, (+) présence de colonies sous le disque.

Degré de substitution en porphyrine 5	0,08	0,18	0,30	0,39	0,59	0,00
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+

Tableau V-3 : Photoabactéricidie des laurates de cellulose protoporphyriniques en fonction de leur teneur en protoporphyrine IX.

(-) aucune colonies n'est observé sous le disque, (+) présence de colonies sous le disque ; a : -/+, présence d'un faible nombre de colonies sous le disque (<5).

Degré de substitution en porphyrine PpIX	0,19	0,38	0,52	0,73	1,1	1,05	0,00
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-/+ ^a	-/+	-	-	-	-	+

Tableau V-4 : Photoabactéricidie des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques en fonction de leur teneur en pyridylporphyrine.

(-) aucune colonies n'est observé sous le disque, (+) présence de colonies sous le disque.

Degré de substitution en pyridylporphyrine	0,14	0,20	0,40	0,50	0,57	0,00
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+

Les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques ne présentent aucune activité photobactéricide, quelque soit leur teneur en porphyrine **3** ou **5**. Cette absence d'activité peut être attribuée aux faibles valeurs de leurs degrés de substitutions respectifs d'une part et à un rendement quantique en oxygène singulet insuffisant d'autre part. Il en est de même pour les chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques. La présence des fonctions ammoniums quaternaires sur ces derniers polymères porphyriniques n'a pas entraîné de toxicité, aucune inhibition n'ayant été observé à l'obscurité. Dans le cas des laurates de cellulose protoporphyriniques on observe un effet photobactéricide par contact. Cet effet est observable à partir d'un degré de substitution égal à 0,19% pour *S. aureus* et 0,52 % pour *E. coli*. Les photosensibilisateurs ne peuvent pénétrer dans les cellules microbiennes puisqu'ils sont liés de manière covalente au polymère. De ce fait, l'activité des esters de cellulose protoporphyriniques passe par le processus de type II impliquant l'oxygène singulet. Aucune activité n'a été observée à l'obscurité. Nous présentons sur la figure V-2 une photographie des boites de Pétri.

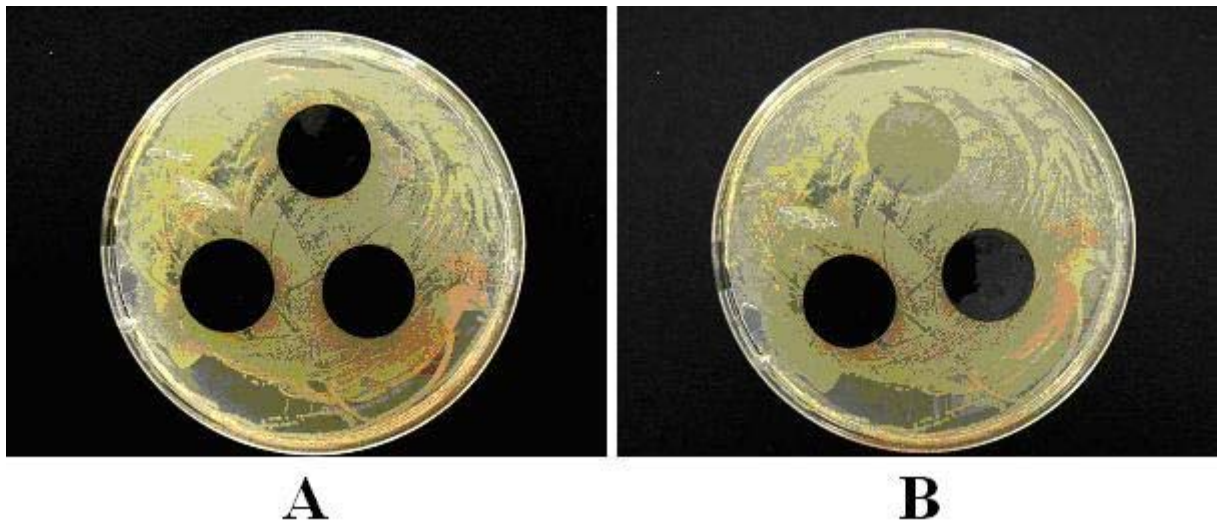


Figure V-2 : Résultats de la photoinactivation de *S. aureus* par les disques de laurates de cellulose protoporphyriniques. Les photographies montrent les boîtes de Petri après 24 heures d'illumination à 37°C. **A**: boîte de Petri contenant les disques ; **B**: boîte de Petri avec un disque retiré montrant l'absence de colonies sous le film.

La différence d'activité peut également s'expliquer par la phototransformation de la protoporphyrine IX. En effet, il est connu que lorsque l'on illumine cette porphyrine avec une lumière visible, des produits dérivés sont formés^[91] Certains de ces composés sont eux-mêmes des photosensibilisateurs et sont appelés photoproduits de la protoporphyrine IX (PPpIX). Sur les spectres UV-visibles des laurates de cellulose protoporphyriniques soumis à une illumination par de la lumière blanche, on retrouve la bande de Soret vers 407 nm. Cependant on note une modification majeure au niveau des bandes Q. En effet, les bandes QIV, QIII et QII sont bien présentes sur tous les spectres UV-visibles aux longueurs d'ondes respectives suivantes 504, 538 et 577 nm, et ne sont pas modifiées. En revanche, on note une forte baisse allant jusqu'à la disparition totale de la bande QI normalement située vers 633 nm, corrélée avec l'apparition d'une bande plus intense vers 670 nm (figure V-3).

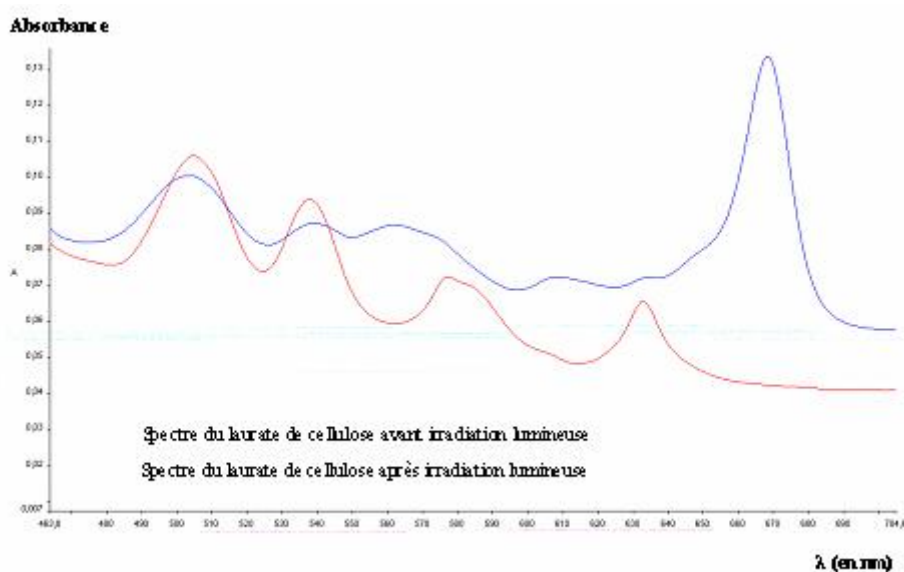


Figure V-3 : Comparaison des bandes Q des spectres UV-visibles des laurates de cellulose protoporphyriniques avant (spectre rouge) et après (spectre bleu) illumination.

Ce spectre atypique s'explique par la formation de la photoprotoporphyrine. Ce photosensibilisateur est une chlorine (figure V-4) présentant un maximum d'absorption vers 670 nm^[100] ; elle de ce fait plus efficace en présence de lumière blanche (lampe à incandescence).

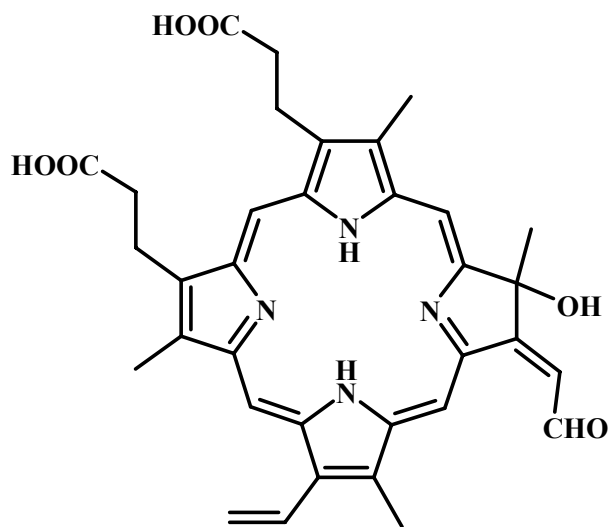


Figure V-4 : Structure de la photoprotoporphyrine.

Ce phénomène explique également la différence d'activité entre les laurates de cellulose protoporphyriniques et les autres esters de cellulose porphyriniques testés. Nous envisageons par la suite d'effectuer une étude quantitative de l'activité photobactéricide des laurates de cellulose protoporphyriniques.

Conclusion générale

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé pour la première fois une série d'esters de cellulose porphyriniques où le photosensibilisateur est lié de manière covalente au polysaccharide par l'intermédiaire de bras espaceurs. Les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques ont été obtenus par estérification en phase homogène de la cellulose dans le solvant DMA/LiCl en utilisant le système activant chlorure de tosyle/pyridine. L'influence de la longueur du bras espaceur porté par les macrocycles sur les degrés de substitution en porphyrine a été étudiée. La même stratégie a également été appliquée à la synthèse de laurates de cellulose protoporphyriniques. Ces polymères ont également été synthétisés par acylation de la cellulose sous activation micro-onde, ce qui nous a permis de ramener les temps de réaction de quelques heures à une minute. Dans ce cas, la présence de deux bras carboxyéthyles sur la protoporphyrine IX a permis de doubler les valeurs du degré de substitution en porphyrine par rapport à celles obtenues pour les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques. Aussi, la présence de deux bras sur la protoporphyrine IX entraîne l'insolubilité des esters de cellulose possédant des degrés de substitution en protoporphyrine IX supérieurs ou égales à 1,1% traduisant ainsi la probable réticulation du polymère. Enfin, des chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques originaux ont été obtenus par alkylation de chloroacétates par la *p*-pyridyl-tri-*p*-tolylporphyrine. Ces polymères ont été obtenus avec des degrés de substitution en porphyrine du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors de la synthèse des laurates de cellulose *meso*-arylporphyrinique. L'absence de bras espaceur sur ce macrocycle et de ce fait, l'encombrement stérique qui en découle explique en partie ces résultats. Les spectres UV-visibles des polymères réalisés en solution ne présentent aucune modification particulière par rapport à ceux des porphyrines réalisés dans les mêmes solvants. Ceci traduit l'absence d'interaction entre les macrocycles greffés sur la cellulose.

Les premiers essais d'activité biologique de ces films plastiques réalisés sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* afin d'évaluer leur activité photobactéricide sont encourageants.

Nous nous proposons dans un premier temps de poursuivre ce travail par la fixation des photosensibilisateurs sur une cellulose ouverte par oxydation puis réduite. Le polymère ainsi obtenu comporte uniquement des fonctions alcools secondaires. Le greffage des macrocycles devrait s'en

trouver facilité. Dans un second temps, cette stratégie pourrait être appliquée à des polysaccharides hydrosolubles comme les hémicelluloses ou l'hydroxyéthylcellulose. Par ailleurs, d'autres photosensibilisateurs du type chlorine devront être utilisés. Des tests quantitatifs de photobactéricidie devront être réalisés.

CHAPITRE VI

Partie Expérimentale

Chapitre VI

Partie Expérimentale

1-Réactifs et solvants

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

Tableau VI-1 : Réactifs et solvants utilisés.

Produit	Pureté	Origine	Conservation/Purification
Acide chlorhydrique à 35%	35%	Labosi	-
Acide laurique	98 %	Acros	-
Acide propanoïque 99%	99%	Acros	-
Argon	-	Air liquide	-
BF ₃ -éthérate	-	Aldrich	conservé à 4°C
4-bromobutanoate d'éthyle	95%	Aldrich	-
11-bromoundécanoate de méthyle	95%	Aldrich	-
Carbonate de potassium	-	Aldrich	séché 24 heures à l'étuve à 100°C
Célite 545	-	Prolabo	-
Cellulose	Pure	Aldrich	Dessiccateur
Chloroforme	99,9 %	SDS	-
Chlorure d'acide laurique	98%	Acros	-
Chlorure de thionyle	99,5% +	Acros	-
Chlorure d'acide chloroacétique	98 %	Acros	-

Produit	Pureté	Origine	Conservation/Purification
Dichlorométhane	99,8 %	SDS	distillé sur P ₂ O ₅ et CaH ₂
Diméthylformamide	-	SDS	-
Diméthylsulfoxyde	-	Riedel-deHaën	-
DMAP	99%	Acros	-
Ethanol	-	Fisher	-
Ethanol absolu	-	Fisher	-
Ether de pétrole	-	SDS	-
Gel de silice 60 PF ₂₅₄	-	Merck	-
4-hydroxybenzaldéhyde	99 %	Acros	-
Hydroxyde de sodium	-	Acros	-
Hydroxyde de potassium	-	Acros	-
LiCl	99%	Prolabo	Dessiccateur
Méthanol	-	Fisher	-
Méthanol	99,99 %	Fisher	-
MgSO ₄	99% +	SDS	-
N,N-Diméthylacétamide	99%	Aldrich	-
<i>Para</i> -chloranile	-	Acros	-
<i>Para</i> -tolualdéhyde	97 %	Aldrich	Distillé sous vide sur CaH ₂
Protoporphyrine IX	95 %	Sigma	-
Pyridine	99,75 %	Aldrich	-
<i>Para</i> -pyridinecarboxaldéhyde	98%	Acros	Distillé sous vide sur CaH ₂
Pyrrole	-	Aldrich	Distillé sous vide sur CaH ₂
Silice 60ACC 20-40 µm	-	SDS	-
Tétrahydrofurane	99,9%	Acros	-

2-Chromatographie

2-1-Chromatographie sur couche mince

Des plaques de silice Kieselgel 60F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur (provenance : Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince. La révélation des plaques se fait :

Par observation directe dans le cas des composés colorés,

Par vaporisation d'une solution à 1% d'orcinol dans l'acide sulfurique à 20% suivie d'un chauffage à 100°C pour visualiser les glucides,

Par vaporisation d'une solution de fluorescéine dans le méthanol/eau (1/1) puis d'une solution aqueuse d'eau oxygénée à 30% dans l'acide acétique suivie d'un chauffage à 100°C pour visualiser les produits bromés,

Par observation sous une lampe UV pour les produits aromatiques.

2-2-Chromatographie sur colonne

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

3-Analyses

3-1-Température de fusion

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

3-2-Analyses élémentaires

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

3-3-Spectroscopie infrarouge

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 1310 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr ou par transmittance directe du faisceau à travers le film dans le cas des esters de cellulose porphyriniques. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} .

3-4-Spectroscopie UV-visible

Les spectres UV-visibles ont été réalisés sur un spectrophotomètre à double faisceau Perkin Elmer Lambda 25, piloté par le logiciel UV Winlab. 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 nanomètres et les coefficients d'absorption en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3-5-Spectroscopie RMN

Les spectres sont réalisés sur un appareil Bruker DPX-400 avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont quant à elles données en Hertz (Hz). Les abréviations retenues sont : s (singulet), s él. (singulet élargi), d (doublet), d él. (doublet élargi), dd (double doublet), t (triplet), t él. (triplet élargi), dt (double triplet), ddd (double double doublet), ddt (double double triplet), quad (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet), ap. (apparent) .

3-6-Spectrométrie de masse MALDI

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

3-7-Mise en forme des films plastiques (Casting)

L'ester de cellulose est dissous dans 50 mL de chloroforme ou de THF puis le solvant est évaporé à l'air libre, à pression et température ambiante, et le film récupéré sur les parois du récipient.

3-8-Calcul du degré de substitution en acide laurique par RMN du proton

Pour toutes les formules mathématiques établies ci-après, les abréviations suivantes ont été adoptées :

$DS_{\text{acide laurique}}$ = degré de substitution en acide laurique de l'échantillon,

I_{CH_3} = Intégration correspondant aux protons terminaux de la chaîne laurique,

I_g = Intégration correspondant aux protons des unités glucidiques des esters de cellulose.

Le degré de substitution en acide laurique ($DS_{\text{acide laurique}}$) est défini comme étant le nombre de chaînes greffées par unité glucidique:

$$DS_{\text{acide laurique}} = \frac{\text{nombre de chaînes}}{\text{nombre d'unités glucidiques}}$$

Le nombre de chaînes grasses est égal à l'intégration des hydrogènes correspondant aux protons terminaux de la chaîne laurique (CH_3 terminal) divisé par 3. On peut donc écrire l'équation suivante :

$$\text{nombre de chaîne} = \frac{I_{CH_3}}{3} \quad (1)$$

Le nombre d'unités glucidiques est égal à l'intégration des protons du sucre divisée par le nombre d'hydrogènes qui ne sont pas substitués par les chaînes grasses. Il y a 10 hydrogènes par unité glucidique, d'où l'équation suivante :

$$\text{nombre d'unités glucidiques} = \frac{I_g}{10 - DS_{\text{acide laurique}}} \quad (2)$$

Il vient donc:

$$DS_{\text{acide laurique}} = \frac{I_{CH_3} \times (10 - DS_{\text{acide laurique}})}{3 \times I_g} \quad (3)$$

En tirant $DS_{\text{acide laurique}}$ de l'équation 3, on déduit l'équation suivante :

$$DS_{\text{acide laurique}} = \frac{10 \times I_{CH_3}}{3 \times I_g + I_{CH_3}} \quad (4)$$

Les intégrations des protons sont toujours réalisées de la même façon pour un laurate de cellulose, à savoir : $I_{CH_3} = 3$

En reportant la valeur de I_{CH_3} dans l'équation (4), le $DS_{\text{acide laurique}}$ est donné par la formule suivante :

$$DS_{\text{acidelaurique}} = \frac{10}{I_g + 1} \quad (5)$$

3-9-Calcul du degré de substitution en acide chloroacétique par microanalyse

Pour toutes les formules mathématiques établies ci-après, les abréviations suivantes ont été adoptées :

$DS_{\text{chloroacétate}}$ = degré de substitution en acide chloroacétique de l'échantillon,

$M_{\text{U.A.G}}$ = masse molaire d'une unité anhydroglucose non estérifiée,

M_{RCOCl} = masse molaire du chlorure d'acide chloroacétique,

M_{HCl} = masse molaire d'une molécule d'acide chlorhydrique,

M_{C} = masse molaire du carbone,

m_{C} = masse de carbone d'une unité anhydroglucose estérifiée,

m_{T} = masse totale d'une unité anhydroglucose estérifiée.

Le degré de substitution en acide chloroacétique ($DS_{\text{chloroacétate}}$) est défini comme étant le nombre de chaînes greffées par unité glucidique:

$$DS_{\text{chloroacétate}} = \frac{\text{nombre de chaînes}}{\text{nombre d'unités glucidiques}} \quad (1)$$

Le $DS_{\text{chloroacétate}}$ est déterminé par microanalyse à partir du pourcentage de carbone de l'échantillon analysé. Le pourcentage de carbone (%C) d'une unité anhydroglucose estérifiée est défini par le rapport de la masse de carbone d'une unité anhydroglucose estérifiée (m_{C}) par sa masse totale (m_{T}), comme l'indique l'équation suivante :

$$\%C = \frac{m_{\text{C}}}{m_{\text{T}}} \quad (2)$$

La masse de carbone d'une unité anhydroglucose (m_C) peut être décomposée en deux parties : l'une en relative au squelette cellulosique dont la composition en carbone est invariable au cours de la réaction d'acylation ; l'autre partie impliquant la chaîne greffée est dépendante du $DS_{\text{chloroacétate}}$. On peut donc écrire :

$$\text{masse de carbone cellulosique d'une U.A.G} = 6 \times M_C$$

$$\text{masse de carbone greffée sur une UAG estérifiée} = M_C \times DS \times 2 = 2M_C DS$$

$$\text{Il vient donc : } m_C = 6M_C + 2M_C DS_{\text{chloroacétate}} \quad (3)$$

La masse totale moyenne d'une unité anhydroglucose estérifiée (m_T) peut être décomposée en deux termes : l'un correspond à unité anhydroglucose non modifiée ; l'autre qui est fonction du $DS_{\text{chloroacétate}}$ implique la chaîne greffée. Ces deux termes sont donnés par les expressions suivantes :

$$\text{masse d'une U.A.G non modifiée} = M_{UAG}$$

$$\text{masse de la chaîne greffée} = DS_{\text{chloroacétate}} \times (M_{RCOCl} - M_{HCl})$$

On en déduit la formule suivante donnant la masse totale d'une U.A.G estérifiée :

$$m_T = M_{UAG} + DS_{\text{chloroacétate}} \times (M_{RCOCl} - M_{HCl}) \quad (4)$$

En reportant les équations (3) et (4) précédentes dans la formule (2) il vient :

$$\% C = \frac{m_C}{m_T}$$

d'où :

$$\% C = \frac{6M_C + 2M_C \times DS_{\text{chloroacétate}}}{M_{UAG} + DS_{\text{chloroacétate}} \times (M_{RCOCl} - M_{HCl})} \quad (5)$$

De l'équation précédente on tire le $DS_{chloroacétate}$:

$$DS_{chloroacétate} = \frac{6M_C - \%C \times M_{UAG}}{\%C \times (M_{RCOCl} - M_{HCl}) - 2M_C}$$

Enfin, en remplaçant M_C , M_{UAG} et M_{RCOCl} par leur valeur on obtient la formule permettant de calculer le $DS_{chloroacétate}$:

$$DS_{chloroacétate} = \frac{72,066 - 162,1424 \times \%C}{76,4820 \times \%C - 24,0220} \quad (6)$$

3-10-Calcul du degré de substitution en porphyrine par spectroscopie UV-visible

Pour toutes les formules mathématiques établies ci-après, les abréviations suivantes ont été adoptées :

DS_{pphine} = degré de substitution en porphyrine de l'échantillon,

V = volume de solvant utilisé pour la dissolution de l'échantillon de plastique (en L),

$A_{\text{bande de Soret}}$ = absorbance de la bande de Soret,

ε = coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre (en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$),

$M_{U.A.G}$ = masse molaire d'une unité anhydroglucose non estérifiée,

M_{RCOOH} = masse molaire de l'acide laurique,

M_{H_2O} = masse molaire d'une molécule d'eau,

m = masse de l'échantillon analysé.

Le degré de substitution en porphyrine (DS_{pphine}) est défini comme étant le nombre d'unités porphyriniques greffées par unité glucidique:

$$DS_{pphine} = \frac{\text{nombre de moles de porphyrines}}{\text{nombre de moles d'unités glucidiques}} \quad (1)$$

Dans un premier temps, compte tenu des faibles valeurs de DS_{pphine} , la masse des porphyrines greffées peut être négligée dans le calcul de la masse moyenne d'une unité glucidique estérifiée. Le DS_{pphine} est déterminé par un dosage spectroscopique UV-visible en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la bande de Soret de la porphyrine libre (porphyrine non fixée). Le nombre de moles de porphyrine contenu dans un échantillon de laurate de cellulose porphyrinique de masse m est donné après dosage UV-visible par la formule suivante :

$$\text{Nombre de mole de porphyrine dans échantillon} = \frac{A_{\text{bande de Soret}}}{\epsilon_{\text{bande de Soret porphyrine libre}}} \times V \quad (2)$$

Le nombre de mole d'unités glucidiques est obtenu à partir de l'équation suivante (3) :

$$\text{Nombre de mole d'unités glucidiques} = \frac{m}{M_{U.A.G} + DS_{\text{acide laurique}} \times (M_{RCOOH} - M_{H_2O})} \quad (3)$$

Il vient donc :

$$DS_{pphine} = \frac{A \times V \times (M_{U.A.G} + DS_{\text{acide laurique}} \times (M_{RCOOH} - M_{H_2O}))}{\epsilon \times m} \quad (4)$$

En remplaçant $M_{U.A.G}$, M_{RCOOH} , M_{H_2O} par leur valeur, le DS_{pphine} est alors obtenu par la formule suivante (5) :

$$DS_{pphine} = \frac{A \times V \times (162,14 + DS_{\text{acidelaurique}} \times 182,32)}{\epsilon \times m} \quad (5)$$

4-Appareillage

4-1-Activation micro-onde

Un réacteur monomode Synthewave 402[®] (Prolabo) d'une puissance maximale de 300 W a été utilisé. L'appareil est piloté par ordinateur et l'asservissement peut-être fait en température ou en puissance. La température est lue avec une sonde infrarouge placée sous l'échantillon.

4-2-Appareillage pour la production d'oxygène singulet

Le système est constitué d'un bain thermostaté à 20°C dans lequel est inséré un tube à hémolyse contenant l'échantillon étudié à une concentration d'environ 10^{-5} M. L'ensemble est maintenu sous bullage d'air comprimé et sous un éclairage fourni par 2 lampes de 100W (figure VI-1).

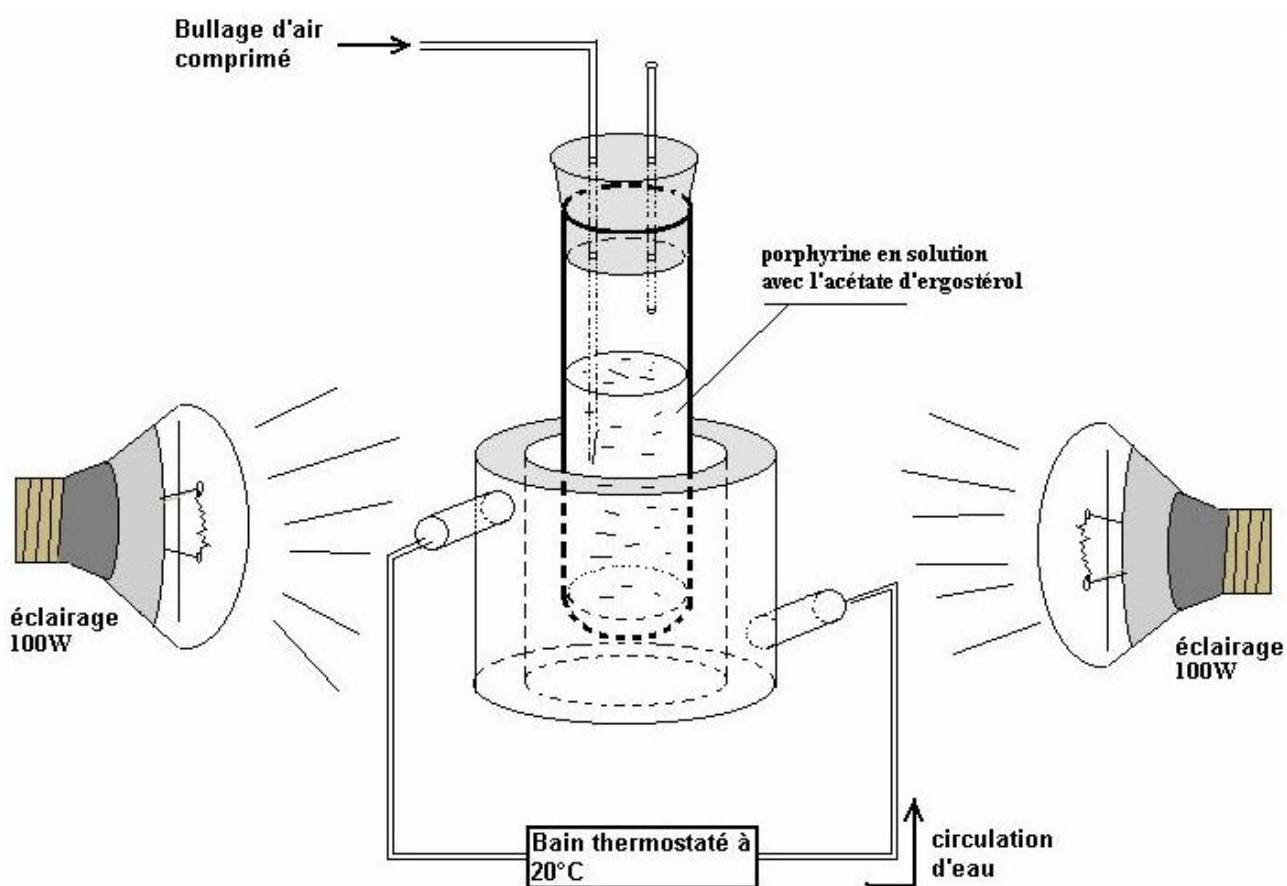


Figure VI-1 : Schéma du montage mis au point pour la production d'oxygène singulet.

Les résultats des tests de production d'oxygène singlet réalisés sur nos porphyrines et nos matériaux plastiques porphyriniques sont qualitativement comparés par CCM 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'acétate d'ergostérol. L'analyse des produits formés met en évidence, après quinze minutes d'irradiation, la présence de l'endoperoxyde et donc la formation d'oxygène singlet pour toutes les porphyrines et matériaux testés (figure VI-2).

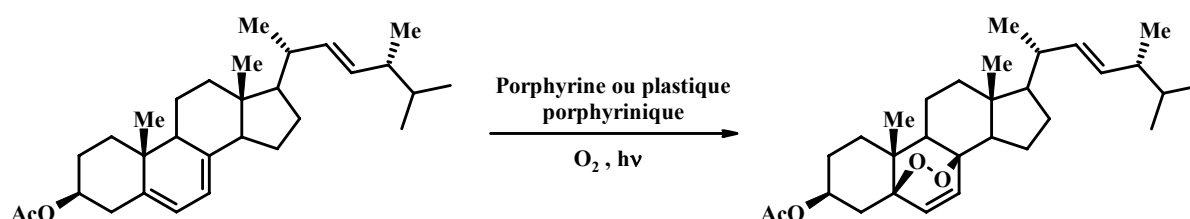
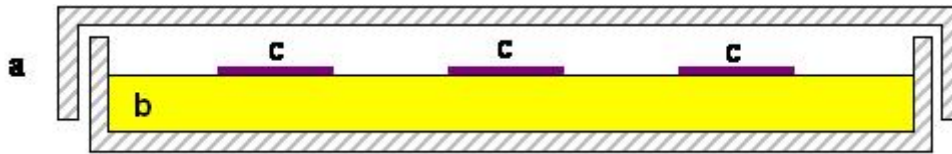


Figure VI-2 : Formation d'endoperoxyde.

5-Protocole mis en œuvre pour l'étude de la phototoxicité des esters de celluloses porphyriniques

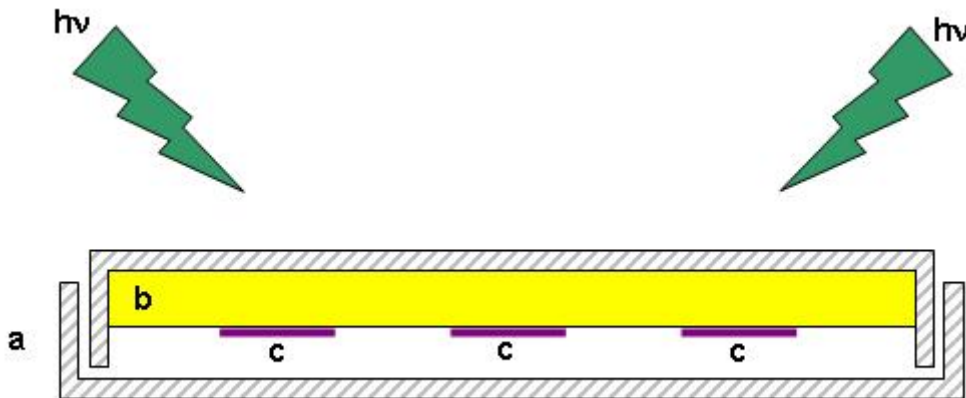
La méthode utilisée pour évaluer l'activité photobactéricide des esters de cellulose porphyriniques est celle des « halos d'inhibition ». Les deux souches de bactéries testées sont *Escherichia coli* (CIP 368 548 class 2) et *Staphylococcus aureus* (CIP 35 053 156 class 2). Les deux souches sont cultivées durant 24 heures à 37°C dans des tubes contenant 10 mL d'eau peptonée. Les boîtes de Pétri contenant un milieu de culture de type Mueller-Hinton (agar) sont inoculées par 0,2 mL de la solution précédente contenant les cellules bactériennes en phase de croissance exponentielle, diluée au 1/10^{ème}. Des disques d'esters de cellulose porphyriniques de 2 cm de diamètre sont découpés dans les films plastiques porphyriniques obtenus après casting et déposés sur le milieu de culture inoculé avec la souche adéquate (figure VI-3).



a : boîte de Pétri ; b : milieu de culture inoculé avec la souche bactérienne adéquate ; c : disques de laurates de cellulose porphyriniques.

Figure VI-3 : Boîte de Pétri inoculée avec les films de laurates de cellulose.

Un disque d'ester de cellulose simple (sans porphyrine) de même degré de substitution en acide laurique ou en chloroacétate a été utilisé comme référence. Les boîtes de Pétri sont retournées, placées à 37°C et illuminées par 4 ampoules de 150W totalisant un flux de 1,7 mW/cm² pendant 24 heures (figure VI-4).



a- boîte de Pétri retournée ; b- milieu de culture inoculé avec la souche bactérienne correspondante ; c- disques de laurates de cellulose.

Figure VI-4 : Photoinactivation des bactéries.

Chaque expérience a été répétée 3 fois. Des boîtes de Pétri identiques sont placées à l'obscurité et servent de témoin. La présence de colonies sous les disques a été examinée visuellement. Les résultats sont donnés en termes de réponse positive (pas de colonie sous les disques) ou négative (présence de colonies sous les disques). Après avoir retiré les disques, les boîtes sont cultivées durant 24 heures supplémentaires à 37°C, à l'obscurité pour vérifier si des colonies se développent dans la zone d'inhibition, ce qui permet de déterminer si l'activité des esters de cellulose porphyriniques est photobactériostatique ou photobactéricide.

6-Synthèses

6-1-Dissolution de la cellulose

6-1-1-Méthode des échanges de solvant

20 g de cellulose sont prétraités par échange de solvants. Ils sont immergés tout d'abord dans 100 mL de méthanol pendant 30 minutes sous agitation, puis après filtration, dans du DMA (100 mL) pendant 30 minutes et filtrés à nouveau. Parallèlement, 80 g de chlorure de lithium sont dissous dans 1 L de DMA à 80°C (30 minutes). La cellulose prétraitée est alors ajoutée au mélange DMA/LiCl et dissoute à 80°C pendant une nuit.

6-1-2-Méthode sans échange de solvant

20 g de cellulose sont immergés dans un premier temps dans 1 L de DMA pendant 2 heures à 120°C, sous agitation. Par la suite, la suspension est refroidie à 100°C puis 80 g de chlorure de lithium sont ajoutés. La cellulose est alors dissoute dans le mélange DMA/LiCl après une nuit d'agitation à température ambiante.

Procédure générale de synthèse de la *meso*-monohydroxyphénylporphyrine

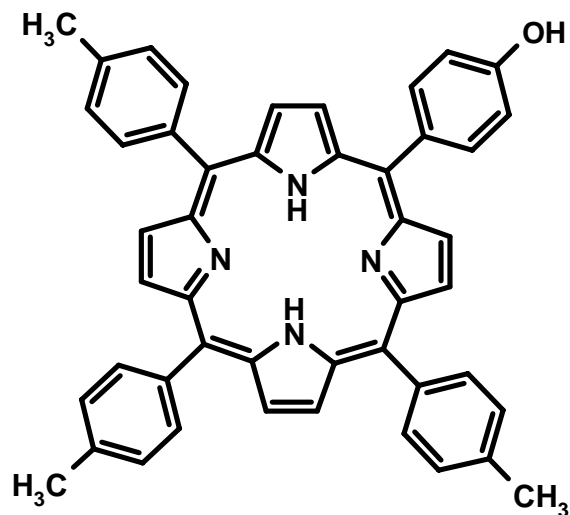
Méthode A :

Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on dissout, selon les conditions stœchiométriques retenues, dans de l'acide propanoïque, le 4-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.) et le *para*-tolualdéhyde (3 éq.). Le mélange est alors porté à 140°C puis maintenu sous agitation à cette température pendant 45 minutes. Le pyrrole (4 éq.) fraîchement distillé est ensuite introduit goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant 90 minutes à l'abri de la lumière. Les tritolylporphyrines cristallisent dans le milieu réactionnel après 18 heures à 4°C. Après filtration et lavage à l'éthanol, les porphyrines sont purifiées par chromatographie sur colonne de silice.

Méthode B :

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

5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (1)



Méthode A :

La réaction de 3,4 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (28 mmol, 1 équ.) avec 10,1 mL de *para*-tolualdéhyde (85 mmol, 3 équ.) et 8,0 mL de pyrrole (114 mmol, 4 équ.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éther de pétrole 8/2 à 10/0), le composé 1 avec un rendement de 8 % (1,88 g).

Méthode B :

En suivant la procédure générale et en utilisant le vingtième des quantités de réactifs employées dans la méthode A, on isole le composé 1 avec un rendement de 12% (113 mg).

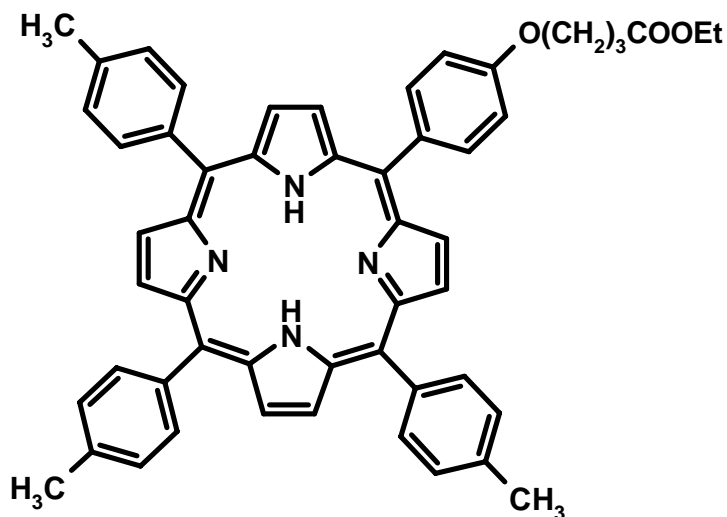
R_f : 0,33 (CH₂Cl₂).

UV-Visible (tableau II-1).

RMN ¹H (tableau II-3).

SM (MALDI) (tableau II-2).

5-[4-(3-éthoxycarbonylpropyloxy)phényl]-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (2)



Par réaction de 150 mg de *para*-hydroxyphényltritolyllporphyrine **1** (0,22 mmol, 1 équ.) et 318 μ L de 4-bromobutanoate d'éthyle (2,2 mmol, 10 équ.) dans 8 mL de DMF anhydre en présence de 616 mg de carbonate de potassium (4,4 mmol, 20 équ.), 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 (3x75 mL), séchée, 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 silice (éluant CHCl_3) et on isole 161 mg de composé **2** (92%).

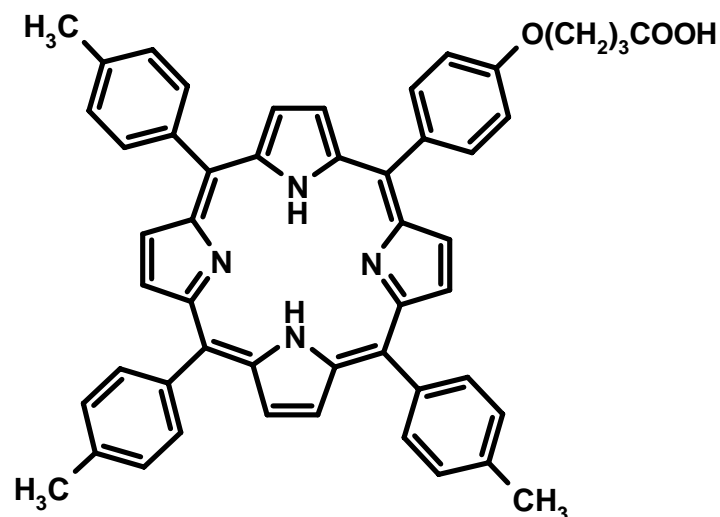
Rf : 0,56 (CHCl_3)

UV-Visible (tableau II-1)

RMN ^1H (tableau II-3)

SM (MALDI) (tableau II-2)

5-[4-(3-carboxypropyloxy)phényl]-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (3)



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, 150 mg de composé 2 sont dissous dans 8 mL de DMF puis 2 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Le mélange est agité pendant deux heures à reflux. Après refroidissement, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est neutralisée par addition d'une solution aqueuse de HCl à 1 mol.L⁻¹ et lavée avec de l'eau (2 x 50 mL). Après séchage sur MgSO₄, et purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 90/10), le composé 3 est isolé avec un rendement de 98% (141 mg).

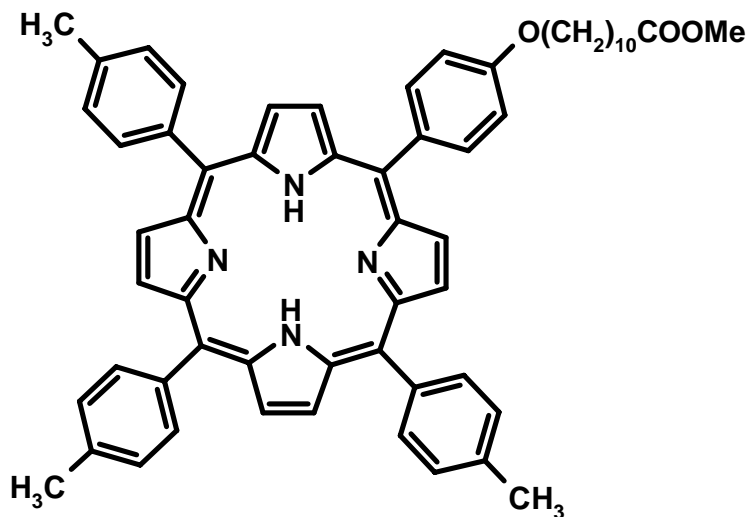
Rf : 0,53 (CHCl₃/EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-1)

RMN ¹H (tableau II-3)

SM (MALDI) (tableau II-2)

5-[4-(10-méthoxycarbonyldécanoxy)phényl]-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (4)



Par réaction de 150 mg de *para*-hydroxyphényltritolyllporphyrine 1 (0,22 mmol, 1 éq.) et 538 μ l de 11-bromoundécanoate de méthyle (2,2 mmol, 10 éq.) dans 8 mL de DMF anhydre en présence de 615 mg de carbonate de potassium (4,4 mmol, 20 éq.), 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 (3x75 mL), séchée, 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 silice (éluant CHCl_3) et on isole 175 mg de composé 4 (90%).

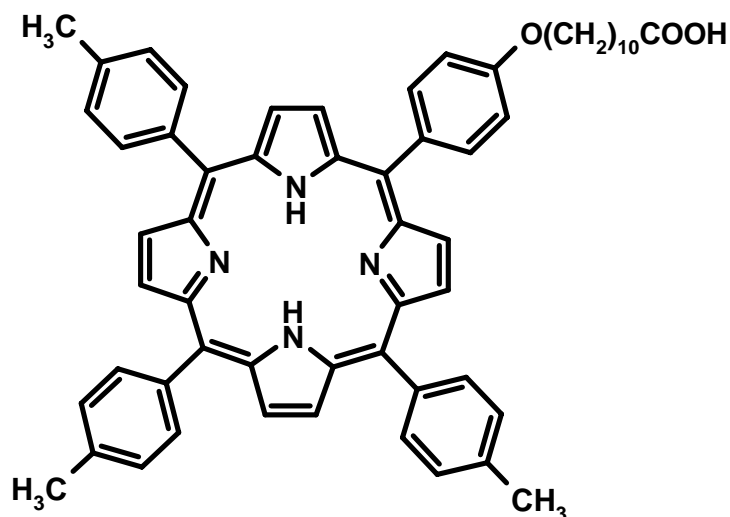
Rf : 0,57 (CHCl_3)

UV-Visible (tableau II-1)

RMN ^1H (tableau II-3)

SM (MALDI) (tableau II-2)

5-[4-(10-carboxydécanoxy)phényl]-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (5)



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant, 150 mg de composé 4 sont dissous dans 8 mL de DMF puis 2 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L⁻¹ sont ajoutés. Le mélange est agité pendant deux heures à relox. Après refroidissement, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est redissous dans 50 mL de dichlorométhane. La solution est neutralisée par addition d'une solution aqueuse de HCl à 1 mol.L⁻¹ et lavée avec de l'eau (2 x 50 mL). Après séchage sur MgSO₄, et purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éthanol de 100/0 à 90/10), le composé 5 est isolé avec un rendement de 98% (144 mg).

Rf : 0,53 (CHCl₃/EtOH 95/5)

UV-Visible (tableau II-1)

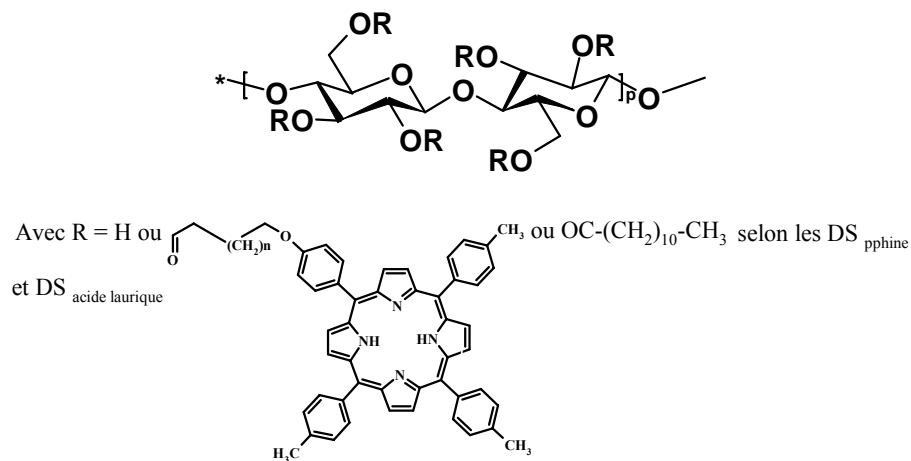
RMN ¹H (tableau II-3)

SM (MALDI) (tableau II-2)

Procédure générale de synthèse des laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques par estérification

Dans un bicol muni de bouchons à jupe, 17 mg de TsCl (86 μmol ; 14 méq/UAG) sont dissous dans 50 ml de solution de cellulose (1g ; 6,17 mmol) portée à 80°C. 7 μL de pyridine (86 μmol ; 14 méq./UAG) puis 86 μmol (14 méq./UAG) de porphyrine sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 heures à 80°C puis 4,705 g de TsCl (25 mmol ; 4 éq/UAG) sont ajoutés. Ensuite, 2 mL de pyridine (25 mmol ; 4 éq./UAG) puis 4,944 g d'acide laurique (25 mmol ; 4 éq./UAG) sont additionnés. Le mélange est à nouveau agité pendant 24 heures à 80°C. Après refroidissement, l'ester de cellulose est précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 50 ml de CHCl_3 puis précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 à 5 précipitation-redissolution sont nécessaires). L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les laurates de cellulose *més*-arylporphyriniques sont alors dissous dans 50 ml de CHCl_3 , filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

Laurate, 4-[(5-phényloxy)-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrinyl]-butyrate de cellulose



Avec $n = 1$ dans le cas des Laurates de cellulose
méso-carboxypropyloxyphénylporphyriniques

RMN ^1H (CDCl_3) : noyau porphyrinique : 8,84 (s) H- β -pyrroliques ; 8,10 (d) ($J = 8,4$ Hz) H-Ph-2,6 ; 8,10 ppm (d) ($J = 7,7$ Hz) H-Tol-2,6 ; 7,56 (d) ($J = 7,7$ Hz) H-Tol-3,5 ; 7,26 (d) ($J = 8,4$ Hz) H-Ph-3,5 ; 2,71 (s) CH_3 -méthyliques ; -2,77 (s él.) NH-internes.

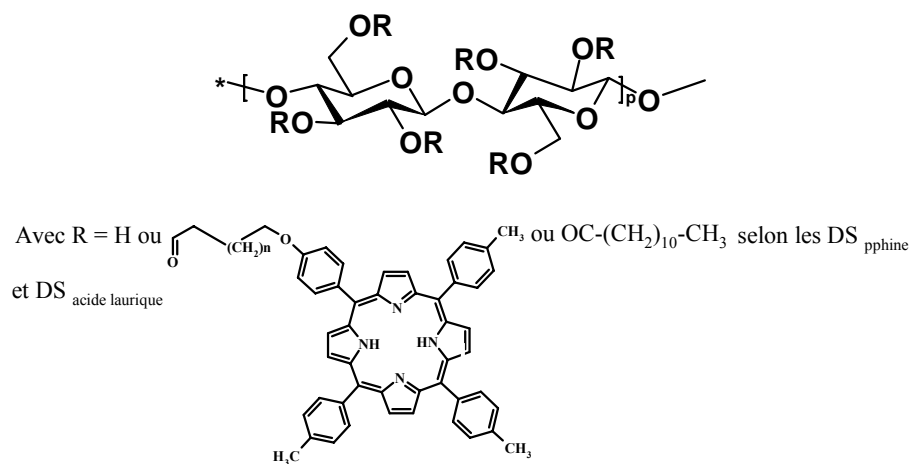
squelette cellulosique : 5,20 à 3,04 (m).

chaînes grasses: 2,21 (m) $(\text{CH}_2)_a$; 1,59 (m) $(\text{CH}_2)_b$; 1,26 (s él.) $(\text{CH}_2)_c$;
 0,88 t ($J = 6,9$ Hz) CH_3 -terminal.

IR : 3480 cm^{-1} (OH), 2900 et 2850 cm^{-1} (CH_2), 1745 cm^{-1} (C=O).

UV-visible (CHCl_3) : 420, 517, 553, 592, 648.

Laurate, 11-[(5-phényloxy)-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrinyl]-undécanoate de cellulose



Avec **n = 8** dans le cas des **Laurates de cellulose méso-carboxydécanoxyphénylporphyriniques**

RMN ¹H (CDCl₃) : noyau porphyrinique : 8,92 (s él.) H-β-pyrroliques ; 8,10 (d) (*J* = 8,10 Hz) H-Ph-2,6 ; 8,10 ppm (d) (*J* = 7,2 Hz) H-Tol-2,6 ; 7,56 (d) (*J* = 7,2 Hz) H-Tol-3,5 ; 7,55 (d) (*J* = 8,10 Hz) H-Ph-3,5 ; 2,70 (s) CH₃-méthyliques ; -2,77 (s él.) NH-internes.

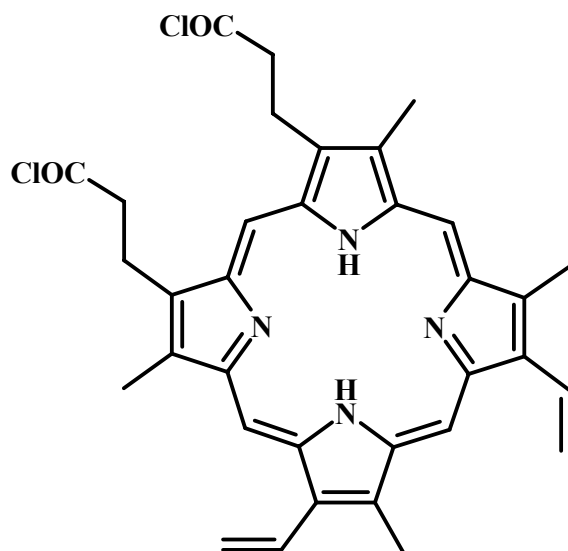
squelette cellulosique : 5,20 à 3,04 (m).

chaînes grasses: 2,21 (m) (CH₂)_a ; 1,59 (m) (CH₂)_b ; 1,26 (s él.) (CH₂)_c ; 0,88 t (*J* = 6,9 Hz) CH₃-terminal.

IR : 3480 cm⁻¹ (OH), 2900 et 2850 cm⁻¹ (CH₂), 1745 cm⁻¹ (C=O).

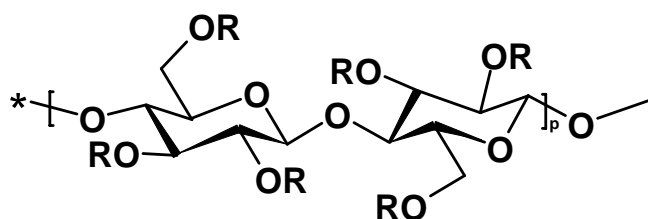
UV-visible (CHCl₃) λ_{max} (nm) : 419, 518, 554, 593, 648

13,17-[2-(di-chlorocarbonyl)éthyl]-2,7,12,18-tétraméthyl-3,8-divinylporphine (6)

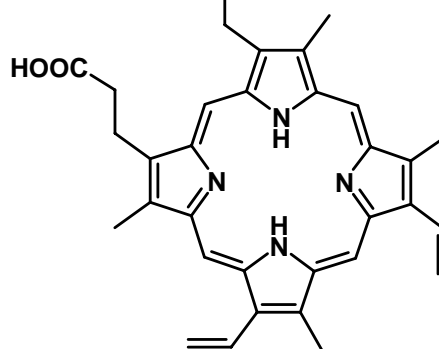


Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant muni d'une garde à CaCl_2 , 10 à 104 mg (18,5 à 185 μmol ; 3 à 30 méq./UAG) de protoporphyrine IX commerciale sont dissous dans 10 ml de chlorure de thionyle (SOCl_2). La solution est portée à 80°C , sous agitation pendant 3 heures. Après refroidissement, l'excès de chlorure de thionyle, l'acide chlorhydrique et le dioxyde de soufre formés sont éliminés par une évaporation sous pression réduite. On obtient ainsi 11 à 111 mg de chlorure d'acide de protoporphyrine IX soit un rendement quantitatif. Le chlorure d'acide de protoporphyrine IX est utilisé par la suite tel quel.

Laurate,13-[-3[(17-carboxyéthyl-2,7,12,18-tétraméthyl-3,8-divinylporphyril)]]-propanoate de cellulose.



Avec R = H ou OC-(CH₂)₁₀-CH₃ ou OC- selon les DS_{acide laurique} et DS_{PpIX}



Voie A : avec TsCl

Dans un bicol muni de bouchons à jupe, 34 mg de TsCl (172 μ mol ; 28 méq./UAG) sont dissous dans 50 ml de solution de cellulose (1g ; 6,17 mmol) portée à 80°C. 14 μ L de pyridine (172 μ mol ; 28 méq./UAG) puis 49 mg de protoporphyrine IX (86 μ mol ; 14 méq./UAG) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 heures à 80°C puis 4,705 g de TsCl (25 mmol ; 4 éq./UAG) sont ajoutés. Ensuite, 2 mL de pyridine (25 mmol ; 4 éq./UAG) puis 4,944 g d'acide laurique (25 mmol ; 4éq./UAG) sont additionnés. Le mélange est à nouveau agité pendant 24 heures à 80°C. Après refroidissement, l'ester de cellulose protoporphyrinique est précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 50 ml de CHCl₃ puis précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 à 5 précipitation-redissolution sont nécessaires). L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les laurates de cellulose protoporphyriniques sont alors dissous dans 50 ml de CHCl₃, filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

Voie B : par activation micro-onde sans DMAP

49 mg de chlorure d'acide de protoporphyrine IX (86 μmol ; 14 $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q./UAG}$) sont ajoutés à 1 g de cellulose en solution et on active 1 minute à 300 W avec le réacteur monomode Synthewave 402[®]. Après refroidissement, 13 mL de chlorure d'acide laurique (56 mmol ; 9 éq./UAG) sont ajoutés et on active à nouveau 1 minute. Après refroidissement, l'ester de cellulose protoporphyrinique est précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 50 ml de CHCl_3 puis précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 à 5 précipitation-redissolution sont nécessaires). L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les laurates de cellulose protoporphyriniques sont alors dissous dans 50 ml de CHCl_3 , filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

par activation micro-onde avec DMAP

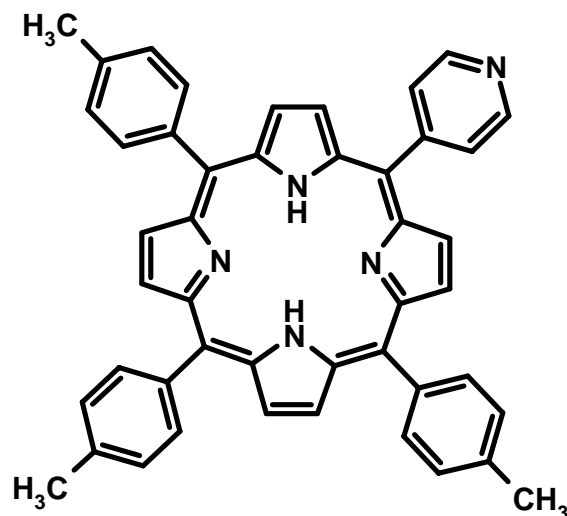
1,1 mg de DMAP (9,25 μmol , 1,5 $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q./UAG}$) sont dissous dans 50 mL de solution de cellulose (1 g, 6,17 mmol.). 49 mg (86 μmol , 14 $\text{m}\ddot{\text{e}}\text{q./UAG}$) de chlorure d'acide de protoporphyrine IX sont ajoutés à la solution de cellulose et on active 1 minute à 300 W avec le réacteur monomode Synthewave 402[®]. Après refroidissement, 377 mg de DMAP (3,08 mmol ; 0,5 éq./UAG) et 13 mL de chlorure d'acide laurique (56 mmol ; 9 éq./UAG) sont additionnés et on active à nouveau 1 minute à 300 W. Après refroidissement, l'ester de cellulose protoporphyrinique est précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 50 ml de CHCl_3 puis précipité dans 200 ml de MeOH puis filtré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 à 5 précipitation-redissolution sont nécessaires). L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les laurates de cellulose protoporphyriniques sont alors dissous dans 50 ml de CHCl_3 , filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

RMN ^1H (CDCl_3) : noyau porphyrinique : aucun signal n'a été observé sur les spectres ; squelette cellulosique : 2,75 à 5,50 (m) ; chaînes grasses: 2,21 (m) (CH_2)_a ; 1,59 (m) (CH_2)_b ; 1,26 (s él.) (CH_2)_c ; 0,88 t ($J = 6,9$ Hz) CH_3 -terminal.

IR : 3345 cm^{-1} (OH), 2955 et 2850 cm^{-1} (CH_2), 1740 cm^{-1} (C=O).

UV-visible (CHCl_3) λ_{max} (nm): 407, 504, 538, 577, 633.

5-(4-pyridyl)-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyrine (7)



Méthode A :

La réaction de 2,7 ml de 4-pyridinecarboxaldéhyde (28 mmol, 1 éq.) avec 10,1 mL de *para*-tolualdéhyde (85 mmol, 3 éq.) et 8,0 mL de pyrrole (114 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éther de pétrole 8/2 à 10/0), le composé 7 avec un rendement de 6 % (1,10 g).

Méthode B :

La réaction de 135µL de 4-pyridinecarboxaldéhyde (1,4 mmol, 1 éq.) avec 505µL de *para*-tolualdéhyde (4,25 mmol, 3 éq.) et 400µL de pyrrole (5,7 mmol, 4 éq.) fournit, après purification sur colonne de silice (éluant CHCl₃/éther de pétrole 8/2 à 10/0), le composé 7 avec un rendement de 10 % (92 mg).

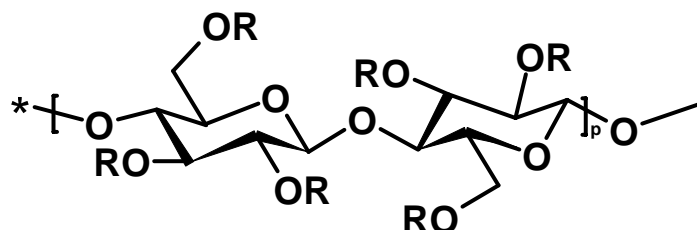
Rf : 0,62 (CHCl₃/EtOH 9/1).

UV-Visible (THF) : λ_{\max} (nm) (coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)), à 20°C - 417 (398,5) ; 513 (11,9) ; 548 (8,7) ; 591 (5,6) ; 647 (4,3).

RMN ¹H (CDCl₃) : 9,01 ppm (d) ($J = 5,8 \text{ Hz}$) H-Py-3,5 ; 8,90 ppm (d) (4,8 Hz) H- β pyrroliques-2,8 ; 8,87 ppm (s) H- β pyrroliques-12,13,17,18 ; 8,76 ppm (d) (4,8 Hz) H- β pyrroliques-3,7 ; 8,16 ppm (d) ($J = 5,8 \text{ Hz}$) H-Py-2,6 ; 8,08 ppm (d) ($J = 7,8 \text{ Hz}$) H-Ar-2,6 ; 7,55 ppm (d) ($J = 7,8 \text{ Hz}$) H-Ar-3,5 ; 2,70 ppm (s) CH₃-Tol. ; -2,79 ppm (s. él) NH-internes.

SM (MALDI) (tableau IV-2).

Chloroacétates de cellulose



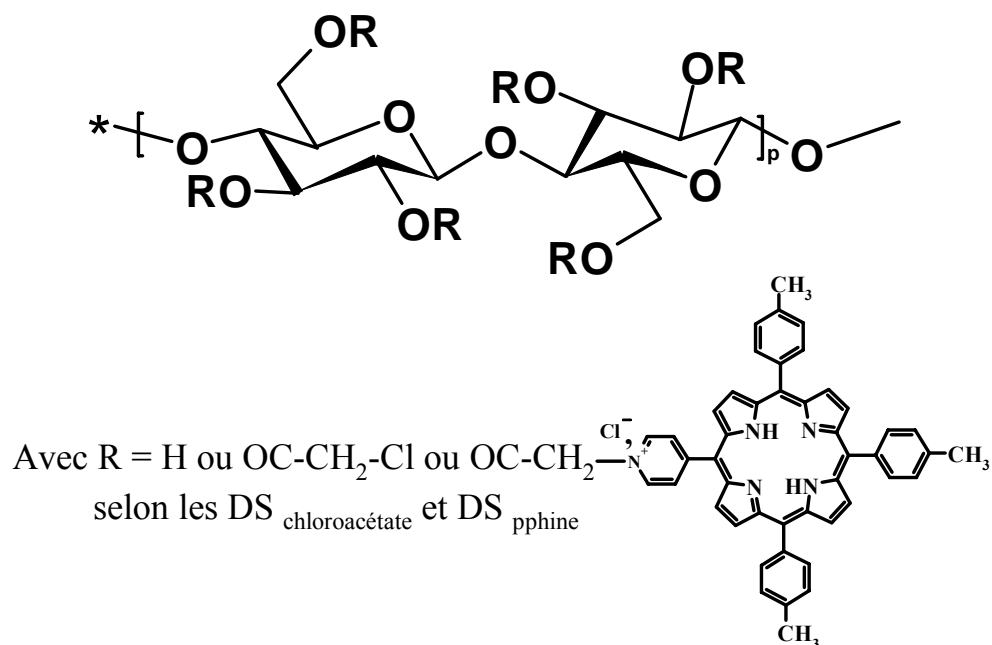
Avec $R = H$ ou $OC-CH_2-Cl$ selon
le $DS_{\text{chloroacétate}}$

Dans un bicol muni de bouchons à jupe, 490 μL à 3,93 mL de chlorure d'acide chloracétique (6,17 à 49,36 mmol ; 1 à 8 eq./UAG) sont ajoutés à 50 mL de solution de cellulose (1g ; 6,17 mmol) à T.A. L'ester de cellulose est précipité dans 1,5 L d'eau puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 50 ml de THF puis précipité dans 1,5 L d'eau puis filtré. Cette étape est répétée 2 fois. L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les chloroacétates de cellulose sont alors dissous dans 50 ml de THF, filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

RMN ^1H (DMSO- d_6) : squelette cellulosique : 2,60 à 5,30 (m) ; 4,27 (s) CH_2 -méthylène.

IR : 3504 cm^{-1} (OH), 2960 et 2888 cm^{-1} (CH_2), 1747 cm^{-1} (C=O), 792 (Cl).

**Chloroacétate, 2-[-(5-pyridiniumylchlorure)-10,15,20-tri-*p*-tolylporphyril]-
acétate de cellulose**



Dans un bicol muni de bouchons à jupe, sont mis à réagir 12 mg de mono-pyridyltritolylporphyrine et 500 mg de chloroacétate de cellulose (de DS_{chloroacétate} égal à 3) dans 8 mL de DMF_{anhydre}, à 45°C pendant 24 heures. Après refroidissement, le mélange réactionnel est précipité dans 100 ml de CHCl₃, puis filtré sur Büchner. Le solide obtenu est ensuite dissous dans 25 ml de THF puis précipité dans 100 ml de CHCl₃ et filtré. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore (3 à 5 précipitation-redissolution sont nécessaires). L'ester est alors séché à T.A puis au dessiccateur (une nuit). Les chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques sont alors dissous dans 50 ml de THF, filtré sur laine de verre puis transformé en films plastiques lors du casting.

RMN ¹H (DMSO-d₆) : noyau porphyrinique : 9,51 ppm (d) (*J* = 5,8 Hz) H-Py-2,6 ; 8,96 ppm (d) (4,8 Hz) H-βpyrroliques-2,8 ; 8,90 ppm (s) H-βpyrroliques-12,13,17,18 ; 8,90 ppm (d) (*J* = 5,8 Hz) H-Py-3,5 ; 8,82 ppm (d) (4,8 Hz) H-βpyrroliques-3,7 ; 8,08 ppm (d) (*J* = 7,8 Hz) H-Ar-2,6 ; 7,55 ppm (d) (*J* = 7,8 Hz) H-Ar-3,5 ; 2,70 ppm (s) CH₃-Tol. ; -2,79 ppm (s. él) NH-internes.

squelette cellulosique : 5,20 à 2,60 (m).

chaînes chloroacétates: 4,23 ppm, (s) CH₂-méthylène.

IR : 3504 cm⁻¹ (OH), 2960 et 2888 cm⁻¹ (CH₂), 1747 cm⁻¹ (C=O), 792 (Cl).

UV-visible (THF) λ_{max} (nm) : 417, 513, 548, 592, 648.

Références bibliographiques

- [1] - Sanders J.K.M., *The Porphyrins Handbook*, vol. III (Inorganic, organometallic and coordination chemistry), Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**
- [2] - Fischer H., Orth H., *Die Chemie des Pyrrols*, **1934-1940**, vol. I-III, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig
- [3] - Dixon H. B. F., Cornish-Bowden A., Liebecq C., Loening K. L., Moss G. P., Reedijk J., Velick S. F., Venetianer P., Vliegenthart J. F. G. et al., *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59(6), 779-832.
- [4] - Perutz M., *Pour la science*, **1979**, 16, 71-85
- [5] - Milgrom L. R., *The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Publisher: Oxford Univ Press, Oxford, UK, **1997**, 249 p.
- [6] - Gouterman M., *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138-163.
- [7] - Smith K.M., *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam, **1975**, 910 p.
- [8] - Craig J. M., *The Porphyrins Handbook*, Vol.5 (NMR and EPR), Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**

- [9] - Abraham R. J., *Mol. Phys.*, **1961**, 4, 145-152.
- [10] - Abraham R. J., Hawkes G. E., Hudson M. F., Smith K. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211.
- [11] - Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F., *Int. J. Mass. Spect. Ion. Proc.*, **1987**, 78, 53-68.
- [12] Schulz E., Karas M., Rosu F., Gabelica V., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17, 1005-1013.
- [13] - Rothemund P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**, 61, 2912-2915.
- [14] - Rothemund P., Menotti A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 267-270.
- [15] - Ball R. H., Dorough G. D., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 2278-2281.
- [16] - Adler A. D., Longo F. R., Finarelli J. D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32(2), 476.
- [17] - Little R. G., Anton J. A., Loach P. A., Ibers J., A., *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12(2), 343-349.
- [18] - Leznoff C. C., Svirskaya P. I., *Angew. Chem.*, **1978**, 90(12), 1001-1002.
- [19] - Gonsalves A. M. A. R., Pereira M. M., *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22(3), 931-

933.

- [20] - Lindsey J.S., *The Porphyrins Handbook*, vol. I (Synthesis and organic chemistry) , Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. (Eds.), **1999**.
- [21] - Lindsey J. S., Hsu H. C., Schreiman I. C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27(41), 4969-4970.
- [22] - Fisher H., Stren A. Akad Verlag Leipzig, **1940**, 2(2)
- [23] - a) - Woodward, R. B., *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662.
- b) - Woodward, R. B., *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404.
- c) - Arsenault G.P., Bullock E., MacDonald S.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.
- [24] - Littler B. J., Ciringh Y., Lindsey J. S., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64(8), 2864-2872.
- [25] - Shi D.F., Wheelhouse R. T., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43(51), 9341-9342.
- [26] - Raab O., *Z. Biol.*, **1900**, 39, 524-526.
- [27] - Tappeiner V.H., Jesionek A., *Muench. Med. Wochschr.*, **1903**, 50, 2042-2044.
- [28] - Hausmann W., *Biochem. Z.*, **1910**, 30, 276-316

- [29] - Meyer-Betz F., *Dtsch. Arch. Klin Med.*, **1913**, 112, 476-503.
- [30] - Policard A., Leulier A., *Compt. rend. soc. biol.*, **1924**, 91, 1422-1433.
- [31] - Figge F. H. J., Weiland G. S., Manganiello L. O. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
- [32] - Lipson R. L., Baldes E. J., Olsen, A. M., *J. Natl. Cancer. I.*, **1961**, 26, 1-12.
- [33] - a) - Dougherty T. J., *J. Natl. Cancer. I.*, **1974**, 52(4), 1333-1336.
- b) - Diamond I., Granelli S. G. McDonagh A. F., Nielsen S., Wilson C.B., Jaenicke R., *Lancet*, **1972**, 2(7788), 1175-1177.
- c) - Kelly J. F., Snell M. E., *J. urology*, **1976**, 115(2), 150-151.
- [34] - Dougherty T.J, Kaufman J., *Cancer Res.*, **1978**, 38(8), 2628-2655.
- [35] - Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J., *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.
- [36] - Dougherty T.J, in *Plenum Press New York*, **1983**, 3.
- [37] - Moan J., *J. Photochem. Photobiol., B*, **1990**, 6(3), 343-344.
- [38] - Bonnett R., *J. Heterocycl. Chem.*, **2002**, 39(3), 455-470.

- [39] - Mai M.S., Allison R.P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1983**, 221, 467-476.
- [40] - Dougherty T.J., Potter W.R., Weishaupt K.R., *Progress in Clinical and Biological Research*, **1984**, 170, 301-314.
- [41] - Lamarche François. Synthèse et évaluation biologique de Porphyrines-Polyamines en vue de leur application en photothérapie dynamique des cancers. Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, **2004**, 204 p.
- [42] - Perlin M., Mao J. C. H., Otis E. R., Shipkowitz N. L., Duff R. G., *Antiviral Res.* , **1987**, 7(1), 43-51.
- [43] - Dixon D. W., Kim M. S., Kumar V., Obara G., Marzilli L. G., Schinazi R. F., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1992**, 3(5), 279-282.
- [44] - Bressler N.M., *Arch. Ophthalmol. (Chicago)*, **2001**, 119(2), 198-207.
- [45] - Merchat M., Bertolini G., Jori G. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1996**, 32,153-157.
- [46] - Orenstein A., Malik M., Nitzan Y., *FEMS Immunology and Med. Microbiol.* **1998**, 19, 307-314
- [47] - Sol V., Branland P., Chaleix V., Granet R., Guilloton M., Lamarche F., Verneuil B., Krausz P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8(21), 3007-3010.
- [48] - Sol V., Branland P., Chaleix V., Granet R., Guilloton M., Lamarche F., Verneuil

B., Krausz P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4207–4211.

- [49] - Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B., *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55(1), 89-96.
- [50] - Nitzan Y., Ashkenazi H., *Curr. Microbiol.*, **2001**, 42, 408-414.
- [51] - Spesia M-B., Lazzeri D., Pascual L., Rosavera R., Durantini E., *Immun. and Med. Microbiol.*, **2005**, 44, 289-295.
- [52] - Taylor P.W., Luzio J.P., Stapleton P.D., *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 1086-1091.
- [53] - Wood B., Natress B., Kirkham J., Shore R., Brookes J., Robinson C.J., *Photobiol. B* **1999**, 50, 1-7.
- [54] - Reddi E., Ceccon M., Valduga G., Jori G., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, 462-470.
- [55] - Gozhansky S., Malik Z., Nitzan Y., *Microbiol. Lett.*, **1982**, 21, 103-112.
- [56] - Gozhansky S., Malik Z., Nitzan Y., *Curr. Microbiol.*, **1983**, 8, 279-284.
- [57] - a) - Salvato B., Bertoloni M., Jori G., *in Andreoni A. an Cubeddu (eds.)*.
- b) - Salvato B., Bertoloni M., Jori G., *Plenum New york*, **1983**, 177-183.

- [58] -Venezio F.R., Di Vincenzo C., Reichman O.H., *J. Infect. Dis.*, **1985**, 151, 166-169.
- [59] -Ehrenberg B., Malik Z., Nitzan M., *Photochem. Photobiol.*, **1985**, 41, 429-435.
- [60] -Gross E., Malik Z., Ehrenberg B., *J. Membr. Biol.*, **1987**, 97, 215-221.
- [61] -Malik Z., Hanania J., Nitzan Y., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1990**, 5, 281-293.
- [62] -Kanofsky J.R., Hoogland H., Weiss S.J., *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263, 9692-9696.
- [63] -Bezman S.A., Burtis T.P.J. Thayer M.A., *Photochem. Photobiol.*, **1978**, 28, 325.
- [64] -Midden W.R., Wang S.Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4129-4135.
- [65] -Kautsky H., *Trans. Faraday Soc.*, **1939**, 35, 216-219.
- [66] Dahl T.A., Midden W.R., Hartman P.E., *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, (3), 345-352.
- [67] Satgé C., Granet R., Verneuil B., Branland P., Krausz P., *C. R. Chimie*, **2004**, (7), 135–142.

- [68] Lapiere C., *Module d'approfondissement de biologie*, **1994**, Institut National Agronomique Paris Grignon.
- [69] O'Sullivan A.C, *Cellulose*, **1997**, 4, 173-207.
- [70] Ibrahim M, Glasser W.G., *Bioresource Technol.*, **1999**, 70, 181-192.
- [71] Girard A., *Ann. Chim. Phys.*, **1881**, 24, 333.
- [72] Morgenstern B., Berger W., *Acta Polymer.*, **1993**, 44, 100-102.
- [73] Vaca-Garcia C., Borredon M.E., *Bioresource Technol.*, **1999**, 70, 135-142.
- [74] Isogai A. , Atalla R.H., *Cellulose*, **1998**, 5, 309-319
- [75] Dawsey T.R, McCormick C.L., *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **1990**, C30, 405-440.
- [76] Heinze T., Liebert T.F., Pfeiffer K.S., Hussain M.A., *Cellulose*, **2003**, 10, 283-296.
- [77] Heinze T., Dicke R., Koschella A., Kull A.H., Klohr E.A., Koch W., *Macromol. Chem. Phys.*, **2000**, 201, 627-631.
- [78] Schützenberger P., *Compt. Rend.*, **1865**, 61, 485.
- [79] McCormick C.L., Chen T.S., *Symor RB, Stahl GA (ed.)*.

- [80] Tosh B., Saikia C.N., *Trends in Carbohydr. Chem.*, **1999**, 16-17, 143-153.
- [81] Vaca-Garcia C., Thiebaud S., Borredon M.E., Gozzelino G., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1998**, 75, 315-319.
- [82] Samaranayake G., Glasser W.G., *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 22,1-7.
- [83] Samaranayake G., Glasser W.G., *Carbohydr. Polym.*, **1993**, 22,79-86.
- [84] Shimizu Y., Hayashi J., *Sen-i Gakkaishi*, **1988**, 44, 451-456.
- [85] Sealey J.E., Samaranayake G., Todd J.D., Glasser W.G., *J. Polym. Sci., Part B : Polym. Phys.*, **1996**, 34, 1613-1620.
- [86] Bonnet R., Buckley D.G., *Biologic effect of light*. New York : Walter de gruyter et co., **1993**
- [87] Chaleix Vincent. Synthèse et caractérisation de nouvelles porphyrines glucosylées peptidiques à motif RGD en vue de leur application en photothérapie dynamique. Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, **2003**, 240 p.
- [88] Heinze T., Liebert T., *Prog. Polym Sci.*,26, **2001**, 9, 1689-1762.
- [89] Satgé C., Granet R., Verneuil B., Branland P., Krausz P.,Rozier J., Petit C., *Carbohydr. Polym.*, **2002**, 49,373-376

- [90] Joly Nicolas. Synthèse et caractérisation de nouveaux films plastiques obtenus par acylation et réticulation de la cellulose. Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, **2003**, 200 p.
- [91] LiWei M., Bagdonas S., Moan J., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **2001**, 60,108-113.
- [92] L Perreux ; A Loupy, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199-9223.
- [93] Satgé Céline. Etude de nouvelles strategies de valorisation de mono et polysaccharides Thèse de doctorat d'université. Limoges : Université de Limoges, **2002**, 2110 p.
- [94] Sun, R.C., Fang, J.M., Tomkinson, J., Hill, C.A.S. - *J. Wood Chem. Technol.*, **1999**, 19, 287-306.
- [95] -Merchat M., Spikes J.D., Bertolini G., Jori G., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1996**, 35,149-157.
- [96] -Juarranz A., Villanueva V., DIAZ V., Canete M., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1994**, 27,47-53.
- [97] -Daniel A., Durantini N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, xx(xx), xxxx-xxxx (in press).
- [98] -Kaldapa C., Blais J.C., Carré V., Granet R., Sol V., Krausz P., *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 41(2000), 331-335.

[99] -Ohloff G., *Pure Appl. Chem.*, 43(3-4), **1975**, 481-502.

[100] Gudgin Dickson E.F., Pottier R.H., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1995**, 29, 91-93.

Résumé

Vers de nouveaux films photobactéricides élaborés à partir de cellulose et de porphyrines

Des travaux menés dans notre laboratoire ont montré que l'on peut obtenir des matériaux plastiques en estérifiant la cellulose par des acides gras. Nous avons utilisé cette propriété dans le cadre de la photothérapie antimicrobienne, pour élaborer de nouveaux films plastiques photobactéricides à partir de cellulose, de porphyrines et d'acides gras. Dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation de tritolylporphyrines *para*-substituées par un bras espaceur comprenant quatre ou onze atomes de carbones portant une fonction acide est présentée. Les laurates de cellulose *meso*-arylporphyriniques sont alors obtenus en estérifiant successivement le polysaccharide par une porphyrine puis par l'acide laurique, en présence du système activant TsCl/pyridine. Dans un second temps, des laurates de cellulose protoporphyriniques ont été préparés en utilisant la même méthodologie. Ces polymères ont également été obtenus par acylation de la cellulose sous activation micro-onde. La présence de deux bras carboxyéthyles sur la protoporphyrine IX a permis d'améliorer la fixation de ce macrocycle sur la chaîne cellulosique. Enfin, nous présentons également la synthèse de chloroacétates de cellulose pyridylporphyriniques cationiques, obtenus par alkylation de chloroacétates de cellulose par la pyridyltritolylporphyrine. Tous ces composés ont été caractérisés par diverses méthodes spectrales (UV-Visible, RMN ^1H , SM MALDI). Une étude préliminaire d'activité biologique a également été réalisée sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Gram⁺) et *Escherichia coli* (Gram⁻) afin d'évaluer leur activité photobactéricide.

Mots clés : Cellulose, Estérification, Film plastique, Photobactéricide, Polymère, Porphyrine.